

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 168**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09760057 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2376519**

54 Título: **Moduladores de TGR5 y método de uso de los mismos**

30 Prioridad:

19.11.2008 EP 08169462

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2014

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
18 Desbrosses Street
New York, NY 10013, US**

72 Inventor/es:

PELLICCIARI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 458 168 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moduladores de TGR5 y método de uso de los mismos.

5 **Solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud europea n.º 08169462.2, presentada el 19 de noviembre de 2008.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un compuesto que modula TGR5 y a composiciones útiles en métodos para el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades.

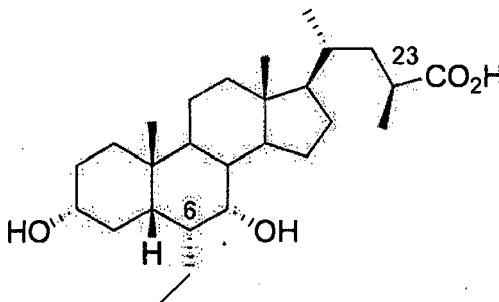
15 **Antecedentes de la invención**

El receptor TGR5 es un receptor acoplado a proteína G que se ha identificado como un receptor de superficie celular que es sensible a ácidos biliares (BA). Se ha encontrado que la estructura primaria de TGR5 y su receptividad a ácidos biliares se conservan altamente en TGR5 entre ser humano, bovino, conejo, rata y ratón, y por tanto sugiere que TGR5 tiene importantes funciones fisiológicas. Se ha encontrado que TGR5 se distribuye ampliamente en no sólo tejidos linfoides sino también en otros tejidos. Se han detectado altos niveles de ARNm de TGR5 en placenta, bazo y monocitos/macrófagos. Se ha mostrado que los ácidos biliares inducen internalización de la proteína de fusión de TGR5 desde la membrana celular hasta el citoplasma. Kawamata *et al.* 2003, J. Bio. Chem., 278, 9435. Se ha encontrado que TGR5 es idéntico a hGPCR19 notificado por Takeda *et al.* 2002, FEBS Lett. 520, 97-101.

TGR5 está asociado con la acumulación intracelular de AMPc, que se expresa ampliamente en diversos tipos celulares. Mientras que la activación de este receptor de membrana en macrófagos disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias (Kawamata, Y., *et al.* J. Biol. Chem. 2003, 278, 9435-9440), la estimulación de TGR5 por BA en adipocitos y miocitos potencia el gasto de energía (Watanabe, M. *et al.* Nature. 2006, 439, 484-489). Este último efecto implica la inducción dependiente de AMPc de yodotironina desyodasa tipo 2 (D2) que, convirtiendo localmente T4 en T3, da lugar a un aumento de la actividad de hormonas tiroideas. De acuerdo con el papel de TGR5 en el control del metabolismo energético, ratones deficientes en TGR5 hembra muestran una acumulación de grasa significativa con aumento del peso corporal cuando se los exponen a una dieta alta en grasa, lo que indica que la falta de TGR5 disminuye el gasto de energía y provoca obesidad (Maruyama, T., *et al.* J. Endocrinol. 2006, 191, 197-205). Además, y en línea con la implicación de TGR5 en la homeostasis de la energía, también se ha notificado que la activación por ácidos biliares del receptor de membrana promueve la producción de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en líneas celulares enteroendocrinas de murino (Katsuma, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 329, 386-390). Basándose en todas las observaciones anteriores, TGR5 es una diana atractiva para el tratamiento de enfermedad por ejemplo, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

Además del uso de agonistas de TGR5 para el tratamiento y la prevención de enfermedades metabólicas, los compuestos que modulan moduladores de TGR5 también son útiles para el tratamiento de otras enfermedades, por ejemplo, enfermedades del sistema nervioso central así como enfermedades inflamatorias (documentos WO 01/77325 y WO 02/84286). Los moduladores de TGR5 también proporcionan métodos de regulación de la homeostasis de colesterol y ácidos biliares, absorción de ácidos grasos y digestión de hidratos de carbonos y proteínas.

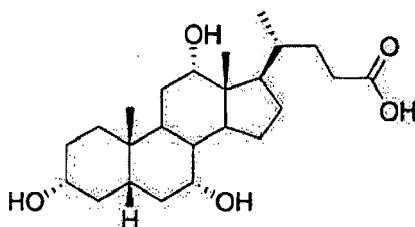
En la bibliografía se han descrito relativamente pocos ejemplos de agonistas de TGR5. Recientemente, se han notificado derivados sustituidos con 23-alquilo y disustituidos con 6,23-alquilo de ácido quenodesoxicólico (CDCA), tal como el compuesto ácido 6 α -etil-23(S)-metilquenodesoxicólico mostrado a continuación, como agonistas potentes y selectivos de TGR5 (Pellicciari, R.; *et al.* J. Med. Chem. 2007, 50, 4265-4268).



En particular, la metilación (configuración S) en la posición C₂₃ de ácidos biliares (BA) naturales confiere una selectividad marcada por la activación de TGR5 con respecto a FXR (receptor farnesoide X), mientras que la sustitución con 6 α -alquilo aumenta la potencia en ambos receptores. Algunos ejemplos de otros agonistas de TGR5 incluyen éster bencílico del ácido 6-metil-2-oxo-4-tiofen-2-il-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxílico (documento WO004067008, Takeda Chemical Industries LTD, Japón, 2004) y ácido oleanoico (Sato, H. *et al.* Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2007, 362, 793-798; Ito, F. *et al.* documento WO2004067008, 2004). Más recientemente, la primera síntesis de ácido quenodesoxicólico enantiomérico (CDCA) y ácido litocólico (LCA) ha permitido acceso al estudio de la especificidad de la interacción de BA naturales con TGR5 (Katona, B. W. *et al.* J. Med. Chem. 2007, 50, 6048-6058).

Los agonistas de TGR5 recientemente desarrollados también han proporcionado por primera vez una diferenciación farmacológica de efectos genómicos frente a no genómicos de BA y también han permitido estudios de la relación estructura-actividad informativos, por ejemplo, se ha encontrado que la presencia de un bolsillo de unión auxiliar en TGR5 desempeña un papel fundamental en la determinación de la selectividad de ligando (véase, Pellicciari, *et al.* J. Med. Chem. 2007, 50, 4265-4268). En este contexto, la disponibilidad de moduladores de TGR5 más potentes y selectivos es necesaria para identificar adicionalmente características adicionales que afectan a la activación del receptor y caracterizan las acciones fisiológicas y farmacológicas de este receptor con el fin de entender mejor su relación con la prevención y el tratamiento de una enfermedad.

Para este fin, de particular interés eran las propiedades biológicas y fisicoquímicas del compuesto ácido cólico (AC), que tiene la estructura mostrada a continuación:

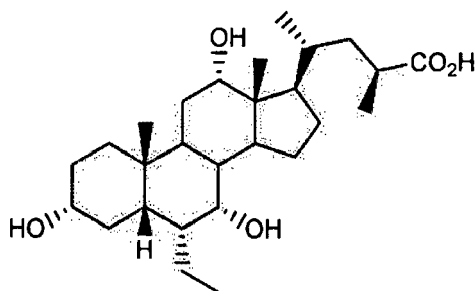


El ácido cólico es un ácido biliar primario en ser humano y muchas especies animales, también notificado como uno de los principales componentes junto con la bilirrubina de *Calculus Bovis*, una medicina china tradicional altamente valorada (Chen, X, Biochem. Pharmacol. 2002, 63, 533-541). El ácido cólico (CA) difiere del ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sus derivados descritos anteriormente por la presencia en C-12 de un grupo alfa-hidroxilo adicional orientado en el lado polar de la molécula. Esta diferencia estructural "menor" explica las características fisicoquímicas y biológicas notablemente diferentes de estos dos ácidos biliares. Con respecto a CDCA, CA protonado es aproximadamente 4 veces más soluble y relativamente menos detergente como resultado de su polaridad y equilibrio hidrófobo/hidrófilo. Además, CA carece de actividad hacia el receptor FXR ($CE_{50} > 100 \mu\text{M}$) mientras que muestra actividad agonista moderada sobre TGR5 ($CE_{50} = 13,6 \mu\text{M}$). Como consideración incluso más importante, se notificó anteriormente que la administración farmacológica de CA al 0,5% p/p en ratones obesos inducidos por la dieta previene y trata eficazmente el síndrome metabólico (Katsuma, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 329, 386). Aunque este estudio proporcionó resultados interesantes relacionados con las funciones endocrinas de ácidos biliares, la alta dosificación requerida (un 0,5% p/p) todavía limitaba la prueba de concepto referente a la relevancia terapéutica de TGR5 en el contexto de enfermedades metabólicas, puesto que la modulación de otras dianas y dianas desconocidas no podía descartarse a esa dosis. Un problema adicional era también el riesgo asociado con pruebas a alta dosis de CA en ensayos clínicos debido a la producción del metabolito secundario tóxico de BA DCA a través de 7 α -deshidroxilación por bacterias intestinales extensa y eficaz (Nagengast, F. M., Eur. J. Cancer, 1995, 31A, 1067).

Por tanto, hay una necesidad del desarrollo de moduladores de TGR5 para el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades. La presente invención ha identificado compuestos que modulan TGR5 así como su uso para tratar o prevenir una enfermedad.

Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a moduladores de TGR5 y a su uso para tratar y/o prevenir diversas enfermedades. La invención se refiere al compuesto según la fórmula 1h3e:



(1h3e) o una sal, hidrato, o conjugado de aminoácido glicina o taurina del mismo. La invención incluye una composición que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o conjugado de aminoácido taurina o glicina del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención incluye un compuesto para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto. La invención también incluye el uso de una composición o compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o conjugado de aminoácido taurina o glicina del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un sujeto. En un aspecto, la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal.

La descripción anterior expone bastante ampliamente las características más importantes de la presente invención con el fin de que pueda entenderse la descripción detallada de la misma que sigue, y con el fin de que puedan apreciarse mejor las presentes contribuciones a la técnica. Otros objetos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada conjuntamente con los ejemplos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra el impacto del compuesto 1h3e sobre el aumento de peso corporal en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores.

La figura 2 es una serie de nueve gráficos (A-I) que muestran los cambios en el perfil metabólico de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con compuesto 1h3e. Análisis de plasma en ratones obesos inducidos por la dieta tratados con compuesto 1h3e. A-D se refieren a enzimas hepáticas. F-I se refieren a lípidos plasmáticos.

La figura 3 es una serie de gráficos (A-B) que muestran los resultados del análisis de insulina plasmática y la prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios en los niveles de glucosa en ratones con dieta de pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 5 es una serie de gráficos (A-D) que muestran la liberación de insulina *in vivo* tras una comida de prueba en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 6 es una serie de gráficos (A-D) que muestran el consumo de oxígeno y la producción de CO₂ tal como se miden mediante calorimetría indirecta en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 7 son tres gráficos (A-C) que muestran el valor de la razón de intercambio respiratorio (RER) tal como se calculó tras la calorimetría indirecta en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 8 es una serie de gráficos (A-B) que muestran la actividad locomotora e ingesta de alimento y agua para ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 9 es una serie de gráficos (A-C) que muestran los cambios en el peso de órganos para ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores tratados con compuesto 1h3e.

La figura 10 es un gráfico que representa la tensión superficial representada gráficamente frente al logaritmo de la concentración de compuesto 1h3e (mM) en NaCl 0,15 M.

La figura 11 es un diagrama de flujo de bilis para un experimento de infusión duodenal realizado usando compuesto 1h3e.

La figura 12 es un diagrama de flujo de bilis para un experimento de infusión femoral realizado usando compuesto lh3e.

5 La figura 13 es un gráfico que representa las tasas de secreción frente al tiempo en experimentos de infusión femoral y duodenal realizados usando compuesto lh3e.

10 La figura 14 es una serie de gráficos (A-D) relacionados con el compuesto lh3e y sus metabolitos. La figura 14A que muestra el compuesto lh3e y sus principales metabolitos identificados en la bilis usando espectrometría de masas en el experimento i.v. Se notifican datos como valores de área absolutos. La figura 14b es una presentación visual en zoom de la figura 14A. La figura 14C muestra el compuesto lh3e y sus principales metabolitos identificados en la bilis usando espectrometría de masas. La figura 14D es una presentación visual en zoom de la figura 14C.

15 La figura 15 es un gráfico que muestra la estabilidad del compuesto lh3e (triángulo) y CA (cuadrado) en cultivo de heces humanas.

La figura 16 es un gráfico de barras que muestra la liberación dependiente de la dosis de GLP-1 *ex vivo* inducida por el compuesto lh3e.

20 La figura 17A muestra gráficos de correlación para la expresión de ARNm en hígado de TGR5 y CoxVI1 a en la población de referencia genética BxD de ratón (n = 41).

25 La figura 17B es un gráfico de barras que muestra la actividad de Cox en células STC-1 tratadas durante 1 h con compuesto lh3e a la concentración indicada. Se añadió vehículo o inhibidor de adenilato ciclasa MDL-12330-A (MDL) (1 μ M) 15 min. antes del tratamiento (n = 3).

30 La figura 17C es un gráfico que muestra el consumo de oxígeno en células STC-1 tal como se midió usando el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience). La primera línea discontinua vertical indica la adición de vehículo o MDL-12330-A (MDL) al medio de cultivo, y la segunda línea discontinua representa el tratamiento con compuesto lh3e a 1 μ M (n = 10).

La figura 17D es un gráfico de barras que muestra la razón de ATP/ADP en células STC-1 tratadas como en la figura B (n=3).

35 La figura 17E muestra gráficos de correlación para la expresión de ARNm en hígado de TGR5 y KiR6.2 en la población de referencia genética BxD de ratón según una estrategia similar tal como se describió en la figura A.

40 La figura 17F es un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de ARNm de TGR5, CoxIV y KiR6.2 en células STC-1 transfectadas durante 36 h con ARNhp de mTGR5 o control tal como se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se normalizaron los niveles de ARNm diana a los niveles de ARNm de 36B4 (n = 3). Se representan los datos como media \pm EE; prueba de la t de Student para datos independientes; *p < 0,05.

45 La figura 18A muestra gráficos de correlación para la expresión de ARNm en hígado de TGR5 y Cav2.2 en la población de referencia genética BxD de ratón (n = 41) tal como se encontró en el sitio web GeneNetwork University of Tennessee.

50 Las figuras 18B y 18C son gráficos que muestran el nivel de calcio intracelular en células NCI-H716 transfectadas con vector simulado, vector de expresión de hTGR5 o ARNip de hTGR5 durante 36 h y tratadas con 1 (B) o 10 μ M (C) de compuesto lh3e. La flecha representa el tratamiento con compuesto lh3e (n = 3).

La figura 18D es un gráfico que muestra el nivel de calcio intracelular en células NCI-H716 tratadas con 3 μ M de compuesto lh3e (indicado por la flecha) en presencia de vehículo o inhibidor de adenilato ciclasa MDL-12330-A (MDL) (10 μ M). Se añadió MDL o vehículo 15 min. antes del tratamiento con compuesto lh3e (n = 3).

55 La figura 18E es un gráfico que muestra el nivel de calcio intracelular en células NCI-H716 tratadas con glucosa al 1% y luego con 1 μ M de compuesto lh3e (n = 3).

60 La figura 18F es un gráfico de barras que muestra la liberación de GLP-1 en células NCI-H716 tratadas con glucosa al 1% o 1 μ M de compuesto lh3e, o una combinación de ambos agentes (n = 3).

La figura 18G es un gráfico de barras que muestra la liberación de GLP-1 en células STC-1 transfectadas durante 36 h con control, vector de expresión de mTGR5 o ARNhp de mTGR5 y luego expuestas 30 min. a compuesto lh3e a la concentración indicada. Se añadió un inhibidor de DPP4 (Millipore) en el medio de cultivo al 0,1% (n = 3).

- 5 La figura 18H es un gráfico de barras que muestra el impacto de 30 min. de tratamiento con compuesto lh3e sobre la liberación de GLP-1 en células STC-1 transfectadas con vector de expresión de mTGR5 en presencia de vehículo o inhibidor de adenilato ciclasa MDL-12330-A (10 μ M). Se añadió MDL o vehículo 15 min. antes del tratamiento con compuesto lh3e. Se añadió un inhibidor de DPP4 (Millipore) al medio de cultivo al 0,1% (n = 3). Se representan los datos como media \pm EE. Prueba de la t de Student para datos independientes; [#]p < 0,05 tratamiento con vehículo frente a con compuesto lh3e; [#]p < 0,05 tratamiento con vehículo frente a con MDL-12330-A.
- 10 La figura 19A es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en ratones TGR5-Tg macho alimentados durante 10 semanas con dieta HF y en compañeros de camada macho de edades coincidentes alimentados con una dieta HF o CD durante la misma duración. Todos los ratones tenían 8 semanas de edad al inicio de la dieta HF. El peso corporal de TGR5-Tg y compañeros de camada control era de 37,9 \pm 1,7 g y 37,0 \pm 1,8 g, respectivamente (n = 8; no diferente estadísticamente). El gráfico de barras adyacente representa el área bajo la curva (AUC) promedio (n = 8).
- 15 Las figuras 19B y 19C muestran los niveles plasmáticos de insulina (panel superior) y GLP-1 (panel inferior) durante la OGTT (19B) o antes y después de una exposición a comida de prueba (19C) (n = 8).
- 20 La figura 19D es un gráfico de barras que muestra la liberación de GLP-1 de explantes de íleo aislados de ratones macho TGR5-Tg y control alimentados durante 18 semanas con dieta HF y expuestos durante 1 h a las concentraciones indicadas de LCA (n = 4).
- 25 La figura 19E es una serie de fotografías que son secciones pancreáticas teñidas con insulina inmunofluorescente representativas de ratones macho TGR5-Tg alimentados con una dieta HF durante 20 semanas o de compañeros de camada macho de edades coincidentes alimentados con una dieta HF o CD durante la misma duración.
- 30 La figura 19F es un gráfico de barras que muestra un perfil de distribución de islotes pancreáticos de ratones TGR5-Tg macho y compañeros de camada control alimentados con una dieta HF o CD tal como se describe en (la figura 19E). Se contaron los islotes y se midieron mediante el software de análisis ImageJ en cuatro secciones pancreáticas alternadas teñidas con H&E separadas entre sí por 150 μ M (n = 5).
- 35 La figura 19G es un gráfico de barras que muestra el contenido en insulina en islotes pancreáticos aislados con colagenasa de ratones TGR5-Tg macho y compañeros de camada control alimentados con una dieta HF o CD tal como se describe en (la figura 19E).
- 40 La figura 19H es un gráfico que muestra los resultados de una OGTT en ratones macho TGR5^{-/-} y TGR5^{+/+} alimentados con una dieta HF durante 8 semanas. El recuadro representa el AUC promedio. El peso corporal de ratones macho TGR5^{-/-} y TGR5^{+/+} en el momento del análisis era de 46,3 \pm 3,9 g y 51,9 \pm 2,0 g, respectivamente (n = 8; no diferente estadísticamente).
- 45 Las figuras 19I y 19J son gráficos que muestran los niveles de GLP-1 en plasma en ratones TGR5^{+/+} (figura 19J) y TGR5^{-/-} (figura 19I) alimentados con CD tras una exposición a glucosa oral, precedida 30 min. antes por la administración oral de solución salina o compuesto lh3e (30 mg/kg), sólo o en combinación con un inhibidor de dipeptidil-peptidasa-4 (DPP4i, 3 mg/kg) (n = 6). Se representan los datos como media \pm EE. Prueba de la t de Student para datos independientes; [#]p < 0,05, ratones tratados con compuesto lh3e alimentados con HF en comparación con ratones alimentados con HF; y [#]p < 0,05, ratones alimentados con HF frente a ratones alimentados con CD excepto para (I) y (J), donde * evaluó ratones tratados con solución salina o DPP4i frente a ratones tratados con compuesto lh3e o lh3e + DPP4i, y [#]ratones tratados con solución salina frente a DPP4i.
- 50 La figura 20A es un gráfico que muestra los resultados de la medición mediante HPLC de los niveles de compuesto lh3e en plasma en ratones C57BL6/J macho tratados con lh3e alimentados con HF, HF y CD.
- 55 La figura 20B es un gráfico que muestra el resultado de la intervención dietética con compuesto lh3e (30 mg/kg/d) iniciada tras un periodo de 14 semanas de alimentación HF en el momento indicado por la flecha. Se siguió la evolución del peso corporal en todos los grupos durante todo el estudio (n = 8).
- 60 La figura 20C es un gráfico de barras que muestra la composición corporal tal como se evaluó mediante qRMN tras 8 semanas de intervención dietética (n = 8).
- La figura 20D es un gráfico de barras que muestra la masa de órganos tal como se expresa como el porcentaje del peso de ratones control alimentados con CD.
- La figura 20E es un gráfico de barras que muestra la ingesta de alimento (n = 8).
- La figura 20F es una serie de gráficos de barras que muestran la actividad horizontal espontánea y el gasto de

energía, evaluados por la medición del consumo de oxígeno (VO_2) y la liberación de dióxido de carbono (VCO_2), que se monitorizaron a lo largo de un periodo de 18 h 6 semanas tras el inicio de la intervención dietética. Se calculó el cociente respiratorio (RQ) como la razón de VCO_2/VO_2 . Los gráficos de barras representan el AUC promedio. Para el RQ, los gráficos de barras representan el promedio (n=8).

5 La figura 20G es un gráfico de barras que muestra la expresión génica en BAT mediante PCR cuantitativa en tiempo real tras 18 semanas de intervención dietética. Se normalizaron los niveles de ARNm diana a los niveles de ARNm de 36B4 (n = 8).

10 La figura 20H es un gráfico que muestra adipocitos marrones primarios aislados de ratones macho C57BL/6J alimentados con CD que se cultivaron durante 12 h con vehículo o compuesto lh3e 3 μ M, y se midió el consumo de O_2 usando el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience) (n = 5). Las líneas discontinuas ilustran la adición del agente de desacoplamiento FCCP a dosis sucesivas de 250 y 500 nM.

15 La figura 20I es una serie de fotografías que son fotografías representativas de la tinción con aceite redO (ORO) de criosecciones (panel superior) y tinción con Sirius rojo de secciones incrustadas en parafina (panel inferior) del hígado al final de la intervención dietética. Se indica fibrosis mediante la flecha.

20 La figura 20J es una serie de gráficos de barras que muestra el contenido en lípidos en muestras de hígado extraídas según el método de Folch (n = 8).

25 La figura 20K y 20 es una serie de gráficos de barras que muestran los niveles en plasma de enzimas hepáticas (figura 20K) y lípidos (figura 20L) al final de la intervención dietética (n = 8). Se representan los datos como la media \pm EE. Prueba de la t de Student para datos independientes; *p < 0,05, ratones tratados con lh3e alimentados con HF en comparación con ratones alimentados con HF; y #p < 0,05, ratones alimentados con CD frente a ratones alimentados con HF.

30 La figura 21A es un gráfico que muestra el resultado de una OGTT en ratones C57BL6/J macho alimentados con CD y HF complementados con 30 mg/kg/d de compuesto lh3e durante 8 semanas tras la aparición de obesidad inducida mediante alimentación con una dieta HF durante 10 semanas. El recuadro representa el AUC promedio. El peso corporal de ratones tratados con vehículo y compuesto lh3e era de 38,08 \pm 1,83 g y 32,26 \pm 0,95 g, respectivamente (n = 8; p < 0,05).

35 La figura 21B es un gráfico que muestra la glucemia e insulinemia en ayunas (4 h de ayuno) en ratones DIO tras 3 semanas de intervención dietética con compuesto lh3e (panel superior). Niveles de insulina en plasma durante la OGTT en ratones DIO (panel inferior).

40 La figura 21C es un gráfico que muestra el resultado de una OGTT en ratones macho db/db alimentados con CD de 14 semanas de edad tratados con 30 mg/kg/d de compuesto lh3e durante 6 semanas. El recuadro muestra el AUC promedio (n = 8).

45 La figura 21D es un gráfico que muestra la glucemia e insulinemia en ayunas (4 h) en ratones db/db tras 6 semanas de tratamiento con compuesto lh3e (panel superior). Niveles de insulina en plasma durante la OGTT en ratones DIO (panel inferior).

50 La figura 21E es una serie de dos gráficos de barras que muestran la sensibilidad a insulina evaluada a través de la tasa de infusión de glucosa promedio en equilibrio (euglucemia) en un pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico (10 mU insulina/min./kg) en ratones DIO (tras la aparición de obesidad inducida mediante alimentación con una dieta HF durante 10 semanas) tras 10 semanas de intervención dietética con compuesto lh3e (30 mg/kg/d) (n = 5). La evaluación de la producción de glucosa hepática y su supresión por la insulina, así como la velocidad de desaparición de la glucosa, se evaluó en equilibrio usando 3H-glucosa (n = 5).

55 La figura 21F es una serie de gráficos de barras que muestran la captación de glucosa estimulada por insulina en los tejidos indicados medida usando indicadores de 14C-2-desoxiglucosa (n = 5).

60 La figura 21G es una serie de gráficos de barras que muestran la obtención del perfil de expresión génica en el hígado que se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se normalizaron los niveles de ARNm diana a los niveles de 36B4 (n = 8). Se representan los datos como media \pm EE. Prueba de la t de Student para datos independientes; *p < 0,05, ratones tratados con compuesto lh3e alimentados con HF en comparación con ratones alimentados con HF; y #p < 0,05, ratones alimentados con CD frente a ratones alimentados con HF.

La figura 22A es una serie de gráficos que muestran los resultados de un estudio en el que se alimentaron ratones macho TGR5^{+/+} y TGR5^{-/-} con una dieta HF durante 9 semanas, y se realizó una primera OGTT a continuación. Entonces se complementó HF con compuesto lh3e a 30 mg/kg/d. Se realizó una segunda OGTT 4 semanas

después de que se iniciase el tratamiento con compuesto lh3e. Las curvas representan la tolerancia a la glucosa antes y después del tratamiento de 4 semanas con compuesto lh3e en ratones TGR5^{+/+} (panel izquierdo) y TGR5^{-/-} (panel derecho). El recuadro representa el AUC promedio. En ratones TGR5^{+/+}, el peso corporal antes y después del tratamiento con compuesto lh3e era de 46,86 ± 3,54 g y 43,50 ± 3,47 g, respectivamente (n = 8; no diferente estadísticamente). En ratones TGR5^{-/-}, el peso corporal antes y después del tratamiento con compuesto lh3e era de 54,34 ± 2,23 g y 52,30 ± 2,72 g, respectivamente (n = 8; no diferente estadísticamente).

La figura 22B es una serie de gráficos que muestran los niveles de insulina en plasma que se midieron simultáneamente durante la OGTT en ratones DIO en TGR5^{+/+} (panel izquierdo) y TGR5^{-/-} (panel derecho) antes y después del tratamiento de 4 semanas con compuesto lh3e. El recuadro representa el AUC promedio (n = 8). Se representan los datos como media ± EE. Prueba de la t de Student para datos independientes; *p < 0,05, ratones tratados con compuesto lh3e 7 en comparación con vehículo.

La figura 23 es un gráfico que muestra las velocidades de flujo biliar de los compuestos lh3e e li3e en un experimento de infusión femoral a 1 μmol/min./kg durante 1 h y la velocidad de flujo biliar en un experimento femoral como control infundiendo una disolución fisiológica de BSA al 3% durante 1 h.

La figura 24 es un gráfico que muestra las velocidades de secreción de compuesto lh3e y tauro-lh3e frente al tiempo en un experimento femoral a 1 μmol/min./kg durante 1 h.

La figura 25 es un gráfico que muestra las velocidades de secreción de compuesto li3e y tauro-li3e frente al tiempo en un experimento femoral a 1 μmol/min./kg durante 1 h.

La figura 26 es un gráfico que muestra el compuesto lh3e y sus principales metabolitos identificados en muestras de bilis recogidas durante el experimento de infusión femoral. Se notifican los datos como valores absolutos de área.

La figura 27 es una presentación visual en zoom de la figura 26.

Descripción de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o pruebas de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva prevalecerá.

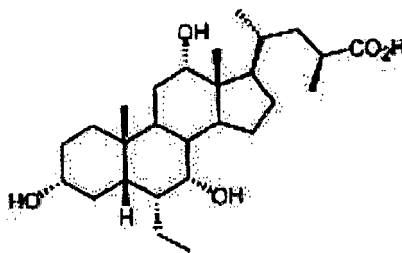
Definiciones

Por conveniencia, se recopilan en el presente documento determinados términos usados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntos.

El término “tratar”, tal como se usa en el presente documento, significa aliviar, disminuir, reducir, eliminar, modular o mejorar, es decir, provocar la regresión del estado patológico o afección.

El término “prevenir”, tal como se usa en el presente documento significa, detener completamente o casi completamente que un estado patológico o afección se produzca en un paciente o sujeto, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto al mismo o corre el riesgo de contraer un estado patológico. Prevenir también puede incluir inhibir, es decir, detener el desarrollo, de un estado patológico o afección, y aliviar o mejorar, es decir, provocar la regresión del estado patológico o afección, por ejemplo cuando el estado patológico o afección pueden estar ya presentes.

El término “6-Et,23(S)-MeCA” se refiere al compuesto lh3e que tiene la estructura química:



Alternativamente, el compuesto lh3e también puede denominarse ácido 6 α -etil-(23S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico.

Tal como se usa en el presente documento, "BA" significa ácido biliar y derivados de ácido biliar. Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos esteroides derivados de colesterol. Los ácidos biliares primarios son ácidos cólico y quenodesoxicólico. En el organismo, estos ácidos se conjugan con glicina o taurina antes de que se secretan en la bilis.

"Alquilo" incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo), grupos alquilo de cadena ramificada (por ejemplo, isopropilo, terc-butilo, isobutilo), grupos cicloalquilo (por ejemplo, alicíclicos) (por ejemplo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En determinadas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono en su estructura principal, denominado "alquilo inferior" (por ejemplo, C₁-C₆ para cadena lineal que significa 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono, C₃-C₆ para cadena ramificada que significa 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono). En algunos ejemplos, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene cuatro o menos átomos de carbono en su estructura principal. Además, los cicloalquilos tienen 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono en su estructura de anillo.

El término "alquilo sustituido" se refiere a restos alquilo que tienen un sustituyente que reemplaza a uno o más átomos de hidrógeno en al menos uno o más carbonos de la estructura principal de hidrocarburo. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinito, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático.

"Ariilo" incluye grupos con aromaticidad, incluyendo grupos aromáticos de 5 y 6 miembros "no conjugados" o de anillo individual que pueden incluir desde cero hasta cuatro heteroátomos, así como sistemas "conjugados" o multicíclicos con al menos un anillo aromático. Los ejemplos de grupos ariilo incluyen benceno, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Además, el término "ariilo" incluye grupos ariilo multicíclicos, por ejemplo, tricíclicos, bicíclicos, por ejemplo, naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilendioxfenilo, quinolina, isoquinolina, naftridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, deazapurina o indolizina. Los grupos ariilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también se denominan "aril-heterociclos", "heterociclos," "heteroarilos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido al menos en una posición del anillo con tales sustituyentes tal como se describió anteriormente, como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinito, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos ariilo también pueden condensarse o unirse con puente con anillos alicíclicos o heterocíclicos, que no son aromáticos de modo que forman un sistema multicíclico (por ejemplo, tetralina, metilendioxfenilo).

A menos que se especifique el número de carbonos de otra forma, "alquilo inferior" incluye un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente, pero que tiene desde uno hasta diez, por ejemplo, desde uno hasta seis, átomos de carbono en su estructura principal.

El término "alcoxi" o "alcoxilo" incluye grupos alquilo, alquenilo y alquinilo unidos covalentemente a un átomo de

oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxilo (o radicales alcoxilo) incluyen grupos metoxilo, etoxilo, isopropiloxilo, propoxilo, butoxilo y pentoxilo.

5 El término "éter" incluye compuestos o restos que contienen un oxígeno unido a dos átomos de carbono o heteroátomos diferentes. Por ejemplo, el término incluye "alcoxiaalquilo" que se refiere a un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo unido covalentemente a un átomo de oxígeno que se está unido covalentemente a otro grupo alquilo.

10 El término "éster" incluye compuestos y restos que contienen un carbono o un heteroátomo unido a un átomo de oxígeno que está unido al carbono de un grupo carbonilo. El término "éster" incluye grupos alcoxicarboxilo tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, butoxicarbonilo, pentoxicarbonilo, etc. Los grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo son tal como se definieron anteriormente.

El término "hidroxi" o "hidroxilo" incluye grupos con un -OH u -O-.

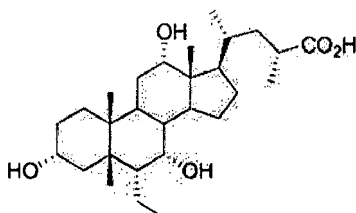
15 El término "halógeno" incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc. El término "perhalogenado" se refiere en general a un resto en el que todos los hidrógenos están reemplazados por átomos de halógeno.

20 Un "grupo aniónico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que está cargado negativamente a pH fisiológico. Los grupos aniónicos incluyen carboxilato, sulfato, sulfonato, sulfinato, sulfamato, tetrazolilo, fosfato, fosfonato, fosfinato o fosforotioato o equivalentes funcionales de los mismos. "Equivalentes funcionales" de grupos aniónicos pretenden incluir bioisoésteres, por ejemplo, bioisoésteres de un grupo carboxilato. Los bioisoésteres abarcan tanto equivalentes bioisoestéricos clásicos como equivalentes bioisoestéricos no clásicos. Se conocen en la técnica equivalentes bioisoestéricos clásicos y no clásicos (véase, por ejemplo, Silverman, R. B. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Academic Press, Inc.: San Diego, Calif., 1992, págs.19-23).
25 Otro grupo aniónico es un carboxilato.

30 El término "funcionalidad inestable" se refiere a un patrón de sustitución que contiene un enlace lábil, por ejemplo, una funcionalidad o enlace que es susceptible a hidrólisis o escisión en condiciones fisiológicas (por ejemplo, disoluciones acuosas en el intervalo de pH neutro). Los ejemplos de funcionalidades inestables incluyen acetales y cetales.

35 Los términos "polimorfos cristalinos" o "polimorfos" se refieren a la existencia de más de una forma cristalina para un compuesto, sal o solvato del mismo. Se preparan polimorfos cristalinos de los compuestos análogos de ácidos biliares mediante cristalización en diferentes condiciones.

El término "R-EMCA" se refiere al compuesto ácido 6 α -etil-23(R)-metilcólico que tiene la estructura:



40 Alternativamente puede denominarse ácido 6 α -etil-(23R)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico

45 Adicionalmente, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir en forma o bien hidratada o bien no hidratada (el anhídrido) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Los ejemplos no limitativos de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Los ejemplos no limitativos de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

50 "Solvatos" significa formas de adición de disolvente que contienen cantidades o bien estequiométricas o bien no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen una tendencia a atrapar una razón molar fijada de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando de ese modo un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman mediante la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en la que el agua retiene su estado molecular como H₂O, pudiendo formar tal combinación uno o más hidratos.

55 Se observará que la estructura de algunos de los compuestos de la invención incluye átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, debe entenderse que los isómeros que surgen de tal asimetría (por ejemplo, todos los enantiómeros y diastereómeros) se incluyen dentro del alcance de la invención, a menos que se indique lo contrario. Tales isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y

mediante síntesis controlada estereoquímicamente. Se nombran los enantiómeros (configuraciones R y S) según el sistema desarrollado por R.S. Cahn, C. Ingold y V. Prelog.

Además, las estructuras y otros compuestos comentados en esta solicitud incluyen todos los isómeros atropicos de los mismos. Los isómeros atropicos son un tipo de estereoisómero en el que los átomos de dos isómeros se disponen de manera diferente en el espacio. Los isómeros atropicos deben su existencia a una rotación restringida provocada por el impedimento de la rotación de grandes grupos alrededor de un enlace central. Tales isómeros atropicos existen normalmente como una mezcla, sin embargo, como resultado de recientes avances en técnicas de cromatografía, ha sido posible separar mezclas de dos isómeros atropicos en casos selectos.

“Compuesto estable” y “estructura estable” pretenden indicar un compuesto que es suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y la formulación para dar un agente terapéutico eficaz.

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo” se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro pero que difiere ligeramente en composición (como en el reemplazo de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en presencia de un grupo funcional particular, o el reemplazo de un grupo funcional por otro grupo funcional). Por tanto, un análogo es un compuesto que es similar a o comparable en función y aspecto al compuesto de referencia.

Tal como se define en el presente documento, el término “derivado”, por ejemplo, en el término “derivados de ácidos biliares”, se refiere a compuestos que tienen una estructura de anillo de 4 miembros de núcleo común y que están sustituidos con diversos grupos tal como se describe en el presente documento.

El término “bioisómero” se refiere a un compuesto que resulta del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos por otro, ampliamente similar, átomo o grupo de átomos. El reemplazo bioisomérico puede estar basado de manera fisicoquímica o topológica. Los ejemplos de bioisómeros de ácidos carboxílicos incluyen acilsulfonimidias, tetrazoles, sulfonatos y fosfonatos. Véase, por ejemplo, Patani y LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176 (1996).

“Terapia de combinación” (o “coterapia”) incluye la administración de un compuesto de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos (es decir, el compuesto de la invención y al menos un segundo agente). El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente a lo largo de un periodo de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). “Terapia de combinación” puede pretender abarcar, pero generalmente no, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que dan como resultado casual y arbitrariamente las combinaciones de la presente invención. “Terapia de combinación” pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea puede lograrse, por ejemplo, administrando al sujeto una cápsula individual que tiene una razón fijada de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse mediante cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitarse a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de los tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse mediante inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intravenosa. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran no es limitadamente crítica.

“Terapia de combinación” también abarca la administración de los agentes terapéuticos tal como se describió anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos y terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o tratamientos mecánicos). Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso semanas.

Los términos “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” tal como se usan en el presente documento se refieren a modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente

mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión.

5 El término “pulmonar” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier parte, tejido u órgano cuya función primaria es el intercambio de gases con el entorno externo, por ejemplo, intercambio de O_2/CO_2 , dentro de un paciente. “Pulmonar” se refiere normalmente a los tejidos del tracto respiratorio. Por tanto, la expresión “administración pulmonar” se refiere a la administración de las formulaciones descritas en el presente documento a cualquier parte, tejido u órgano cuya función primaria es el intercambio de gases con el entorno externo (por ejemplo, boca, nariz, faringe, orofaringe, laringofaringe, laringe, tráquea, carina, bronquios, bronquiolos, alveolos). Para fines de la presente invención, “pulmonar” también incluye un tejido o cavidad que depende del tracto respiratorio, en particular, los senos.

15 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto de la invención, o una combinación de compuestos es una cantidad (cantidad o concentración) de compuesto o compuestos. En una realización, cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto a un sujeto que necesita tratamiento se mejoran inmediatamente los síntomas que surgen de la enfermedad o tras la administración del compuesto una o más veces. La cantidad del compuesto que va a administrarse a un sujeto dependerá del trastorno particular, el modo de administración, los compuestos coadministrados, si los hay, y las características del sujeto, tales como salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto podrá determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

25 El término “cantidad profilácticamente eficaz” significa una cantidad (cantidad o concentración) de un compuesto de la presente invención, o una combinación de compuestos, que se administra para prevenir o reducir el riesgo de una enfermedad, en otras palabras, una cantidad necesaria para proporcionar un efecto preventivo o profiláctico. La cantidad del presente compuesto que va a administrarse a un sujeto dependerá del trastorno particular, el modo de administración, los compuestos coadministrados, si los hay, y las características del sujeto, tales como salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto podrá determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

30 El término “reducir el riesgo de”, tal como se usa en el presente documento, significa disminuir la posibilidad o probabilidad de que se produzca una enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad inflamatoria y/o enfermedad metabólica en un paciente, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto a tal aparición.

35 Una “sal farmacéuticamente aceptable” o “sal” de un compuesto de la invención es un producto del compuesto que contiene un enlace iónico, y se produce normalmente haciendo reaccionar el compuesto con o bien un ácido o bien una base, adecuado para su administración a un sujeto.

40 Tal como se usa en el presente documento, “sales farmacéuticamente aceptables” se refieren a derivados de los compuestos de la invención en los que el compuesto original se modifica preparando sales de ácido o base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos o minerales de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos seleccionados de 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietanosulfónico, acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicoliarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laurilsulfónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico y toluenosulfónico.

55 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., pág. 1445 (1990).

60 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se reconoce en la técnica. En determinadas realizaciones, el término incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad,

irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, de acuerdo con una razón de beneficio/riesgo razonable.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se reconoce en la técnica, e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como una carga líquida o sólida, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación, implicado en portar o transportar cualquier composición objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, hasta otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de que ser compatible con los otros componentes de una composición objeto y no perjudicial para el paciente. En determinadas realizaciones, un portador farmacéuticamente aceptable es no pirogénico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar-agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tamponadas con fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Una “composición” o “composición farmacéuticamente aceptable” es una formulación que contiene un compuesto de la invención o sal, solvato o hidrato del mismo. En una realización, la composición farmacéutica está en volumen o en forma farmacéutica unitaria. La forma farmacéutica unitaria es cualquiera de una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa i.v., un comprimido, una bomba individual en un inhalador de aerosol, o un vial. La cantidad de principio activo (por ejemplo, una formulación de un compuesto de la invención o sales del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y varía según el tratamiento particular implicado. Un experto en la técnica apreciará que a veces es necesario realizar variaciones de rutina a la dosificación dependiendo de la edad y estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contemplan una variedad de vías, incluyendo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, y similares. Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. En otra realización, se mezcla el compuesto activo en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que se requiera.

El término “dosis instantánea” se refiere a formulaciones de compuesto que son formas farmacéuticas de dispersión rápida.

El término “liberación inmediata” se define como una liberación de compuesto a partir de una forma farmacéutica en un periodo de tiempo relativamente breve, en general hasta aproximadamente 60 minutos. El término “liberación modificada” se define que incluye liberación retardada, liberación extendida y liberación pulsada. El término “liberación pulsada” se define como una serie de liberaciones de fármaco a partir de una forma farmacéutica. El término “liberación sostenida” o “liberación extendida” se define como liberación continua de un compuesto a partir de una forma farmacéutica a lo largo de un periodo prolongado.

Un “sujeto” incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, aves, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, oveja, cerdos, caballos, aves de corral, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, aves, y similares). Normalmente, el sujeto es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término “conjugados de aminoácidos” se refiere a conjugados de los compuestos de la invención con cualquier aminoácido adecuado. Taurina ($\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$) y glicina ($\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$) son ejemplos de conjugados de aminoácidos. Los conjugados de aminoácidos adecuados de los compuestos tienen la ventaja adicional de integridad potenciada en los fluidos biliar o intestinal. Los aminoácidos adecuados no se limitan a taurina y glicina. La invención incluye los conjugados de taurina y glicina del compuesto 1h3e.

El término “compuesto(s) de la invención” se refiere a un compuesto que tiene la fórmula descrita de 1h3e, o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o conjugado de aminoácido glicina o taurina del mismo.

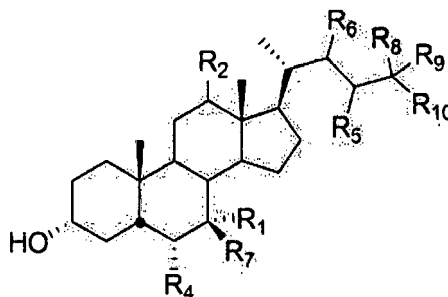
El término “modulador de TGR5” significa cualquier compuesto que interaccione con el receptor TGR5. La interacción no se limita a un compuesto que actúa como antagonista, agonista, agonista parcial o agonista inverso del receptor TGR5. En un aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como antagonista del receptor TGR5. En otro aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como agonista del receptor TGR5. En otro aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como agonista parcial del receptor TGR5. En otro aspecto,

los compuestos de la presente invención actúan como agonista inverso del receptor TGR5. El perfil de un ligando, tradicionalmente, endógeno o sintético, se caracteriza por su eficacia intrínseca "e" originalmente descrita por Furchgott en 1966. Se usa para expresar el grado al que los diferentes ligandos producen respuestas biológicas variables mientras que ocupan el mismo número de receptores. En general, el término "agonista" significa un compuesto que potencia la actividad de otra molécula o sitio de receptor. Un agonista, por la definición clásica, ya sea un agonista ortoestérico, alostérico, inverso o un co-agonista, tiene la propiedad de unirse al receptor, alterar su estado de receptor y dar como resultado una acción biológica. En consecuencia, agonismo se define como la propiedad de un agonista o un ligando para producir una acción biológica. En contraposición a esto, un "antagonista" es esencialmente un agonista con alta afinidad por la misma macromolécula de receptor, pero con muy poca o insignificante eficacia intrínseca, y por tanto evita de manera estérica las acciones biológicas de un agonista. Como propiedad, el antagonismo puede ser funcional o fisiológico, en el que un agonista tiene una competencia directa para el sitio de receptor en efectos anteriores y opuestos a través de un sistema de receptor-mensajero diferente en este último. Más específicamente, un agonista de TGR5 es un ligando de receptor o compuesto que se une a TGR5 y aumenta la concentración de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) en al menos el 20% en células que expresan el receptor. A la inversa, un antagonista de TGR5 sería un compuesto que antagoniza o bloquea la actividad de un agonista, efectuando de ese modo una reducción en la concentración de AMPc

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad moduladora del receptor TGR5 y a su uso para tratar y/o prevenir diversas enfermedades incluyendo enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal. Además, la presente invención se refiere a compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento.

Compuestos y composiciones

Los compuestos de la invención se definen en la reivindicación 1. Se describen adicionalmente en el presente documento compuestos de fórmula A:



(A) o una sal, solvato o hidrato de los mismos, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidrógeno, hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es alquilo sustituido o no sustituido o arilo; R₆ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; R₈ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido; R₉ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o tomados juntos R₈ y R₉ forman un carbonilo; R₁₀ es R₃ o SO₃H; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. En un aspecto, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

En un aspecto, R₁ es hidrógeno o hidroxilo. R₁ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₂ es α -hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es α -hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidrógeno. R₁ y R₂ son iguales. R₁ y R₂ son cada uno α -hidroxilo. R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno.

En otro aspecto, R₁₀ es R₃. R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es hidroxilo. R₃ no es hidroxilo. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y n es 1.

En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo no sustituido. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo. R₃ y R₄ son iguales. R₃ y R₄ son diferentes. R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno. R₃ es hidroxilo y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H, R₄ es hidrógeno y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ es hidrógeno y n es 1. R₃ es H y R₄ es alquilo no sustituido. R₃ es OH y R₄ es metilo. R₃ es OH y R₄ es etilo. R₃ es OH y R₄ es metilo.

En otro aspecto, R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ es alquilo sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. R₅ es arilo. R₅ es fenilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, en los que R₅ está en la configuración S y R₄ está en la configuración alfa. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, R₁ es hidroxilo y R₂ es hidrógeno.

En un aspecto, R₁, R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂ y R₃ son hidrógeno. Al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es hidrógeno. Al menos dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son hidrógeno. Al menos tres de R₁, R₂, R₃ o R₄ son hidrógeno. Al menos cuatro de R₁, R₂, R₃ o R₄ son hidrógeno.

En un aspecto, R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos uno de R₁, R₂ o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos dos de R₁, R₂ o R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH.

En otro aspecto, al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es etilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es propilo. R₁ es metilo. R₁ es etilo. R₁ es propilo. R₇ es metilo. R₇ es etilo. R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo no sustituido. Tanto R₁ como R₇ son metilo. Tanto R₁ como R₇ son etilo. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₁ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el otro R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el otro R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo y R₅ es metilo. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo no sustituido. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido, en el que además R₅ está en la configuración S. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido, en el que además R₅ está en la configuración R.

En otro aspecto, R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo. R₆ es alquilo no sustituido. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₆ es propilo.

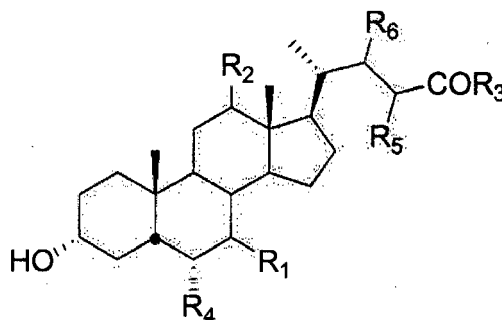
En otro aspecto, R₈ es hidrógeno. R₈ es alquilo no sustituido. R₈ es metilo. R₈ es etilo. R₈ es propilo. R₂ es α -hidroxilo y R₈ es alquilo no sustituido. En otro aspecto, R₈ y R₉ forman un carbonilo.

En un aspecto, R₁₀ es R₃. R₃ es hidroxilo. Al menos uno de R₈ o R₉ es hidrógeno. R₈ y R₉ son ambos hidrógeno. Al menos uno de R₈ o R₉ es alquilo no sustituido. Al menos uno de R₈ o R₉ es metilo. Al menos uno de R₈ o R₉ es etilo. En otro aspecto, R₁₀ es SO₃H.

En otro aspecto, cuando R₂, R₄ y R₆ son cada uno hidrógeno, R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces el otro R₁ o R₇ no es metilo. En otro aspecto, cuando R₂ es α -OH; R₃ es hidroxilo; R₄ y R₆ son cada uno hidrógeno; y uno de R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces el otro R₁ o R₇ no es metilo. En otro aspecto, la presente invención no incluye los siguientes compuestos: ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-7 β -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-7 α -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α -hidroxil-7 ϵ -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α ,7 β ,12 α -trihidroxi-7 α -metil-5 β -colan-24-oico; ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-7 β -metil-5 β -colan-24-oico; y ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-7 ϵ -metil-5 β -colan-24-oico.

En otro aspecto, cuando R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es metilo y el otro R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces R₂, R₄ y R₆ no son todos hidrógeno. En otro aspecto, cuando R₂ es α -OH, R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es metilo y el otro R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces R₄ y R₆ no son todos hidrógeno.

También se describe sólo para información un compuesto de fórmula I:

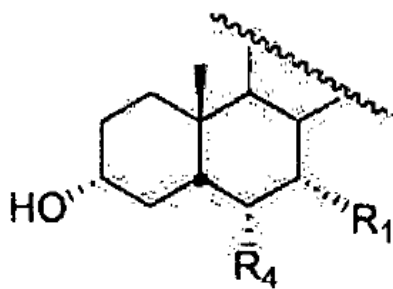


(I) o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o

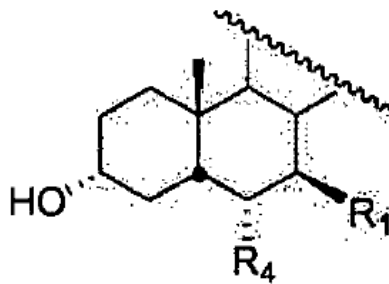
halógeno; R_5 es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. En un aspecto, cuando R_5 es metilo, R_1 es hidroxilo y R_3 es hidroxilo o $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, entonces R_4 no es hidrógeno.

5 En un aspecto son compuestos en los que R_1 es hidrógeno o hidroxilo. R_1 es hidroxilo. R_1 es hidrógeno. R_1 es α -hidroxilo. R_1 es β -hidroxilo.

10 En otro aspecto son compuestos en los que R_1 es halógeno. R_1 es flúor. R_1 es α -flúor. R_1 es β -flúor. La estereoquímica de R_1 en las configuraciones α y β se muestra a continuación:



R_1 configuración alfa (α -)



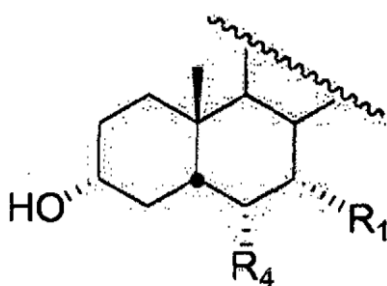
R_1 configuración beta (β -)

15 En otro aspecto son compuestos en los que R_2 es α -hidroxilo. R_2 es hidrógeno. R_1 es β -hidroxilo y R_2 es α -hidroxilo. R_1 es β -hidroxilo y R_2 es H. R_1 es α -hidroxilo y R_2 es H.

20 En otro aspecto son compuestos en los que al menos uno de R_1 o R_2 es hidroxilo. En otro aspecto, al menos uno de R_1 o R_2 es hidrógeno. R_1 y R_2 son iguales. R_1 y R_2 son cada uno α -hidroxilo. R_1 y R_2 son cada uno hidrógeno.

25 En otro aspecto son compuestos en los que R_3 es hidrógeno, hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$. R_3 es hidroxilo. R_3 no es hidroxilo. R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$. En otro aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ y m es 2. R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$. En otro aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ y n es 1.

En otro aspecto, R_4 es hidrógeno o alquilo. R_4 es hidrógeno. R_4 es alquilo inferior. R_4 es alquilo inferior y el grupo alquilo inferior está en la configuración alfa. R_4 en la configuración alfa significa que R_4 tiene la estereoquímica mostrada en la estructura a continuación.



R_4 configuración alfa (α -)

30 En otro aspecto, R_4 es halógeno. R_4 es flúor. R_4 es halógeno y el halógeno está en la configuración alfa. R_4 es α -flúor.

35 En otro aspecto, R_4 es metilo o etilo. R_4 es metilo. R_4 es etilo. R_4 es α -metilo. R_4 es α -etilo. R_3 y R_4 son iguales. R_3 y R_4 son diferentes. R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno. R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ y R_4 es hidrógeno. R_3 es hidroxilo y R_4 es hidrógeno. En otro aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, R_4 es hidrógeno y m es 2. R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ y R_4 es hidrógeno. En otro aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 es hidrógeno y n es 1.

40 En otro aspecto, R_3 es OH y R_4 es alquilo. R_3 es OH y R_4 es alquilo inferior. Alquilo inferior está en la configuración alfa. R_3 es OH y R_4 es metilo. R_3 es OH y R_4 es etilo. R_3 es OH y R_4 es α -metilo. R_3 es OH y R_4 es α -etilo.

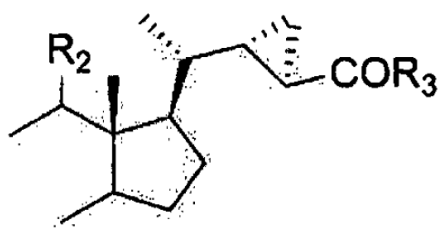
En otro aspecto, R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. R₅ es alquilo inferior sustituido o no sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R-metilo. R₅ es S-etilo. R-etilo. R₅ es alquilo sustituido con fenilo. R₅ es alquilo inferior sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo.

5 En otro aspecto, R₅ es arilo. R₅ es fenilo.

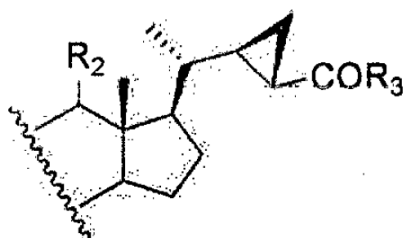
10 En otro aspecto, R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido y R₅ está en la configuración S. R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido y R₄ está en la configuración alfa. En otro aspecto, R₄ y R₅ no son hidrógeno.

15 En otro aspecto, R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido y R₁ es α-hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo inferior no sustituido, R₁ es α-hidroxilo y R₂ es hidrógeno.

En otro aspecto, R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos. R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de 3 miembros. El anillo de 3 miembros tiene la siguiente estereoquímica:



20 El anillo de 3 miembros tiene la siguiente estereoquímica:

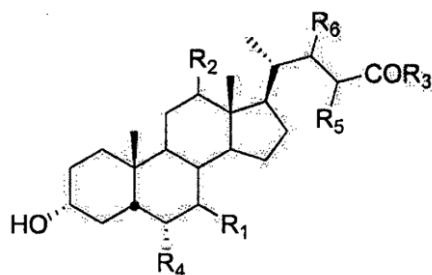


25 En otro aspecto, R₁, R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂ y R₃ son hidrógeno. En otro aspecto, R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ es hidrógeno y R₃ es OH.

30 En otro aspecto, al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es hidrógeno. En otro aspecto, al menos dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, al menos tres de R₁, R₂, R₃ o R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, R₁, R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, al menos uno de R₁, R₂ o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. En otro aspecto, al menos dos de R₁, R₂ o R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. En otro aspecto, R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. En otro aspecto, los compuestos descritos no incluyen cuando R₅ es metilo, R₄ es hidrógeno y R₂ es H o OH.

35 También se describen compuestos seleccionados de compuestos Ia, Ib, Ic, Ig, Ih, Ii, Io, Ip, Iq, Ia1, Ibl, Ic1, Ig1, Ih1, Ii1, Il1, Im1, In1, Io1, Ip1, Iq1, Ia2, Ib2, Ic2, Id2, Ie2, If2, Ig2, Ih2, Ii2, Il2, Im2, In2, IO2, Ip2, Iq2, Ia3, Ib3, Ic3, Id3, Ie3, If3, Ig3, Ih3, Ii3, Il3, Im3, In3, Ia4, Ib4, Ic4, Id4, Ie4, If4, Ig4, Ih4, Ii4, Il4, Im4, In4, Ia5, Ib5, Ic5, Id5, Ie5, If5, Ig5, Ih5, Ii5, Il5, Im5, In5, Ib3e, Ic3e, Id3e, Ie3e, If3e, Ig3e, Ih3e, Ii3e, Il3e, Im3e, In3e, Ia4e, Ib4e, Ic4e, Id4e, Ie4e, If4e, Ig4e, Ih4e, Ii4e, Il4e, Im4e, In4e, Ia5e, Ib5e, Ic5e, Id5e, Ie5e, If5e, Ig5e, Ih5e, Ii5e, Il5e, Im5e, Io5, Ip5, Iq5 e Ir5.

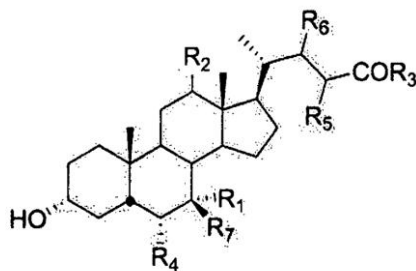
40 También se describe sólo para información una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula I:



(I),

o una sal, solvato o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en la que R₁ es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es arilo o alquilo inferior sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. En otro aspecto es una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula I con la condición de que cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

También se describen sólo para información compuestos de fórmula IA:



(IA)

o una sal, solvato o hidrato de los mismos, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidroxilo, hidrógeno, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. En un aspecto, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

En un aspecto, R₁ es hidrógeno o hidroxilo. R₁ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₁ es hidroxilo y R₂ es α -hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidrógeno. R₁ y R₂ son iguales. R₁ es hidroxilo y R₂ es α -hidroxilo. R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno.

En un aspecto, R₃ es hidrógeno, hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es hidroxilo. R₃ no es hidroxilo. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y n es 1.

En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo no sustituido. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo. R₃ y R₄ son iguales. R₃ y R₄ son diferentes. R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno. R₃ es OH y R₄ es hidrógeno.

En otro aspecto, R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H, R₄ es hidrógeno y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ es hidrógeno y n es 1. R₃ es OH y R₄ es alquilo no sustituido. R₃ es OH y R₄ es alquilo no sustituido. R₃ es OH y R₄ es metilo. R₃ es OH y R₄ es etilo. R₃ es OH y R₄ es metilo.

En un aspecto, R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ está sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. En otro aspecto, R₅ es arilo. Por ejemplo, R₅ es fenilo.

R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración S. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, R₁

es hidroxilo y R₂ es hidrógeno.

En un aspecto, R₁, R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno. R₂ y R₃ son hidrógeno. Al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es hidrógeno. Al menos dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ es hidrógeno. Al menos tres de R₁, R₂, R₃ o R₄ es hidrógeno. R₁, R₂, R₃ y R₄ es hidrógeno.

En un aspecto, R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos uno de R₁, R₂ o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos dos de R₁, R₂ o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. Todos de R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH.

En otro aspecto, al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es etilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo no sustituido. Tanto R₁ como R₇ son metilo. Tanto R₁ como R₇ son etilo. R₁ y R₇ son iguales. R₁ y R₇ son diferentes. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el restante R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el restante R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo y R₅ es metilo.

Tanto R₁ como R₅ son alquilo no sustituido y R₇ es hidroxilo. Tanto R₇ como R₅ son alquilo no sustituido y R₁ es hidroxilo. R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido en el que además R₅ está en la configuración S. R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido, en el que además R₅ está en la configuración R.

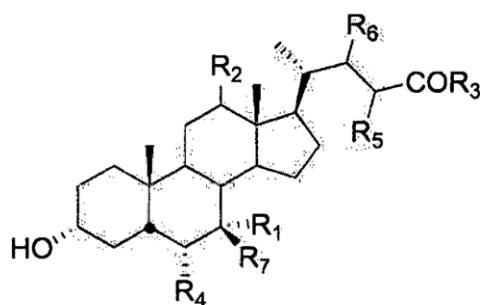
En otro aspecto, R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo. R₆ es alquilo no sustituido. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₂ y R₆ son cada uno hidrógeno. R₂ y R₆ son hidrógeno y R₅ es alquilo no sustituido. R₂ y R₆ son hidrógeno, R₅ es alquilo no sustituido, y al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido.

En un aspecto, el compuesto se selecciona de los compuestos la6, lb6, lc6, lg6, lh6, li6, lo6, lp6, lq6, la7, lb7, lc7, lg7, lh7, li7, ll7, lm7, ln7, lo7, lp7, lq7, la8, lb8, lc8, ld8, le8, lf8, lg8, lh8, li8, ll8, lm8, ln8, lo8, lp8, lq8, la9, lb9, lc9, ld9, le9, lf9, lg9, lh9, li9, ll9, lm9, ln9, la10, lb10, lc10, ld10, le10, lf10, lg10, lh10, li10, ll10, lm10, ln10, la11, lb11, lc11, ld11, le11, lf11, lg11, lh11, li11, ll11, lm11, ln11, la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, ll9e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e, le11e, lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e e ln11e.

En otro aspecto cuando R₂, R₄ y R₆ son cada uno hidrógeno, R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces el otro R₁ o R₇ no es metilo. En otro aspecto, cuando R₂ es α -OH; R₃ es hidroxilo; R₄ y R₆ son cada uno hidrógeno; y uno de R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces el otro R₁ o R₇ no es metilo. En otro aspecto, la presente invención no incluye los siguientes compuestos: ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-7 β -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-7 α -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α -hidroxi-7 ϵ -metil-5 β -colanoico, ácido 3 α ,7 β ,12 α -trihidroxi-7 α -metil-5 β -colan-24-oico; ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-7 β -metil-5 β -colan-24-oico; y ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-7 ϵ -metil-5 β -colan-24-oico.

En otro aspecto de la presente invención, cuando R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es metilo y el otro R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces R₂, R₄ y R₆ no son todos hidrógeno. En otro aspecto, cuando R₂ es α -OH, R₃ es hidroxilo y uno de R₁ y R₇ es metilo y el otro R₁ y R₇ es hidrógeno o hidroxilo, entonces R₄ y R₆ no son hidrógeno.

También se describe sólo para información una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula IA:

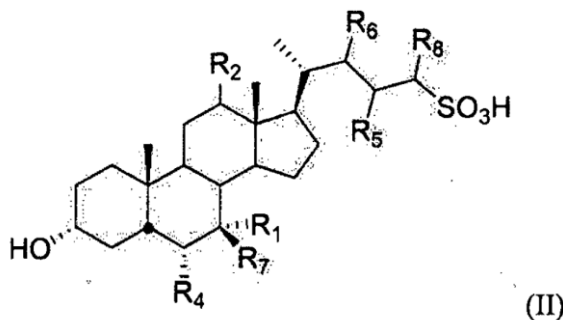


o una sal, solvato o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₅ y R₆ tomados junto con los

carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; y m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

- 5 En un aspecto de la invención, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

También se describe sólo para información un compuesto de fórmula II:



- 10 o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; y R₈ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido. En un aspecto, cuando R₅ es metilo y R₁ es hidroxilo, entonces R₄ no es hidrógeno.

- 15 En un aspecto, R₁ es hidrógeno o hidroxilo. R₁ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₁ es β -hidroxilo. R₂ es α -hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es α -hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidrógeno. R₁ y R₂ son iguales. R₁ es hidroxilo y R₂ es α -hidroxilo. R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno.

- 20 En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo no sustituido. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es alquilo no sustituido. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo.

- 25 En un aspecto, R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ está sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. R₅ es arilo. R₅ es fenilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración S. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo no sustituido, R₁ es hidroxilo y R₂ es hidrógeno.

- 30 En un aspecto, R₁, R₂ y R₄ son hidrógeno. R₂ y R₄ son hidrógeno. R₂ es hidrógeno. Al menos uno de R₁, R₂ o R₄ es hidrógeno. Al menos dos de R₁, R₂ o R₄ son hidrógeno. Todos de R₁, R₂ o R₄ son hidrógeno.

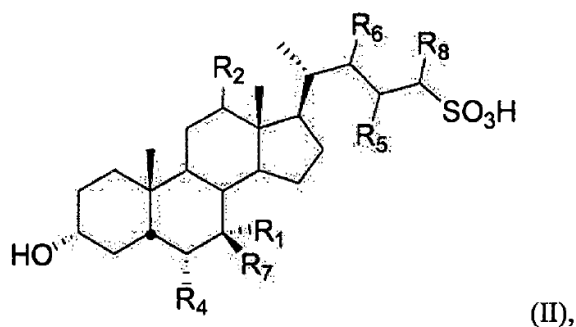
- 35 En un aspecto, R₁ o R₇ es alquilo no sustituido. R₁ o R₇ es metilo. R₁ o R₇ es etilo. R₁ o R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo no sustituido. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el restante R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y el restante R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo y R₅ es metilo. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo no sustituido. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo no sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido, en el que además R₅ está en la configuración S. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo no sustituido y R₅ es alquilo sustituido o no sustituido, en el que además R₅ está en la configuración R. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración S. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración R. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración S. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo no sustituido, en los que además R₅ está en la configuración R. R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo.

- 40 En otro aspecto, R₆ es alquilo no sustituido. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₈ es hidrógeno.

R₈ es alquilo no sustituido. R₈ es metilo. R₈ es etilo. R₂ es α -hidroxilo y R₈ es alquilo no sustituido.

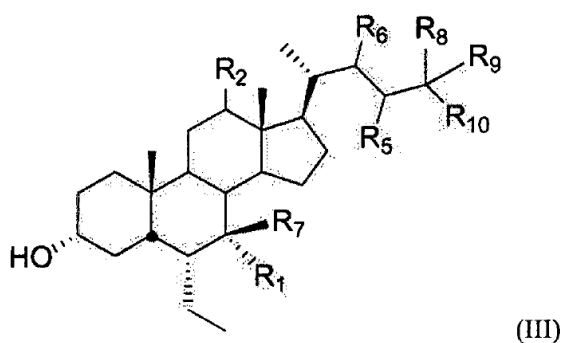
También se describen sólo para información compuestos seleccionados de los compuestos la12, lb12, lc12, lg12, lh12, li12, lo12, lp12, lq12, la13, lb13, lc13, lg13, lh13, li13, ll13, lm13, ln13, lo13, lp13, lq13, la14, lb14, lc14, ld14, le14, lf14, lg14, lh14, li14, ll14, lm14, ln14, lo14, lp14, lq14, la15, lb15, lc15, ld15, le15, lf15, lg15, lh15, li15, ll15, lm15, ln15, la16, lb16, lc16, ld16, le16, lf16, lg16, lh16, li16, ll16, lm16, ln16, la17, lb17, lc17, ld17, le17, lf17, lg17, lh17, li17, ll17, lm17, ln17, la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e, ld16e, le16e, lf16e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e e ln17e.

También se describe sólo para información una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula II:



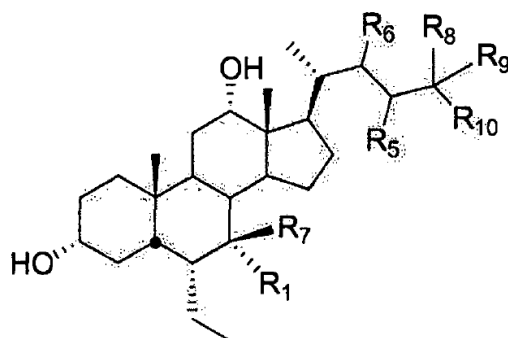
o una sal, solvato o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o halógeno; R₅ es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; y R₈ es hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido. En un aspecto, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

También se describe sólo para información un compuesto según la fórmula III:



o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que R₁ es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R₂ es hidrógeno o α -hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H o NH(CH₂)_nCO₂H; R₅ es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R₆ es hidrógeno o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; R₈ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido; R₉ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R₈ y R₉ tomados junto con el carbono al que están unidos forman un carbonilo; R₁₀ es R₃ o SO₃H; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

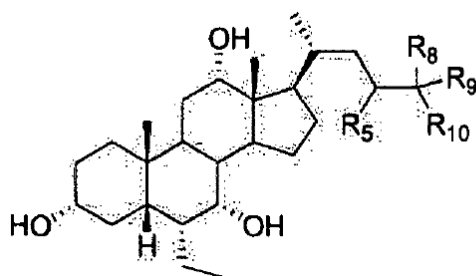
También se describe sólo para información un compuesto según la fórmula IIIA:



(IIIA)

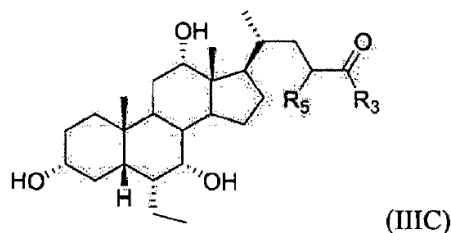
- o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que R_1 es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; R_7 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o hidroxilo; R_8 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido; R_9 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están unidos forman un carbonilo; R_{10} es R_3 o SO_3H ; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.
- 10 También se describe un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es hidroxilo. Otro aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están unidos forman un carbonilo y R_{10} es R_3 . En un aspecto, R_3 se selecciona de hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_6 es hidrógeno.
- 15 Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 es alquilo no sustituido. En un aspecto, R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_7 es hidrógeno.
- 20 Un aspecto incluye un compuesto seleccionado de los compuestos Ig3e, Ih3e, li3e, Ig4e, lh4e, li4e, Ig5e, lh5e e li5e.

También se describe sólo para información un compuesto según la fórmula IIIB:



(IIIB)

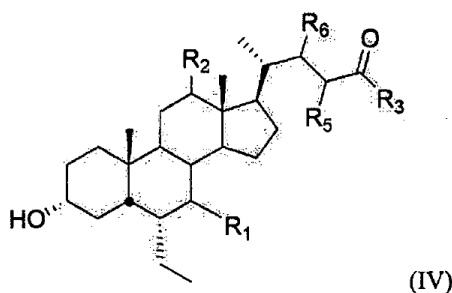
- 25 o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R_8 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido; R_9 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están unidos forman un carbonilo; R_{10} es R_3 o SO_3H ; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 es alquilo no sustituido. En un aspecto, R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están unidos forman un carbonilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_{10} es R_3 . En un aspecto, R_3 se selecciona de hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$.
- 30
- 35
- 40 También se describe sólo para información un compuesto según la fórmula IIIC:



o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 ó 5. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que R_3 se selecciona de hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 es alquilo no sustituido. En un aspecto, R_5 es metilo.

Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo.

También se describe sólo para información un compuesto según la fórmula IV:



o una sal, solvato o hidrato del mismo, en la que: R_1 es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R_2 es hidrógeno o α -hidroxilo; R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es arilo o alquilo sustituido o no sustituido; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo de tamaño de 3, 4, 5 ó 6 átomos; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y n es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

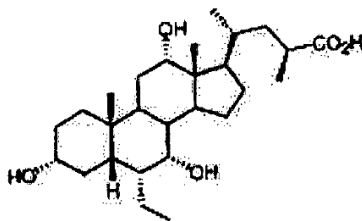
Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es hidroxilo. En otro aspecto, la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es alfa-hidroxilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es beta-hidroxilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es metilo.

Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 es alquilo no sustituido. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración R. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S.

Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_6 es hidrógeno. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_2 es hidrógeno. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_2 es alfa-hidroxilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_3 es hidroxilo.

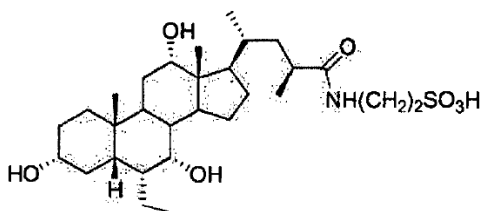
También se describe sólo para información un compuesto seleccionado de los compuestos Ib3e, Ic3e, Id3e, Ie3e, If3e, Ig3e, Ih3e, Ii3e, Il3e, Im3e, In3e, Ia4e, Ib4e, Ic4e, Id4e, Ie4e, If4e, Ig4e, Ih4e, Ii4e, Il4e, Im4e, In4e, Ia5e, Ib5e, Ic5e, Id5e, Ie5e, If5e, Ig5e, Ih5e, Ii5e, Il5e, Im5e, In5e, Ia9e, Ib9e, Ic9e, Id9e, Ie9e, If9e, Ig9e, Ih9e, Ii9e, Ij9e, Im9e, In9e, Ia10e, Ib10e, Ic10e, Id10e, Ie10e, If10e, Ig10e, Ih10e, Ii10e, Il10e, Im10e, In10e, Ia11e, Ib11e, Ic11e, Id11e, Ie11e, If11e, Ig11e, Ih11e, Ii11e, Il11e, Im11e, In11e, Ia15e, Ib15e, Ic15e, Id15e, Ie15e, If15e, Ig15e, Ih15e, Ii15e, Il15e, Im15e, In15e, Ia16e, Ib16e, Ic16e, Id16e, Ie16e, If16e, Ig16e, Ih16e, Ii16e, Il16e, Im16e, In16e, Ia17e, Ib17e, Ic17e, Id17e, Ie17e, If17e, Ig17e, Ih17e, Ii17e, Il17e, Im17e e In17e.

La invención incluye el compuesto lh3e:

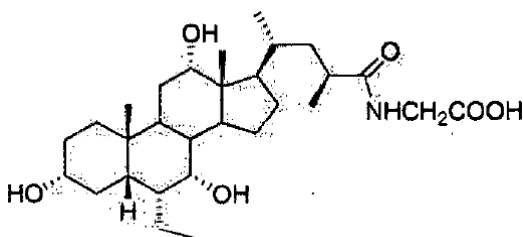


5 o una sal, hidrato o conjugado de glicina o taurina del mismo.

En un aspecto, la invención incluye el conjugado de taurina del compuesto lh3e:



10 o una sal o hidrato del mismo. En un aspecto, incluye el conjugado de glicina del compuesto lh3e:



15 o una sal o hidrato del mismo.

También se describen sólo para información los compuestos lb3e, lc3e, ld3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, ll3e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, li5e, ll5e, lm5e e ln5e.

También se describen sólo para información los compuestos la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, ll9e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e, le11e, lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e e ln11e.

También se describen sólo para información los compuestos la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e, ld16e, le16e, lf16e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e e ln17e.

30 En un aspecto, la invención incluye un compuesto de la invención, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la invención incluye una composición que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La presente invención también incluye compuestos radiomarcados de la invención. Pueden prepararse compuestos radiomarcados usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse compuestos radiomarcados de la invención haciendo reaccionar el compuesto de la invención con gas de tritio en presencia de un catalizador apropiado para producir compuestos radiomarcados que tienen las fórmulas descritas en el presente documento. En

una realización, los compuestos de la invención están tritiados.

Uso. La invención incluye el uso de un compuesto o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para un tratamiento o una prevención de una enfermedad en un sujeto.
5 La invención también incluye un compuesto de la invención o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un sujeto.

10 Un aspecto de la invención incluye el compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, en el que la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal.

15 En un aspecto, la invención incluye una enfermedad metabólica seleccionada de obesidad, diabetes, diabetes, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, incluyendo resistencia a la insulina pre-diabética, hipertensión y dislipidemia. En un aspecto, la enfermedad metabólica es obesidad. En otro aspecto, la enfermedad metabólica es diabetes. En un aspecto, la diabetes se selecciona de pre-diabetes y diabetes tipo II. En un aspecto, la enfermedad metabólica es síndrome metabólico. En un aspecto, la enfermedad metabólica es resistencia a la insulina. En un aspecto, la enfermedad metabólica es dislipidemia. En un aspecto, la enfermedad metabólica es diabetes. El término "diabetes" se refiere a un estado en el que el sujeto tiene tanto diabetes como peso excesivo.

20 En un aspecto, la invención incluye una enfermedad inflamatoria seleccionada de alergia, osteoartritis (OA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), apendicitis, asma bronquial, pancreatitis, erupción alérgica y psoriasis.

25 En un aspecto, la invención incluye una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo I.

30 En un aspecto, la invención incluye una enfermedad gastrointestinal seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome del intestino corto (colitis posradiación), colitis microscópica, síndrome del intestino irritable (malabsorción) y sobrecrecimiento bacteriano.

35 En un aspecto, la invención incluye enfermedad renal seleccionada de nefropatía diabética, insuficiencia renal crónica, nefritis glomerular, nefrosclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefropatía intersticial crónica y enfermedad de riñón poliquístico.

40 En un aspecto, la invención incluye cáncer seleccionado de cáncer colorrectal, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata e insulanoma.

45 En un aspecto, la invención incluye enfermedad hepática seleccionada de esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, hepatitis inducida por fármacos, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hipertensión portal, desaturación biliar, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Wilson, deficiencia de α 1-antitripsina, nutrición parenteral total (TPN), colelitiasis, colestasis asociada a TPN y septicemia.

50 En un aspecto, la invención incluye la enfermedad autoinmunitaria eritematosa.

55 En un aspecto, la invención incluye enfermedad cardíaca seleccionada de insuficiencia cardíaca congestiva, infarto del miocardio, aterosclerosis, angina de pecho, arteriosclerosis y enfermedad cerebrovascular (hemorragia, accidente cerebrovascular, infarto cerebrovascular).

60 En un aspecto, la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, en el que el compuesto de la invención es un agonista de TGR5. En un aspecto, la razón de selectividad de CE_{50} de TGR5 con respecto a CE_{50} de FXR es inferior a 0,05.

65 En un aspecto, la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, en el que el compuesto o la composición se administra al sujeto por vía oral, por vía parental, por vía intravenosa o por vía tópica. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

70 Un aspecto de la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención. En un aspecto, la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad mediante administración a un sujeto que lo necesita. La presente invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad administrando a un sujeto una cantidad profilácticamente eficaz del compuesto de la invención.

Los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías de administración de las composiciones farmacéuticas a las que se hace referencia son oral, subcutánea e intravenosa a dosis diarias de aproximadamente 0,01-5000 mg, preferiblemente 5-500 mg, del ligando de FXR para un adulto humano de 70 kg al día. La dosis apropiada puede administrarse en una dosis diaria individual o como dosis divididas presentadas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis al día.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la invención, se usan portadores farmacéuticamente aceptables e inertes. El portador farmacéutico puede ser o bien sólido o bien líquido. Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, cachets y supositorios. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material de encapsulación.

En polvos, el portador es en general un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido, por ejemplo, un compuesto de la invención. En comprimidos, el principio activo se mezcla con el portador que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

Para preparar composiciones farmacéuticas en forma de supositorios, en primer lugar se funde una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao y se dispersa el principio activo en la misma mediante, por ejemplo, agitación. Entonces se vierte la mezcla homogénea fundida en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 70% en peso del principio activo del compuesto de la invención. Los portadores adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como un portador que proporciona una cápsula en la que el compuesto de la invención (con o sin otros portadores) está rodeado por el portador, de modo que el portador está por tanto en asociación con el compuesto. De manera similar, también pueden incluirse cachets. Pueden usarse comprimidos, polvos, cachets y cápsulas como formas farmacéuticas sólidas adecuadas para la administración oral.

Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, disoluciones adecuadas para la administración oral o parenteral, suspensiones y emulsiones adecuadas para la administración oral. Disoluciones acuosas estériles del componente activo o disoluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua tamponada, solución salina, PBS, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para la administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, y agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes, y similares.

Pueden prepararse disoluciones estériles disolviendo el componente activo (por ejemplo, un compuesto de la invención) en el sistema de disolventes deseado, y entonces haciendo pasar la disolución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarlo o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado en condiciones estériles. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal como están, o liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará normalmente entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 y lo más preferiblemente entre 7 y 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en una cantidad suficiente para curar, revertir o al menos ralentizar o detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para curar, revertir o al menos ralentizar o detener parcialmente el síntoma de la enfermedad y sus complicaciones se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". En aplicaciones profilácticas, las composiciones se administran en una cantidad suficiente para prevenir los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para prevenir el síntoma de la enfermedad y sus complicaciones se define como una "dosis profilácticamente eficaz".

Las cantidades eficaces para su uso terapéutico dependerán de la gravedad de la enfermedad o estado y el peso y estado general del paciente, pero en general oscilan entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 2.000 mg del compuesto al día para un paciente de 70 kg, usándose más comúnmente dosificaciones de desde

aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 500 mg del compuesto al día para un paciente de 70 kg.

En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención a un paciente susceptible a o que de otra forma corre el riesgo de desarrollar una enfermedad, en una cantidad suficiente para retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad de este tipo se define que es una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas del compuesto dependen de nuevo del peso y estado de salud del paciente, pero en general oscilan entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 2.000 mg para un paciente de 70 kg al día, más comúnmente entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 500 mg para un paciente de 70 kg al día.

Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples de las composiciones con niveles de dosis y patrón que se seleccionan por el médico encargado. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para tratar o prevenir eficazmente la enfermedad en el paciente.

La invención también proporciona kits para la prevención o el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, la invención incluye un kit para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto, en el que el kit comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o hidrato del mismo. Los kits incluyen normalmente una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, así como material de información que contiene instrucciones de cómo dispensar la composición farmacéutica, incluyendo la descripción del tipo de pacientes que pueden tratarse, el horario (por ejemplo, dosis y frecuencia) y la vía de administración y similares.

Se muestran a continuación algunos compuestos descritos pero no reivindicados.

Los siguientes compuestos a continuación Ia-IR₅ pertenecen a al menos la fórmula I:

Ia: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Ib: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

Ic: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H

Id: R₁= β -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Ie: R₁= β -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

If: R₁= β -OH, R₂= H, R₃= OH, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H

Ig: R₁= α -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Ih: R₁= α -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

Ii: R₁= α -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H

Ij: R₁= β -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Im: R₁= β -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

In: R₁= β -OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H

Io: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Ip: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

Iq: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H

Ia1: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Ib1: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H

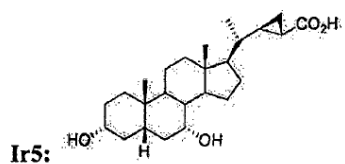
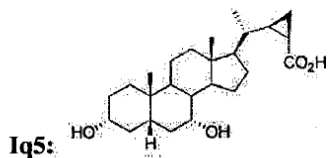
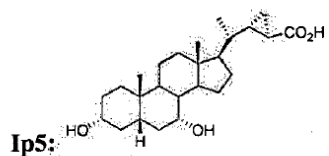
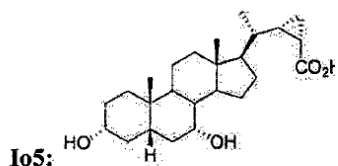
Ic1: R₁= α -OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H

Id1: R₁= β -OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Il5e: R₁= β-OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H

Im5e: R₁= β-OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H

5 In5e: R₁= β-OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H



10 Los siguientes compuestos In6-In11e pertenecen a al menos la fórmula IA:

Ia6: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=Me

Ib6: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me

15

Ic6: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me

Id6: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH

20 Ie6: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH

If6: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH

Ig6: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me

25

Ih6: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me

Ii6: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me

30 II6: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH

Im6: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH

In6: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH

35

Io6: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me

- Ip6: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- Iq6: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 5 Ia7: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ib7: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ic7: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 10 Id7: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Ie7: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 15 If7: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Ig7: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ih7: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 20 Ii7: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- II7: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 25 Im7: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- In7: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Io7: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 30 Ip7: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- Iq7: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 35 Ia8: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ib8: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ic8: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 40 Id8: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Ie8: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 45 If8: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Ig8: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- Ih8: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 50 Ii8: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- II8: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 55 Im8: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- In8: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- Io8: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 60 Ip8: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- Iq8: R₁= H, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me

- 1a9: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1b9: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 5 1c9: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1d9: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 10 1e9: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1f9: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1g9: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 15 1h9: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1i9: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 20 1l9: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1m9: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1n9: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 25 1a10: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1b10: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 30 1c10: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1d10: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1e10: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 35 1f10: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1g10: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=Me
- 40 1h10: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1i10: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1l10: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 45 1m10: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1n10: R₁= Me, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 50 1a11: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1b11: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 1c11: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 55 1d11: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1e11: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 1f11: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 60 1g11: R₁= OH, R₂= α -OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me

- lh11: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- li11: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 5 ll11: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- lm11: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 10 ln11: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- la9e: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- lb9e: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- 15 lc9e: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- ld9e: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- le9e: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 20 lf9e: R₁= Me, R₂= H, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- lg9e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 25 lh9e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- li9e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- ll9e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 30 lm9e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- ln9e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= OH, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 35 la10e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- lb10e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- lc10e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 40 ld10e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- le10e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- 45 lf10e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- lg10e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 50 lh10e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me
- li10e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me
- ll10e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH
- 55 lm10e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH
- ln10e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CH₂SO₃H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH
- la11e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me
- 60 lb11e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me

lc11e: R₁= OH, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me

ld11e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH

5 le11e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH

lf11e: R₁= Me, R₂= H, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=14, R₇=OH

10 lg11e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me

lh11e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me

li11e: R₁= OH, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me

15 ll11e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH

lm11e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH

20 ln11e: R₁= Me, R₂= α-OH, R₃= NHCH₂CO₂H, R₄= α-Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH

Los siguientes compuestos la12-In17e pertenecen a al menos la fórmula II:

la12: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

25 lb12: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

lc12: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

30 ld12: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

le12: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

lf12: R₁= Me, R₂=H, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

35 lg12: R₁= OH, R₂= α-OH; R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

lh12: R₁= OH, R₂= α-OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

40 li12: R₁= OH, R₂= α-OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

ll12: R₁= Me, R₂= α-OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

lm12: R₁= Me, R₂= α-OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

45 ln12: R₁= Me, R₂= α-OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

lo12: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

50 lp12: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

lq12: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

la13: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

55 lb13: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

lc13: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

60 ld13: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

le13: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

lf13: R₁= Me, R₂= H, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

- lg13: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 5 lh13: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- li13: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- ll13: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 10 lm13: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- ln13: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lo13: R₁= H, R₂=H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 15 lp13: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lq13: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 20 la14: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lb14: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lc14: R₁= OH, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 25 ld14: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- le14: R₁= Me, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 30 lf14: R₁= Me, R₂= H, R₄=H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lg14: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 35 lh14: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- li14: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- ll14: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 40 lm14: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- ln14: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lo14: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 45 lp14: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lq14: R₁= H, R₂= H, R₄= H, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 50 la15: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lb15: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lc15: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 55 ld15: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- le15: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 60 lf15: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lg15: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

- lh15: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
li15: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
5 ll15: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
lm15: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
10 ln15: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
la16: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
lb16: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
15 lc16: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
ld16: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
le16: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
20 lf16: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
lg16: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
25 lh16: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
li16: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
ll16: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
30 lm16: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
ln16: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
35 la17: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
lb17: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
lc17: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
40 ld17: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
le17: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
45 lf17: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
lg17: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
50 lh17: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
li17: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
ll17: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
55 lm17: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
ln17: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Me, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
60 la15e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
lb15e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

- lc15e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- ld15e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 5 le15e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lf15e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 10 lg15e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lh15e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- li15e: R₁=OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 15 ll15e: R₁=Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lm15e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 20 ln15e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- la16e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lb16e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 25 lc16e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- ld16e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- le16e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 30 lf16e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lg16e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 35 lh16e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- li16e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 40 ll16e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lm16e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- ln16e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 45 la17e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lb17e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 50 lc17e: R₁= OH, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- ld17e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- le17e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- 55 lf17e: R₁= Me, R₂= H, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H
- lg17e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- lh17e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H
- 60 li17e: R₁= OH, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇= Me, R₈=H

II17e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S,R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

Im17e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (S)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

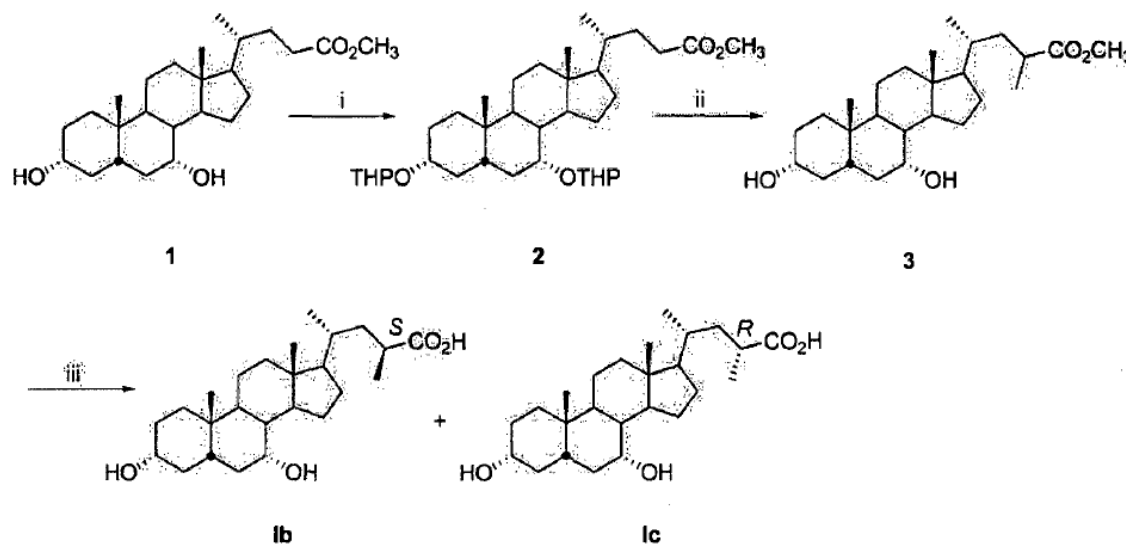
5 In17e: R₁= Me, R₂= α -OH, R₄= α -Et, R₅= (R)Me, R₆=H, R₇=OH, R₈=H

Ejemplo 1. Síntesis de moduladores de TGR5

10 Los compuestos de la invención, y derivados relacionados, pueden sintetizarse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Se describen a continuación métodos detallados para sintetizar compuestos descritos en el presente documento. Véanse, también, los documentos WO 02/072598, WO 2004/0007521, EP 1568706 y EP 135782. Excepto cuando un esquema o ejemplo se refiere a la síntesis o actividad de un compuesto de la invención, los esquemas y ejemplos dados a conocer en el presente documento son sólo para información y/o comparación.

15 En el caso del compuesto en el que R₁ es hidrógeno, R₂ y R₃ son hidroxilo y R₄ es un grupo alquilo inferior, el compuesto de fórmula (I) puede obtenerse según el siguiente esquema:

Esquema 1



20

Esquema 1

(i) 3,4-DHP, p-TSA, dioxano, t.a.; (ii) a) LDA, CH₃I, -78°C; b) HCl, CH₃OH, t.a.; iii) NaOH, CH₃OH, reflujo.

25

Se protegió quenodesoxicolanoato de metilo (1) en las posiciones 3 y 7 mediante tratamiento con 3,4-dihidro-2H-pirano en dioxano en presencia de una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico (p-TSA) dando el correspondiente análogo de 3 α ,7 α -tetrahidropiraniloxilo (2). La reacción de 2 con yoduro de metilo (o con un haluro de alquilo apropiado), a -78°C usando diisopropilamida de litio como base y tetrahidrofurano (THF) como disolvente, seguido por tratamiento con HCl metanólico proporcionó el correspondiente 23-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3). La hidrólisis con álcali del éster metílico 3 y la purificación mediante cromatografía ultrarrápida produjeron el ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib) y el ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ic) deseados.

30

35 Preparación de ácido 23(R) y 23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib, Ic)

a) 3 α ,7 α -Ditetrahidropiraniloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (2)

40

Se añadieron ácido p-toluenosulfónico (78 mg, 0,41 mmol), 3,4-dihidro-2H-pirano (20,1 ml, 0,098 mol) a una disolución de 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (1) (2,0 g, 4,9 mmol) en dioxano (6 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 min. Entonces se añadió H₂O (50 ml) y se concentró parcialmente la mezcla a vacío y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con salmuera (1 x 50 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre columna de gel de sílice. La elución con petróleo ligero/acetato de etilo 80/20 proporcionó 2,5 g del compuesto 2 puro (rendimiento del 90%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0,64 (s, 3H, CH₃-18), 0,89 (s, 3H, CH₃-19), 0,92 (d, 3H, CH₃-21),

45

3,31-3,67 (m, 4H, -CH₂OCH-), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,67 (m, 1H, CH-3), 3,88 (sa, 1H, CH-7), 4,67 (sa, 1H, -O-CH-O-), 4,73 (sa, 1H, -O-CH-O-).

b) 23(R,S)-Metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3)

5 Se añadieron gota a gota n-butil-litio (4,3 ml, disolución 2,2 M en hexano) a -78°C a una disolución de diisopropilamina (1,4 ml, 10,1 mmol) en THF seco (50 ml). Se mantuvo el sistema a -78°C durante 30 min. adicionales y, entonces, se añadió gota a gota 3 α ,7 α ,12 α -tetrahidropiranioloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (2) (1,8 g, 3,2 mmol) disuelto en THF seco (14 ml) a la mezcla. Tras 20 min. se añadió lentamente yoduro de metilo (1,4 ml, 22,0 mmol) disuelto en THF seco (7 ml) y se permitió que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente durante la noche. Se eliminaron los disolventes a vacío y se acidificó mediante HCl al 10% y se extrajo con EtOAc (5 x 50 ml), se lavó con disolución de Na₂S₂O₃ al 5% (2 x 50 ml), se secó (sobre Na₂SO₄ anhidro), se filtró y se evaporó a vacío. Entonces se trató el residuo bruto con una disolución de HCl 2 N en MeOH (50 ml) durante 12 h. Se evaporó el residuo a vacío y se llevó a EtOAc (100 ml), se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice. La elución con petróleo ligero/acetato de etilo 70/30 proporcionó 1,1 g (2,7 mmol) del compuesto 3 puro (rendimiento del 84%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0,62 (s, 3H, CH₃-18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,92 (d, 3H, CH₃-21), 2,38 (m, 1H, CH-23), 3,27-3,40 (m, 1H, CH-3), 3,55 (sa, 1H, CH-7), 3,63 (s, 3H, CO₂CH₃).

20 c) Ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib) y ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ic)

Se disolvió 23-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo 0,97 g (2,3 mmol) en MeOH (25 ml) y se le añadió NaOH al 10% en MeOH (5,7 ml, 14,2 mmol). Se sometió la mezcla a reflujo durante 16 h. Se acidificó la mezcla con HCl 3 N y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con salmuera (1 x 50 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice. La elución con CHCl₃:MeOH (95/5) proporcionó 1,5 g (65%) de ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico y 330 mg de ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico.

30 Ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib): pf: 125-126°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 0,44 (s, 3H, CH₃-18), 0,69 (s, 3H, CH₃-19), 0,73-0,76 (d, 3H CH₃-21), 0,93-0,97 (d, 3H, -CH₃), 2,36 (m, 1H, CH-23), 3,15-3,38 (m, 1H, CH-3), 3,62 (sa, 1H, CH-7). ¹³C-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 11,55, 18,43, 18,87, 20,49, 22,69, 28,15, 28,57, 30,14, 32,65, 34,43, 34,61, 34,94, 35,23, 37,06, 39,17, 39,60, 40,81, 41,40, 42,57, 46,54, 50,29, 56,63, 68,24, 71,62, 179,99.

35 Ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ic): pf: 163-164°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 0,43 (s, 3H, CH₃-18), 0,65 (s, 3H, CH₃-19), 0,65-0,69 (d, 3H CH₃-21), 0,83-0,86 (d, 3H, -CH₃), 2,20 (m, 1H, CH-23), 3,09-3,15 (m, 1H, CH-3), 3,58 (sa, 1H, CH-7). ¹³C-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 11,94, 16,40, 18,30, 20,93, 23,06, 23,89, 28,85, 30,52, 33,08, 34,16, 34,91, 35,38, 35,68, 37,14, 39,49, 39,64, 40,04, 40,17, 41,92, 43,05, 50,69, 57,10, 68,51, 72,01, 181,09.

40 **Ejemplo 2. Preparación de ácido 23(S)- y 23(R)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib3, Ic3)**

Se prepararon los siguientes compuestos mediante alquilación de ácido 6 α -metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico según el procedimiento del ejemplo 1.

45 Ácido 23(S)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib3): pf: 98-100°C. ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0,63 (s, 3H, CH₃-18), 0,89 (s, 3H, CH₃-19), 0,92-1,00 (m, 6H, CH₃-21 y CH₃-6), 1,15-1,19 (d, 3H, -CH₃), 2,45-2,73 (m, 1H, CH-23), 3,31-3,52 (m, 1H, CH-3), 3,58 (sa, 1H, CH-7). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 11,76, 15,72, 18,58, 18,88, 20,63, 23,11, 23,65, 28,19, 30,21, 30,47, 32,64, 33,79, 33,97, 34,61, 35,42, 35,66, 37,03, 39,60, 40,01, 40,71, 42,71, 47,35, 50,44, 56,60, 72,34, 72,87, 182,37.

55 Ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ic3): pf: 89-90°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,88 (s, 3H, CH₃-19), 0,88-0,92 (m, 3H, CH₃-6), 0,95-0,99 (d, 3H, CH₃-21), 1,08-1,14 (d, 3H-CH₃), 2,35 (m, 1H, CH-23), 3,29-3,48 (m, 1H, CH-3), 3,57 (sa, 1H, CH-7). ¹³C-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ : 11,70, 15,66, 16,02, 18,00, 20,61, 23,09, 23,60, 28,51, 30,39, 32,61, 33,72, 33,92, 35,38, 35,65, 36,33, 39,57, 39,94, 42,77, 47,30, 50,39, 56,53, 72,22, 72,83, 180,50.

Ejemplo 3. Preparación de ácido 23(R)- y 23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih, Ii)

60 Se prepararon los siguientes compuestos mediante alquilación de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico según el procedimiento del ejemplo 1.

Ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih): pf: 237-239°C. ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0,63 (s, 3H, CH₃-18),

0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,96-0,98 (m, 3H, CH₃-21), 1,07-1,11 (d, 3H, -CH₃), 2,44-2,73 (m, 1H, CH-23), 3,35-3,50 (m, 1H, CH-3), 3,82 (sa, 1H, CH-7) 3,95 (sa, 1H, CH-12). ¹³C-RMN (DMSO) δ: 12,72, 17,60, 19,24, 19,24, 23,00, 23,19, 26,59, 27,78, 28,88, 30,72, 34,77, 35,22, 35,66, 37,19, 41,84, 46,19, 47,27, 49,01, 66,69, 70,88, 71,45, 178,25.

- 5 Ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (li): pf: 221-223°C. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 0,63 (s, 3H, CH₃-18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,96-0,98 (m, 3H, CH₃-21), 1,07-1,11 (d, 3H, -CH₃), 2,44-2,73 (m, 1H, CH-23), 3,35-3,50 (m, 1H, CH-3), 3,82 (sa, 1H, CH-7) 3,95 (sa, 1H, CH-12). ¹³C-RMN (DMSO) δ: 12,76, 16,88, 17,31, 23,04, 23,24, 26,62, 28,12, 28,94, 30,81, 33,97, 34,80, 35,28, 35,71, 37,20, 41,85, 46,29, 47,44, 66,67, 70,86, 71,45, 178,77.

10 **Ejemplo 4. Preparación de ácido 23(R)- y 23(S)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih₃, li3)**

Se prepararon los siguientes compuestos mediante alquilación de ácido 6 α -metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico según el procedimiento del ejemplo 1.

- 15 Ácido 23(S)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih₃): pf: 131-134°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ: 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,97-1,00 (m, 3H, CH₃-21), 1,14-1,18 (d, 3H, -CH₃), 1,23 (m, 1H, CH-6), 2,52 (m, 1H, CH-23), 3,32-3,50 (m, 1H, CH-3), 3,55 (sa, 1H, CH-7) 3,94 (sa, 1H, CH-12). ¹³C-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ: 12,43, 145,66, 17,62, 18,92, 22,70, 23,14, 26,21, 27,45, 28,01, 30,03, 33,44, 34,11, 34,42, 35,30, 36,71, 39,97, 40,45, 41,73, 46,45, 47,25, 72,13, 72,76, 73,01, 180,53.

- 20 Ácido 23(R)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (li3): pf: 109-110°C. ¹H-RMN (CD₃OD) δ: 0,72 (s, 3H, CH₃-18), 0,91 (s, 3H, CH₃-19), 1,07-1,11 (m, 6H, -CH₃ y CH₃-21), 2,37-2,53 (m, 1H, CH-23), 3,15-3,42 (m, 1H, CH-3), 3,53 (sa, 1H, CH-7) 3,97 (sa, 1H, CH-12). ¹³C-RMN (CD₃OD) δ: 11,61, 15,04, 15,32, 16,15, 22,04, 22,75, 26,27, 27,62, 28,18, 29,61, 32,91, 33,74, 34,31, 35,06, 35,18, 36,56, 39,70, 40,25, 41,68, 46,19, 46,31, 71,76, 71,77, 72,62, 180,11.

- 25

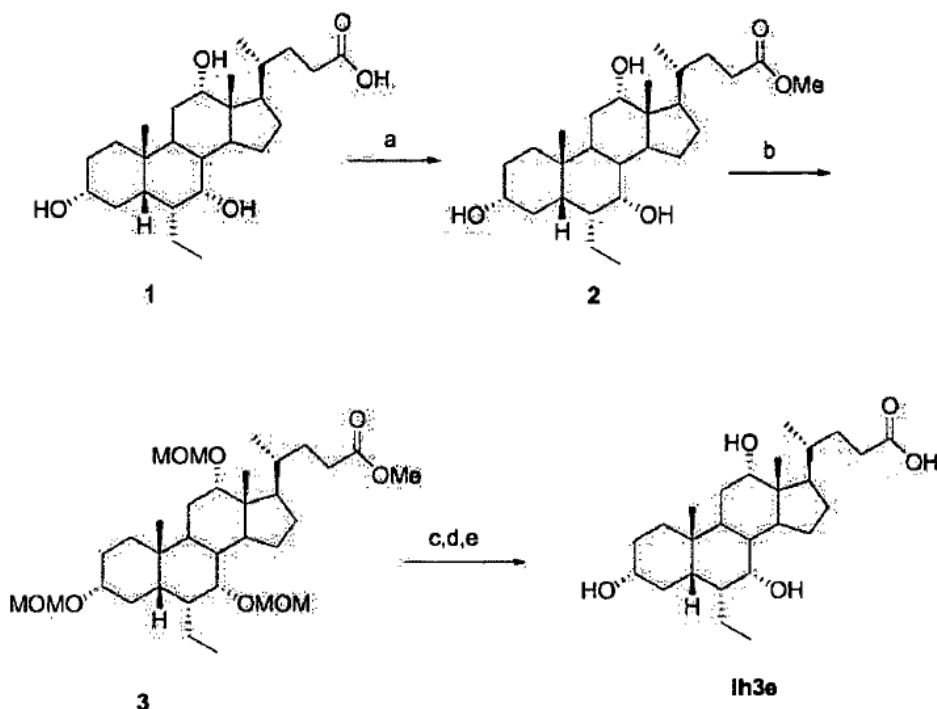
Ejemplo 5. Preparación de ácido 23(R)- y 23(S)-metil-3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico (Ip, Iq)

- 30 Se prepararon los siguientes compuestos mediante alquilación de ácido 3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico según el procedimiento del ejemplo 1.

- 35 Ácido 23(S)-metil-3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico (Ip): pf: 161-162°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ: 0,60 (s, 3H, CH₃-18), 0,88 (s, 3H, CH₃-19), 0,92-1,01 (m, 3H, CH₃-21), 1,13-1,16 (d, 3H, -CH₃), 2,55 (m, 1H, CH-23), 3,60 (m, 1H, CH-3). ¹³C-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ: 11,97, 18,52, 18,87, 20,73, 23,30, 24,14, 26,34, 27,10, 28,15, 30,18, 34,48, 34,50, 35,23, 35,74, 36,06, 37,01, 40,13, 40,34, 40,74, 41,99, 42,68, 56,43, 56,75, 71,70, 181,42.

- 40 Ácido 23(R)-metil-3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico (Iq): pf: 152-153°C. ¹H-RMN (CDCl₃+CD₃OD) δ: 0,63 (s, 3H, CH₃-18), 0,89 (s, 3H, CH₃-19), 0,94-1,03 (m, 3H, CH₃-21), 2,45 (m, 1H, CH-23), 3,59 (m, 1H, CH-3). ¹³C-RMN (CD₃OD) δ: 11,98, 15,97, 18,00, 20,75, 23,31, 24,14, 26,34, 27,11, 28,48, 30,26, 33,68, 34,50, 35,26, 35,77, 36,15, 36,46, 39,59, 40,13, 40,36, 42,01, 42,79, 56,45, 56,76, 71,71, 181,02.

Ejemplo 6. Preparación de ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (Ih3e)



Reactivos y condiciones: a) pTSA, MeOH, ultrasonidos, cuant. b) $\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$, P_2O_5 , CHCl_3 , 97%. c) LDA, MeI, -78°C . d) MeOH, HCl, 45°C . e) MeOH, NaOH, 45°C , 41%. Rendimiento global: 39,7%.

5

Síntesis de 23(S)-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oato de metilo (2):

A una disolución de 1 (2,78 g, 6,37 mmol) en MeOH (120 ml), se le añadió pTSA (0,12 g, 0,63 mmol), y se trató la mezcla con ultrasonidos durante 90'. Entonces se concentró la mezcla a presión reducida, y se diluyó el residuo resultante con AcOEt (120 ml), se lavó con H_2O (3x100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida dando 2 (rendimiento cuantitativo) que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0,63 (3H, s, 18- CH_3), 0,84-0,88 (6H, s, 19- CH_3 + CH_3CH_2), 0,97 (3H, d, $J = 6,62$ Hz, 21- CH_3), 3,30 (1H, m, 3-CH), 3,48 (3H, s, COOCH_3), 3,62 (1H, m, 7-CH), 3,97 (1H, m, 12-CH).

10

15 3 α ,7 α ,12 α -Trihidroxi-6 α -etil-5 β -24-oato de metilo (3):

A una disolución de 2 (2,50 g, 5,55 mmol) en CHCl_3 (60 ml) y dimetoximetano (34,10 ml, 166,66 mmol), se le añadió P_2O_5 en porciones (14,18 g, 99,90 mmol), y se agitó mecánicamente la suspensión resultante durante 45'. Entonces se decantó la mezcla y se trató la fase orgánica con NaHCO_3 al 10% (50 ml) durante 10'. Entonces se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con CHCl_3 (3x50 ml). Se lavaron las fases orgánicas recogidas con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida dando 3 (3,14 g, 97%), que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0,67 (3H, s, 18- CH_3), 0,88-1,04 (9H, m, 19- CH_3 + CH_3CH_2 + 21- CH_3), 3,30 (1H, m, 3-CH), 3,30-3,40 (7H, m, 3-CH + 2 x $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$), 3,45 (3H, s, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$), 3,50 (1H, m, 7-CH), 3,66 (3H, s, COOCH_3), 3,79 (1H, m, 12-CH), 4,57-4,75 (6H, m, 3 x $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$).

20

25

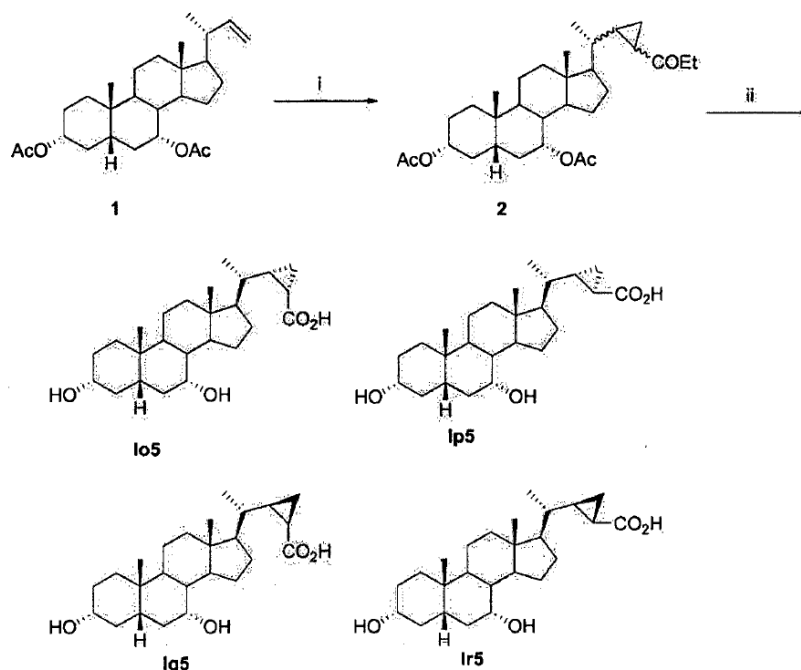
Ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (1h3e):

A una disolución de diisopropilamina (0,56 ml, 4,026 mmol) en THF recién destilado (15 ml) enfriada a -78°C y bajo atmósfera de N_2 , se le añadió gota a gota $^{11}\text{BuLi}$ 2,5 N en hexano (1,53 ml, 3,840 mmol). Se agitó la reacción a -78°C durante 30' y entonces se añadió gota a gota una disolución de 3 (350 mg, 0,601 mmol) disuelta en THF recién destilado (7 ml). Se agitó la disolución resultante a -78° durante 90'. Se añadió yodometano (0,56 ml, 9,015 mmol), se agitó la mezcla de reacción a -78°C durante 60' y entonces se calentó lentamente hasta temperatura ambiente durante la noche. Entonces se concentró la mezcla a presión reducida, y se diluyó el residuo resultante con H_2O (30 ml) y se extrajo con AcOEt (3x30 ml). Se lavaron las fases orgánicas recogidas con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida. Entonces se trató el residuo con una disolución de MeOH/HCl al 37% (20 ml, 20:1 vol/vol) a 45°C durante 8 h. Se concentró la mezcla a presión reducida, y se diluyó el residuo resultante con H_2O (30 ml) y se extrajo con AcOEt (3x30 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión

35

reducida. Se trató el residuo resultante con una disolución de NaOH al 10% en MeOH (15 ml) a 45°C durante 24 h. Entonces se concentró la mezcla a presión reducida, y se diluyó el residuo resultante con H₂O (20 ml), se lavó con PR₂O (3x15 ml), se acidificó con HCl 3 N y finalmente se extrajo con CHCl₃ (3x20 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía de media presión (columna: "RP-1 8 Lobar B", MeOH/H₂O desde 5:5 hasta 6:4,50 psi) dando 4 (47 mg, 41%). Pf: 195-197°C ¹H-RMN (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 0,63 (3H, s, 18-CH₃), 0,84-0,88 (6H, m, 19-CH₃ + CH₃CH₂), 0,98 (3H, d, J = 6,60 Hz, 21-CH₃), 1,10 (3H, d, J = 6,80 Hz, CH(CH₃)COOH), 2,61 (m, 1H, CH(CH₃)COOH), 3,3 (1H, m, 3-CH), 3,65 (1H, m, 7-CH), 3,92 (1H, m, 12-CH). ¹³C-RMN (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 11,51, 12,34, 17,52, 19,19, 22,09, 22,67, 23,11, 26,65, 27,40, 28,05, 29,83, 33,31, 34,56, 35,06, 35,40, 38,67, 39,90, 41,11, 41,39, 41,69, 45,10, 46,39, 47,32, 70,65, 71,79, 72,90, 182,07.

Ejemplo 7. Síntesis de los compuestos lo5, lp5, lq5 e lr5



(i) EDA, RH₂(OAc)₄, CH₂Cl₂, temperatura ambiente; (ii) (a) NaOH, EtOH, reflujo, (b) MPLC

Ácidos 3α,7α-dihidroxi-22,23-metilen-5β-colan-24-oicos (lo5, lp5, lq5 e lr5).

Se añadió lentamente gota a gota diazoacetato de etilo (0,478 g, 1,19 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 ml) a una suspensión con agitación de 3α,7α-diacetoxi-5-norcolan-22,23-eno (1) (0,6 g, 1,39 mmol) en presencia de tetraacetato de didio (II) (9 mg, 0,02 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó con H₂O (20 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó a vacío, proporcionando así una mezcla de los cuatro ésteres diastereoisoméricos 2. Se disolvieron sucesivamente los ésteres 2 en EtOH (15 ml) y se trataron con una disolución de NaOH 10 N (10 ml) a reflujo durante 4 h, se enfriaron, se vertieron sobre H₂O fría (50 ml), se acidificaron con HCl 2 N y se extrajeron con EtOAc (3 x 15 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (10 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío. Se sometió a cromatografía el residuo sobre gel de sílice. La elución con CH₂Cl₂/MeOH 96/4 con AcOH al 0,1% proporcionó 0,087 g (rendimiento del 15%) de ácido (22S,23S)-3α,7α-dihidroxi-22,23-metilen-5β-colan-24-oico (lo5) y 0,065 g (rendimiento del 11,5%) de ácido (22R,23R)-3α,7α-dihidroxi-22,23-metilen-5β-colan-24-oico (lq5). La elución con CH₂Cl₂/MeOH 95,5/4,5 con AcOH al 0,1% proporcionó 0,18 g (rendimiento del 32%) de ácido (22S,23R)-3α,7α-dihidroxi-22,23-metilen-5β-colan-24-oico (lp5) y 0,15 g (rendimiento del 26,7%) de ácido (22R,23S)-3α,7α-dihidroxi-22,23-metilen-5β-colan-24-oico (lr5) como sólidos blancos.

lo5. Pf: 148-150°C [α]_D²⁰+5,16 (c 1, EtOH). ¹H-RMN (CD₃OD y CDCl₃) δ: 0,67 (s, 3H, 18-CH₃), 0,90 (s, 3H, 19-CH₃), 0,96 (d, J=6,68 Hz, 3H, 21-CH₃), 3,40-3,50 (m, 1H, 3-CH), 3,85 (m, 1H, 7-CH). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 12,20, 16,80, 17,08, 20,80, 21,00, 23,15, 24,10, 28,30, 30,80, 31,30, 33,30, 34,80, 34,90, 35,40, 35,70, 39,80, 39,90, 41,80, 43,40, 50,55, 58,20, 68,90, 72,30, 177,00.

lq5. PF: >230°C. $[\alpha]_D^{20}$ -38,19 (c 1.1, CH₃Cl/MeOH 1:1). ¹H-RMN (CD₃OD y CDCl₃) δ: 0,50 (s, 3H, 18-CH₃), 0,86 (s, 3H, 19-CH₃), 0,96 (d, J= 6,40 Hz, 3H, 21-CH₃), 3,40-3,60 (m, 1H, 3-CH), 3,80 (m, 1H, 7-CH). ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 12,00, 12,50, 20,90, 21,00, 21,10, 23,00, 23,80, 27,10, 30,50, 31,00, 32,10, 33,10, 34,80, 35,30, 35,60, 39,50, 39,70, 39,85, 41,80, 43,00, 50,40, 58,50, 68,60, 72,00, 176,90.

lp5. Pf: 221-225°C. $[\alpha]_D^{20}$ -40,22 (c1, EtOH). ¹H-RMN (CD₃OD y CDCl₃) δ: 0,56 (s, 3H, 18-CH₃), 0,86 (s, 3H, 19-CH₃), 1,16 (d, J= 6,60 Hz, 3H, 21-CH₃), 3,10-3,30 (m, 1H, 3-CH), 3,85 (m, 1H, 7-CH). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 12,10, 18,30, 18,55, 20,00, 20,90, 23,10, 24,00, 28,20, 30,70, 31,70, 33,20, 34,80, 35,40, 35,70, 39,80, 40,10, 41,80, 43,15, 50,40, 57,80, 68,90, 72,20, 178,40.

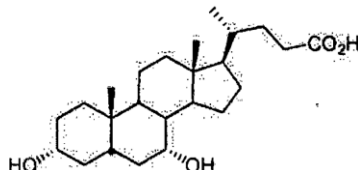
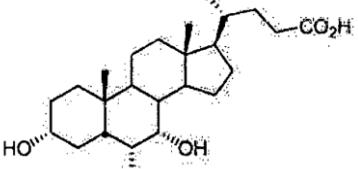
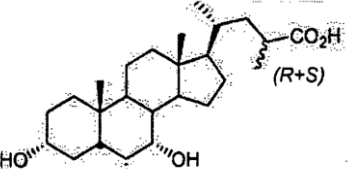
lr₅. Pf: 136-140°C. $[\alpha]_D^{20}$ +13,66 (c 1, EtOH). ¹H-RMN (CD₃OD y CDCl₃) δ: 0,56 (s, 3H, 18-CH₃), 0,86 (s, 3H, 19-CH₃), 0,96 (d, J=6,66 Hz, 3H, 21-CH₃), 3,40-3,60 (m, 1H, 3-CH), 3,80 (m, 1H, 7-CH). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 12,00, 13,50, 19,90, 20,90, 22,50, 23,10, 24,00, 28,00, 30,70, 31,60, 33,20, 34,90, 35,40, 35,65, 39,70, 39,73, 41,80, 43,10, 50,40, 58,00, 68,80, 72,20, 177,60.

Ejemplo 8. Actividad de FXR y TGR5 *in vitro*

Se evaluaron la potencia y eficacia de los compuestos de la invención en el receptor TGR5 usando ensayos *in vitro*.

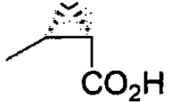
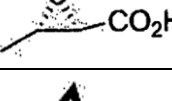
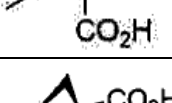
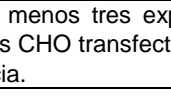
La tabla 1 muestra que los compuestos de la invención son moduladores de TGR5 potentes y selectivos. La introducción de un grupo alquilo en la posición C-23 del ácido biliar proporciona selectividad por el receptor TGR5 con respecto a FXR. Esto es evidente por la observación de los resultados biológicos obtenidos para CDCA, 6-MeCDCA y 6,23-diMe-CDCA (mezcla de isómeros 23-R,S) en FXR y TGR5 tal como se muestra en la tabla 1. 6,23-diMe-CDCA es 100 veces más potente en el receptor TGR5 con respecto al receptor FXR. Para una descripción de la unión al receptor TGR5 usando un ensayo *in vitro*, véase, por ejemplo, Kawamata, J. Biol. Chem 2003, vol. 278 n.º 11, págs. 9435-9440). Se sometió a ensayo la actividad en FXR mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para determinar el reclutamiento del péptido SRC-1 a FXR humano usando un ELISA sin células. Véase, Blanchard *et al.* documento WO 00/37077.

Tabla 1: CE₅₀ (μM) de compuestos de ejemplo en el receptor TGR5 y FXR

Compuesto	Estructura	Datos de FXR	Datos de TGR5
CDCA (ácido quenodesoxicólico)		CE ₅₀ : 8,6 μM Eficacia: 100%	CE ₅₀ : 4,0 μM Eficacia: 100%
6α-MeCDCA		CE ₅₀ : 0,21 μM Eficacia: 148%	CE ₅₀ : 0,37 μM Eficacia: 119%
23(R+S)-Me-6MeCDCA (I3a)		CE ₅₀ : 15,62 μM Eficacia: 60%	CE ₅₀ : 0,11 μM Eficacia: 123%

Las tablas 2 y 3 muestran compuestos adicionales evaluados para determinar la actividad en TGR5. Se determinó la actividad luciferasa en células CHO que expresan de manera estable hTGR5 o cotransfectadas de manera transitoria con un vector de expresión de hTGR5 y un gen indicador de luciferasa dirigido por un elemento de respuesta a AMPc (CRE). Se sometieron adicionalmente algunos de los compuestos a un ensayo de indicador de luciferasa para puntuar su capacidad para activar el receptor FXR nuclear de ácidos biliares.

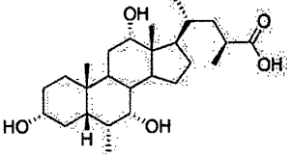
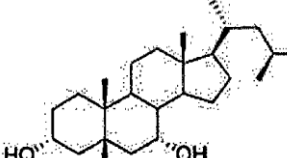
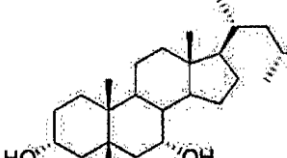
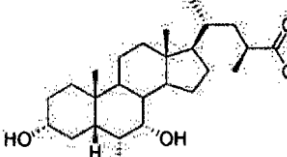
Tabla 2.

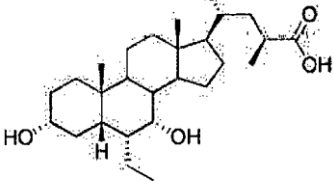
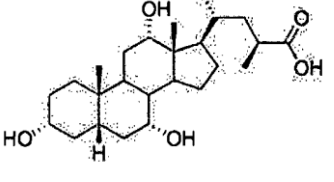
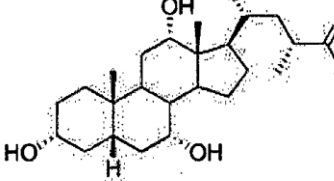
Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	CE ₅₀ de TGR5	Eficacia en TGR5
22S,23S-CCDCA* (I _{o5})	α-OH	-H		1,33	110
22S,23R-CCDCA* (I _{p5})	α-OH	-H		2,91	102
22R,23R-CCDCA* (I _{q5})	α-OH			75,7	5
22R,23S-CCDCA* (I _{r5})	α-OH	-H		>100	4

*Los datos representan valores promedio de al menos tres experimentos independientes de ensayos de indicador de luciferasa dirigido por CRE en células CHO transfectadas con TGR5. Las unidades son μM para CE₅₀ y el % del valor de LCA 10 μM para la eficacia.

5

Tabla 3. Actividades^a de TGR5 y FXR

Nombre	CE ₅₀ de FXR, μM	Eficacia en FXR	CE ₅₀ de TGR5, μM	Eficacia en TGR5	Razón de CE ₅₀ (TGR5/FXR)
 Ib3	22,8	0,76	0,8	75,6	0,035
 Ib	>100	0 ^b	3,58	110	0,036
 Ic	10,5	49	25,5	100	2,4
 Ib3	11,6	23	0,140	105	0,012

 <p>Ib3e</p>	3,97	64,4	0,51	165	0,128
 <p>Ih</p>			4,39	105	
 <p>Ii</p>			>51,9	75b	
<p>^a Los datos representan valores promedio de al menos tres experimentos independientes. El valor para la eficacia se expresa como el % de actividad frente a LCA 10 μM (TGR5) o 6ECDCA 10 μM (FXR).</p> <p>^b Nivel de activación de meseta no alcanzado; la concentración máxima sometida a prueba fue 125 μM para Ib y 100 μM para Ii.</p>					

Los datos en las tablas 2 y 3 pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe a continuación.

5 Plásmidos

Se obtuvieron el clon MGC:40597 de la colección de genes de mamíferos del NIH (también denominado pCMVSPORT6/hTGR5 o pTGR5) y pcDNA3.1(+) de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se obtuvieron pCRE-Luc y pCMV β de Clontech (Palo Alto, CA). pCMX-hFXR y pCMX-mRXR fueron amables regalos del Dr. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center). pEcREX7-Luc fue un amable regalo del Dr. Richard A. Heyman (X-ceptor Therapeutics, CA).

Cultivo celular

Se obtuvieron células de ovario de hámster chino (CHO), células NCI-H716, células Hep3B y células COS1 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). El medio de cultivo celular, el suero y los complementos eran de Invitrogen o Sigma-Aldrich. Se mantuvieron todas las células CHO en medio esencial mínimo α (α -MEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (v/v) y aminoácidos no esenciales (NEAA) 100 μ M. Se mantuvieron las células NCI-H716 en suspensión en RPMI-1640 complementado con FBS al 10%(v/v), HEPES 10 μ M y piruvato de sodio 1 μ M. Se mantuvieron las células Hep3B en medio de Eagle complementado con FBS al 10%(v/v) y NEAA 100 μ M. Se mantuvieron las células COS1 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con FBS al 10% (v/v). Se complementó todo el medio de cultivo celular con 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina. Se hicieron crecer las células a 37°C en una atmósfera de un 5% de CO₂, se pasaron cada 2-6 días y se sembraron en placa nuevamente para cada experimento.

Transfecciones transitorias

Se sembraron en placa células CHO en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo, se cultivaron durante 24 h y entonces se transfectaron con 150 ng de plásmido de expresión de TGR5 humano (h) (pCMVSPORT6/hTGR5) y 100 ng de plásmido de indicador de luciferasa dirigido por elemento de respuesta a AMPc

(CRE) (pCRE-Luc) en cada pocillo usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Tras 6 h de incubación, se lavaron las células una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se intercambió el medio por DMEM que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% (p/v). Tras la incubación durante otras 18 h, se trataron las células durante 5 h con diferentes concentraciones de cada compuesto en DMEM nuevo que contenía BSA al 0,1% (p/v). Tras el tratamiento, se lisaron las células con 50 μ l de tampón de lisis (Tris-Cl 25 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, ditiotreitól (DTT) 1 mM, glicerol al 10% (v/v) y triton X-100 al 1% (v/v)) mediante un ciclo de congelación-descongelación y se sometieron a ensayos de luciferasa tal como se describe a continuación.

Se sembraron en placa células COS1 en placas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en DMEM complementado con FBS al 10% (v/v) tratado con carbón vegetal, se cultivaron durante 24 h y entonces se transfectaron con 25 ng de plásmido de expresión de hFXR (pCMX-hFXR), 25 ng de plásmido de expresión de receptor α retinoide X (RXR α) de ratón (m) (pCMX-mRXR α), 50 ng de plásmido de indicador (pEcREx7-Luc) y 50 ng de pCMV β como control interno en cada pocillo, usando el reactivo Lipofectamine 2000. Tras 24 h, se lavaron las células dos veces con PBS y se trataron con diferentes concentraciones de cada compuesto en DMEM fresco complementado con FBS tratado con carbón vegetal al 10% (v/v) durante 24 h. Tras el tratamiento, se lisaron las células con 50 μ l de tampón de lisis mediante un ciclo de congelación-descongelación y se sometieron a ensayos de tanto luciferasa como β -galactosidasa tal como se describe a continuación. Se determinaron los valores de luciferasa normalizados dividiendo la actividad luciferasa por la actividad β -galactosidasa.

Ensayos de luciferasa y β -galactosidasa

Para los ensayos de luciferasa, se mezclaron 20 μ l de lisado celular con 100 μ l de tampón de reacción de luciferasa [luciferina 235 μ M, ATP 265 μ M y coenzima A (CoA) 135 μ M] y se determinó la luminiscencia con CentroXS3 LB960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Para los ensayos de β -galactosidasa, se mezclaron 10 μ l de lisado celular con 100 μ l de tampón Z [Na₂HPO₄ 60 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM y o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 0,75 mg/ml] y se incubaron a 37°C durante 0,5-3h. Se detuvieron las reacciones añadiendo 50 μ l de tampón de detención (Na₂CO₃ 1 M) y se determinó la densidad óptica a 420 nm.

Establecimiento de células CHO que expresan de manera estable TGR5 humano (células CHO-TGR5)

Se transfectaron células CHO con 3,8 μ g del plásmido de expresión de hTGR5 (pCMVSPORT6/hTGR5), 3,8 μ g de plásmido de indicador de luciferasa dirigido por CRE (pCRE-Luc) y 0,4 μ g de plásmido de expresión de gen resistente a neomicina [pcDNA3.1(+)] usando Lipofectamine 2000. Se seleccionaron los transfectantes con sulfato de G418 400 μ g/ml y se hicieron crecer clones individuales en placas de 96 pocillos, independientemente. Se examinaron líneas de células CHO que expresan TGR5 mediante tratamientos con LCA, seguido por ensayos de luciferasa.

Análisis de la producción de AMPc

Se sembraron en placa células NCI-H716 en placas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel 0,75 mg/ml (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante justo antes de su uso, a una densidad de 6×10^4 células/pocillo en DMEM complementado con FBS al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml y sulfato de estreptomocina 100 μ g/ml, y se cultivaron durante 24 h, lo que permitió la adhesión celular al fondo de la placa. Se sembraron en placa células CHO-TGR5 en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo en α -MEM complementado con FBS al 10%(v/v), NEAA 100 μ M, penicilina 100 unidades/ml y 100 μ g de sulfato de estreptomocina, y se cultivaron durante 24 h. Se lavaron las células dos veces con PBS y se intercambió el medio por medio de ensayo de AMPc [DMEM que contenía BSA al 0,1% (p/v) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM]. Tras la incubación durante 30 minutos a 37°C, se trataron las células con cada compuesto en medio de ensayo de AMPc nuevo durante 30 minutos. Tras el tratamiento, se descartó el medio y se determinaron las cantidades de AMPc usando kit de examen de AMPc (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante.

Concentraciones eficaces al 50% (CE₅₀) y determinación de la eficacia

Se realizaron ensayos por triplicado o cuadruplicado para cada condición. Se determinaron los valores de CE₅₀ mediante análisis de probit. Se determinó la eficacia calculando porcentajes del valor de LCA 10 μ M para el estudio de agonistas de TGR5 y el valor de 6 α -Et-CDCA 10 μ M para el estudio de agonistas de FXR, respectivamente. Tras restar el valor promedio de la condición basal (tratado con vehículo), se aplicaron los valores a determinaciones de CE₅₀ y/o eficacia. Se realizaron el cálculo de CE₅₀ promedio y la comparación de la CE₅₀ entre diferentes compuestos tras la transformación logarítmica.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de la t de Student y se consideró p<0,05 estadísticamente

significativo.

Tabla 3A.

Compuesto (patrón de referencia)		Ensayo Alphascreen	FRET (AMPc) NCHH716	Ensayo de transactivación	FRET-AMPc en células Hek293 que sobreexpresan TGR5
		CE ₅₀ en hFXR (CDCA = 10-20 μM) (μM)	CE ₅₀ en hTGR ₅ (LCA = 4-8 μM) (μM)	CE ₅₀ en hTGR ₅ (LCA = 16 μM) (μM)	CE ₅₀ en hTGR ₅ (LCA = 0,35 μM) (μM)
1H3e		175	0,9	1,7	0,001
Se generaron los datos en la tabla 3A usando métodos descritos a continuación.					

5

Ensayo de FRET (detección de niveles de AMPc intracelular).

Se realizó el ensayo de unión a receptor midiendo el nivel de AMP cíclico (AMPc) usando el ensayo de FRET. Se sembraron en placa líneas de células intestinales humanas (NCI-H716) en placas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel 0,75 mg/ml (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante justo antes de su uso, a una densidad de 12×10^3 células/pocillo en DMEM complementado con FBS al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml y sulfato de estreptomicina 100 μg/ml, y se cultivaron durante 24 h, lo que permitió la adhesión celular al fondo de la placa. Se lavaron las células dos veces con PBS y se intercambió el medio por medio de ensayo de AMPc [OPTIMEM que contenía BSA al 0,1% (p/v) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 1 mM]. Tras la incubación durante 60 minutos a 37°C, se trataron las células con concentraciones crecientes de compuesto lh3 en tampón de estimulación (HEPES 5 mM, BSA al 0,1% en HBSS pH 7,4) que contenía el quelato de europio-estreptavidina y el anticuerpo anti-AMPc conjugado con ALEXA Fluor 647 (PerkinElmer) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determinó el nivel de AMPc intracelular con el kit Lance (PerkinElmer). Se usó ácido litocólico como ligando control. Se usó factor Z' para validar los ensayos. Se realizaron curvas de regresión no lineal, sin restricciones, usando una ecuación de cuatro parámetros y el software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE₅₀.

10

15

20

Ensayo Alphascreen

25

30

35

40

45

Se sometió a ensayo la actividad en FXR usando tecnología Alphascreen en un ensayo de coactivador de reclutamiento. AlphaScreen es un ensayo químico basado en perlas usado para estudiar interacciones biomoleculares. La unión de moléculas capturadas sobre las perlas conduce a una transferencia de energía de una perla a otra, produciendo en última instancia una señal luminiscente. Cuando las parejas interactúan, la energía química se transfiere desde perlas donadoras hastaceptoras y se produce una señal. Tras la estimulación con ácidos biliares, el GST-FXR-LBD interactúa con el péptido Src-1. Se usaron perlasceptoras recubiertas con anticuerpo anti-GST para capturar la fusión con GST FXR-LBD mientras que se capturó el péptido SRC-1 biotinilado por las perlas donadoras de estreptavidina. Tras la iluminación a 680 nm, se transfiere energía química desde perlas donadoras hastaceptoras a través del complejo estreptavidina-donador/Src-1-biotina/GSTFXR-LBD/anti-GST-aceptor y se produce una señal. Se realizó el ensayo en placas Optiplat de 384 pocillos blancas, de bajo volumen (PerkinElmer) usando un volumen final de 25 μl que contenía concentraciones finales de 10 nM de proteína FXR-LBD etiquetada con GST purificada, péptido Src-1 biotinilado 30 nM, perlasceptoras anti-GST 20 μg/ml y 10 μg/ml de perla donadora de estreptavidina (PerkinElmer). El tampón de ensayo contenía Tris 50 mM (pH 7,4), KCl 50 mM, BSA al 0,1% y DTT 1 mM. Se fijaron los tiempos de estimulación con 1 μl de ligandos (solubilizados en DMSO al 100%) a 30' a temperatura ambiente. Se mantuvo la concentración de DMSO en cada pocillo a una concentración final del 4%. Tras la adición de la mezcla de detección (perlasceptoras y donadoras) se incubaron las placas en la oscuridad durante 4 h a temperatura ambiente y entonces se leyeron en un analizador de microplacas Envision (PerkinElmer). Se realizaron curvas de respuesta a la dosis por triplicado y se usó el factor Z' para validar los ensayos. Se realizaron curvas de regresión no lineal, sin restricciones, usando una ecuación de cuatro parámetros y el software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE₅₀.

50

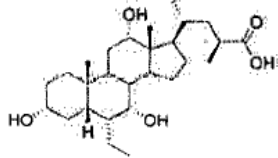
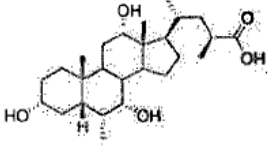
Cultivo celular, transfección y ensayo de luciferasa

55

Se cultivaron células HEPG2 y HEK293T en E-MEM y DMEM respectivamente, o bien complementados con penicilina/estreptomicina al 1%, L-glutamina al 1% y suero bovino fetal al 10% (alta concentración de glucosa) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se hicieron crecer las células a 37°C en un 5% de CO₂. Se realizaron todas las transfecciones usando reactivo de transfección Fugene HD 5:2 (μl) con respecto a ADN (μg) respectivamente (Roche). Veinticuatro horas antes de la transfección, se sembraron células HEK293T o HepG2 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 ó 15.000 células/pocillo, respectivamente. Se realizaron transfecciones transitorias usando 100 ng de vector de indicador pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega), 40 ng de pGL4.74 (Renilla), como control interno para la eficacia de transfección, y 10 ng de plásmido de expresión pCMV-SPORT6-hTGR5. Clon MGC:40597 de la colección de genes de mamíferos del NIH (Invitrogen). Se añadió el vector pGEM

para normalizar las cantidades de ADN transfectado en cada ensayo (2 µg). Veinticuatro horas tras la transfección, se estimularon las células con concentraciones crecientes de compuesto lh3e durante 18 h. Los cultivos control recibieron vehículo (DMSO al 0,1%) solo. Entonces se lisaron las células añadiendo 75 µl de reactivo de luciferasa Dual-Glo (Promega) a 75 µl de medio que contenía células/pocillo. Se midió la actividad luciferasa de renilla añadiendo un volumen de reactivo Dual-Glo Stop & Glo y medio de cultivo original. Se expresaron las actividades luciferasa como la razón entre la unidad de luciferasa y la unidad de luciferasa de renilla. Cada punto de datos es el promedio de ensayos por triplicado. Se repitió cada experimento al menos tres veces.

Tabla 3A. Comparación directa de ácido 23-metilcólico sustituido con 6-etilo frente a 6-metilo

N.º de comp.	Patrón de referencia LCA (4,5 ± 2,4 µM) AC (69 ± 24 µM)	Exp. de TGR5 I (CE ₅₀ = µM)	Exp. de TGR5 II (CE ₅₀ = µM)	Exp. de FXR I (CE ₅₀ = µM)	Exp. de FXR II (CE ₅₀ = µM)
lh3e		0,8	1,1	53	23
lh3		1,7		10	7,8

* Los resultados mostrados en la tabla 3A se generaron usando los procedimientos descritos de manera directa anteriormente.

Se prefieren compuestos que tienen un grupo alfa-etilo en la posición C-6 en el anillo del ácido biliar. Más específicamente, los compuestos que tienen un grupo alfa-etilo en la posición C-6 del ácido 23-metilcólico son los más preferidos. Tal como se muestra en la tabla 3A anterior, los compuestos que tienen un grupo alfa-etilo en la posición C-6 son sorprendente e inesperadamente más potentes que el correspondiente derivado de alfa-metilo C-6.

Ejemplo 9. Actividades metabólicas de ácido oleanólico y ácido 6-etil, 23-metil-cólico (lh3e) en un modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta

El objetivo del estudio es definir si los agonistas de TGR5 (ácido oleanólico (OA) o ácido 6 etil, 23-metilcólico (lh3e) corrigen el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina asociada *in vivo*. Para someter a prueba esta posibilidad, se administraron OA/lh3e por medio de administración en los alimentos durante 16 semanas a ratones C57BL6J macho que se habían sometido previamente durante 10 semanas a una dieta alta en grasa.

II-Protocolo

En un estudio anterior, se observó que OA era un agonista de TGR5 selectivo que no provocaba aversión a los alimentos. Sin embargo, los animales tratados con una dosis de 100 mg/kg/día de OA mostraron algunas señales de toxicidad, mientras que una dosis inferior se toleró bien. Por tanto, se administró OA a la dosis de 50 mg/kg/d en este estudio.

Los estudios *in vitro* han identificado lh3e como un ligando de TGR5 potente y selectivo. No se esperaban problemas con la toxicidad con lh3e, que se administró a una concentración ~50 veces inferior.

Para este estudio, se dividieron 48 ratones C57BL6J macho (5 semanas de edad) en dos grupos: un grupo de 24 animales (grupo 1, 2 y 3) recibieron dieta de pienso para roedores mientras que los otros 24 recibieron una dieta alta en grasa durante un periodo de 10 semanas (grupo 4, 5 y 6). Entonces se analizaron los animales durante un periodo de 16 semanas. Se asignaron cinco grupos de 10 animales tal como sigue:

- 1: dieta de pienso para roedores
- 2: dieta de pienso para roedores + OA 50 mg/kg/día
- 3: dieta de pienso para roedores + 6Et23MeCA (lh3e) 30 mg/kg/día
- 4: dieta alta en grasa

5: dieta alta en grasa + OA 50 mg/kg/día

6: dieta alta en grasa + 6Et23MeCA (1h3e) 30 mg/kg/día

5 Durante todo el estudio, se monitorizaron el peso corporal y la ingesta de alimentos dos veces a la semana.

Semana 2: Se analizó la composición corporal, para todos los grupos, mediante absorciometría de rayos X de energía dual (Dexascan).

10 Semana 1: Se midieron los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos tras un periodo de ayuno de 12 h y entonces los ratones iniciaron las dietas tal como se indicó (día 0).

15 Semana 2: Se midieron los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos tras un periodo de ayuno de 12 h (día 14).

20 Semana 4: Se determinó la tolerancia a la glucosa sometiendo todos los animales a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). Se sometieron los animales a ayuno durante 12 h antes de esta prueba. Se midió el gasto de energía nocturno de los grupos 1, 4, 5 y 6 (dieta de pienso para roedores, dieta alta en grasa y dieta alta en grasa OA / 6Et23MeCDCA (1h3e)) mediante calorimetría indirecta.

25 Semana 8: Se analizó de nuevo la composición de peso corporal mediante Dexascan para todos los grupos. Se midieron los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos tras un periodo de ayuno de 12 h (día 56).

Semana 9: Se estudió la actividad circadiana de los grupos 4, 5 y 6 (ratones alimentados con dieta alta en grasa) durante un periodo de 30 h.

Semana 10: Se realizó medición de la tensión arterial y frecuencia cardiaca en los grupos 4, 5 y 6.

Semana 11: Se midió la temperatura rectal de todos los animales a temperatura ambiente a las 10:00 a.m. Se realizó la medición de la actividad circadiana en los grupos 1, 2, 3 y 4.

35 Semana 12: Se analizó la tolerancia a la glucosa realizando una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los grupos 4, 5 y 6. Durante la IPGTT, también se extrajo sangre para analizar los niveles de insulina. Se sometieron los animales a ayuno 12 h antes de estas pruebas. Se recogieron heces en todos los grupos a lo largo de un periodo de tiempo de 24 h y se midió el contenido en lípidos fecales.

40 Semana 16: Se realizó una prueba de frío en todos los animales midiendo la temperatura corporal de animales expuestos a 4°C.

45 Tres días después, se sacrificaron los animales. En el sacrificio, se extrajo sangre y se analizó para determinar: lípidos plasmáticos (TC, TG, HDL-C, FFA); funciones hepáticas (ALAT, ASAT, fosfatasa alcalina, γ -GT); glucosa e insulina; perfiles de lipoproteínas de grupos de plasma seleccionados (cromatografía de exclusión molecular).

50 Se extrajeron el hígado, el intestino delgado, los tejidos adiposos (WAT y BAT), el páncreas, el corazón y el músculo, se pesaron y se mantuvieron para análisis adicionales incluyendo: histología convencional (tinción con HE, tinción con succinato deshidrogenasa, tinción con aceite-rojo-O y morfología celular); contenido en lípidos tisulares; microscopía electrónica en BAT y músculo para analizar las mitocondrias; aislamiento de ARN para estudios de expresión de genes seleccionados implicados en homeostasis de energía y metabolismo mediante RT-PCR cuantitativa; extracción de proteínas para el estudio de modificaciones postraduccionales tales como acetilación de proteínas de interés (por ejemplo PGC-1 α).

III-Procedimientos detallados

A-Procedimiento con los animales y dietas

Alojamiento y manipulación de los animales

60 Se alojaron grupos de ratones (5 animales / jaula) en condiciones libres de patógenos específicos con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h (se encienden a las 7:00), en un vivario de temperatura (20-22°C) y humedad controladas, según las especificaciones de la Comunidad Europea. Se permitió a los animales libre acceso a agua y alimento.

Agua potable

5 Se analizó regularmente la composición química del agua del grifo para verificar la ausencia de sustancias tóxicas potenciales en el Institut d'Hydrologie, ULP, Estrasburgo. Se trató el agua potable con HCl y HClO₄ para mantener el pH entre 5 y 5,5 y la concentración de cloro entre 5 y 6 ppm.

Dieta

10 Se obtuvo la dieta de pienso para roedores convencional de UAR y la dieta alta en grasa de Research Diet. Se alimentaron los ratones o bien con dieta de pienso para roedores (el 16% de proteína, el 3% de grasa, el 5% de fibra, el 5% de cenizas) o bien con dieta alta en grasa (el 20% de proteína, el 20% de hidratos de carbono, el 60% de grasa). Se mezclaron ácido oleanólico y 6Et23MeCDCA (Ih3e) con o bien dieta de pienso para roedores en polvo o bien dieta alta en grasa en polvo en las siguientes proporciones: 0,5 g de OA/kg de alimento para el tratamiento de 15 50 mg/kg/día y 0,08 g de 6Et23MeCA (Ih3e)/kg de alimento para el tratamiento de 10 mg/kg/día. Entonces se reconstituyeron los gránulos. Los grupos control recibieron gránulos de alimentos tal como se proporcionaron por la compañía. Debido a la consistencia de la dieta alta en grasa, no se añadió agua en la mezcla con OA. En el caso de la dieta de pienso para roedores, que es más difícil de reconstituir, se añadió una cantidad mínima de agua al polvo para reconstituir los gránulos, que entonces se secaron al aire. Se prepararon semanalmente nuevos lotes de 20 alimento.

Extracción de sangre

Se extrajo sangre o bien del seno retro-orbital con anestesia o bien de la vena de la cola.

25 *Anestesia*

Para el experimento de exploración Dexa, se anestesiaron los animales con una mezcla de ketamina (200 mg/kg) / xilasina (10 mg/kg) administrada mediante inyección intraperitoneal. Para la venopunción, se anestesiaron los animales mediante inhalación de una mezcla de isoflurano-O₂.

30 *B-Bioquímica*

Se realizaron las pruebas con una estación de trabajo de laboratorio automatizada Olympus AU-400 usando reactivos comerciales (Olympus).

35 *Análisis de lípidos y lipoproteínas*

Se determinaron los triglicéridos, el colesterol total y HDL en suero mediante ensayos enzimáticos. Se determinó el contenido en colesterol HDL en suero tras la precipitación de lipoproteínas que contenían apo B con ácido fosfotúngstico/Mg (por ejemplo, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se determinó el nivel de ácidos grasos libres con un kit de Wako (por ejemplo, Neuss, Alemania) según especifica el proveedor.

Exploración metabólica y endocrina

45 Se midió la concentración de glucosa en sangre mediante un analizador Precision Q.I.D (por ejemplo, sistema Medisense), usando electrodos Medisense Preci (por ejemplo, Abbot Laboratories, Medisense products, Bedford, EE.UU.). Se validó este método comparando los valores del analizador Precision Q.I.D con mediciones de glucosa clásicas. Se eligió el método de Precision Q.I.D puesto que requiere una cantidad mínima de sangre y por tanto puede emplearse para múltiples mediciones tal como durante una IPGTT. Se determinó la insulina en plasma (por 50 ejemplo, Mercodia, Uppsala, Suecia) mediante ELISA según las especificaciones del fabricante.

C-Pruebas metabólicas

55 *Perfiles de lipoproteínas*

Se obtuvieron los perfiles de lipoproteínas mediante cromatografía de líquidos de proteínas rápida, permitiendo la separación de las tres clases principales de lipoproteínas VLDL, LDL y HDL.

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) - Prueba de tolerancia a la glucosa oral

60 Se realizó la IPGTT en ratones que se sometieron a ayuno durante la noche (12 h). Se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal (IPGTT) una disolución de glucosa al 20% en solución salina estéril (NaCl al 0,9%) a una dosis de 2 g de glucosa/kg de peso corporal. Se extrajo sangre de la vena de la cola, para monitorizar la glucosa e insulina, antes y 15, 30, 45, 75, 90, 120, 150, 180 min. después de la administración de la disolución de glucosa. Se calculó el

área incremental de la curva de glucosa como una medida de la sensibilidad a la insulina, mientras que los correspondientes niveles de insulina indican reservas de secreción de insulina.

Gasto de energía

Se evaluó el gasto de energía a través de calorimetría indirecta midiendo el consumo de oxígeno con el aparato Oximax (por ejemplo, Columbus Instruments, Columbus, OH) durante 12 h. Este sistema consiste en un circuito abierto con aire que entra y sale de jaulas de plástico (un ratón por jaula). Se permitió a los animales libre acceso a agua y alimento. Un sensor de CO₂ y O₂ muy preciso midió la diferencia en las concentraciones de O₂ y CO₂ en ambos volúmenes de aire, lo que proporcionó la cantidad de oxígeno consumida en un periodo de tiempo dado en el que el flujo de aire que entra en la jaula era constante. Se procesaron los datos que salían del aparato en un ordenador conectado, se analizaron y se mostraron en un archivo de Excel exportable. Se expresaron los valores como ml.kg⁻¹.h⁻¹, que se conoce comúnmente como VO₂.

Determinación del contenido en grasa corporal mediante exploración Dexa

Se realizaron los análisis Dexa mediante el densitómetro de la serie PIXIMUS de resolución ultra alta (píxeles de 0,18 x 0,18 mm, GE Medical Systems, Madison, WI, EE.UU.). Se determinaron la densidad mineral ósea (BMD en g/cm²) y la composición corporal usando el software PIXIMUS (versión 1.4x, GE Medical Systems).

Pulso y medición de la tensión arterial D-no-invasiva

El sistema de análisis de la tensión arterial Visitech BP-2000 es un sistema de manguito en la cola automático-informático que se usa para tomar múltiples mediciones en 4 ratones despiertos simultáneamente sin intervención del operario. Se contuvieron los ratones en cámaras oscuras individuales sobre una plataforma calentada con sus colas enroscadas a través de un manguito en la cola. El sistema mide la tensión arterial determinando la presión del manguito a la que se eliminó el flujo de sangre a la cola. Un sensor fotoeléctrico detecta el pulso del espécimen. El sistema genera resultados que se ha mostrado que se corresponden estrechamente con la presión intraarterial media medida simultáneamente en la arteria carótida. Esto permite que se obtengan valores reproducibles de tensión arterial sistólica y frecuencia de latido cardiaco. Esto requirió entrenamiento de los animales durante una semana en el sistema.

E- Actividad circadiana

Se midió la actividad locomotora espontánea usando cajas individuales, cada una compuesta por un suelo deslizante, una jaula desmontable y equipada con captosres infrarrojos que permiten la medición de la actividad locomotora deambulatoria y partes traseras. Se conectaron las cajas a un ordenador usando una interfaz electrónica (por ejemplo, Imetronic, Pessac, Francia). Se sometieron a prueba los ratones durante 32 horas con el fin de medir la habituación al aparato así como las actividades nocturnas y diurnas. Se midió la cantidad de agua consumida durante el periodo de prueba usando un medidor de lamidas automático.

Los resultados del estudio se muestran en las figuras 1 a 9. La figura 1 muestra el impacto del compuesto lh3e sobre el aumento de peso corporal en ratones alimentados con dieta alta en grasa y pienso para roedores. Se midió el aumento de peso corporal a lo largo de 16 semanas. Los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e mostraron menos aumento de peso que los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo. La figura 2 muestra que el compuesto lh3e mejora el perfil metabólico de ratones alimentados con dieta alta en grasa. Los resultados del análisis de plasma sanguíneo y frecuencia cardiaca en ratones obesos inducidos por la dieta tratados con el compuesto lh3e se muestran en la figura 2, incluyendo los niveles de glucemia, enzimas hepáticas (LDH, ASAT y ALAT) y lípidos plasmáticos (colesterol total, HDL-col, LDL-col y triglicéridos). Los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e mostraron menos glucemia, enzimas hepáticas y lípidos plasmáticos que los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo. La frecuencia cardiaca de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e también mostró una menor frecuencia cardiaca en comparación con ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo. La figura 3 muestra que el compuesto lh3e mejora la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta alta en grasa. Tras 10 semanas, los niveles de insulina en plasma aumentaron tanto en los ratones alimentados con pienso para roedores como en los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e en comparación con ratones tratados con vehículo tal como se muestra en la figura 3A. Tras 12 semanas, se mostró que los niveles de glucosa eran inferiores en ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e tal como se muestra en la figura 3B. La figura 4 muestra los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) como niveles de glucosa a lo largo de un periodo de 200 min. en ratones alimentados con dieta de pienso para roedores tratados con el compuesto lh3e. La figura 5 (gráficos A-D) muestra la liberación de insulina *in vivo* tras una alimentación de prueba. La figura 5A muestra la liberación de insulina a lo largo de 30 min. La figura 5B muestra el aumento en veces en la liberación de insulina en comparación con el nivel de insulina basal. Los niveles de insulina alcanzaron sus niveles más altos a ~12 minutos en ratones alimentados con

dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e en comparación con ratones tratados con vehículo. Las figuras 5C y 5D muestran el aumento en veces en la liberación de insulina en comparación con niveles de insulina basal.

El aumento en veces en ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e fue mayor a los puntos de tiempo de tanto 15 como 30 min. tal como se muestra en la figura 5D. La figuras 6 (gráficos A-D) y 7 (gráficos A-C) muestran que los ratones tratados con el compuesto lh3e tienen un aumento en la razón de intercambio respiratorio (RER) con HFD (dieta alta en grasa) que puede explicarse como vinculado a su sensibilidad a la insulina mejorada que mantiene su capacidad para oxidar glucosa. La figura 8 (gráficos A y B) muestra la actividad locomotora e ingesta de alimento/agua de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados y alimentados con pienso para roedores tratados en comparación con los tratados con vehículo. La ingesta de alimento/agua para ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con el compuesto lh3e mostró un ligero aumento en la ingesta frente a ratones tratados con vehículo. La figura 9 (gráficos A-C) muestra los cambios en el peso de órganos. Las figuras 9B y 9C muestran el porcentaje de cambio en peso corporal, hígado, riñón, corazón, peri WAT, epi WAT, Sc WAT y BAT en comparación con el peso en ratones alimentados con una dieta de pienso para roedores. En todos los órganos, los ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con el compuesto lh3e mostraron un cambio en porcentaje reducido.

Ejemplo 10. Propiedades fisicoquímicas

20 Solubilidad en agua

Se suspendió BA sólido (en forma protonada para el compuesto lh3e) en 5 ml de HCl 0,1 M. Se filtraron las disoluciones saturadas, tras incubación durante 1 semana, en un filtro Millipore (0,22 μm) y se midió la concentración de BA mediante HPLC-ESI-EM/EM usando una columna C18 (150 mm x 2 mm de d.i., 4 μm) y fases móviles de agua que contenía ácido acético 15 mM pH 5 y acetonitrilo. La velocidad de flujo era de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se realizó la adquisición de la espectrometría de masas en el modo de monitorización de reacción múltiple usando la fuente de ESI en ionización negativa. Se expresó la solubilidad en agua como $\mu\text{mol}/\text{litro}$.

La solubilidad en agua del compuesto lh3e es 99 μM , un valor superior al correspondiente dihidroxi-BA y comparable al de CA (véase la tabla 4).

Ácido biliar	Ws ^(a) (μM)	CMC ^(b) Na ⁺ 0,15 M (mM)	ST _{CMC} ^(c) Dina/cm	LogP _A ^(d)	Unión a albúmina ^(e) (%)
CDCA	32	32	45,5	2,2	93
UDCA	7,5	60	50,5	2,2	94
CA	273*	11*	-	11*	50*
TCDCA	as	3,0*	-	0,9*	70*
TUDCA	as	2,2*	-	1,1*	67*
6MUDCA	28*	4,2*		1,3*	80*
lh3e	99	14	50,1	1,4	62

^aWs: La solubilidad en agua se refiere a BA como especie protonada y por tanto no se evalúa para TCDCA y TUDCA que son altamente solubles (as).
^bCMC: Concentración micelar crítica determinada en solución acuosa de NaCl 0,15 M.
^cST CMC: Tensión superficial a CMC en solución acuosa de NaCl 0,15 M.
^dLogP_A: Coeficiente de reparto en 1-octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas.
*: valores de la bibliografía.

La presencia de un grupo 23-metilo en el compuesto lh3e no compromete la solubilidad en agua. El compuesto lh3e presenta un valor de solubilidad en el intervalo de BA que se produce de manera natural y análogos sintéticos estudiados anteriormente. Además, dada la unión a albúmina relativamente buena del compuesto lh3e, puede facilitarse la circulación del compuesto lh3e en la sangre, favoreciendo de ese modo el direccionamiento sistémico de TGR5 en tejidos periféricos tales como músculo y tejido adiposo marrón. Los ejemplos 9, 16 y 17 apoyan adicionalmente esta hipótesis.

40 Concentración micelar crítica (CMC)

Se evaluó la detergencia, es decir, la tendencia a formar micelas para todas las moléculas cargadas que son solubles en agua como sal de sodio (2 unidades hasta el pKa). Se determinó la concentración micelar crítica (CMC) mediante mediciones de la tensión superficial (ST) usando un método de presión máxima de burbuja que proporciona valores de tensión superficial afectados ligeramente por posibles impurezas como los métodos estáticos. El tensiómetro era un Sensadyne 6000 (Chem-Dyne Research Corp., Milwaukee, WI) equipado con dos sondas de vidrio de 0,5 y 4,0 mm de diámetro conectadas a una fuente de nitrógeno. La frecuencia de burbujas era 1 burbuja/segundo en agua destilada a 26°C (P=2,7 atm) y se realizó la calibración con agua destilada doble y metanol. Se midió la tensión superficial de disoluciones de sales de sodio de BA en NaCl 0,15 M a diversas

concentraciones dentro del intervalo de 0,13-50 mM. Se representaron gráficamente los valores de tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de sales biliares; se calcularon las líneas de regresión correspondientes a las dos partes de la curva (fases monomérica y micelar) usando el método de mínimos cuadrados, y se tomó la intersección de las líneas como el valor de CMC. A partir de las curvas de ST frente a concentración también se calculó el valor de la tensión superficial a la CMC (equilibrio entre especies de monómeros y multímeros) que proporciona información sobre el poder de detergencia que está relacionado con el tamaño de las micelas con capacidad de reducción de la tensión superficial asociada.

Se evaluó la CMC mediante mediciones de la tensión superficial en condiciones distintas del equilibrio, es decir, en condiciones en las que las impurezas afectan ligeramente a los resultados de la tensión superficial (figura 10). El compuesto lh3e presenta una CMC baja pero una detergencia moderada y una capacidad de reducción de la tensión superficial tal como se muestra por los valores de tensión superficial a la CMC (baja detergencia significa baja toxicidad para la membrana o células).

Coeficiente de reparto en octanol/agua

Puesto que los análogos de sulfato y sulfonados están siempre ionizados a todos los valores de pH, se midió el coeficiente de reparto en octanol/agua para todas las moléculas en forma ionizada y por tanto se estudiaron los análogos de carboxilo a pH alto. Se evaluó el coeficiente de reparto en 1-octanol/agua ($\log P$) usando un procedimiento de matraz con agitación convencional. Se llevaron a cabo los experimentos en una disolución de sal biliar 0,1 mM tamponada a pH 8 con tampón de fosfato 0,1 M para garantizar la ionización completa del BA; los valores de $\log P$ se refieren al BA en forma ionizada, no a las especies protonadas, y la concentración inicial de cada BA estaba por debajo de su propio valor de CMC. Se presaturó previamente el tampón acuoso con 1-octanol, entonces se añadieron 5 ml de 1-octanol presaturado con agua y se dejó que las muestras se equilibraran durante 2 semanas con agitación continua a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se separaron cuidadosamente las dos fases. Se midió la concentración de BA en la fase acuosa con HPLC-ESI-EM/EM usando una columna C18 (150 mm x 2 mm de d.i., 4 μ m) y, como fases móviles, agua que contenía ácido acético 15 mM pH 5 y acetonitrilo. La velocidad de flujo era de 150 μ l/min. y se mantuvo la columna a 45°C. Se realizó la adquisición de espectrometría de masas en el modo de monitorización de reacción múltiple usando la fuente de ESI en ionización negativa.

El compuesto carboxilado lh3e con tres grupos hidroxilo en las posiciones 3 α , 7 α y 12 α presenta una liofilicidad ligeramente mayor con respecto al análogo natural CA, 1,4 frente a 1,1 como resultado de la presencia de un etilo en la posición 6 y un metilo en la posición 23.

Unión a albúmina

Se evaluó el grado de unión a albúmina mediante diálisis en equilibrio a una razón de BA-albúmina fija. Se disolvió BA a una concentración de 100 μ M en albúmina sérica bovina al 5%-solución salina (pH 7,2) y se dejó reposar durante 24 h a 25°C. Se dializaron dos mililitros de esta disolución en sacos de celulosa que tenían un punto de corte de peso molecular de 12-14.000 frente a 25 ml de solución salina. Se equilibró el sistema mediante agitación mecánica suave durante 72 h a 25°C. Se determinaron las concentraciones de BA de la disolución dializada (correspondiente a la fracción no unida libre) y de la disolución de partida con HPLC-ESI-EM/EM en las mismas condiciones del análisis anterior.

Se calculó el porcentaje de unión a albúmina a partir de la concentración de BA inicial y de la concentración no unida en la fracción dializada. Se notifican los datos en la tabla 4.

El porcentaje de unión a albúmina del compuesto lh3e es ligeramente superior que el de CA y esto deriva de la presencia de los grupos 23 metilo y 6 etilo.

Ejemplo 11. Estabilidad metabólica *in vitro* en cultivo de heces humanas

Estabilidad a bacterias intestinales.

Ejemplo 11a. 7 α -deshidroxilación.

Se transfirieron heces humanas recientes homogenizadas (500 mg) a viales estériles a los que se añadieron 5 ml de medio de glucosa-carne picada esterilizado (Scott Lab., Fiskville, RI). Entonces se añadió BA a una concentración final de 0,05 mM. Se incubaron los viales a 37°C; luego, a las 0, 1, 2, 4, 8 y 24 h tras la adición del BA, se detuvo la reacción con 150 μ l de KOH al 30%. Se centrifugaron las muestras a 3500 rpm durante 10 min.; a partir del sobrenadante, se aislaron los BA mediante extracción en fase sólida C-18 y se analizaron mediante CCF y HPLC-ES-EM/EM.

Se empleó cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de gel de sílice de 0,25 mm de grosor (Merck,

Darmstat, Alemania) como primera prueba de examen. El sistema de disolventes usado para la separación de BA conjugado estaba compuesto por ácido propiónico/acetato de isoamilo/agua/N-propanol (3:4:1:2, v/v/v/v; disolvente I), y el del BA no conjugado era ácido acético/tetracloruro de carbono/isopropil éter/acetato de isoamilo/agua/N-propanol/benceno (1:4:6:8:2:2, v/v/v/v/v/v; disolvente II). Se revelaron los BA separados con disolución de ácido fosfomolibdico al 5%-etanol.

El compuesto lh3e era muy estable cuando se incubaba en cultivos de heces humanas e incluso tras 24 horas se recuperaba más del 85% del compuesto sin modificar. Por el contrario, el análogo natural de referencia CDCA presentaba un tiempo de semivida de casi una hora y tras 8 horas de incubación estaba casi completamente metabolizado (7-deshidroxilado) para formar ácido litocólico.

Tras la incubación de larga duración para lh3e, la 7-deshidroxilación y la formación de productos intermedios de un derivado de 7-oxo estaban prácticamente suprimidas.

15 **Ejemplo 11b.**

Se sabe que las bacterias intestinales hidrolizan el enlace amida C24 de BA conjugados con taurina y glicina y eliminan el grupo 7 α -hidroxilo de CA, conduciendo a la formación de BA secundarios lipofílicos tóxicos tales como ácido desoxicólico (DCA) (Ridlon, J.M., *et al.*, J. Lipid Res. 2006, 47, 241-259). Para determinar la sensibilidad del compuesto lh3e a la 7-deshidroxilación mediada por la flora intestinal, se evaluó su estabilidad metabólica en cultivo de caldo de heces humanas tal como se describe en Roda, A., *et al.*, J. Lipid Res. 1994, 35, 2268-2279. El compuesto lh3e parece no ser sensible a este proceso y se mostró que es altamente estable con más del 95% del compuesto sin modificar tras 12 h de incubación. Por comparación, se metabolizó más del 50% de CA (ácido cólico) tras 1 h y hasta el 90% en el plazo de 8 h (figura 15). Es probable que la estabilidad extendida del compuesto lh3e esté relacionada con la alquilación de la posición C6 que proporciona impedimento estérico al proceso de 7 α -deshidroxilación bacteriano.

Estabilidad de la cadena lateral

Según estos resultados, la cadena lateral del compuesto lh3e no se modificaba por actividades enzimáticas de bacterias intestinales.

Estos datos sugieren que la presencia del grupo etilo en la posición C-6 protege al grupo 7-hidroxilo frente a la oxidación o eliminación mediante impedimento estérico. Además, el compuesto lh3e es muy estable también para el metabolismo de la cadena lateral. No se han encontrado metabolitos minoritarios mediante HPLC-ES-EM/EM. Estos datos sugieren que en el contenido intestinal inferior en presencia de bacterias anaeróbicas estos análogos son estables.

40 **Ejemplo 12. Secreción biliar y metabolismo del compuesto lh3e en rata con fistula biliar tras administración duodenal (i.d.) y femoral (i.v.)**

Ejemplo 12a. Objetivo y fundamento

Las modificaciones estructurales de ácidos biliares podrían afectar a su captación hepática, transportes hepáticos y secreción y absorción intestinal. Por tanto, el conocimiento de la secreción biliar tras administración tanto i.v. como i.d. junto con su metabolismo es un punto clave en la selección de compuestos para estudios adicionales.

Para evaluar el modo y la eficacia de la absorción intestinal del compuesto lh3e, se administró el compuesto tanto por vía intravenosa (infusión femoral) como por vía oral (infusión duodenal) a la misma dosis y se evaluó su tasa de secreción biliar en el modelo de rata con fistula biliar.

Las diferencias en el área bajo la curva de la secreción biliar frente al tiempo entre la administración i.v. e i.d. explican su absorción intestinal y proporcionan información sobre su biodisponibilidad. Además, el metabolismo hepático e intestinal también podrían ser bastante diferentes y, por tanto, se determinó la secreción biliar del compuesto lh3e y sus principales metabolitos hepáticos.

Efecto colerético

- Infusión duodenal

Se desarrolló el modelo de rata con fistula biliar en las instalaciones de laboratorios de la Universidad de Bolonia. Se administró el compuesto lh3e a una dosis de 1 μ mol/kg/min. (infusión de 1 hora) a un grupo de ratas por medio de infusión duodenal (i.d.). Las ratas tenían una fistula biliar para recoger muestras de bilis en diferentes tiempos antes, durante y después de la infusión. Para el experimento de infusión duodenal, se trataron 6 ratas (250 \pm 10 g). Se

recogieron muestras de bilis cada 15 minutos durante cuatro horas. Además, se trataron 3 ratas control con solución salina en las mismas condiciones para tiempos y toma de muestras (ratas control duodenal).

5 La infusión duodenal del compuesto lh3e aumentó significativamente la velocidad de flujo de bilis que alcanzó el valor máximo de aproximadamente 120 $\mu\text{l}/\text{min}.\text{kg}$. Este fenómeno empezó durante el periodo de infusión y continuó durante al menos 3 horas.

10 El compuesto lh3e presentó un efecto colerético potente y se cree que esto está relacionado con su estructura; un grupo metilo en la posición C-23 impide parcialmente la conjugación y esta molécula puede experimentar una ruta de desviación colehepática. Para comparación, la infusión duodenal de CDCA aumentó ligeramente el flujo de bilis, que no superó 80 $\mu\text{l}/\text{min}.\text{kg}$.

-Infusión intravenosa

15 Para el experimento de infusión femoral, se trataron 6 ratas. La figura 12 muestra el flujo de bilis durante el estudio. La infusión femoral empezó tras 75 minutos de estado estacionario y continuó durante 60 min. Se recogieron muestras de bilis cada 15 minutos durante cuatro horas. Además, se trataron 3 ratas con solución salina con BSA al 3% en las mismas condiciones para tiempos y toma de muestras (ratas control femoral). El flujo de bilis durante la infusión i.v. de vehículo de solución salina con BSA al 3% (control, n=1) mantuvo un valor que oscilaba entre 40 y 80 $\mu\text{l}/\text{min}.\text{kg}$ durante todo el periodo del experimento.

20 La infusión i.v. del compuesto lh3e aumentó significativamente la velocidad de flujo de bilis y el fenómeno empezó 15 minutos tras el comienzo del periodo de infusión y continuó durante al menos dos horas. El efecto colerético fue bastante similar al logrado en el experimento de infusión i.d.

Secreción biliar

25 Se analizaron muestras de bilis recogidas durante los experimentos i.v. e i.d. para determinar la secreción biliar del compuesto lh3e y sus metabolitos.

Análisis de HPLC-ES-EM/EM.

30 Se obtuvo polvo cristalino puro del compuesto lh3e del laboratorio de R. Pellicciari de Perugia. Se prepararon disoluciones madre en metanol a 1 mmol/l y se prepararon disoluciones de trabajo diluyendo volúmenes apropiados de la disolución primaria. El metanol y acetonitrilo eran de una pureza de calidad para HPLC. El amoniaco era al 30% y ácido acético era al 99,8%. Se obtuvieron todos los reactivos de Carlo Erba Reagents. Se preparó agua de calidad para HPLC mediante un sistema Milli-Q.

Preparación de muestras

35 Se llevaron muestras de bilis de rata a temperatura ambiente, se agitaron brevemente y se diluyeron 1:100 v/v (muestras de bilis de infusión duodenal) y 1:100 ó 1:200 v/v (muestras de bilis de infusión femoral) con tampón acetato de amonio 15 mM (pH = 5,0):acetonitrilo=70:30 (v/v). Se transfirió la disolución final a un vial de inyector automático, y se inyectaron 10 μl en la columna cromatográfica.

Método de HPLC-ESI-EM/EM

40 Se analizaron muestras de bilis de rata mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (HPLC-EM/EM) usando una fuente de electropulverización (ESI) en modo de ionización negativa. Para la cromatografía de líquidos se usó un módulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado con un inyector automático. Se mantuvo el inyector automático a 7°C. Se realizó la separación en una columna Synergi Hidro-RP C₁₈ (150 x 2,0 mm de d.i., tamaño de partícula de 4 μm), protegida por una precolumna SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm de d.i., suministradas ambas por Phenomenex. Se eluyó el analito usando tampón acetato de amonio 15 mM (pH = 5,00) como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. Se aumentó la fase móvil B desde el 30% hasta el 64% en 10 min., luego hasta el 100% en 10 min., y se mantuvo constante durante 10 min. La velocidad de flujo era de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. y se mantuvo la columna a 45°C. Se introdujo el efluente de la columna en la fuente de ESI conectada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro-LC, Micromass) que funcionaba en el modo de adquisición de monitorización de reacción múltiple (MRM). Se usó nitrógeno como gas nebulizador a una velocidad de flujo de 100 l/h y como gas de desolvatación a 930 l/h. Se ajustaron respectivamente las temperaturas del bloque de fuente de iones y de desolvatación a 80°C y 180°C. El voltaje capilar era de 3,0 kV. Se usó el software MassLynx versión 4.0 para la adquisición y el procesamiento de datos. Además, se realizaron experimentos usando espectrometría de masas tanto en la configuración de EM individual como de EM/EM en tándem para identificar metabolitos.

Cuantificación

5 Se preparó una curva de calibración de 5 puntos diariamente y se inyectó por duplicado. Se obtuvieron muestras de calibración en el intervalo de concentración de 0,1 a 20 $\mu\text{mol/l}$ preparadas en la fase móvil. Se obtuvieron los parámetros de la curva de calibración lineal a partir del gráfico del área de pico de analito frente a la concentración de analito usando un análisis de regresión de mínimos cuadrados (peso = $1/x^2$). Los coeficientes de correlación eran $\geq 0,981$.

10 También se estimaron los metabolitos conjugados con taurina del compuesto lh3e. Se estimaron factores de corrección, para tener en cuenta las diferentes respuestas en ES-EM/EM entre especies conjugadas con taurina y libres, y se aplicaron a los valores de área obtenidos a partir de los cromatogramas del conjunto de datos de HPLC-MRM. Finalmente, se usaron las curvas de calibración obtenidas para los ácidos biliares libres para estimar los metabolitos conjugados con taurina.

15 *Farmacocinética (secreción biliar) de los análogos administrados: comparación i.v. frente a i.d.*

Los datos se refieren a la tasa de secreción del compuesto recuperado en la bilis como tal tras la infusión duodenal y femoral a una dosis de 1 $\mu\text{mol/Kg/min}$.

20 La tabla 5 muestra los valores de concentración y secreción para el compuesto lh3e obtenidos a partir de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 h oscilando entre 75 y 135 min.).

Tabla 5. Valores de concentración y secreción del compuesto lh3e obtenidos de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 hora oscilando entre 75 y 135 minutos)

Tiempo (min.)	lh3e (n = 4)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción ($\mu\text{mol/kg/min.}$)
90	0,007	0,0003
120	0,69	0,057
150	1,88	0,167
180	1,29	0,150
210	0,79	0,077
240	0,39	0,033
270	0,27	0,026
300	0,20	0,015

25 La tabla 6 muestra los valores de concentración y secreción obtenidos de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión femoral (1 h oscilando entre 75 y 135 min.).

30 Tabla 6. Valores de concentración y secreción del compuesto lh3e obtenidos de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión femoral (1 h oscilando entre 75 y 135 min).

Tiempo (min.)	lh3e (n = 5)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción ($\mu\text{mol/kg/min.}$)
75	n.a.	^a
90	1,9	0,1
120	3,1	0,23
50	3,4	0,31
180	2,3	0,2
210	1,06	0,105
240	0,55	0,049
270	0,27	0,018

^a:- No calculado

35 Tabla 6A. Valores de concentración y secreción de tauro-lh3e estimados a partir de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 hora oscilando entre 75 y 135 minutos)

Tiempo (min.)	lh3e (n = 4)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción ($\mu\text{mol/kg/min.}$)
90	0,017	0,001
120	0,63	0,051
150	0,68	0,053
180	0,75	0,091
210	0,68	0,063

240	0,60	0,054
270	0,64	0,074
300	0,74	0,053

Tabla 6B. Valores de concentración y secreción de tauro-lh3e estimados a partir de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión femoral (1 hora oscilando entre 75 y 135 minutos)

Tiempo (min.)	lh3e (n = 5)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción ($\mu\text{mol/kg/min.}$)
90	0,29	0,0101
120	0,50	0,044
150	0,43	0,043
180	0,51	0,045
210	0,33	0,031
240	0,21	0,019
270	0,059	0,0039

5 La secreción biliar del compuesto lh3e tras la administración i.v. fue eficaz y se recuperó el compuesto en la bilis en un porcentaje relativamente alto. El perfil cinético indicó que el compuesto se captaba eficazmente por el hígado y se secretaba en la bilis parcialmente como tal y también, en un menor grado, se metabolizaba para dar compuestos más polares (figura 13, 14a y 14b). Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación con taurina y glicina que en parte es relevante para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados que se producen de manera natural; esto es fundamental para dihidroxi-BA y en un menor grado para trihidroxi-BA. El grado de su recuperación en la bilis también está relacionado con la dosis administrada. Tras la administración i.d., la recuperación en la bilis fue ligeramente inferior que la recuperación tras la administración i.v., lo que sugiere que el compuesto no se absorbe eficazmente por el intestino (figuras 13, 14c y 14d). Considerando las propiedades fisicoquímicas, se espera que este compuesto pueda absorberse mediante un mecanismo de difusión pasiva ($\text{LogP}=1,44$) y no parecía estar implicado un mecanismo activo. La presencia de tres grupos hidroxilo permite que la molécula por un lado se absorba eficazmente por el hígado y secrete parcialmente en la bilis. También impide que la molécula se absorba por el intestino.

20 Ejemplo 12B.

Los resultados en la tabla mostrada a continuación revelan que el compuesto lh3e tiene un efecto colerético potente, siendo la tasa de secreción biliar máxima (SV_0) significativamente mayor que las de CDCA y CA.

25 Tabla. Parámetros de secreción de lípidos biliares tras la infusión i.v. e i.d. a una dosis de 1 ($\mu\text{mol/min.}$)/kg de peso corporal a lo largo de 1 h de BA^a

Comp.	SV_0 i.d.(i.v.)	S_{BA} i.d.(i.v.)	% libre i.d.(i.v.)	% de conjug. id(i.v.)
CDCA	57 \pm 7 (51 \pm 9)	0,7 \pm 0,2 (0,8 \pm 0,1)	3 \pm 1 (4 \pm 1)	96 \pm 8 (98 \pm 5)
CA	64 \pm 6 (78 \pm 8)	1,0 \pm 0,4 (1,3 \pm 0,2)	12 \pm 2 (8 \pm 3)	90 \pm 4 (92 \pm 6)
lh3e	112 \pm 12 (131 \pm 11)	0,5 \pm 0,2 (0,7 \pm 0,3)	94 \pm 6 (93 \pm 5)	10 \pm 5 (7 \pm 3)
R-EMCA	81 \pm 8 (90 \pm 5)	0,4 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,1)	68 \pm 8 (65 \pm 4)	32 \pm 7 (26 \pm 6)
Solución salina	46 \pm 4 (48 \pm 4)	0,4 \pm 0,1 (0,4 \pm 0,1)		

^aLos datos representan valores promedio y desviaciones estándar de seis experimentos independientes. El vehículo usado para la administración i.d. fue solución salina. El vehículo usado para la administración i.v. fue solución salina con BSA al 3%, pH 7,2. SV_0 : tasa de secreción biliar máxima ($(\mu\text{l/min.})/\text{kg}$ de peso corporal). S_{BA} : tasa de secreción de BA máxima ($(\mu\text{mol/min.})/\text{kg}$ de peso corporal). % libre: porcentaje de la dosis administrada recuperada en la bilis de las moléculas como tales. % de conjugado: porcentaje de la dosis administrada recuperada como BA conjugado.

30 Por consiguiente, los resultados en la tabla anterior muestran que el compuesto lh3e es resistente a conjugación, secretándose más del 90% del compuesto en la bilis en su forma no conjugada tras la infusión intravenosa o intraduodenal. En contraposición, CDCA y CA no pueden secretarse en la bilis como tales, requiriendo la etapa de conjugación. Por tanto, se prevé que el grupo metilo C23(S) del compuesto lh3e impide la activación de carboxilo CoA y su posterior conjugación, favoreciendo de ese modo su ruta de desviación colehepática con una absorción ductular y un efecto colerético potente.

35 Para estudiar adicionalmente la influencia de la configuración del grupo metilo C23 sobre la amidación de la cadena lateral y el efecto colerético del compuesto, también se llevaron a cabo análisis similares en el otro epímero,

concretamente, ácido 6 α -etil-23(R)-metilcólico (R-EMCA en la tabla anterior). La inspección de la tasa de secreción biliar máxima (SV0) muestra que el efecto colerético de R-EMCA es todavía superior que el de CA, aunque menor que el del compuesto lh3e. Como resultado, estos datos sugieren que la orientación del grupo metilo C-23 es importante para la conjugación del grupo carboxilo, ajustándose mal el resto metilo en el bolsillo catalítico de la enzima de conjugación en el caso del epímero C23(S). En conjunto, estos resultados muestran que el compuesto lh3e se absorbe eficazmente y experimenta ciclación enterohepática aunque con relativamente poca conjugación hepática. La baja tasa de conjugación también puede permitir que el compuesto lh3e escape del aclaramiento de primer paso hepático y alcance la circulación sanguínea sistémica.

10 *Metabolismo hepático*

Para un examen preliminar, se realizó la búsqueda de los posibles metabolitos basándose en los compuestos esperados según los experimentos y datos anteriores y la estructura y propiedades fisicoquímicas del compuesto lh3e.

El compuesto lh3e se secreta principalmente como compuesto original (no modificado) y sólo se metabolizaba ligeramente por el hígado. El metabolito principal era el conjugado de taurina y el monoglucurónido estaba presente en una baja cantidad. El metabolismo es similar para la administración tanto i.v. como i.d.. Considerando la recuperación en la bilis, se espera identificar otros metabolitos. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere en parte para lograr una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados que se producen de manera natural; esto es fundamental para dihidroxi-BA y en un menor grado para trihidroxi-BA puesto que son ya bastante polares. La formación de glucurónidos podría volverse relevante si se administran dosis superiores.

La figura 14a muestra el compuesto lh3e y sus principales metabolitos identificados en la bilis usando espectrometría de masas en el experimento i.v. Se notifican los datos como valores absolutos de área (n = 5). La figura 14b es una presentación visual en zoom de la figura 14a. La figura 14c muestra el compuesto lh3e y sus principales metabolitos identificados en la bilis usando espectrometría de masas en el experimento i.d. Se notifican los datos como valores absolutos de área. La figura 14d es una presentación visual en zoom de la figura 14c.

En resumen, el compuesto lh3e es moderadamente hidrófilo y tiene una detergencia moderada. Su captación hepática parece ser eficaz. La secreción biliar también es eficaz considerando que el compuesto se secreta principalmente no modificado y, en un grado limitado, conjugado con taurina. La absorción intestinal también es eficaz, incluso si no es completa, y la molécula no requiere metabolismo hepático extenso a la dosis administrada para secretarse a la bilis. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 impide una conjugación extensa con taurina para la secreción biliar. Por tanto, hay un aumento en el tiempo de resonancia hepática de la molécula que experimenta una ruta de desviación colehepática, que es responsable de su efecto colerético potente.

40 **Ejemplo 13. Toxicidad *in vitro* en células HepG2**

Se evaluaron los compuestos de la invención para determinar la toxicidad *in vitro* usando un ensayo de células HepG2. Se determinó la citotoxicidad en células HepG2 monitorizando la disminución de ATP y se determinó la apoptosis de células HepG2 monitorizando la activación de caspasa-3. Los resultados se muestran en la tabla 7.

45 **Citotoxicidad**

Se midió la viabilidad celular usando PerkinElmer ATP-Lite 1 STEP. El ATP es un marcador para la viabilidad celular debido a que está presente en todas las células metabólicamente activas y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células experimentan necrosis o apoptosis. Se sembraron células HepG2 (1×10^4) en una placa de 96 pocillos y se estimularon con diluciones de 10 veces desde 1 nM hasta 300 μ M del compuesto lh3e durante 4 h a 37°C. Se equilibraron las placas a TA durante 10 minutos y se añadieron 100 μ l de reactivo ATP-Lite 1 STEP a 100 μ l de medio de cultivo que contenía células. Se leyó la luminiscencia con un instrumento Victor Light (PerkinElmer). Se restó la señal experimental del fondo. Se usó tamoxifeno como control positivo de citotoxicidad celular, mientras que el control negativo eran las células no tratadas.

55 **Apoptosis**

Las caspasas participan en el control molecular de la apoptosis y el sustrato de caspasa-3 TruPoint permite un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogéneo, robusto y sensible de la actividad de caspasa-3. Se sembraron células de hepatocitos humanos (HepG2) (1×10^4) en una placa de 96 pocillos con medio de HepG2 sin piruvato de sodio. Se estimularon las células 4 h a 37°C con diluciones en serie del compuesto de prueba lh3e desde 1 nM hasta 300 μ M por triplicado. Se usó estaurosporina como control positivo de células apoptóticas. Los controles negativos eran: 1. Células no estimuladas; 2. Medio solo sin células; 3. Células incubadas sin el sustrato de caspasa. Se añadieron tampón de lisis y sustrato de caspasa-3 a las células y 1 hora y 24 horas después se

midió la fluorescencia con el aparato EnVision.

Necrosis

5 Se analizó la necrosis celular midiendo la liberación de lactato deshidroxigenasa (LDH) a partir de las células necróticas usando el ensayo de integridad de la membrana homogéneo CytoTox ONE de Promega. Se sembraron las células HepG2 (1×10^4) en una placa de 96 pocillos. Tras 18 horas de incubación, se reemplazó el medio nuevo sin piruvato de sodio y libre de suero y se añadió el compuesto lh3e en respuesta a la dosis desde 0,1 μ M hasta 500 μ M. Se usó Triton al 1% como control de liberación de LDH máxima. Se usó tamoxifeno como inductor de necrosis. Se colocaron de nuevo las células sembradas en placa en la incubadora durante 4 horas adicionales. Se transfirió el sobrenadante a una nueva placa y se añadió el mismo volumen de reactivo CytoTox-ONE a la placa. Tras 1 h de incubación se leyó la fluorescencia con el lector de placas multimarcador EnVision con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una emisión de 590 nm.

15 Tabla 7.

Toxicidad <i>in vitro</i> en células HepG2			
Compuesto	CITOTOXICIDAD disminución de ATP CE_{50} (μ M)	APOPTOSIS activación de caspasa-3 CE_{50} (μ M)	NECROSIS liberación de LDH CE_{50} (μ M)
Estaurosporina (apoptosis)	15	3	n.d.
Tamoxifeno (necrosis)	47	4	35
LCA	84	65	105
CDCA	650	890	>1000
UDCA	>1000	n.d.	n.d.
CA	>1000	n.d.	n.d.
Compuesto lh3e	>1000	n.d.	n.d.

20 Ejemplo 14. Ensayos de selectividad de NR

Se evaluó la selectividad de los compuestos de la invención usando métodos de ensayo conocidos en la técnica. Específicamente, se usaron los siguientes métodos de ensayo:

25 FXR y LXR: Reclutamiento de coactivador (alphascreen);

TGR5: Nivel de AMPc en línea de células intestinales humanas (NCI-H716);

30 PXR: Ensayo de competición de ligandos (ensayo de unión)

CAR: Reclutamiento de coactivador (Lanthascreen)

La tabla 8 muestra los resultados de estos ensayos.

35 Ensayo de coactivador de TR-FRET

Se usó el ensayo Lanthascreen (Invitrogen) para el ensayo de selectividad de receptores nucleares. El kit usa un anticuerpo anti-GST marcado con terbio, un péptido coactivador marcado con fluoresceína y un dominio de unión a ligando de NR que está etiquetado con glutatión-S-transferasa (GST) en un formato de ensayo de mezclado y lectura homogéneo. Se realizaron los ensayos en placas de 384 micropocillos (PerkinElmer). Una reacción de ensayo total de 20 μ l incluía NR etiquetados con GST 5 nM, 125 nM de péptido corregulador, 5 nM de anticuerpo anti-GST etiquetado con TB (anti-glutatión-S-transferasa etiquetado con terbio), DTT 5 mM y una concentración variable de compuesto lh3e en el tampón de ensayo suministrado por Invitrogen. El control negativo carecía del compuesto lh3e pero contenía todo lo demás en el pocillo de agonista. Tras 1 hora de incubación en la oscuridad, se realizaron mediciones de TR-FRET en el aparato Envision. Se representó gráficamente la razón de emisión 520/495 frente a concentraciones de ligando variables. Se analizaron los datos usando GraphPad Prism usando la ecuación de curva sigmoidea con pendiente variable para obtener los valores de CE_{50} .

50

Tabla 8

Ensayos de selectividad de NR							
Compuesto (Patrón de referencia)	Activación de FXR (CDCA = 10-20 μ M) CE ₅₀ (μ M)	Activación de TGR5 [LCA = 4-8 μ M] CE ₅₀ (μ M)	Activación de LXR? (T0901317 = 0,08 μ M) CE ₅₀ (μ M)	Unión a PXR (SR-12183 = 0,013 μ M) CI ₅₀ (μ M)	Activación de CAR (CITCO = 0,005 μ M) CE ₅₀ (μ M)	Activación de PPAR δ (GW0742 = 0,004 μ M) CE ₅₀ (μ M)	Activación de VDR (di-hidroxiVitD3 = 0,005 μ M) CE ₅₀ (μ M)
CDCA	20	30	Sin actividad	> 250	> 250	Sin actividad	Sin actividad
LCA	Sin actividad	4-8	Sin actividad	23	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
CA	Sin actividad	30	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
UDCA	> 150	Sin actividad	Sin actividad	> 250	> 250	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto lh3e	175	0,9	Sin actividad	110	> 250	Sin actividad	Sin actividad

FXR, LXR, CAR, PPAR δ , VDR: Ensayo de reclutamiento de coactivador; TGR-5: nivel de AMPc en línea de células intestinales humanas, NCHH716; PXR: Ensayo de competición de ligandos,

Ejemplo 15. Estabilidad del compuesto

5 Se determinó la estabilidad del compuesto lh3e usando métodos conocidos en la técnica. La concentración de la fracción celular fue de 1 mg/ml a lo largo de un transcurso de tiempo de 0-15-30-60-120-240-360-1440 minutos. Los controles positivos fueron testosterona (1000 ng/ml); 7-hidroxi-cumarina (1296 ng/ml); ácido benzoico (2440 ng/ml) a lo largo de un transcurso de tiempo de 0-10-20-40-60-120. El método analítico usado fue separación por CL/EM en una columna C18 mediante polaridad de gradiente; adquisición realizada en monitorización de ión individual. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 9.

Tabla 9.

	lh3e	Controles positivos		
		Testosterona	7-Hidroxycumarina	Ácido benzoico
		T1/2 (expresado en minutos)		
Fracción S9 de hígado humano	725	39	8,5	236
Microsomas de hígado humano	1942	8-20	----	----

Ejemplo 16. Liberación de GLP-1 ex vivo

15 La figura 16 muestra que el compuesto lh3e induce drásticamente y de manera dependiente de la dosis la liberación de GLP-1 *ex vivo*. La figura 16 muestra el impacto de 1 h de exposición a la concentración indicada de compuesto lh3e sobre la liberación de GLP-1 *ex vivo* en explantes de íleo aislados de ratones macho TGR5-Tg alimentados con HF de 18 semanas (n = 4). Se representan los datos como media \pm EE: Prueba de la t de Student para datos independientes, (*) P < 0,05, explantes de íleo tratados con compuesto lh3e frente a tratados con vehículo.

25 Se utilizan los siguientes procedimientos experimentales en los ejemplos 17 a 21.

Productos químicos y reactivos

30 Se adquirieron todos los reactivos bioquímicos de Sigma-Aldrich a menos que se indique lo contrario. El inhibidor de DPP4 (DPP4i) sitagliptina fue un amable regalo del Dr. C. Ullmer (Hoffmann-La Roche). Se sintetizó el compuesto lh3e tal como se describió anteriormente (Macchiarulo *et al.*, 2008; Pellicciari *et al.*, 2007).

Cultivo celular

35 Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* en células STC-1 o NCI-H716 tratadas con vehículo (DMSO) o compuesto lh3e. Se evaluó el compuesto lh3e para determinar su actividad agonista en TGR5 tal como se describió anteriormente (Macchiarulo *et al.*, 2008, J. Chem. Inf. Model. 48, 1792; Pellicciari *et al.*, 2007, J. Med. Chem. 50, 4265-4268). Se realizó la producción de AMPc tal como se describe (Sato *et al.*, 2008, J. Med. Chem. 51, 1831; Watanabe *et al.*, 2006, Nature 439, 484). Se evaluó la actividad de Cox siguiendo la oxidación de citocromo c completamente reducido (Sigma) a 550 nm (Feige *et al.*, 2008b, Cell Metab. 8, 347). Se midieron la razón de

ATP/ADP y liberación de GLP-1 según las instrucciones del fabricante (Biovision y Millipore, respectivamente). Se prepararon adipocitos marrones primarios tal como se describió anteriormente (Watanabe *et al.*, 2006, Nature 439, 484), y se prepararon explantes de íleo según un método establecido (Cima *et al.*, 2004, J. Exp. Med. 200, 1635-1646).

5

Cuantificación de calcio intracelular

Se sembraron NCI-H716 (40.000 células) en placas negras de 96 pocillos recubiertas con Matrigel (BD Biosciences). Setenta y dos horas tras la transfección, se lavaron las células dos veces en tampón de ensayo (HBSS1x, HEPES 20 mM [pH 7,4]) y se sometieron a ensayo para determinar el calcio intracelular con Fluo-4 AM según el protocolo del fabricante (Invitrogen).

10

Bioquímica e histoquímica

Se midieron los parámetros plasmáticos y el contenido en lípidos fecales y hepáticos tal como se describe (Mataki *et al.*, 2007, Mol. Cell. Biol. 27, 8330-8339). Se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H&E), Sirius rojo y aceite rojo O tal como se describe (Mark *et al.*, 2007, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29B, 24), y se tomaron micrografías en microscopios de campo amplio (Leica) con una cámara CCD. Para secciones pancreáticas, se determinó el tamaño de los islotes y se contaron a partir de cuatro secciones alternadas teñidas con HE separadas 150 μ M usando el software ImageJ (cinco animales por grupo). Se realizó la tinción inmunofluorescente de insulina tal como se describe (Fajas *et al.*, 2004, J. Clin. Invest. 113, 1288). Adicionalmente, se aislaron islotes pancreáticos mediante digestión con colagenasa de páncreas de ratones TGR5-Tg alimentados con HF según procedimientos disponibles en línea (por ejemplo, véase JOVE (sitio web de Journal of Visualized Experiments)). Se extrajo insulina tras la incubación durante la noche a -20°C en etanol ácido y se midió mediante ELISA en muestras diluidas con PBS según las instrucciones del fabricante (Merckodia). Se midió la liberación de GLP-1 *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* según métodos conocidos en la técnica.

15

20

25

Medición del consumo de oxígeno

Se midió el consumo de oxígeno celular usando un analizador Seahorse Bioscience XF24 con diez réplicas biológicas por condición (Feige *et al.*, 2008b, Cell Metab. 8, 347).

30

Experimentos con animales

Se alojaron los animales y se criaron según procedimientos normalizados (Argmann y Auwerx, 2006b). Se usaron ratones macho de edad coincidente para todos los experimentos. Se generaron modelos de ratón modificados por ingeniería genética (GEMM), es decir, ratones TGR5-Tg y TGR5^{-/-}, tal como se describe en los datos complementarios. Se indujo DIO en los GEMM o ratones C57BL/6J (Charles River) alimentando ratones de 8 semanas de edad con una dieta HF (el 60% de cal/grasa, D12492; Research Diets) durante al menos 8 semanas, tal como se menciona en el texto y las leyendas de las figuras. En los experimentos de intervención dietética, se mezcló el compuesto lh3e con la dieta (Feige *et al.*, 2008a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29B, 25) a la dosis suficiente para lograr una dosis *in vivo* de 30 mg/kg/d. Se realizaron experimentos de fenotipado de ratones según protocolos de EMPRESS (véase, por ejemplo, el sitio web de Empress (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screening)) y estaban dirigidos a evaluar la ingesta de alimento y agua, la composición corporal (Argmann *et al.*, 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29A, 23), el gasto de energía (Argmann *et al.*, 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29A, 23), la homeostasis de glucosa y lípidos (Argmann *et al.*, 2006b, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29A, 22); Heikkinen *et al.*, 2007, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29B, 23; Mataki *et al.*, 2007, Mol. Cell Biol. 27, 8330) y la bioquímica plasmática (Argmann y Auwerx, 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, unidad 29A, 22). Se recogieron tejidos y sangre y se procesaron para la histopatología, química sanguínea y expresión génica según procedimientos normalizados (Argmann y Auwerx, 2006a; Feige *et al.*, 2008b; Mark *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2006). Se realizaron estudios de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico tal como se describe (Feige *et al.*, 2008b), con modificaciones menores incluyendo un cambio en el bolo de insulina inicial (30 mU/kg) y la tasa de infusión de insulina (10 mU/min./kg). Se midieron los niveles de GLP-1 en plasma mediante ELISA (Millipore) en sangre extraída mediante punción retro-orbital. Se realizaron experimentos con ratones db/db (Charles River) en animales de 14 semanas de edad alimentados con CD sin o con el compuesto lh3e (30 mg/kg/d) durante 6 semanas (Feige *et al.*, 2008a).

35

40

45

50

55

Obtención del perfil de expresión génica

Se realizó la obtención del perfil de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Feige *et al.*, 2008b; Watanabe *et al.*, 2006). Las secuencias de cebador usadas se han publicado anteriormente, excepto las usadas para el gen Kir6.2: R-5' AGATGCTAAACTTGGGCTTG (SEQ ID NO. 1), F-5' TAAAGTGCCACACCACTC (SEQ ID NO. 2).

60

Estadística

Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba de la t de Student para datos independientes. Se expresan los datos como media \pm EEM, y se consideraron valores de P menores de 0,05 estadísticamente significativos.

5

Ejemplo 17. Expresión de ARNm de TGR5

Se ha establecido anteriormente un vínculo entre BA y el gasto de energía *in vivo* (Watanabe *et al.*, 2006, Nature, 439, 484-489), por tanto se especuló que la activación de la señalización de TGR5 podría tener un impacto sobre la actividad mitocondrial de un modo más general. Para encontrar apoyo inicial para esta hipótesis, se analizó la expresión de ARNm de TGR5 mediante la base de datos de ARNm de hígado GeneNetwork en la población de referencia genética BxD tal como se encuentra en el sitio web de GeneNetwork University of Tennessee. Era evidente un amplio intervalo de variación en la expresión de ARNm de TGR5 entre las diferentes cepas de ratones BxD. De manera interesante, la expresión de ARNm de TGR5 estaba correlacionada de manera significativamente alta con la expresión de varios genes que codifican para subunidades de complejos implicados en fosforilación oxidativa, tales como citocromo c oxidasa (Cox) (por ejemplo, CoxVI1a; figura 17A) y ATP sintasa (Atp6v0b, subunidad B de V0 que transporta H⁺ de ATPasa; Atpaf2, factor 2 de ensamble del complejo F1 de ATP sintasa mitocondrial; Atp1a3, polipéptido alfa 3 que transporta Na⁺/K⁺ de ATPasa; Atp6v1 b2, isoforma 2 de la subunidad V1 que transporta H⁺ de ATPasa). Concordando con esta observación, el tratamiento de células STC-1 con el compuesto lh3e dio como resultado un aumento dependiente de AMPc en la actividad de Cox (figura 17B), que estaba asociado con un aumento en el consumo de oxígeno celular (figura 17C) y una elevación en la razón de ATP/ADP (figura 17D). Se confirmó este resultado en la línea celular enteroendocrina humana NCI-H716, en la que el tratamiento con el compuesto lh3e aumentó la producción de ATP de una manera dependiente de AMPc. De manera interesante, la expresión de TGR5 también estaba fuertemente correlacionada con la de Kir6.2, un componente del canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}) (figura 17E). Se corroboraron adicionalmente estas correlaciones mediante interferencia de ARN de TGR5 en células STC-1, que dio como resultado una caída concomitante en la expresión de ARNm de Kir6.2 y CoxIV (figura 17F).

Ejemplo 18. La activación de la ruta de señalización de TGR5 aumenta los niveles de calcio intracelular y estimula la liberación de GLP-1 en células L enteroendocrinas

En células β pancreáticas, está bien establecido que un aumento en la razón de ATP/ADP derivada del metabolismo de glucosa cierra los canales de K_{ATP}, dando como resultado despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización de la membrana a su vez abre canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v), provocando un flujo de entrada de calcio. Entonces el aumento resultante en el calcio intracelular desencadena la interacción directa entre proteínas exocitóticas situadas en la membrana de gránulos que contienen insulina y las ubicadas en la membrana plasmática (Yang y Berggren, 2006, Endocr. Rev. 27, 621-676), conduciendo a la posterior liberación de insulina (Nichols, 2006, Nature, 440, 470-476). Recientes hallazgos apoyan la hipótesis de que los canales K_{ATP} y Ca_v también desempeñan un papel fundamental en la liberación de GLP-1 a partir de células L enteroendocrinas (Reimann y Gribble, 2002, Diabetes 51, 2757-2763; Reimann *et al.*, 2008, Cell Metab. 8, 532-539). De manera fascinante, en la población de referencia BxD, también se encontró que la expresión de TGR5 estaba correlacionada con la expresión de Ca_v2.2 (figura 18A), cuya expresión se describió anteriormente en células enteroendocrinas (Reimann *et al.*, 2005, J. Physiol. 563, 161-175) y que participa en la liberación de insulina estimulada por calcio en células β pancreáticas (Yang y Berggren, 2006, Endocr. Rev. 27, 621-676). Junto con esto, el compuesto lh3e aumentó fuertemente el flujo de entrada de calcio en la línea celular enteroendocrina humana NCI-H716, un efecto que se potenció por la sobreexpresión de TGR5 y, en contraposición, se suavizó por interferencia de ARN de TGR5 (figuras 18B y 18C) o por la adición del inhibidor de adenilato ciclasa MDL-12330A(MDL) (figura 18D). Además, la presencia de glucosa potenció el aumento dependiente de TGR5 en el calcio intracelular (figura 18E). Este efecto estaba correlacionado con un aumento en la liberación de GLP-1 a partir de las células NCI-H716 (figura 18F), que se inhibió por MDL-12-330A.

Se confirmó adicionalmente la liberación de GLP-1 mediada por TGR5 desencadenada por el compuesto lh3e en las células STC-1 enteroendocrinas de ratón en las que el impacto del compuesto lh3e sobre la liberación de GLP-1 se potenció por la sobreexpresión de TGR5, mientras que se previno o bien mediante interferencia de ARN (figura 18G) o bien mediante MDL-12-330A, subrayando adicionalmente la dependencia de AMPc de la liberación de GLP-1 mediada por TGR5 (figura 18H). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que TGR5 regula una ruta clave que gobierna la liberación de GLP-1 a partir de células L enteroendocrinas.

Ejemplo 19. La sobreexpresión de TGR5 modula la secreción de GLP-1 *in vivo*

Para evaluar adicionalmente el papel metabólico de la señalización de TGR5 potenciada, se evaluó el impacto de la sobreexpresión transgénica de TGR5 *in vivo* en el contexto de DIO en ratones. Se generaron ratones transgénicos para TGR5 (TGR5-Tg) mediante inyección en ovocitos del cromosoma bacteriano artificial (BAC) RP23-278N1. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se mostró que los ratones TGR5-Tg habían integrado seis copias del clon

60

de BAC RP23-278N1 1, conduciendo a una expresión de ARNm de TGR5 fuerte, restringida a la mayoría de tejidos que expresan TGR5 normalmente. Se mejoró notablemente la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5-Tg expuestos durante 10 semanas a una dieta alta en grasa (HF) en comparación con compañeros de camada alimentados con HF control (figura 19A), mientras que no se observaron diferencias en ratones con dieta de pienso para roedores (CD) (datos no mostrados). A diferencias de las expectativas, no se observaron diferencias en el aumento de peso corporal entre ratones de tipo natural y TGR5-Tg con la dieta CD o HF, demostrando que la mejora de la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5-Tg no podía atribuirse a los efectos confusos de la pérdida de peso. Se explicó la ausencia de aumento de peso en ratones TGR5-Tg, tras un aumento en el gasto de energía, por una reducción de la actividad locomotora. Puesto que los ratones deficientes en receptor de GLP-1 presentan una hiperactividad marcada (Hansotia *et al.*, 2007, J. Clin. Invest. 117, 143-152), se administró el agonista de receptor de GLP-1 Ex-4 a ratones de tipo natural con el fin de evaluar si la disminución en la actividad locomotora en ratones TGR5-Tg podría estar vinculada a la secreción de GLP-1. Ex-4 redujo eficazmente y de manera dependiente de la dosis la actividad locomotora en ratones. De manera interesante, a 1 nmol/Kg, se observó una disminución significativa en la actividad locomotora mientras que los ratones aún estaban comiendo apropiadamente.

De manera interesante, y según las expectativas, la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5-Tg estaba asociada con una fuerte secreción de GLP-1 y liberación de insulina en respuesta a una carga de glucosa oral (figura 19B). Se subrayó la significación de la secreción de GLP-1 potenciada por el hecho de que se realizaron las mediciones de los niveles de GLP-1 en plasma sin administración oral preliminar de un inhibidor de dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) a los ratones. Esta liberación de GLP-1 potenciada en ratones TGR5-Tg ayuda a explicar la actividad locomotora disminuida en estos ratones. Para investigar adicionalmente el impacto de la sobreexpresión de TGR5 sobre la secreción de GLP-1, se expusieron posteriormente los ratones alimentados con HF a una comida de prueba para estimular la liberación de BA a partir de la vesícula biliar. De manera interesante, el impacto de la sobreexpresión de TGR5 sobre la liberación de insulina y GLP-1 era más pronunciado de manera posprandial que tras la exposición simple a glucosa (figura 19C). Se especula que estos efectos se deben al flujo de BA aumentado desencadenado por la comida de prueba en comparación con la exposición a glucosa. En línea con esta hipótesis, el tratamiento de explantes de íleo de ratones TGR5-Tg y control con ácido litocólico (LCA) confirmó que los BA proporcionan una excelente señal para inducir la liberación de GLP-1 en el contexto de expresión de TGR5 alta (figura 19D). Estos datos están además de acuerdo con resultados obtenidos en células STC-1 transfectadas con mTGR5 en las que la liberación de GLP-1 también se reforzó por el aumento de la expresión de TGR5 (figura 19G). Se especula que en el contexto de explantes de íleo de tipo natural, la degradación rápida de GLP-1 por la enzima DPP4 podría enmascarar el moderado aumento en la liberación de GLP-1 desencadenado por LCA.

El impacto de GLP-1 sobre la función pancreática se ha documentado de manera extensa durante la última década y oscila entre los efectos de secretagogos de insulina y la promoción de la supervivencia y proliferación de islotes pancreáticos (Drucker, 2006, Cell Metab. 3, 153-165). En este contexto, la tinción inmunofluorescente de insulina en secciones pancreáticas reveló que, a diferencia de islotes hipertróficos con bajo contenido en insulina, tal como se observa en ratones control alimentados con HF, los islotes de ratones TGR5-Tg alimentados con HF no eran hipertróficos ni se teñían más intensamente para la insulina (figura 19E). En línea con estos datos, el recuento y la determinación del tamaño de islotes pancreáticos confirmaron que la expresión de TGR5 da como resultado el mantenimiento de un perfil de distribución de islotes normal (figura 19F), probablemente debido a niveles de GLP-1 en plasma potenciados. Además, el contenido en insulina de islotes pancreáticos aislados era significativamente mayor en ratones TGR5-Tg alimentados con HF que en los controles (figura 19G).

Para establecer adicionalmente un papel de la señalización de TGR5 en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, se evaluó la tolerancia a la glucosa de ratones deficientes en TGR5 de línea germinal (TGR5^{-/-}), generados criando ratones en los que el alelo de TGR5 se intercaló entre dos sitios Lox P con ratones transgénicos para CMV-Cre. En contraste directo con lo que se observó en ratones TGR5-Tg, la tolerancia a la glucosa estaba alterada en ratones TGR5^{-/-} expuestos a una dieta HF durante 8 semanas (figura 19H), mientras que no se observaron diferencias en ratones alimentados con CD (datos no mostrados). Entonces se sometió a prueba la secreción de GLP-1 exponiendo ratones TGR5^{+/-} y TGR5^{-/-} a una carga de glucosa oral 30 min. tras la administración de solución salina o compuesto lh3e solo, o en combinación con el inhibidor de DPP4 (DPP4i), sitagliptina. La administración previa del compuesto lh3e aumentó moderadamente la liberación de GLP-1 tras una exposición a glucosa en ratones TGR5^{+/-} (figura 19I). Sin embargo, este efecto era marcadamente más pronunciado cuando se coadministró DPP4i como consecuencia de su capacidad para prolongar la semivida de GLP-1 en plasma (Drucker y Nauck, 2006, Lancet, 368, 1696-1705) (figura 19I). En contraposición, se suavizaron los efectos del compuesto lh3e sobre los niveles de GLP-1 en plasma en ratones TGR5^{-/-} (figura 19J). Conjuntamente, estos datos subrayan el papel crítico de la señalización de TGR5 en el control de la liberación de GLP-1 y demuestran además la especificidad del compuesto agonista semisintético lh3e *in vivo*.

Ejemplo 20. El compuesto agonista de TGR5 lh3e aumenta el gasto de energía y reduce la esteatosis hepática y la obesidad con alimentación alta en grasa

En vista del perfil de glucosa e insulina mejorado en ratones TGR5-Tg, a continuación se evaluó el potencial

terapéutico del compuesto lh3e mezclado a una dosis de 30 mg/kg/día (mkd) con la dieta en un estudio de intervención en ratones C57BL/6J en los que se indujo diabetes mediante alimentación HF durante 14 semanas. Tal como se esperaba, el perfil de HPLC de BA en plasma confirmó la presencia de compuesto lh3e en los ratones tratados sólo (figura 20A). Los niveles en plasma de compuesto lh3e estaban dentro del intervalo de los de CA y ácido 3-muricolico. Es destacable que el tratamiento con compuesto lh3e no afectó ni a la composición de BA en plasma ni al perfil de expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de BA, cuya expresión está principalmente bajo el control de receptores nucleares. La ausencia completa de cambios en el nivel de expresión de genes diana clásicos de FXR en el hígado, tales como colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) y bomba de exportación de sales biliares (BSEP) (Thomas *et al.*, 2008, Nat. Rev. Drug Discovery 7, 678-693), confirmó adicionalmente la especificidad del compuesto lh3e hacia TGR5.

Tras 10 semanas de tratamiento con el compuesto lh3e, se observó una atenuación significativa del aumento de peso corporal de aproximadamente el 15%, en asociación con una fuerte reducción en la masa grasa, en ratones tratados con lh3e alimentados con HF en relación con controles alimentados con HF (figuras 20B y 20C). También se atenuó el aumento en la masa de almohadilla de grasa e hígado en ratones tratados con lh3e alimentados con HF (figura 20D). Tal como se observó en el estudio previo con CA (Watanabe *et al.*, 2006, Nature, 439, 484-489), la disminución en la masa de BAT estaba relacionada con una disminución de tejido adiposo blanco (WAT) en la región interescapular (figura 20D y datos no mostrados). Los cambios metabólicos entre ratones alimentados con HF tratados con lh3e y alimentados con HF control no estaban provocados por una ingesta de calorías reducida (figura 20E) o una pérdida de energía fecal, sino que más bien fueron la consecuencia del gasto de energía potenciado, tal como se indica por la medición del consumo de O₂ y la producción de CO₂ durante la calorimetría indirecta (figura 20F). Durante el periodo de oscuridad, se redujo significativamente el cociente respiratorio de ratones tratados con lh3e, lo que concuerda con un aumento de la quema de grasa (figura 20F). La obtención del perfil de expresión génica de BAT confirmó que la activación de la ruta de señalización de TGR5 desencadena el aumento de varios genes mitocondriales implicados en el gasto de energía junto con una inducción de la expresión del gen de desyodasa tipo 2 (figura 20G). La activación de la cadena respiratoria mitocondrial por el compuesto lh3e se demostró adicionalmente midiendo el consumo de O₂ en adipocitos marrones primarios aislados de ratones C57BL/6J tratados durante 12 h con compuesto lh3e. La adición del agente de desacoplamiento, carbonilcianuro-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), reforzó el consumo de O₂ basal en todas las condiciones pero estaba significativamente más pronunciado en los tratados con compuesto lh3e (figura 20H). Además del gasto de energía potenciado, también se mejoró la función hepática, tal como se demuestra por la reducción en la esteatosis del hígado, que se evaluó mediante tinción con aceite rojo O (figura 20I) y cuantificación bioquímica del contenido en lípidos del hígado (figura 20J). Además, se redujeron notablemente los niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en comparación con controles alimentados con HF, lo que se correlaciona con la ausencia de fibrosis hepática en secciones de hígado de ratones tratados con lh3e teñidas con Sirius rojo (figuras 20I y 20K). También se reflejó la mejora en la función hepática por la caída significativa en triglicéridos plasmáticos y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en ratones alimentados con HF tratados con compuesto lh3e (figura 20L).

Ejemplo 21. El compuesto agonista de TGR5 lh3e mejora la sensibilidad a la insulina en ratones obesos

Se determinó la capacidad del compuesto lh3e para mejorar la homeostasis de la glucosa. Tanto en ratones DIO como db/db, un modelo ambiental y genético de diabetes, respectivamente, el tratamiento con compuesto lh3e (30 mkd) mezclado con la dieta mejoró fuertemente la tolerancia a la glucosa tras una exposición oral a glucosa (figuras 21A y 21C), junto con una mejora del perfil de secreción de insulina estimulada por glucosa (figuras 21B y 21D, panel inferior). Esta característica concuerda con una mejora mediada por GLP-1 en la función pancreática. Además, los niveles de glucosa e insulina en ayuno estaban disminuidos en ratones tanto DIO como db/db que se trataron con compuesto lh3e (figuras 21B y 21D, panel superior). Para caracterizar adicionalmente el impacto del compuesto lh3e sobre la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, se realizó un pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico de glucosa en estos ratones DIO. Concordando con la tolerancia a glucosa mejorada, la tasa de infusión de glucosa requerida para mantener la euglucemia en ratones DIO tratados con compuesto lh3e era prácticamente idéntica a la observada en ratones control alimentados con CD (figura 21E). Aunque los ratones alimentados con HF resistentes a la insulina mostraron una producción endógena aumentada de glucosa hepática, junto con una reducción de tanto la tasa de disposición de glucosa como la supresión de la producción de glucosa por la insulina, el tratamiento con compuesto lh3e de ratones alimentados con HF normalizó estos parámetros a los valores observados en ratones alimentados con CD (figura 21E). La medición de la captación de ¹⁴C-desoxiglucosa estimulada por insulina durante el pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico de glucosa indicó que la mejora en la homeostasis de la glucosa por el compuesto lh3e podía atribuirse principalmente a la reducción de la resistencia a la insulina en hígado y músculo (figura 21F). Estos efectos se correlacionaban con una normalización en la expresión de genes clave implicados en la homeostasis de glucosa hepática (figura 21G).

Para abordar la especificidad del compuesto lh3e con respecto a TGR5 *in vivo*, se comparó el impacto del tratamiento de 4 semanas con compuesto lh3e a 30 mkd sobre la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5⁺ y TGR5^{-/-}, sensibilizados mediante alimentación HF durante 9 semanas. Incluso a lo largo de ese corto periodo de tiempo, el compuesto lh3e mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa en TGR5^{+/+} alimentados con una dieta

HF (figura 6A), junto con una normalización de la secreción de insulina durante la exposición a glucosa oral (figura 6B). Se suavizaron estos efectos en ratones TGR5^{-/-}, proporcionando de ese modo argumentos adicionales para apoyar la especificidad del compuesto lh3e para TGR5 (figuras 22A y 22B).

5 Ejemplo 22. Farmacocinética y metabolismo en rata con fístula biliar tras administración i.v. para los compuestos lh3e e li3e

La diferencia entre los dos diastereoisómeros puros, lh3e e li3e, es que el grupo C-23 metilo está orientado de manera diferente, generando así las formas 23S y 23R. Esta modificación estructural podría modificar en parte las propiedades fisicoquímicas, el metabolismo y la farmacocinética de los dos compuestos. La introducción de un grupo C-23 metilo en la cadena lateral orientada de manera diferente produjo dos isómeros en los que también el grupo carboxilo está orientado de manera diferente y su reactividad en el proceso de amidación o en la desconjugación de la forma amidada puede ser diferente entre los dos diastereoisómeros. La diferente orientación del grupo carboxilo también es responsable de un equilibrio hidrófobo/hidrófilo diferente de las dos moléculas que podría dar como resultado diferentes propiedades biológicas y metabolismo. Con el fin de aclarar este punto, se administraron los dos isómeros puros mediante infusión femoral (i.v.) a un modelo de rata con fístula biliar a una dosis única de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ de peso corporal durante 1 hora y se recogieron muestras de bilis durante 3 horas. También se evaluaron el efecto sobre el flujo de bilis, sobre la secreción biliar del compuesto original y del metabolito principal.

20 *Flujo de bilis. Efecto colerético*

Métodos

Se realizó este estudio mediante administración de los dos compuestos por medio de infusión femoral (i.v.); se trataron 6 ratas (peso corporal 267 ± 12 g) con cada diastereoisómero a una dosis de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$. La infusión femoral empezó tras 75 minutos de estado estacionario y continuó durante 60 minutos. Se recogieron muestras de bilis cada 15 minutos durante 2 horas. Además, se trataron 3 ratas con solución salina con BSA al 3% en las mismas condiciones para tiempos y toma de muestras (ratas control femoral).

30 Resultados

El flujo de bilis durante la infusión i.v. del vehículo de solución salina con BSA al 3% control mantuvo un valor que oscilaba entre 40 y 60 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$ durante todo el periodo de los experimentos. La infusión i.v. del compuesto lh3e aumentó significativamente la velocidad de flujo de bilis y este fenómeno empezó 15 minutos tras el comienzo del periodo de infusión y continuó durante al menos 2 horas tras el final del periodo de infusión (figura 23). La infusión i.v. del compuesto li3e también aumentó la velocidad de flujo de bilis pero este efecto es significativamente inferior al observado para el compuesto lh3e de isómero (figura 23).

Farmacocinética (secreción biliar) de los isómeros administrados tras la infusión i.v.

Se analizaron muestras de bilis recogidas a diferentes tiempos durante los experimentos i.v. para determinar las secreciones biliares de los isómeros administrados y sus principales metabolitos recuperados en la bilis.

45 Materiales

Se obtuvo polvo cristalino puro de cada compuesto del laboratorio de R. Pellicciari's en la Universidad de Perugia. Se prepararon disoluciones madre en metanol a 1 mmol/l y se prepararon disoluciones de trabajo diluyendo volúmenes apropiados de la disolución primaria. El metanol y acetonitrilo eran de pureza de calidad para HPLC. El amoniaco era puro al 30% y el ácido acético era puro al 99,8%. Se obtuvieron todos los reactivos de Carlo Erba Reagents. Se preparó agua de calidad para HPLC mediante un sistema Milli-Q.

Preparación de muestras

Se llevaron muestras de bilis de rata a temperatura ambiente, se agitaron brevemente y se diluyeron 1:100 ó 1:200 v/v con tampón acetato de amonio 15 mM (pH = 5,0): acetonitrilo (70:30, v/v). Se transfirió la disolución final a un vial de inyector automático y se inyectaron 10 μl en la columna cromatográfica. Cuando se encontraba que las muestras estaban fuera del intervalo de linealidad, se diluyeron y se analizaron de nuevo.

60 Método de HPLC-ESI-EM/EM

Se analizaron muestras de bilis de rata mediante HPLC-ESI-EM/EM usando la fuente ESI en el modo de ionización negativa. Para la cromatografía de líquidos se usó un módulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado con un inyector automático. Se mantuvo el inyector automático a 7°C. Se realizó separación en una columna Synergi Hidro-RP C 18 (150 x 2,0 mm de d.i., tamaño de partícula de 4 μm), protegida por una precolumna SecurityGuard ODS 4 x

2,0 mm de d.i., ambas suministradas por Phenomenex. Se eluyó el analito usando tampón acetato de amonio 15 mM (pH = 5,0) como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. Se aumentó la fase móvil B desde el 30% hasta el 64% en 10 minutos, luego hasta el 100% en 10 minutos, y se mantuvo constante durante 10 minutos. La velocidad de flujo era de 150 µl/min. y se mantuvo la columna a 45°C. Se introdujo el efluente de la columna en la fuente de ESI conectada a un EM de triple cuadruplo (Quattro-LC, Micromass) que funcionaba en el modo de adquisición de monitorización de reacción múltiple (MRM). Se usó nitrógeno como gas nebulizador a una velocidad de flujo de 100 l/h y como gas de desolvatación a 930 l/h. Se ajustaron las temperaturas del bloque de fuente de iones y de desolvatación respectivamente a 80°C y 180°C. El voltaje capilar era de 3,0 kV. Se usó el software MassLynx versión 4.0 para la adquisición y el procesamiento de datos. Además, usando espectrometría de masas tanto en las configuraciones de EM individual como de EM/EM en tándem, se realizaron experimentos para identificar metabolitos.

Cuantificación

Se preparó diariamente una curva de calibración de 5 puntos y se inyectó por duplicado. Se obtuvieron muestras de calibración en el intervalo de concentración 0,1-20 µmol/l preparadas en la fase móvil. Se obtuvieron los parámetros de la curva de calibración lineal a partir del gráfico del área de pico de analito frente a la concentración de analito usando un análisis de regresión de mínimos cuadrados (peso = 1/x²). Los coeficientes de correlación eran ≥ 0,994. También se estimaron los metabolitos conjugados con taurina de los compuestos lh3e e li3e incluso si no estaban disponibles patrones. Se aplicó un factor de corrección estimado previamente, para tener en cuenta las diferentes respuestas en ES-EM/EM entre especies conjugadas con taurina y libres, a los valores de área obtenidos a partir de los cromatogramas de conjuntos de datos de HPLC-MRM. Finalmente, se usaron curvas de calibración obtenidas para el BA libre para estimar los metabolitos conjugados con taurina.

Resultados-Secreción biliar-Compuesto lh3e

La secreción biliar del compuesto lh3e tras la administración i.v. fue eficaz y se recuperó el compuesto en la bilis a un porcentaje relativamente alto de la dosis administrada. El perfil cinético indica que el compuesto lh3e se captó eficazmente por el hígado y se secretó en la bilis principalmente no modificado y también, en un menor grado, conjugado con taurina (figura 24); se han identificado otros metabolitos minoritarios incluyendo glucurónidos en la bilis en cantidades traza (figuras 26 y 27).

La presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación fisiológica con taurina y glicina que es relevante para la secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados que se producen de manera natural; es fundamental para dihidroxi-BA y en un menor grado para trihidroxi-BA. El grado de su recuperación en la bilis también está relacionado con la dosis administrada como se ha observado para el ácido cólico (Roda A. *et al.* Hepatology. 8,1571-6,1988).

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del compuesto lh3e, se esperaba que este compuesto se absorbiese mediante un mecanismo de difusión pasiva (Log P = 1,44) y no parecía estar implicado un mecanismo activo. La presencia de tres grupos hidroxilo permite que la molécula se capte eficazmente por el hígado y se secrete a la bilis. El grupo 6-etilo impide también la 7-deshidroxilación por bacterias intestinales tal como se mostró en el informe previo.

Resultados-Secreción biliar-Compuesto li3e

Se notifica en la figura 25 la secreción biliar del compuesto li3e tras la infusión i.v. El perfil cinético indica que el compuesto se metaboliza por el hígado más extensamente que el compuesto lh3e. El compuesto original se secreta en la bilis como tal y en un menor grado como conjugado con taurina. Con respecto a su compuesto lh3e de diastereoisómero, el porcentaje de conjugación es superior y la tasa de secreción máxima de la forma no conjugada es inferior. Esto sugiere que el isómero C-23(R) presenta una geometría de cadena lateral y orientación más adecuadas para el proceso de amidación con respecto al isómero (S) que se secreta como forma no conjugada en un porcentaje superior. La conjugación con taurina contribuye a mejorar la recuperación del compuesto li3e en la bilis que es aproximadamente del 70-80% de la dosis administrada. Se han identificado otros metabolitos minoritarios incluyendo glucurónidos en la bilis en cantidad traza (figuras 28-29).

Metabolismo hepático

Métodos

Usando datos obtenidos de experimentos previos así como las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los análogos estudiados, se llevó a cabo un examen preliminar para buscar posibles metabolitos.

Compuesto lh3e

Se secretó principalmente esta molécula como compuesto original (no modificado) y sólo se metabolizó ligeramente por el hígado. El metabolito principal fue la especie conjugada con taurina y, a niveles muy bajos, se detectó la especie de mono-glucurónido (figura 26-27).

5 La presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados que se producen de manera natural; esto es fundamental para dihidroxi-BA y en un menor grado para trihidroxi-BA puesto que son ya bastante polares. La formación de glucurónidos podría volverse relevante si se administra a dosis superiores.

10 Compuesto li3e

Se secretó esta molécula principalmente como compuesto original (no modificado) y también se metabolizó por el hígado para formar la especie conjugada con taurina y, a niveles muy bajos, la especie de mono-glucurónido (figura 27-29).

15 La presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados que se producen de manera natural; esto es fundamental para dihidroxi-BA y en un menor grado para trihidroxi-BA, puesto que son ya bastante polares. La formación de glucurónidos podría volverse relevante si se administra la molécula a dosis superiores.

20 Se secreta el compuesto li3e en la bilis en porcentaje superior que el compuesto lh3e de diastereoisómero como forma conjugada con taurina, el 20-30% frente al 5-10% y esto explica la diferente geometría de la cadena lateral y la lipofiliidad ligeramente superior del compuesto li3e.

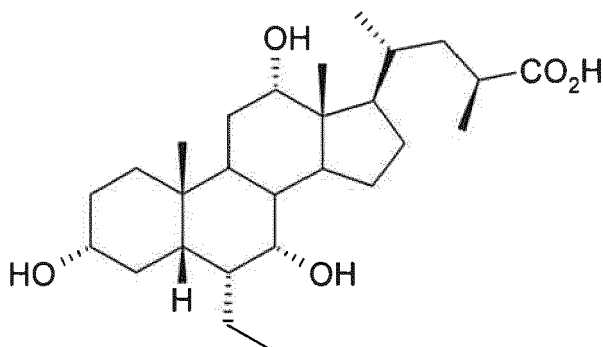
25 El compuesto lh3e es moderadamente hidrófilo y tiene una detergencia moderada. Su captación hepática parece eficaz. La secreción biliar también es eficaz considerando que el compuesto se secreta principalmente no modificado y, en un grado limitado, conjugado con taurina. La absorción intestinal se produce por medio de un mecanismo pasivo como BA no conjugado que se produce de manera natural y la cinética es similar a la del ácido cólico ligeramente inferior que ácidos dihidroxibiliares (Aldini R. *et al.* Steroids 61, 590-7, 1996).

30 El compuesto lh3e no requiere metabolismo hepático extenso a la dosis administrada para secretarse a la bilis. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 (S) impide la conjugación extensa con taurina y la molécula puede secretarse eficazmente no modificada. Un aumento del tiempo de residencia hepático de la molécula resulta de una absorción ductular ya que esta molécula experimenta una ruta de desviación colehepática, que es responsable de su efecto colerético potente.

35 El compuesto li3e es el diastereoisómero del compuesto lh3e. El compuesto li3e se caracteriza por una hidrofiliidad ligeramente inferior como resultado de la diferente geometría de la cadena lateral. Por tanto, el grupo carboxilo C-23 está orientado de manera diferente y esto explica el equilibrio hidrófilo-hidrófobo diferente de la molécula. Como consecuencia de su lipofiliidad superior, la molécula requiere una conjugación más extensa con taurina con respecto al compuesto lh3e. La geometría de la cadena lateral de este último compuesto produce probablemente un BA con una especificidad de sustrato inferior hacia la enzima responsable de la conjugación mediada por el proceso de activación con CoA. El resultado final es que el compuesto li3e se secreta en la bilis en un porcentaje conjugado superior que el compuesto lh3e.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto lh3e que tiene la estructura química:

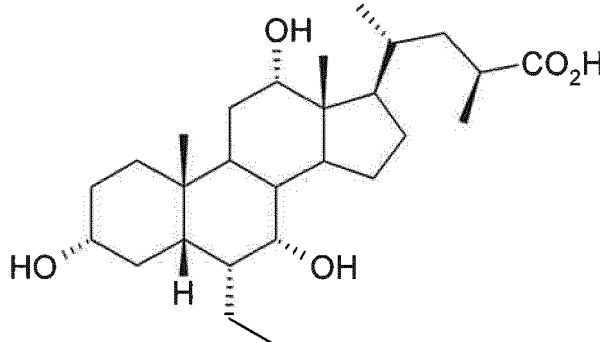


5 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o conjugado de aminoácido taurina o glicina del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es un conjugado de aminoácido glicina.

- 10 3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es un conjugado de aminoácido taurina.

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es



- 15 5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.

6. Composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto según la reivindicación 1, 4 ó 5 o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 7. Compuesto según la reivindicación 1, 4 ó 5 o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un sujeto, en el que la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal.

- 25 8. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad es diabetes.

9. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad es obesidad.

- 30 10. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad es diabetes.

11. Kit para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto, en el que el kit comprende un compuesto según la reivindicación 1, 4 ó 5 o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

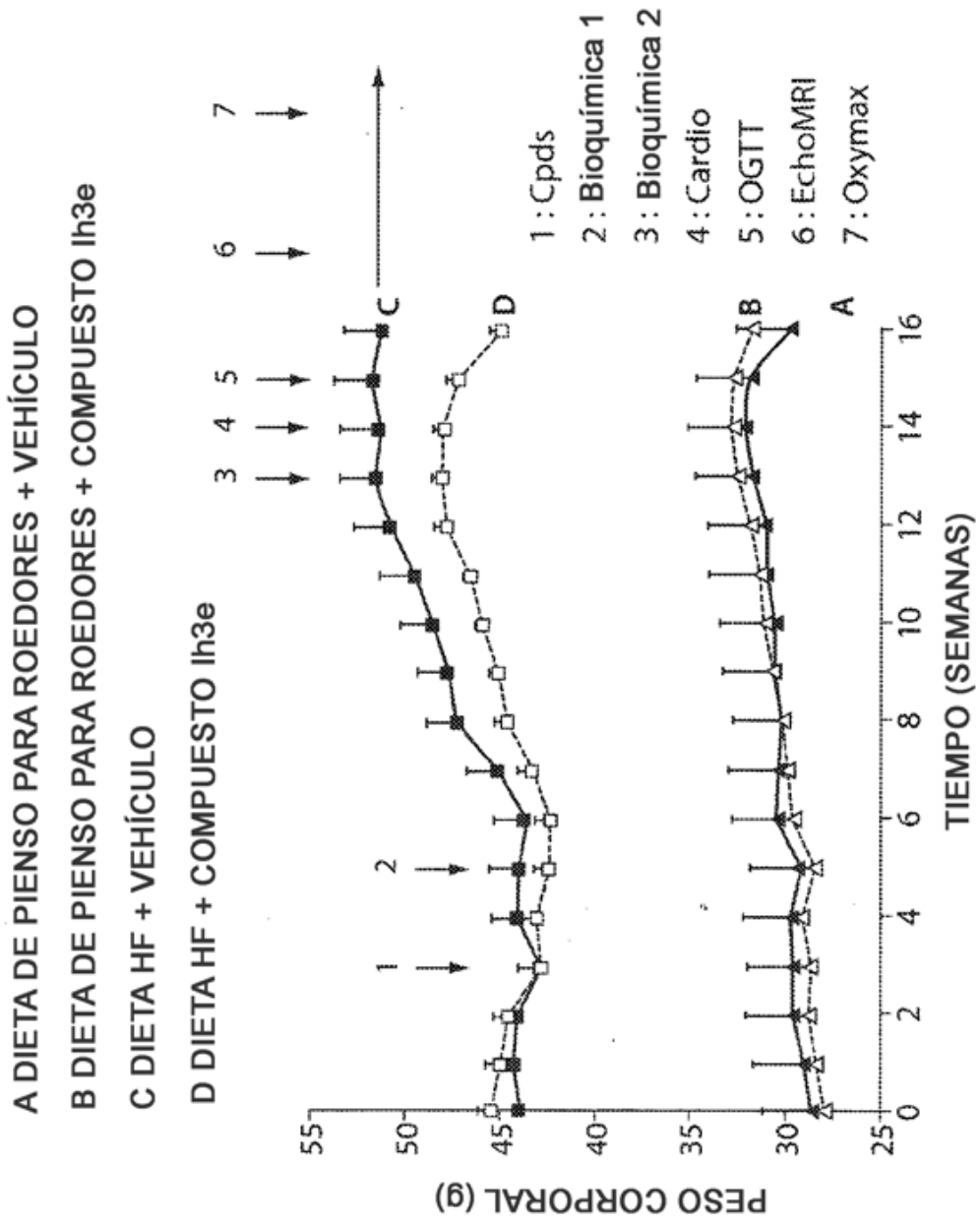


Fig. 1





- A  DIETA DE PIENSO PARA ROEDORES + VEHÍCULO C  DIETA HF + VEHÍCULO
 B  DIETA DE PIENSO PARA ROEDORES + 6-Et,23(S)-Me CA D  DIETA HF + 6-Et,23(S)-Me CA

Fig. 2

GLUCEMIA

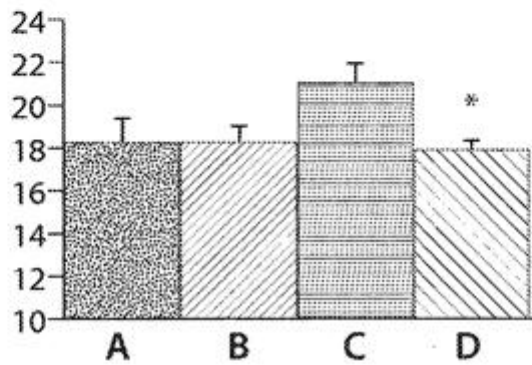


Fig. 2A

LDH

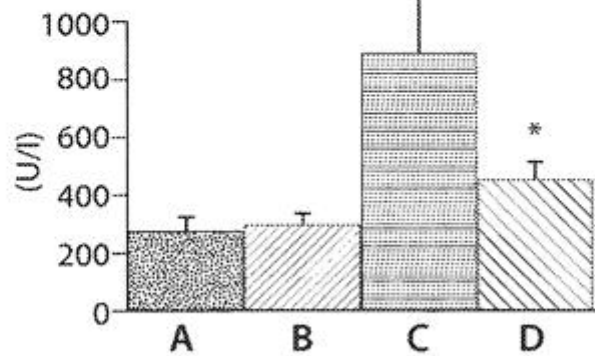


Fig. 2B

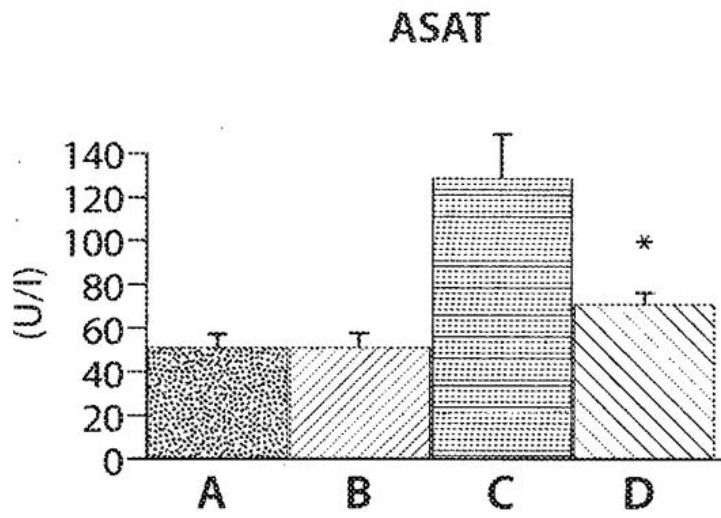


Fig. 2C

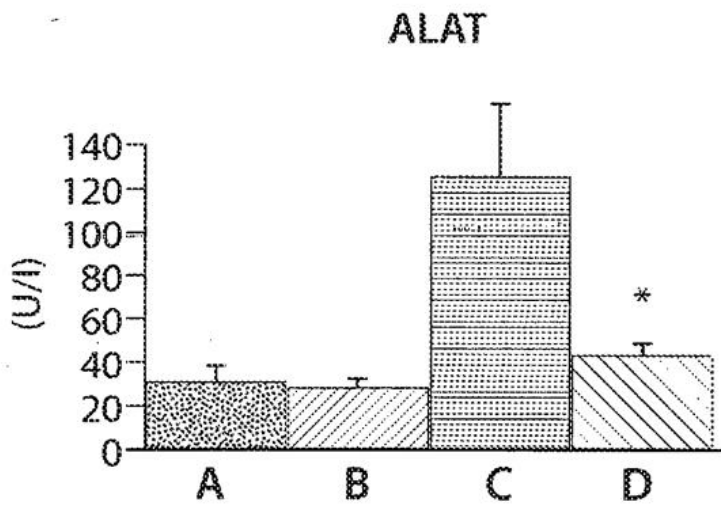


Fig. 2D

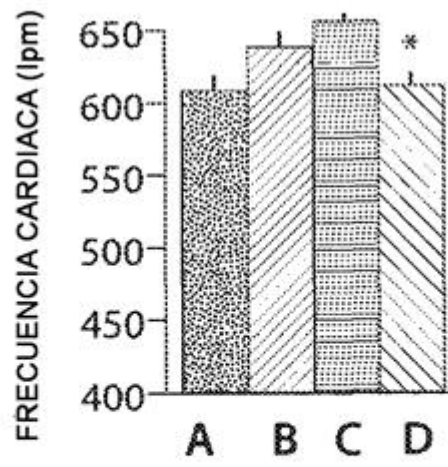


Fig. 2E

COLESTEROL TOTAL

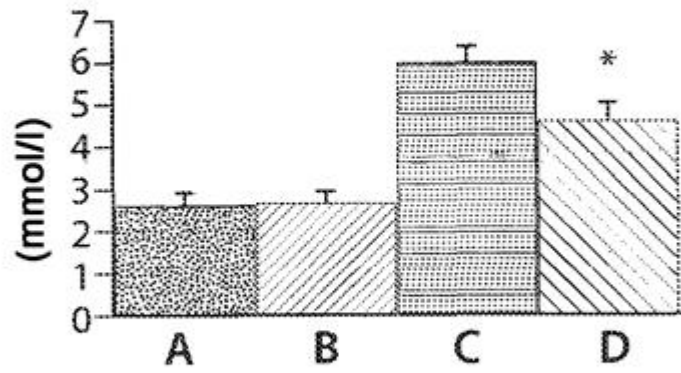


Fig. 2F

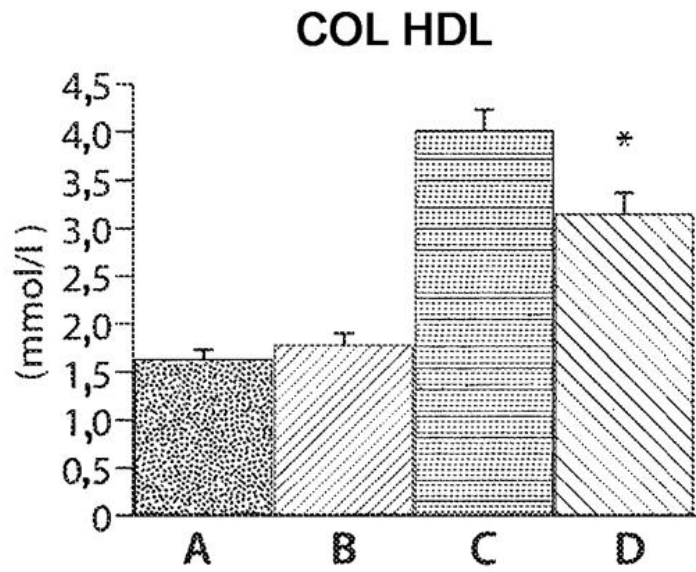


Fig. 2G

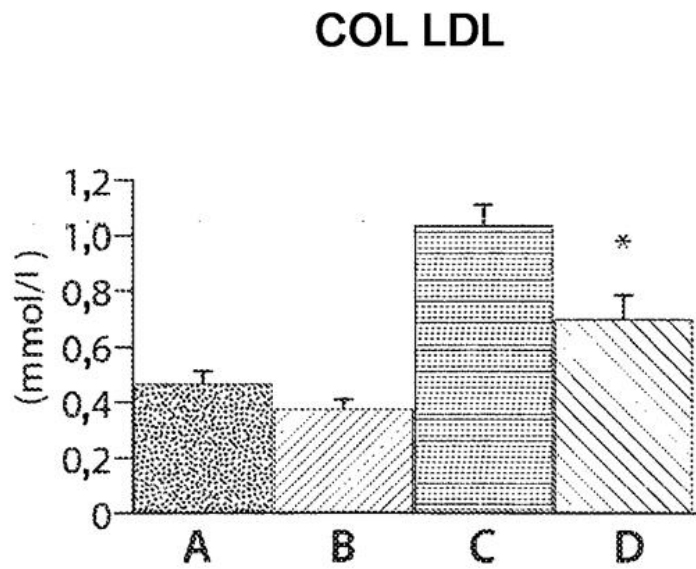


Fig. 2H

TRIGLICÉRIDOS

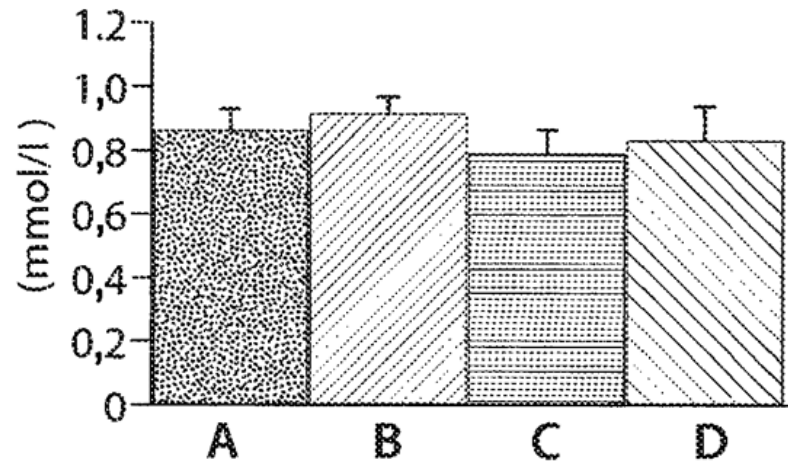


Fig. 21

SEGUIMIENTO DE INSULINA EN PLASMA

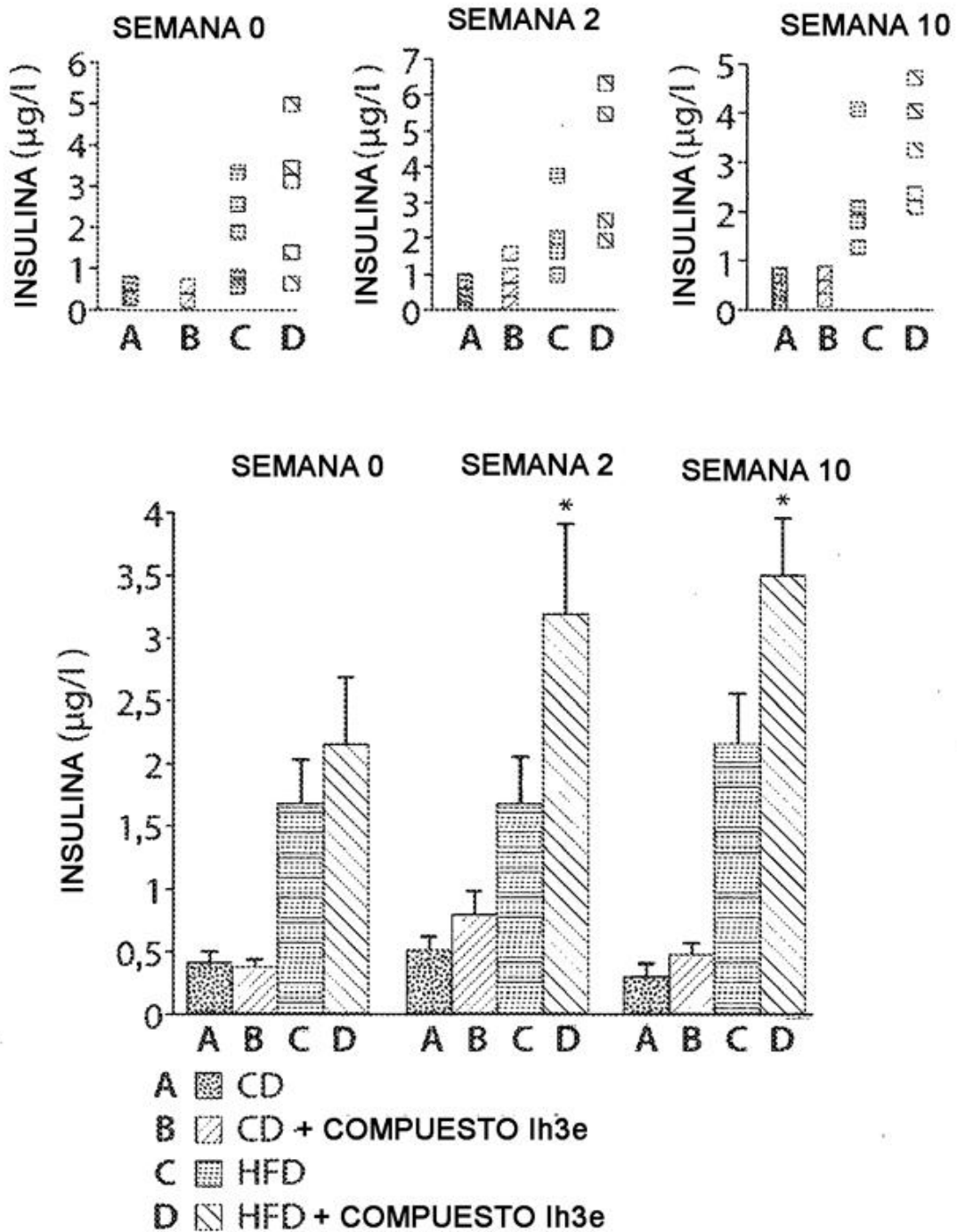


Fig. 3A

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL

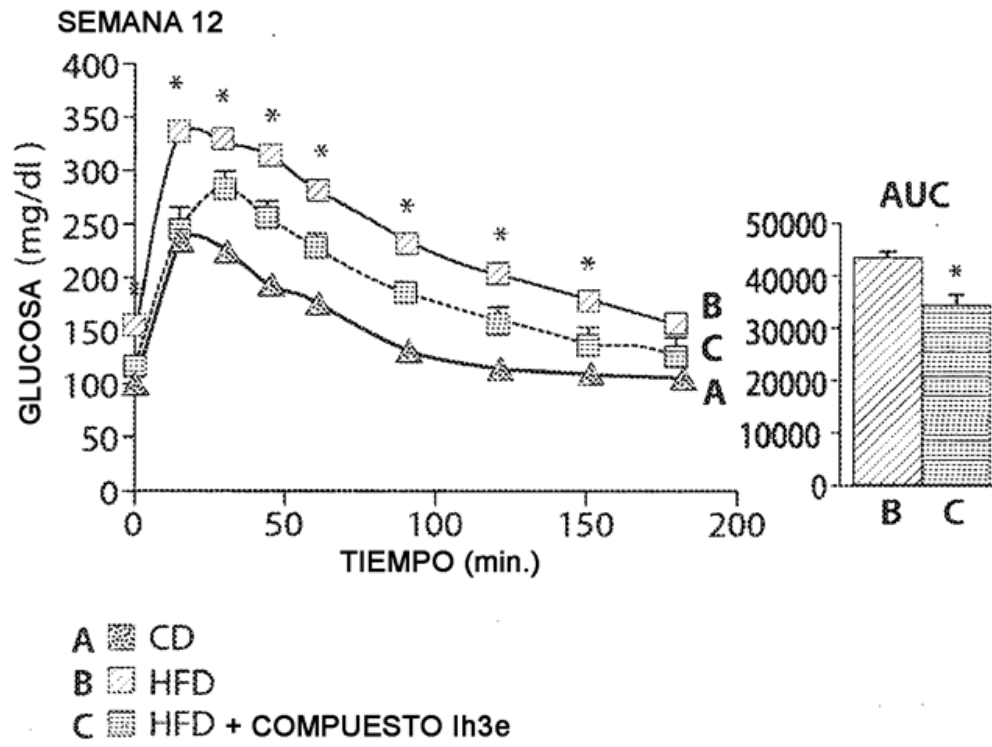


Fig. 3B

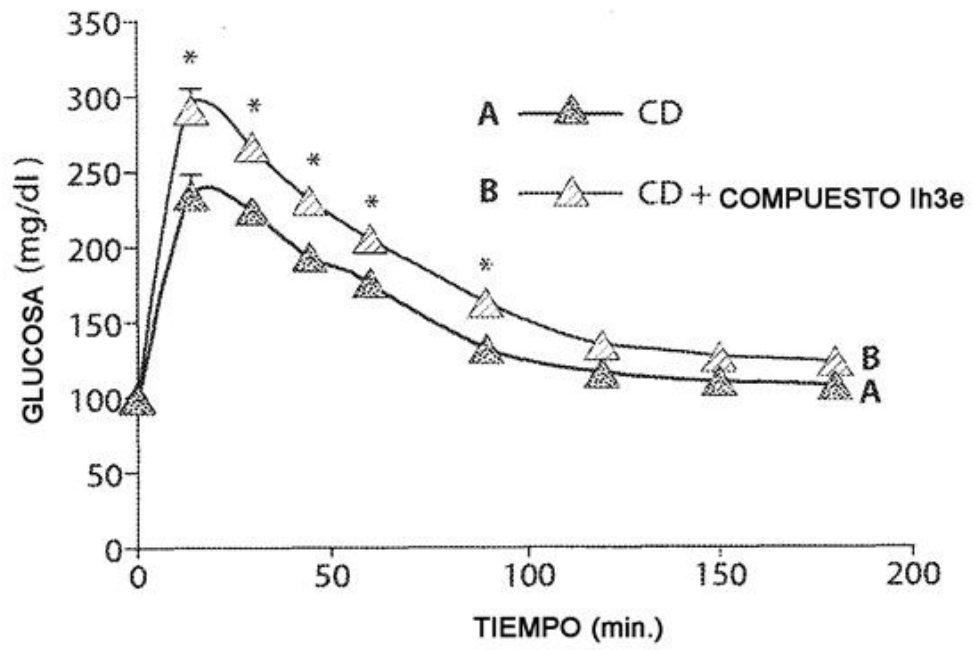


Fig. 4

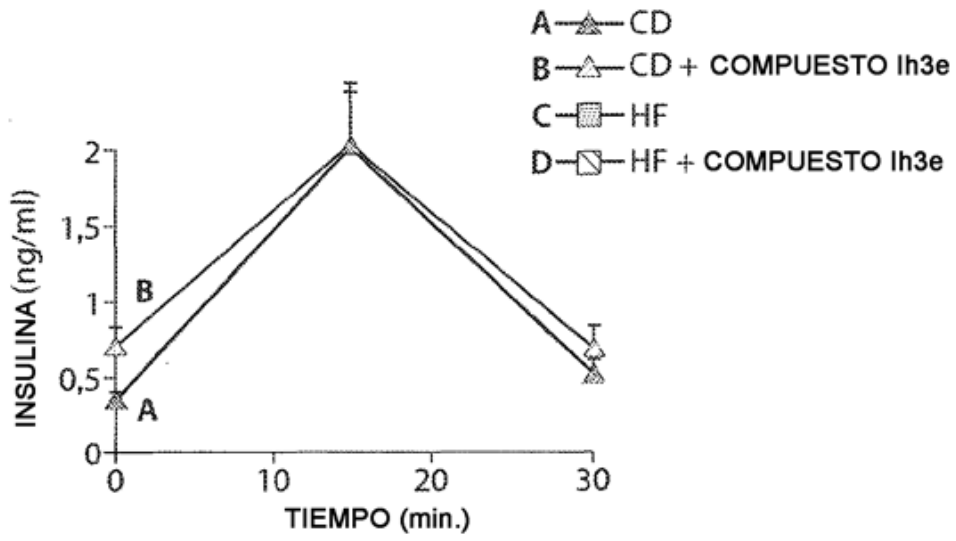


Fig. 5A

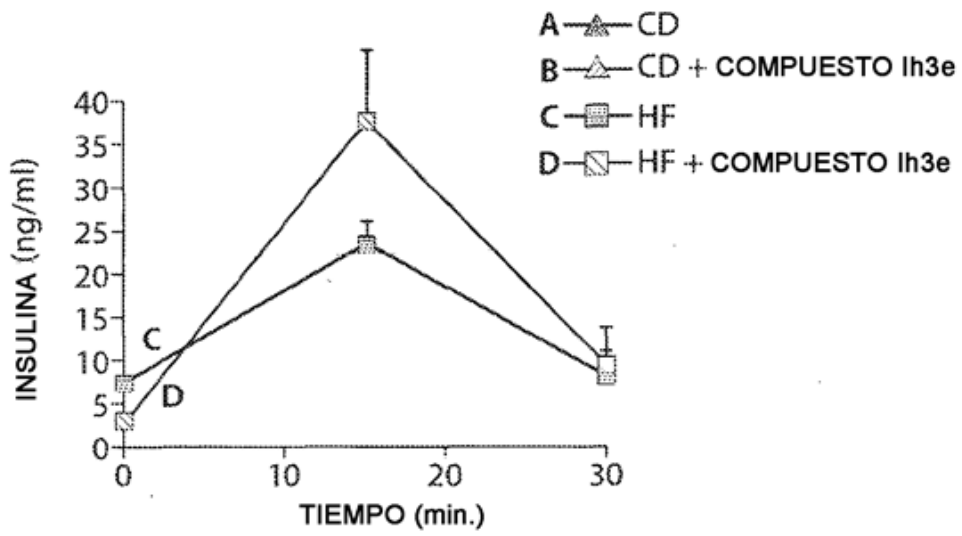


Fig. 5B

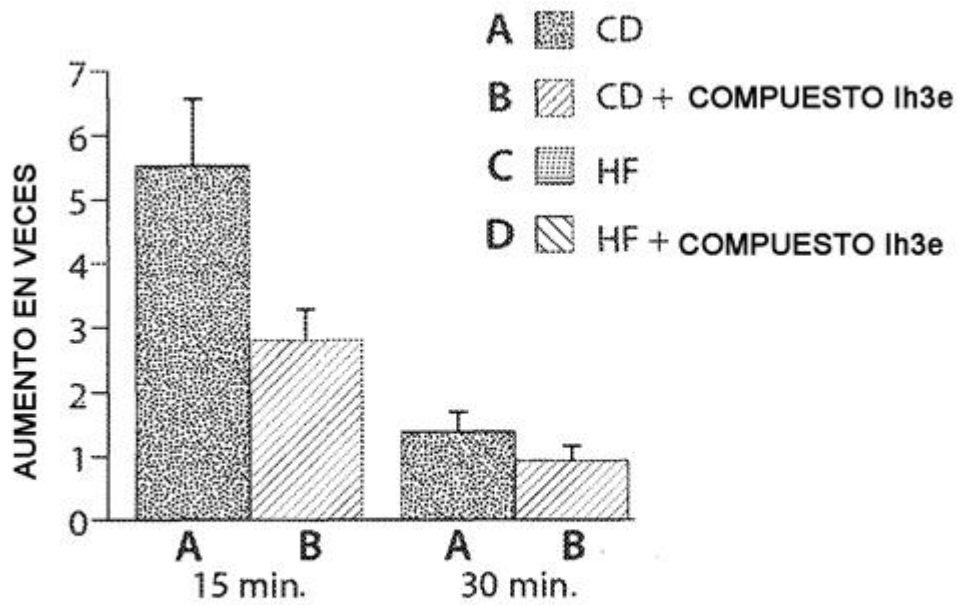


Fig. 5C

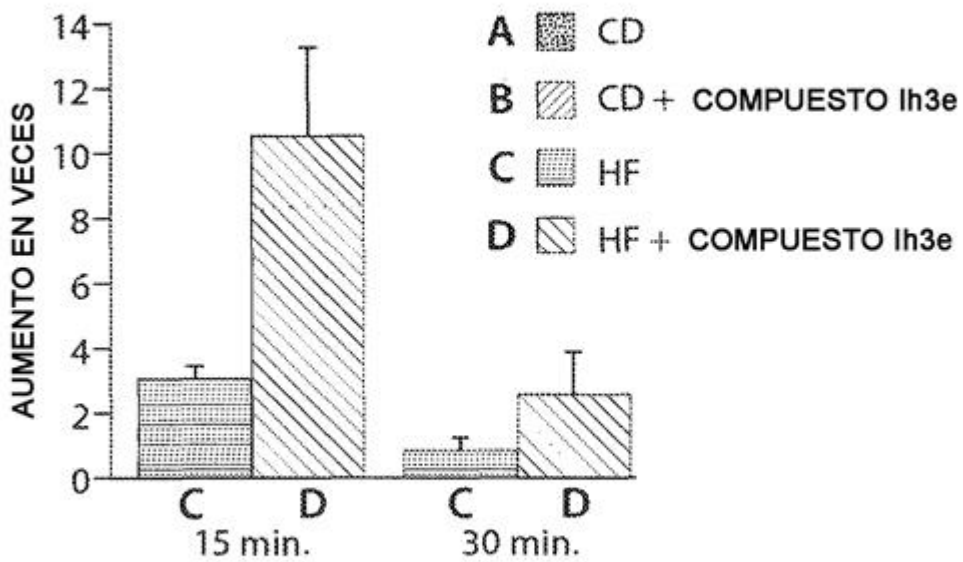


Fig. 5D





- A  CD
- B  CD + COMPUESTO lh3e
- C  HF
- D  HF + COMPUESTO lh3e

Fig. 6

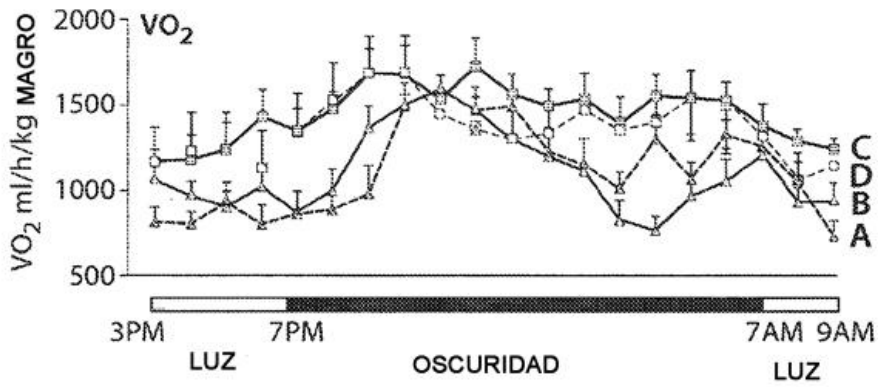


Fig. 6A

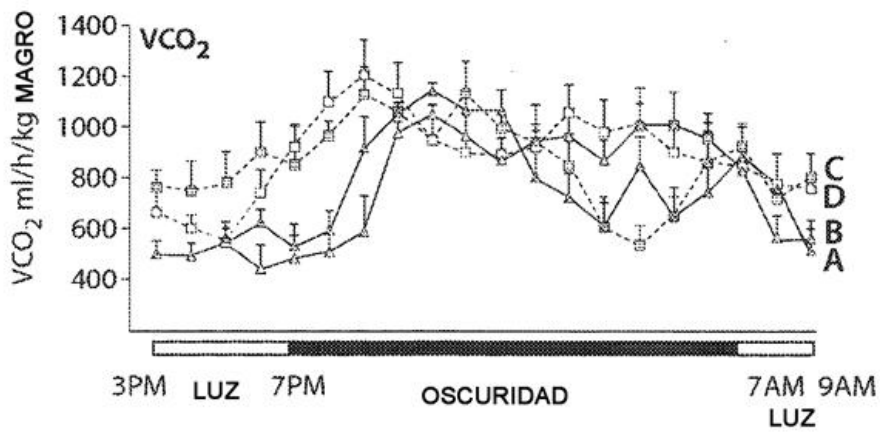


Fig. 6B

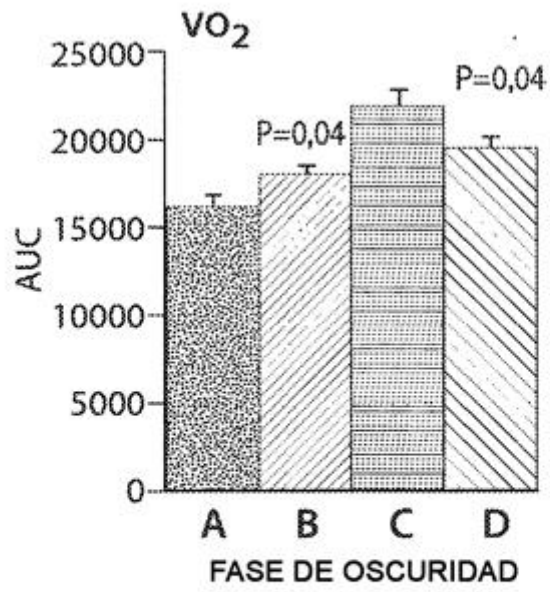


Fig. 6C

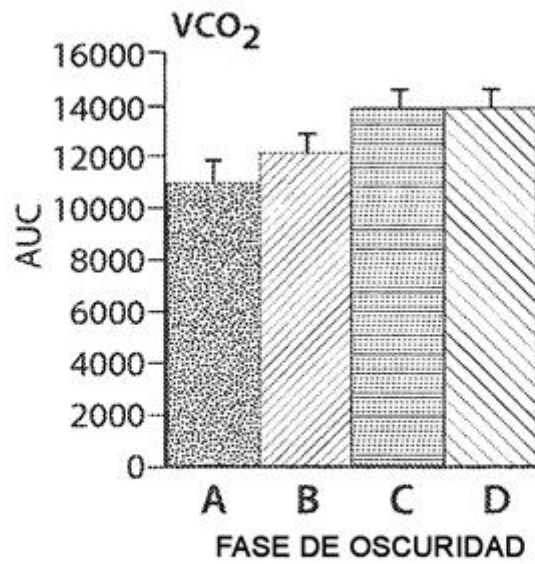


Fig. 6D

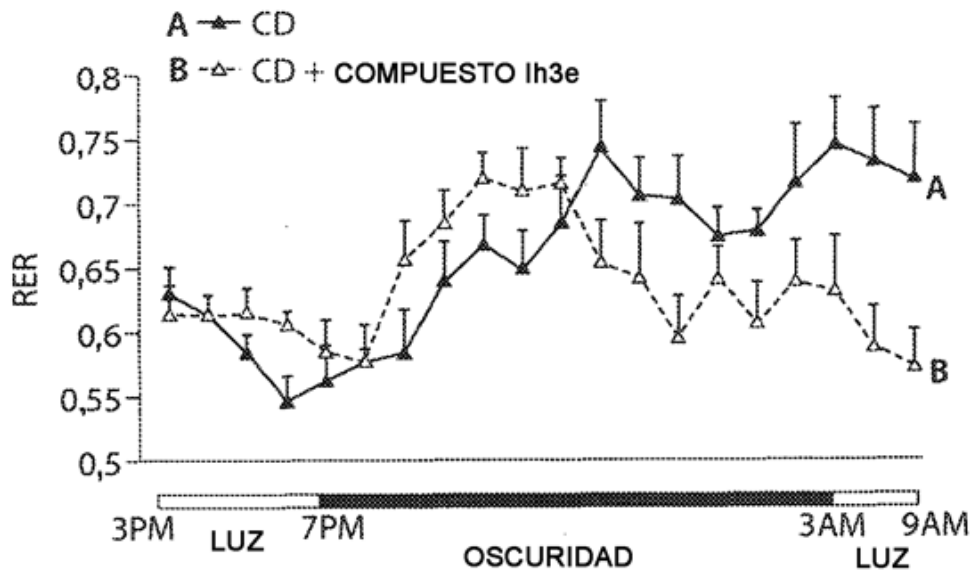


Fig. 7A

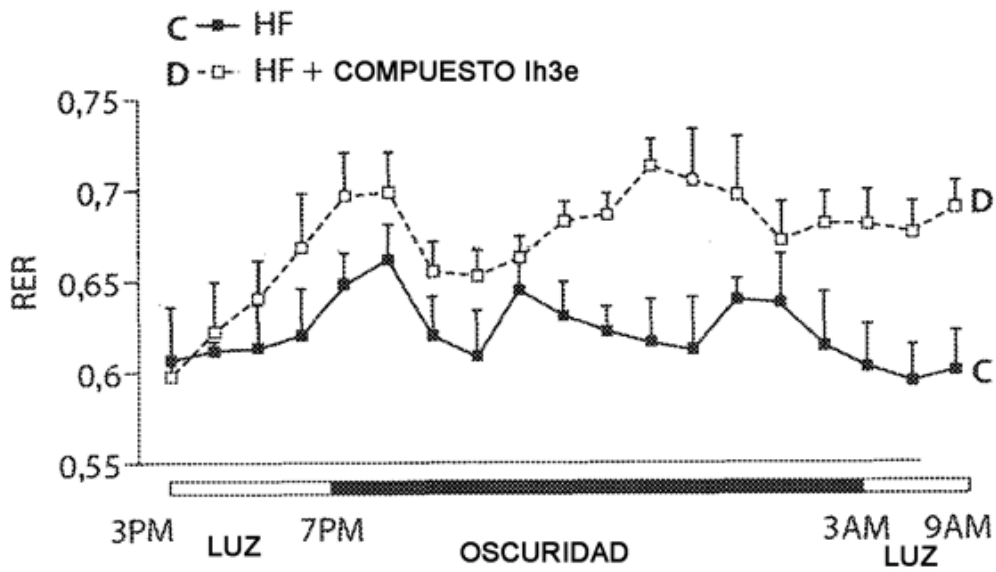


Fig. 7B

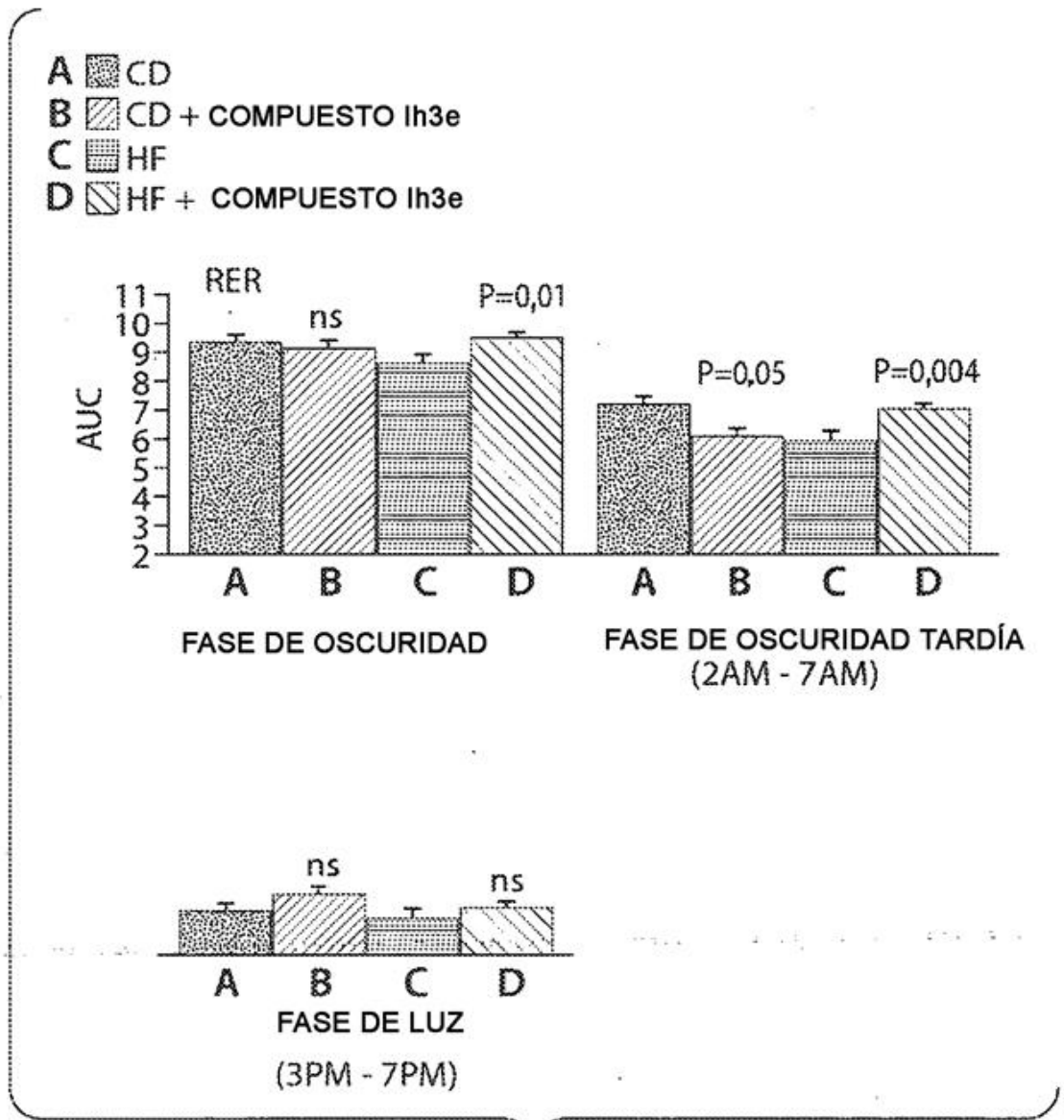


Fig. 7C

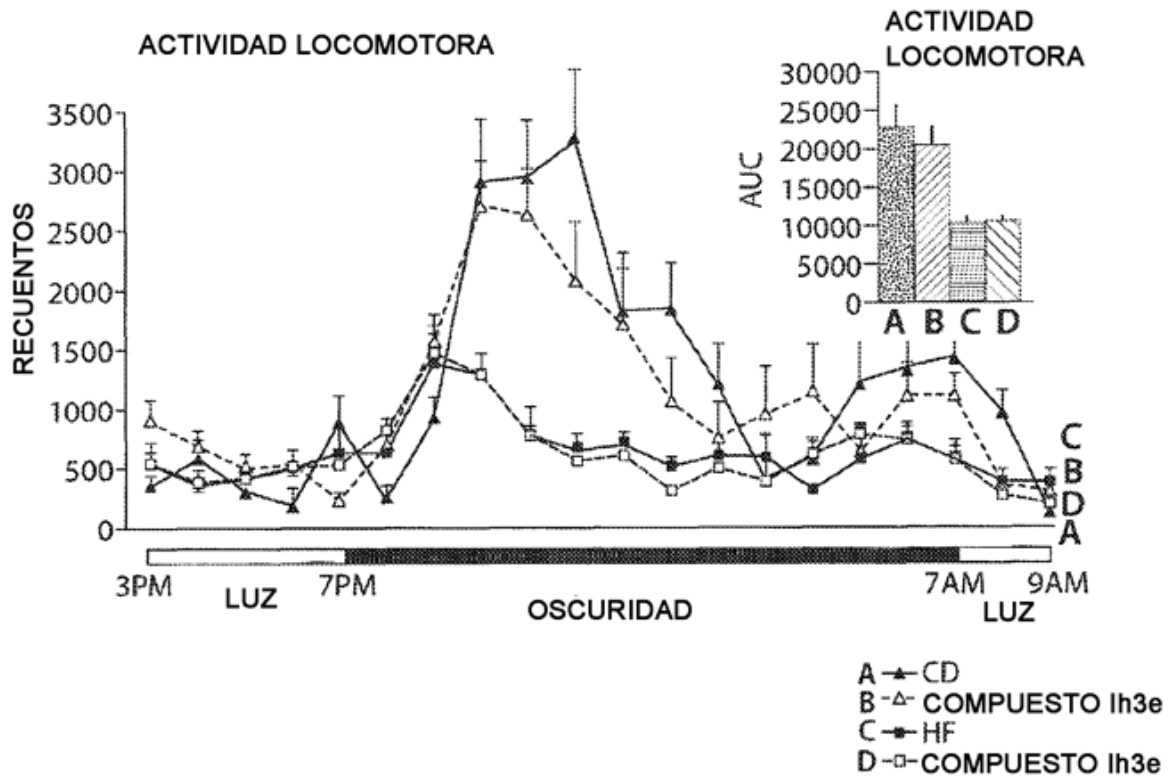


Fig. 8A

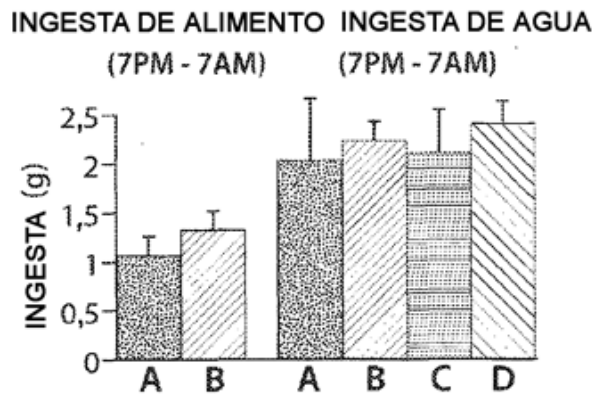


Fig. 8B





A  CD C  HF
 B  CD + COMPUESTO lh3e D  HF + COMPUESTO lh3e

Fig. 9

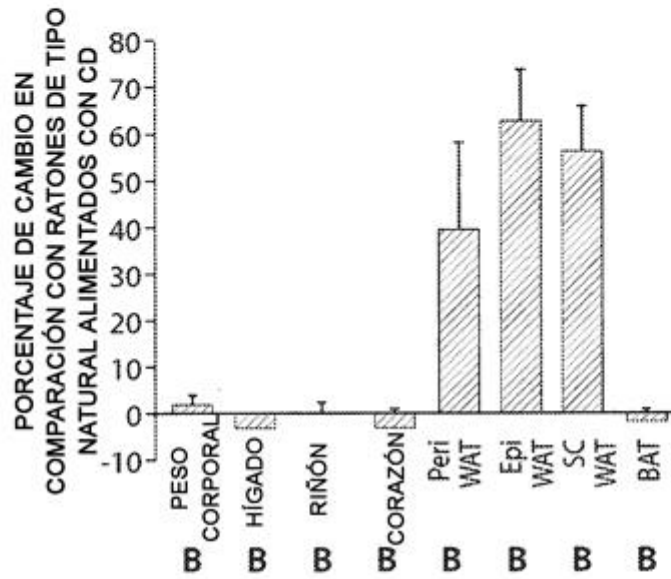


Fig. 9A

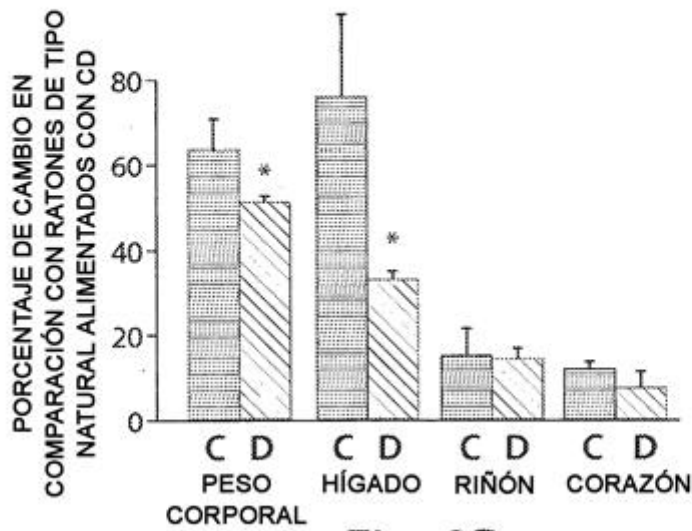


Fig. 9B

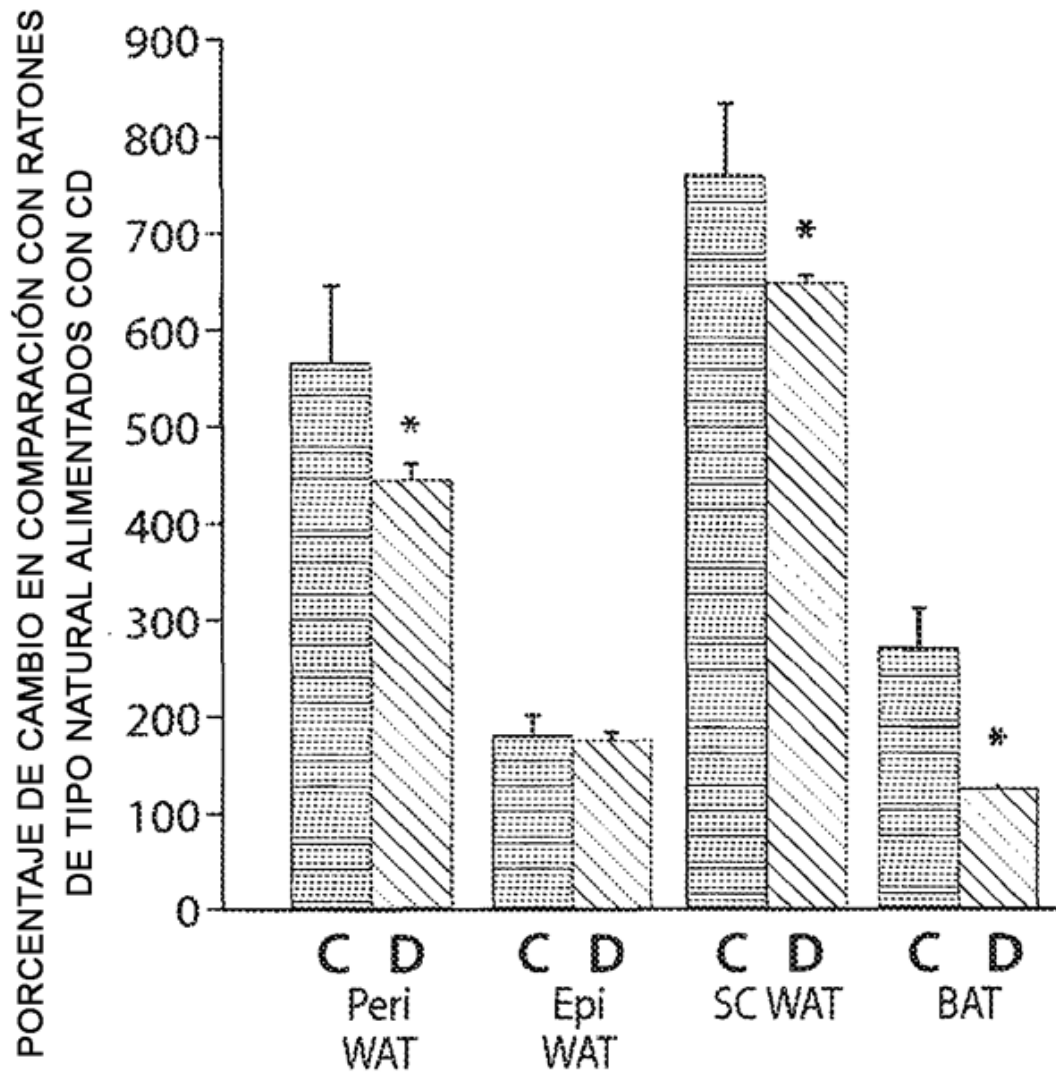


Fig. 9C

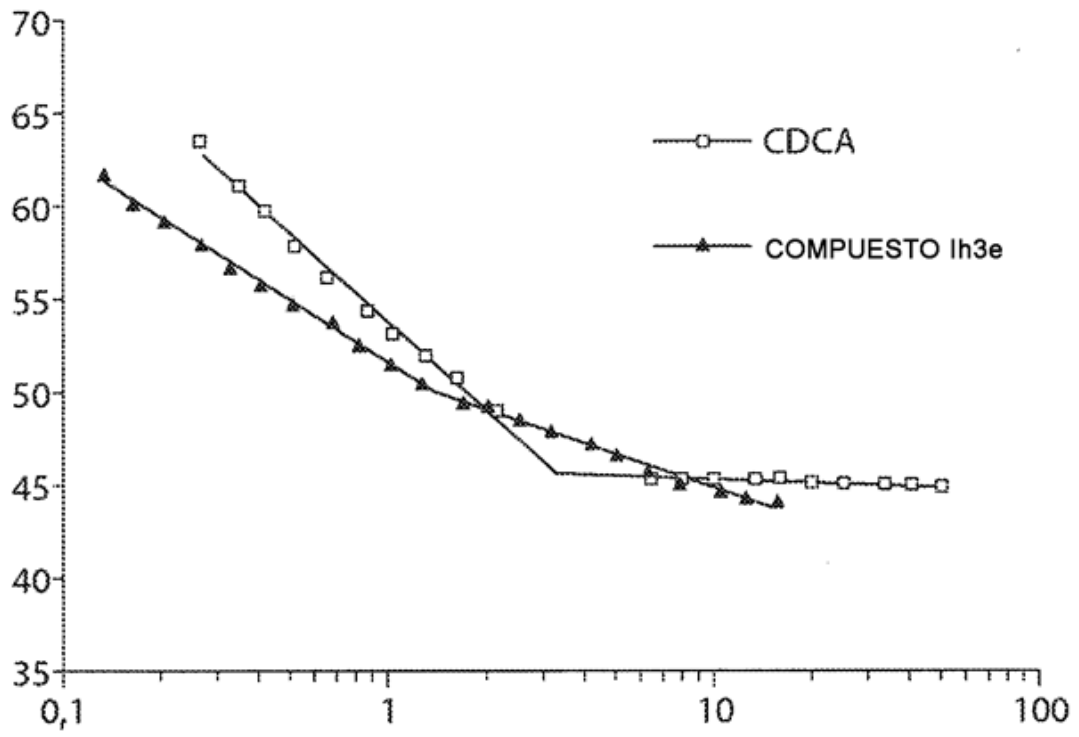


Fig. 10

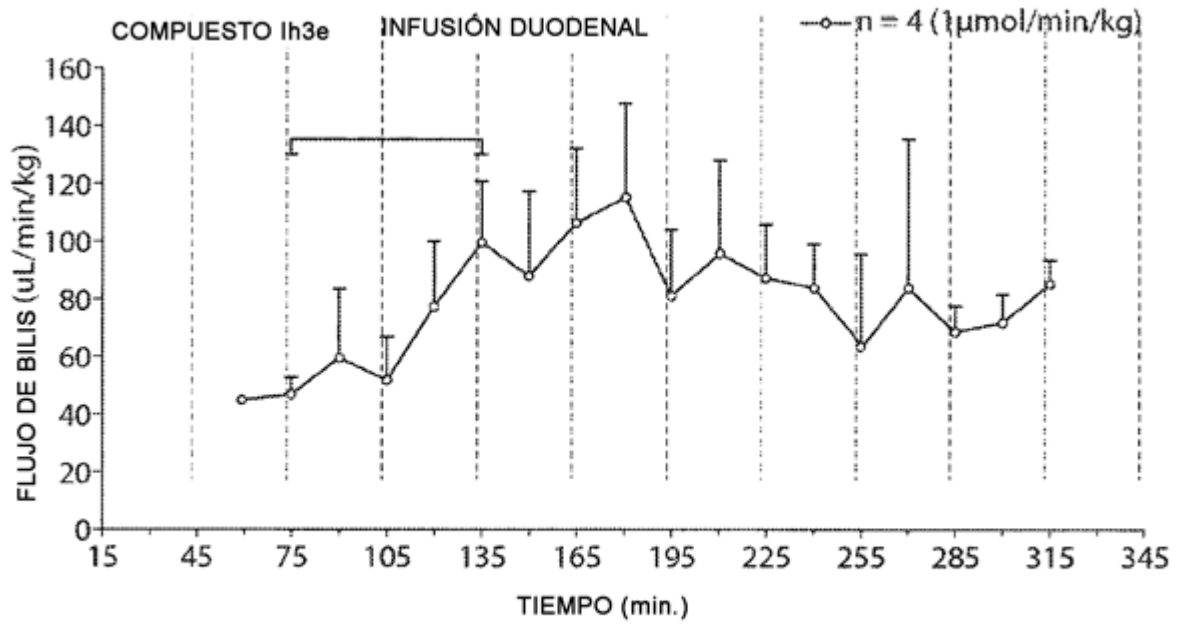


Fig. 11

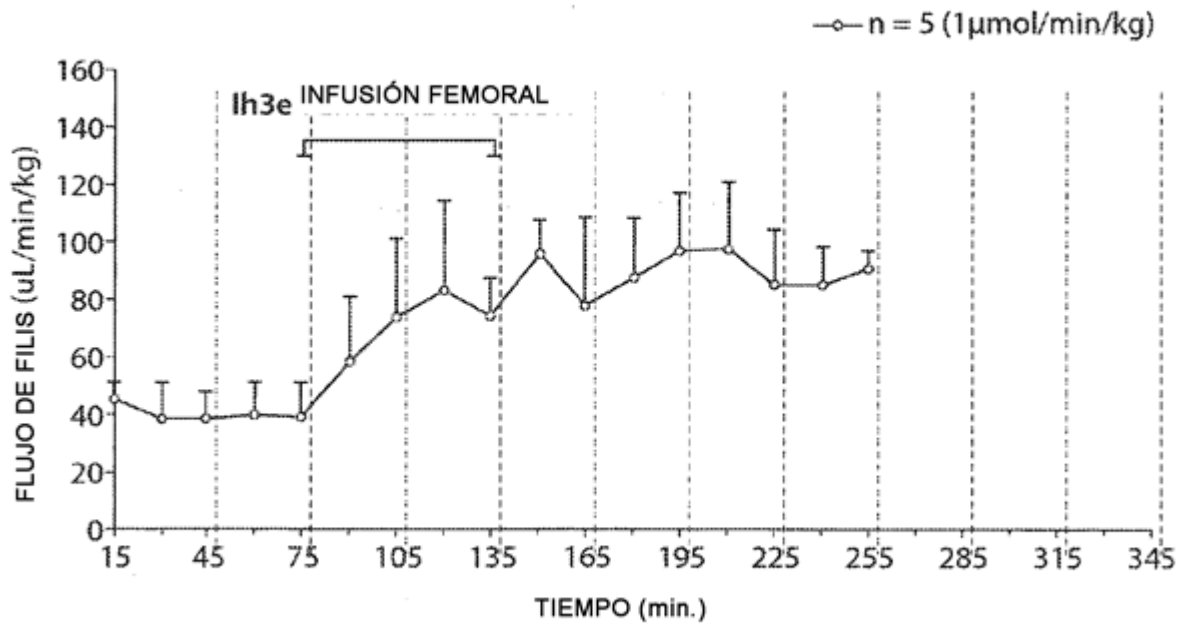


Fig. 12

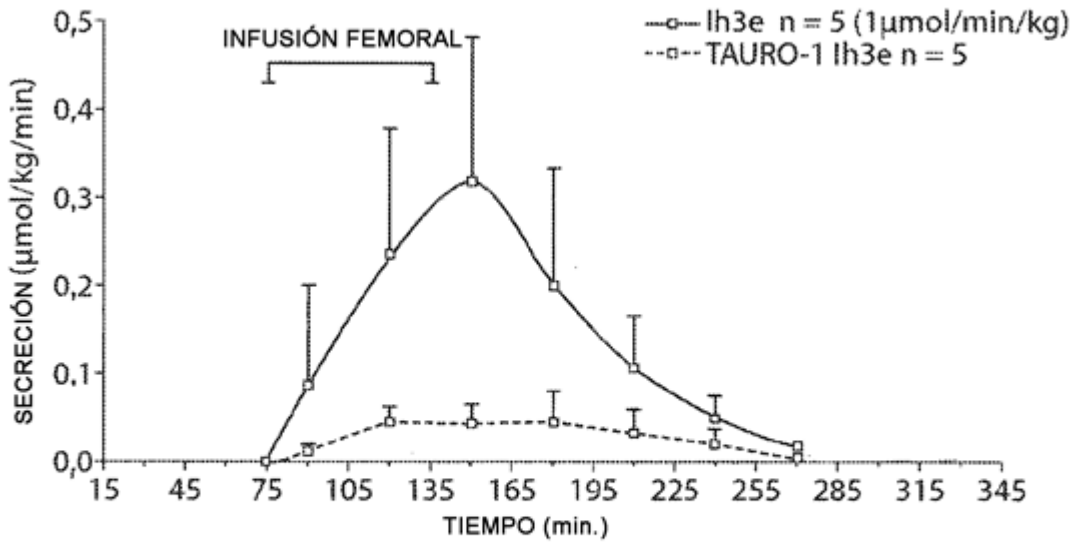


Fig. 13

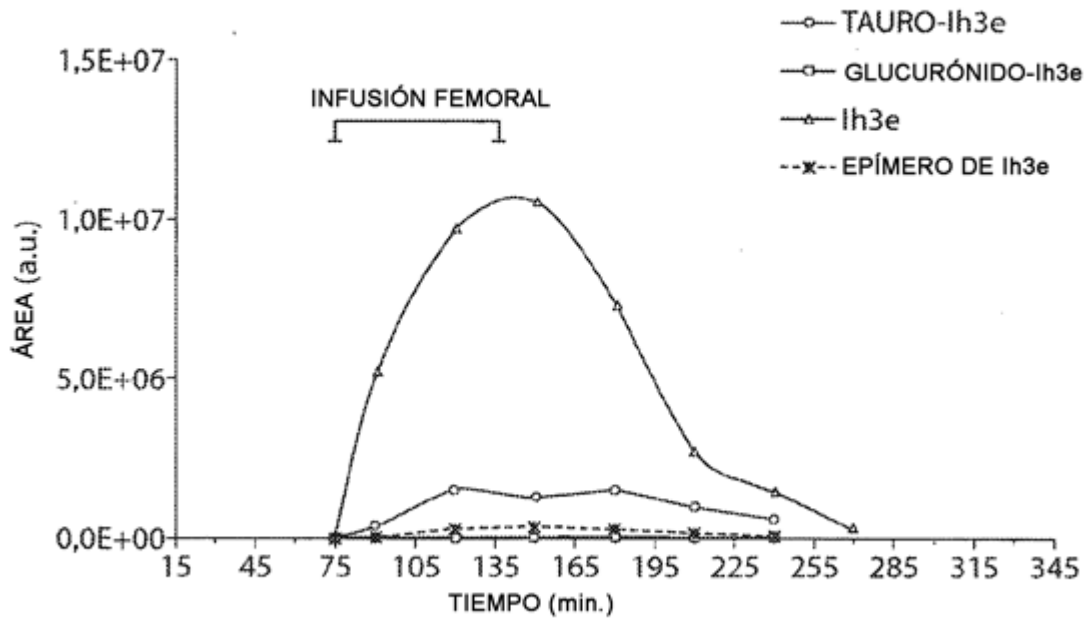


Fig. 14A

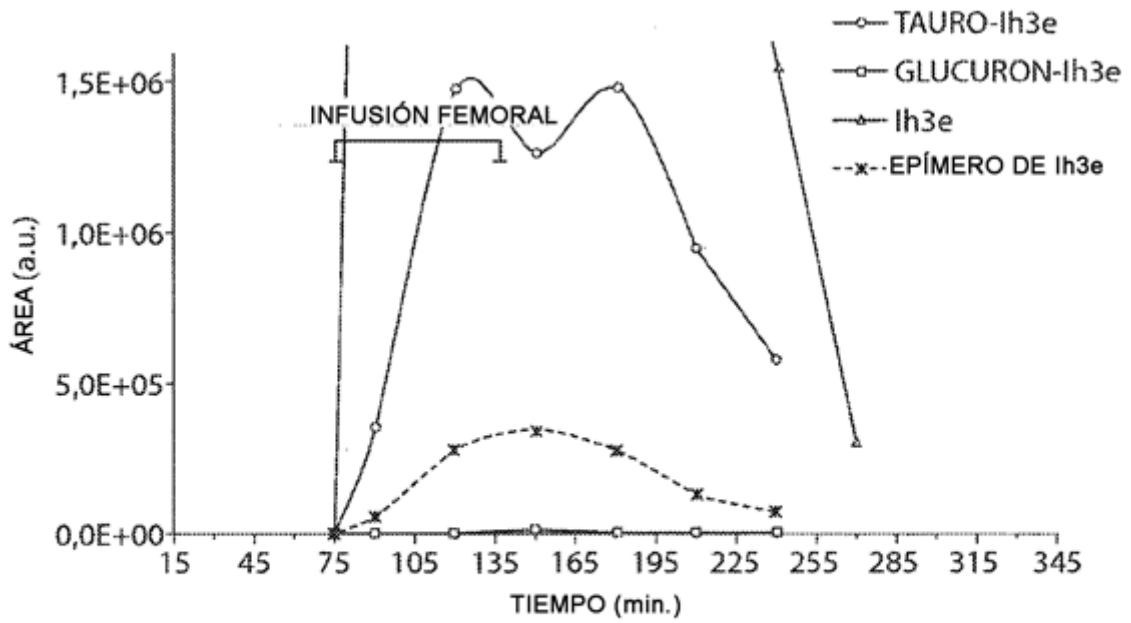


Fig. 14B

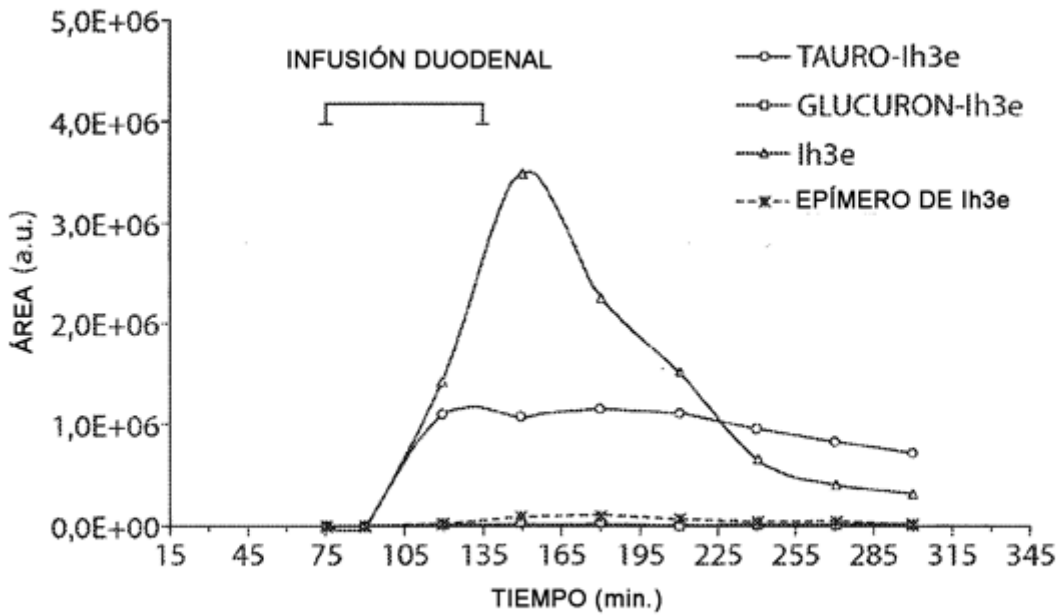


Fig. 14C

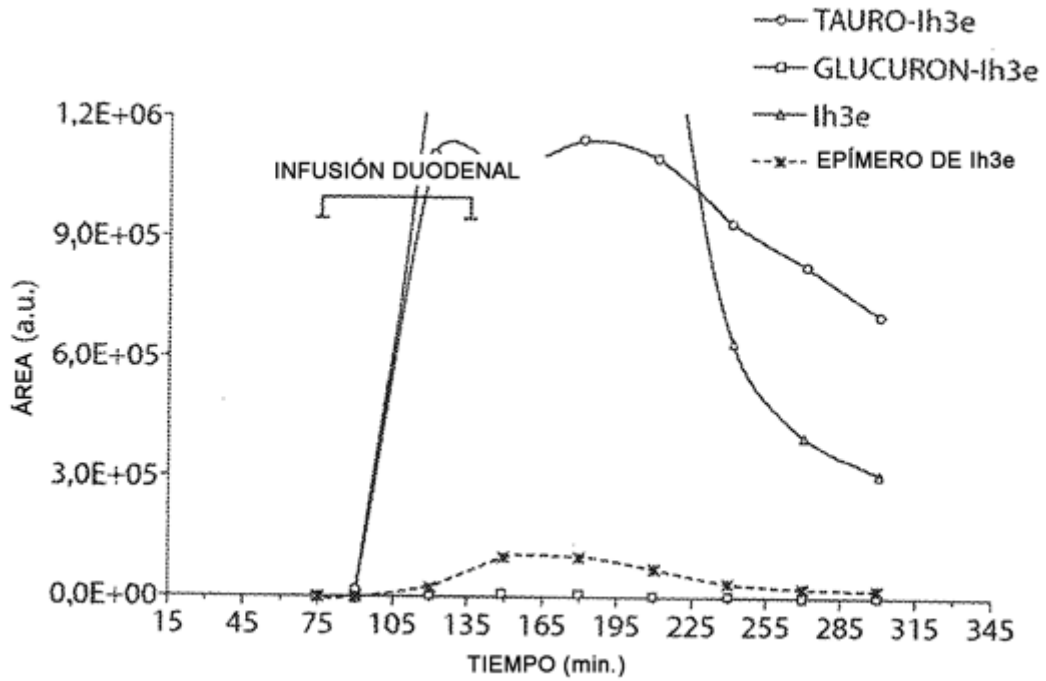


Fig. 14D

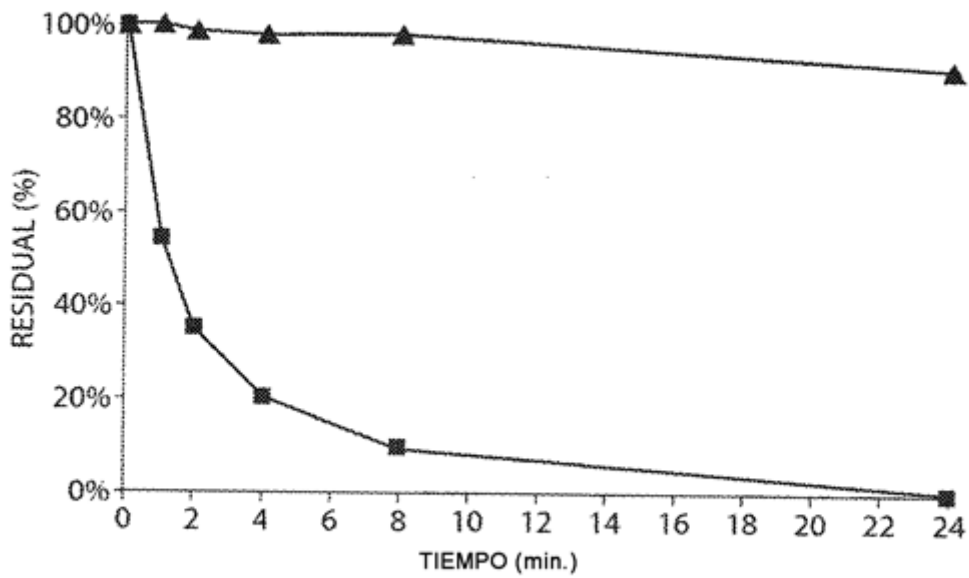


Fig. 15

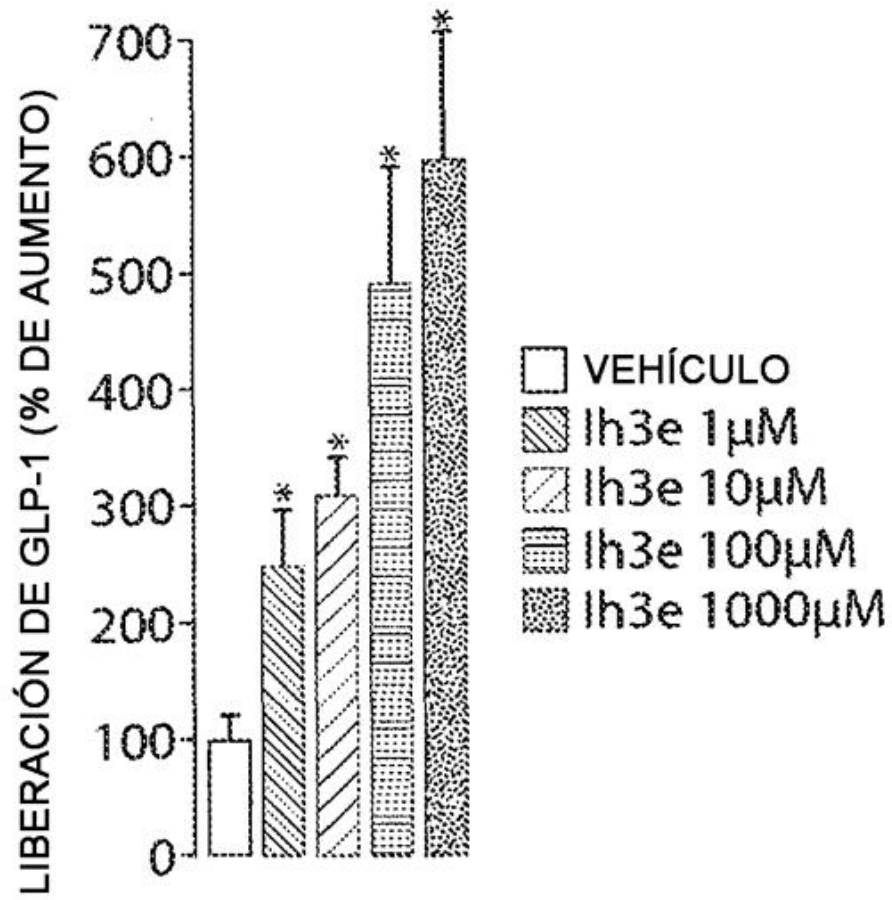


Fig. 16

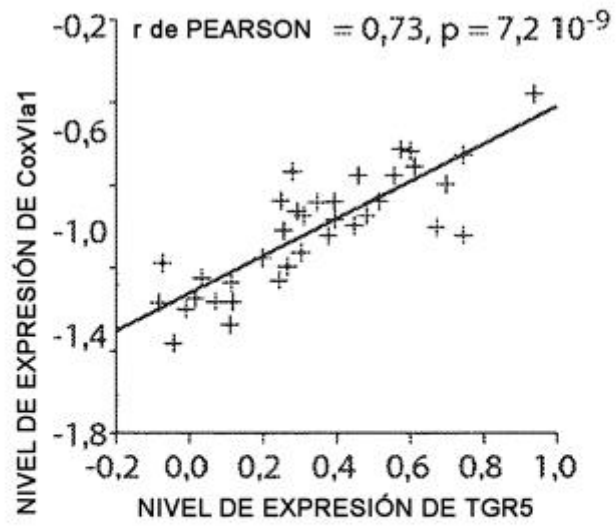


Fig. 17A

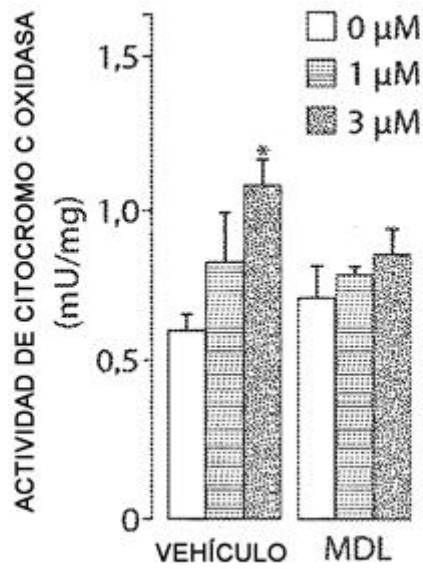


Fig. 17B

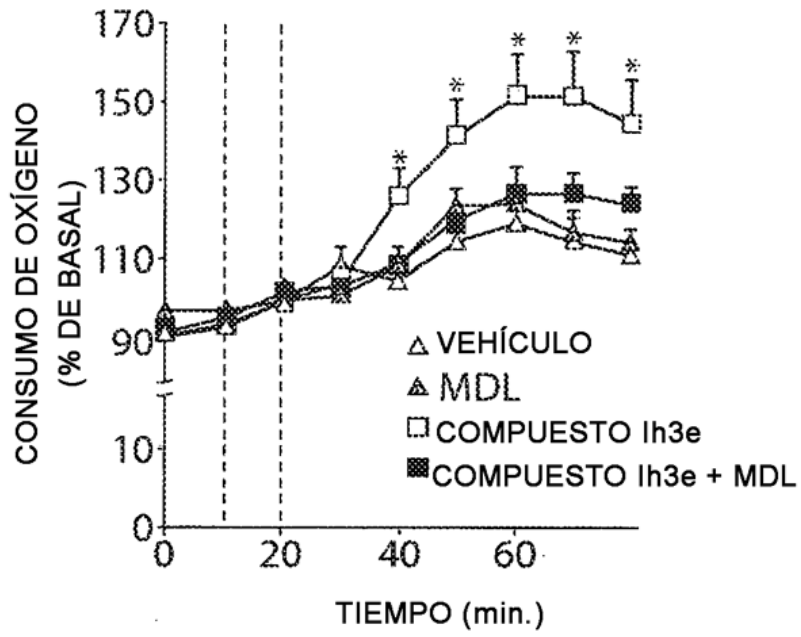


Fig. 17C

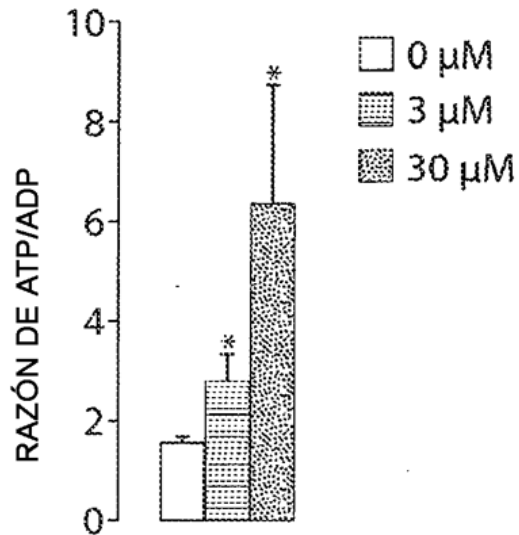


Fig. 17D

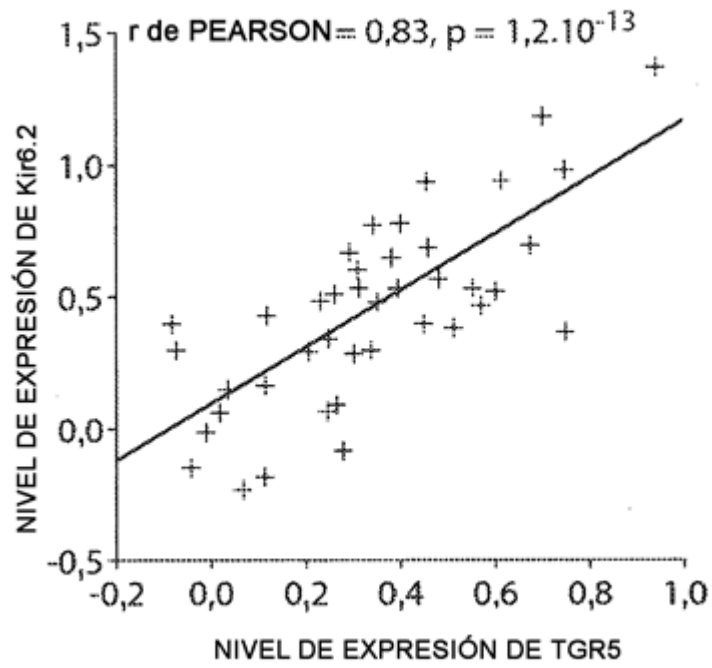


Fig. 17E

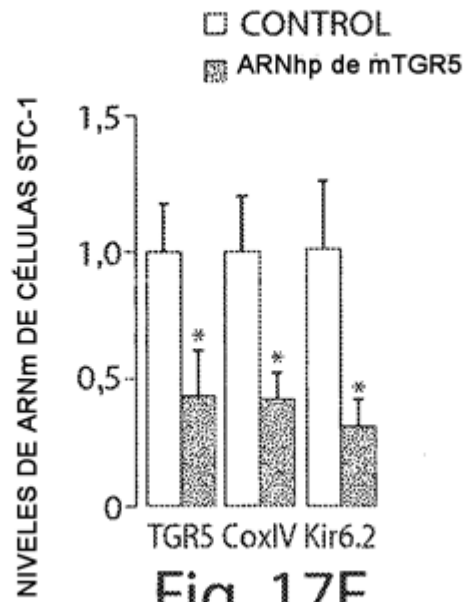


Fig. 17F

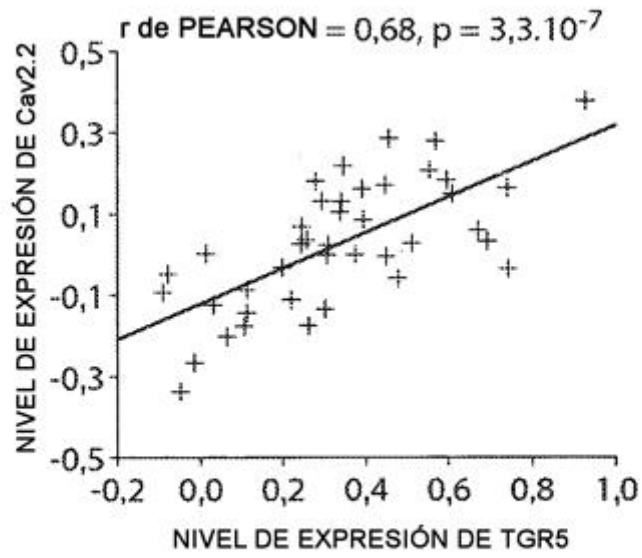


Fig. 18A

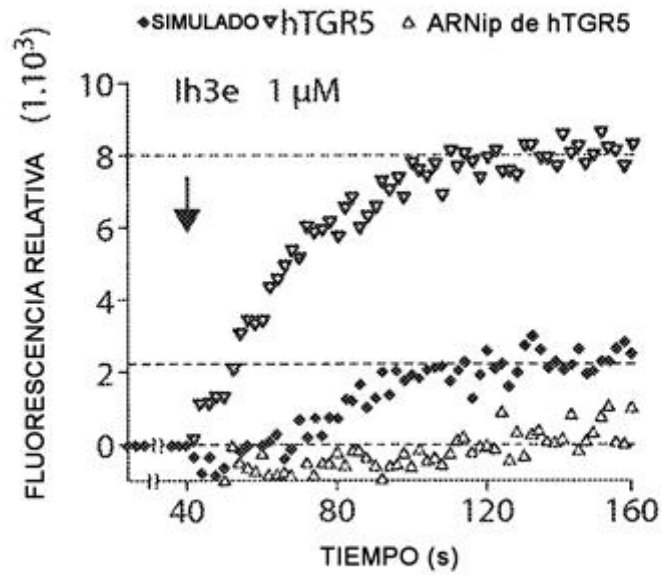


Fig. 18B

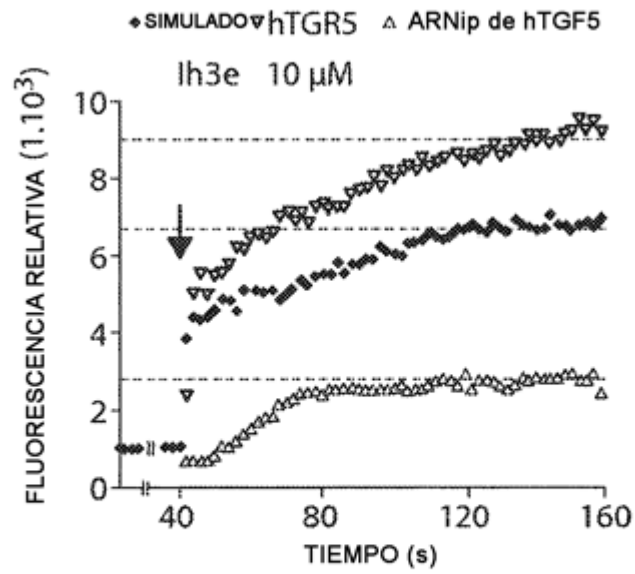


Fig. 18C

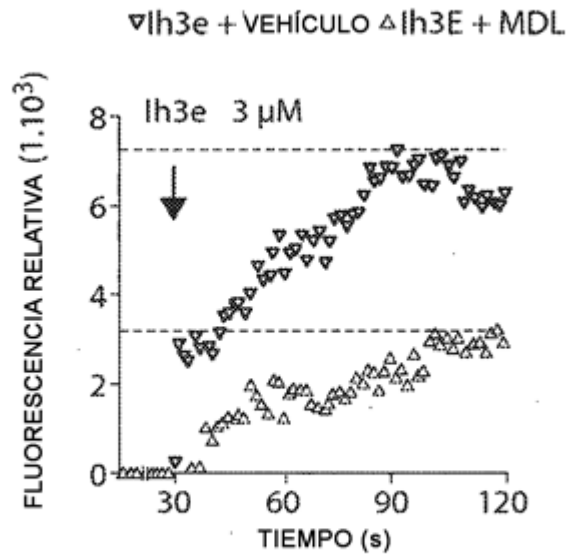


Fig. 18D

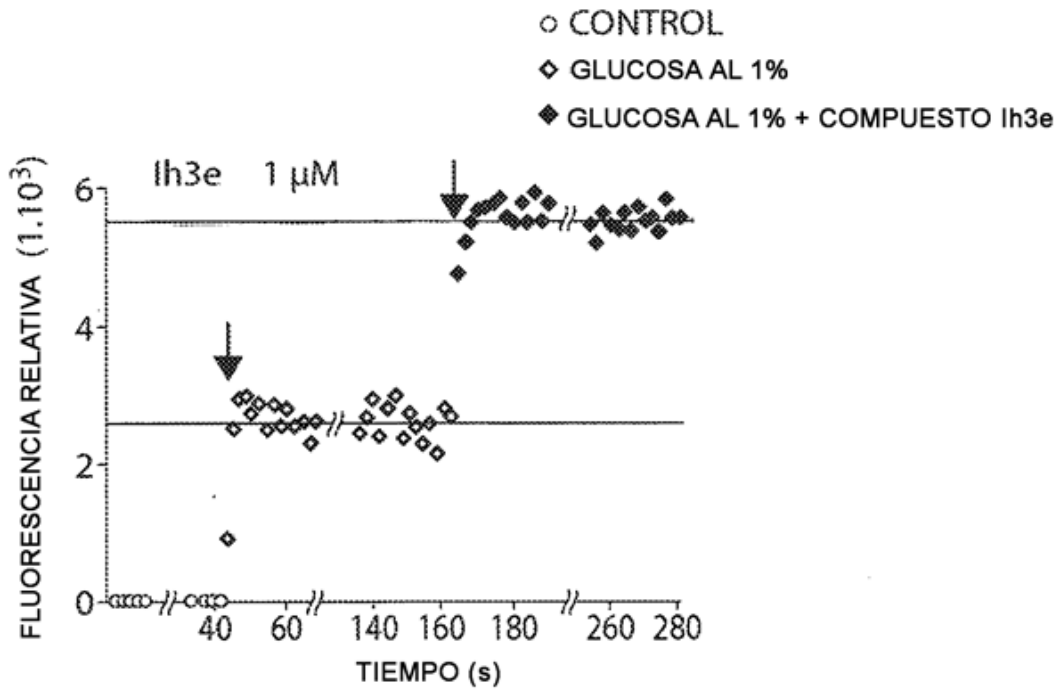


Fig. 18E

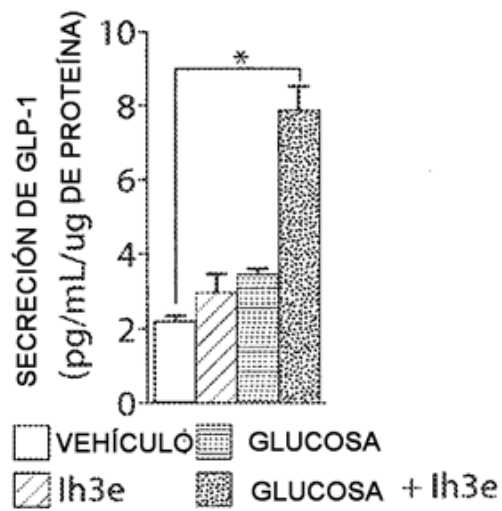


Fig. 18F

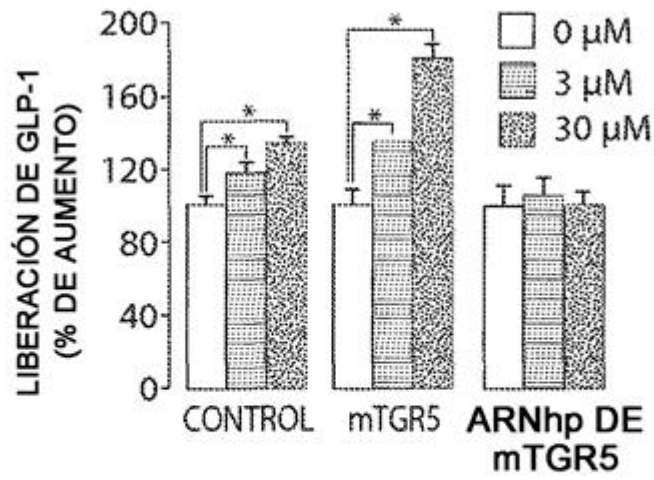


Fig. 18G

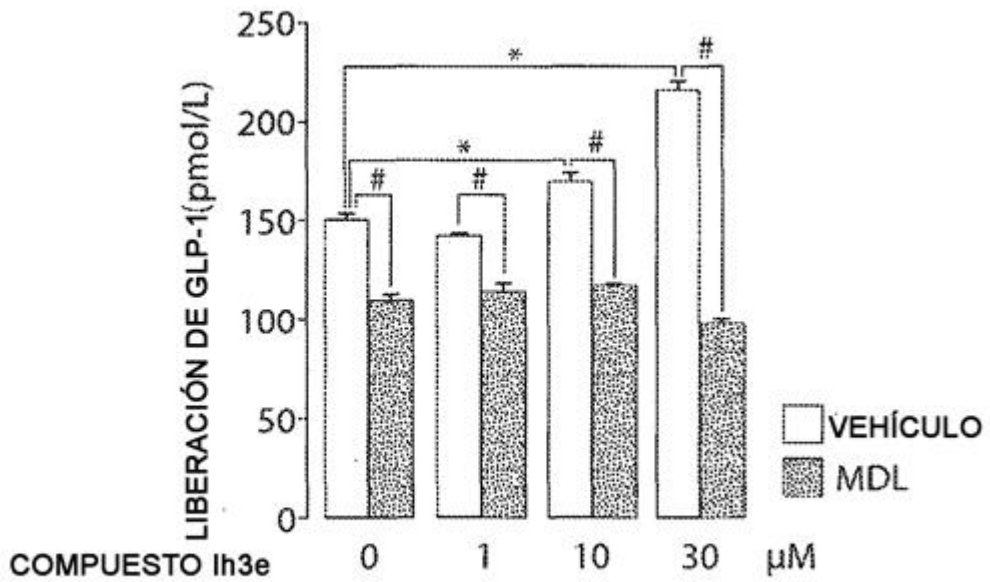


Fig. 18H

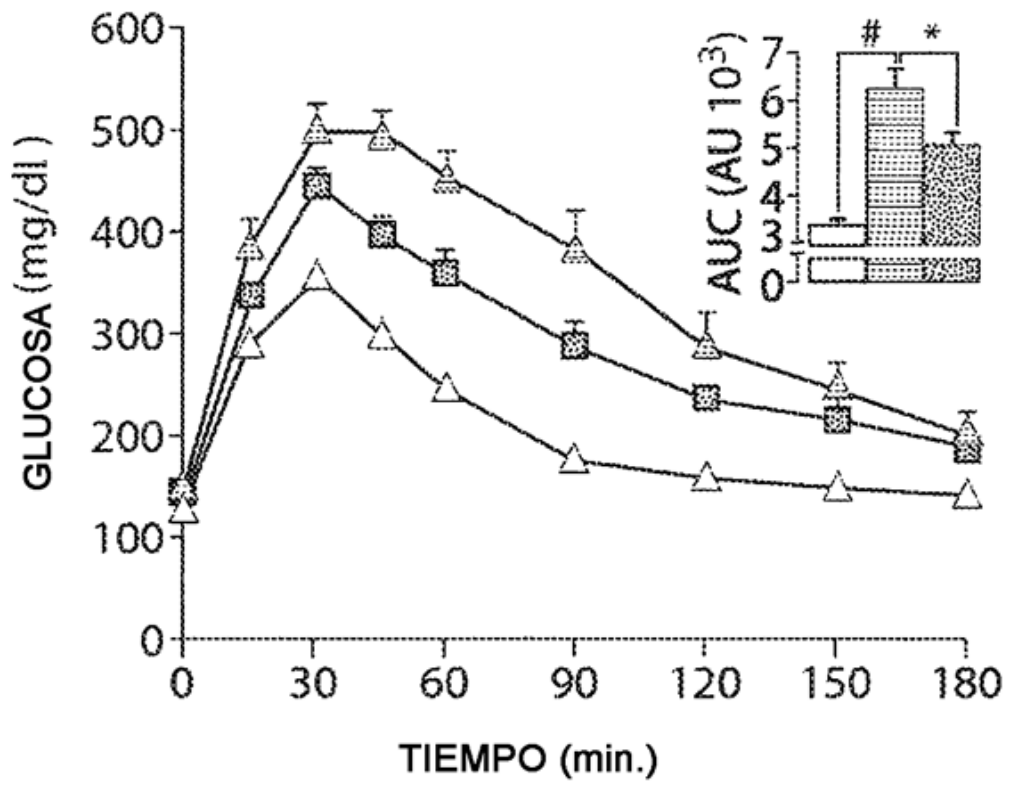


Fig. 19A

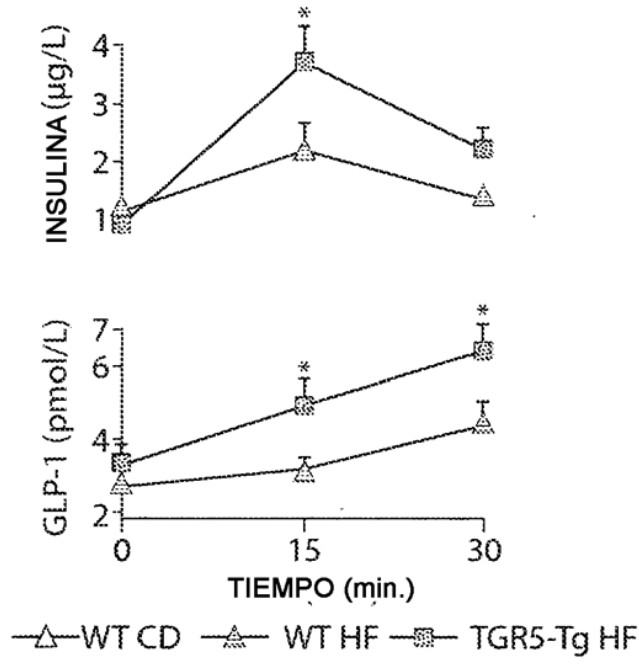


Fig. 19B

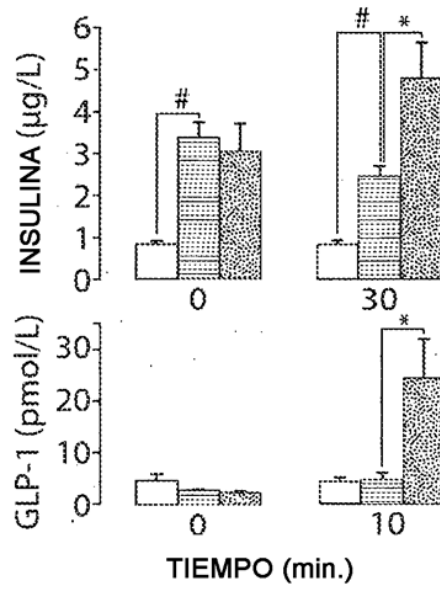


Fig. 19C

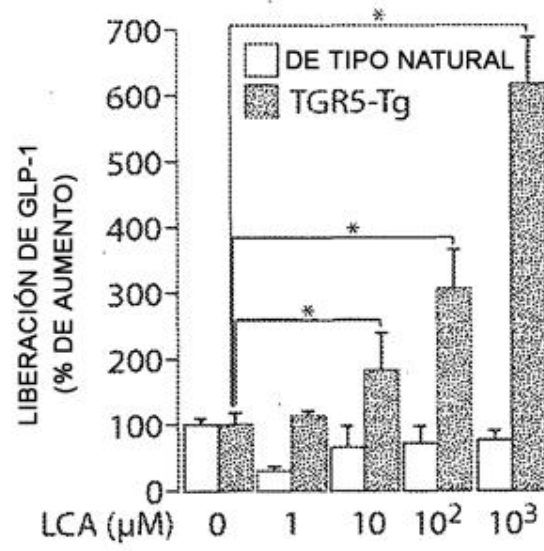


Fig. 19D

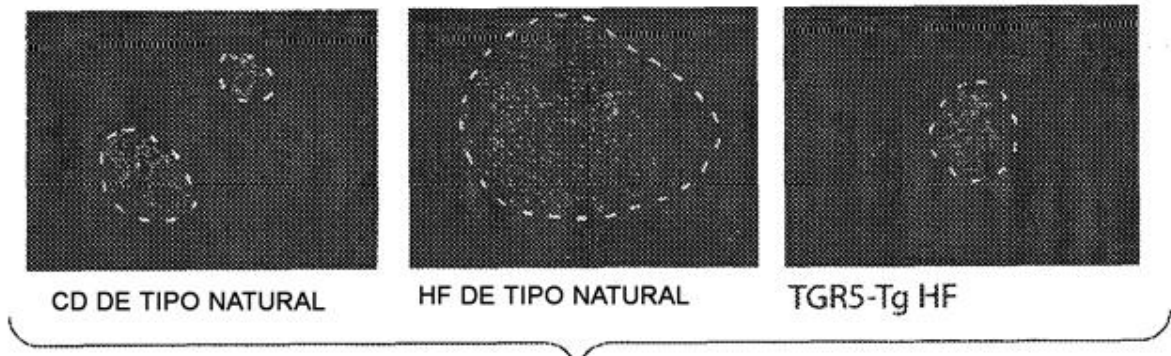


Fig. 19E

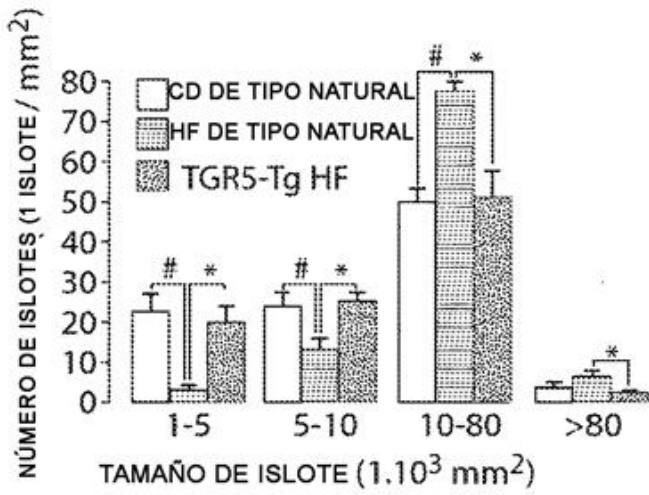


Fig. 19F

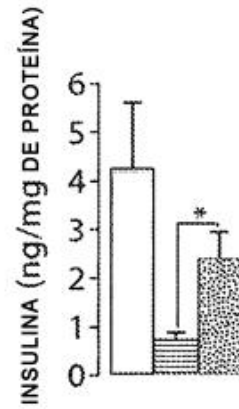


Fig. 19G

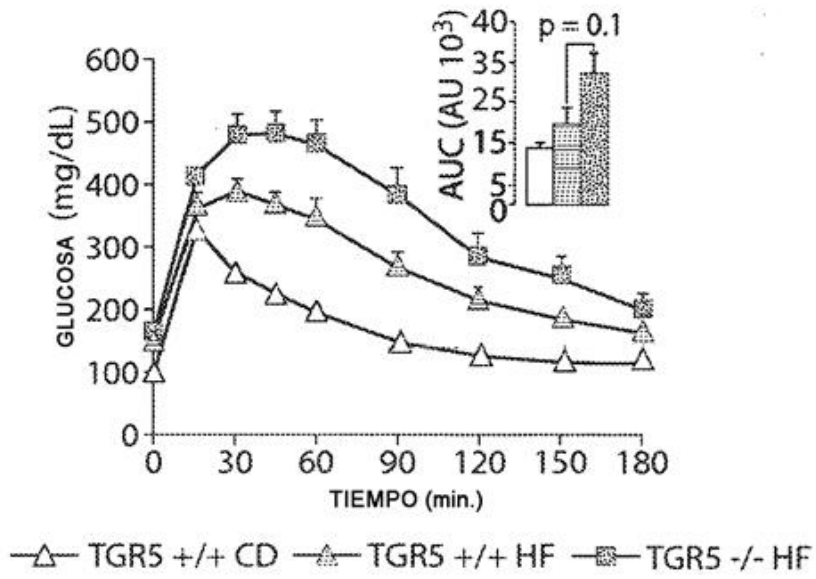


Fig. 19H

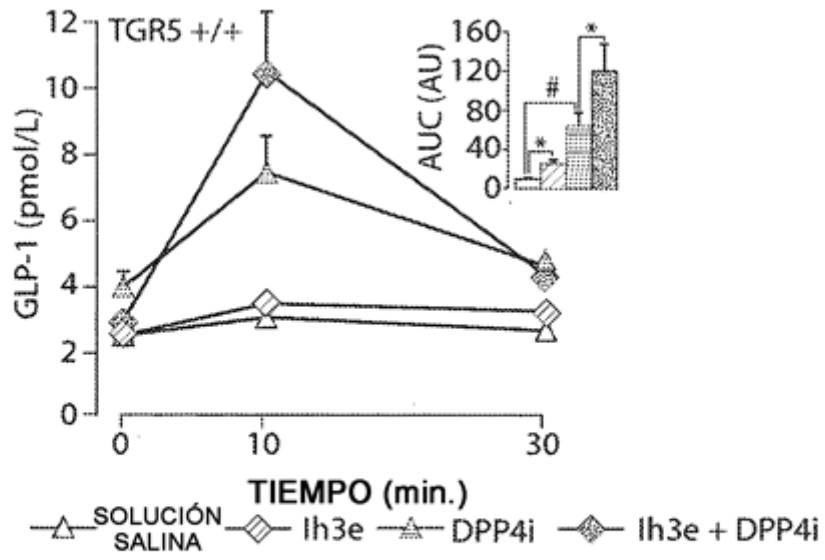


Fig. 19I

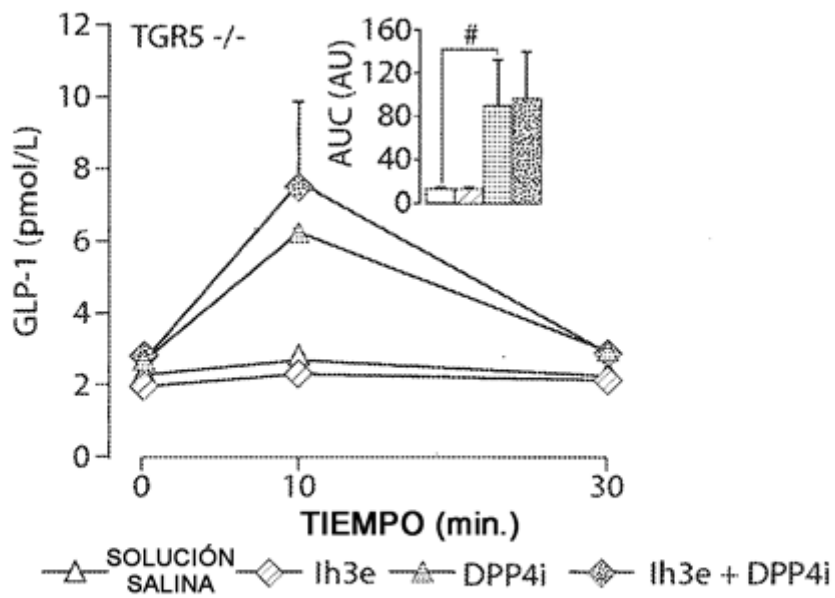


Fig. 19J

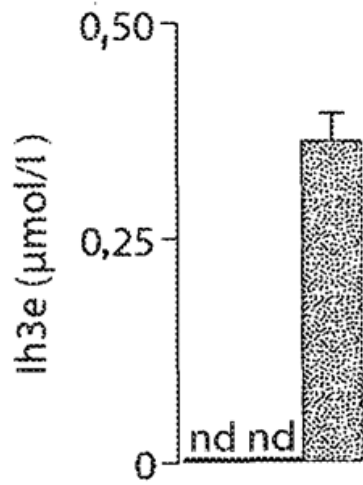


Fig. 20A

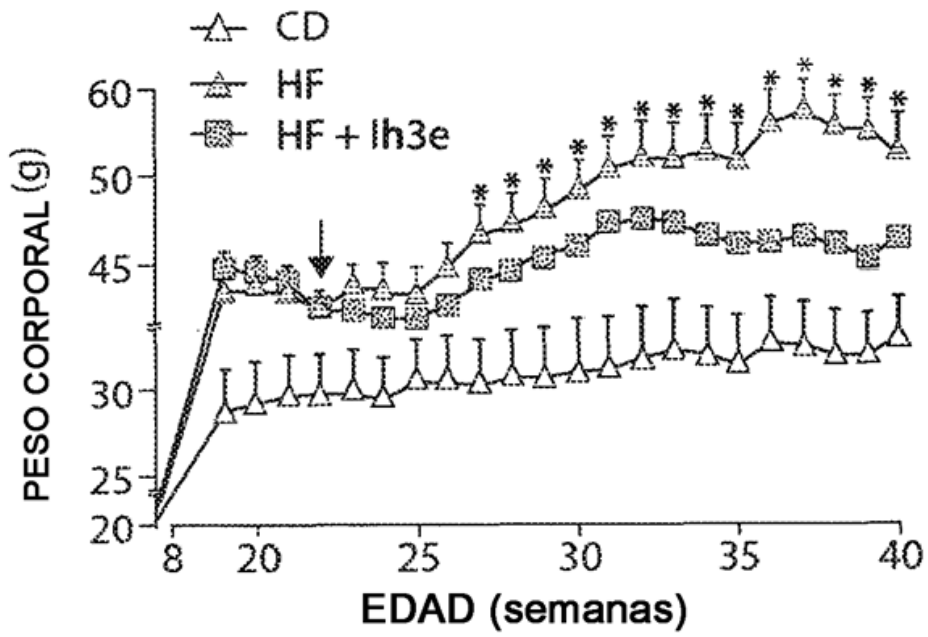


Fig. 20B

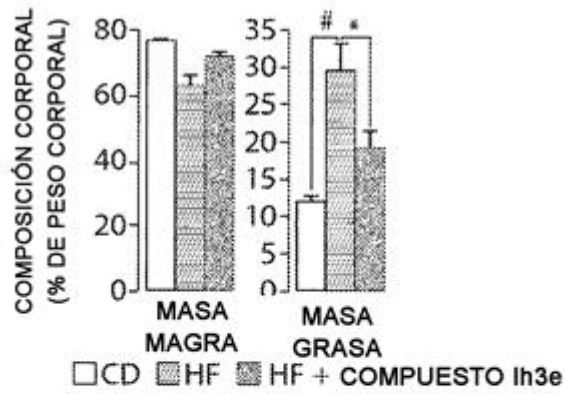


Fig. 20C

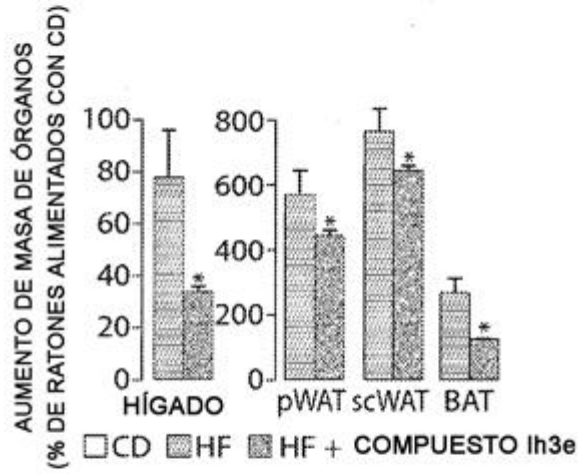


Fig. 20D

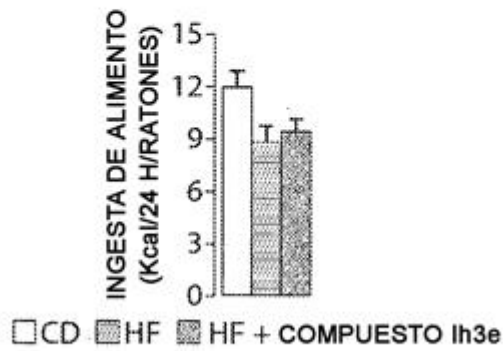


Fig. 20E

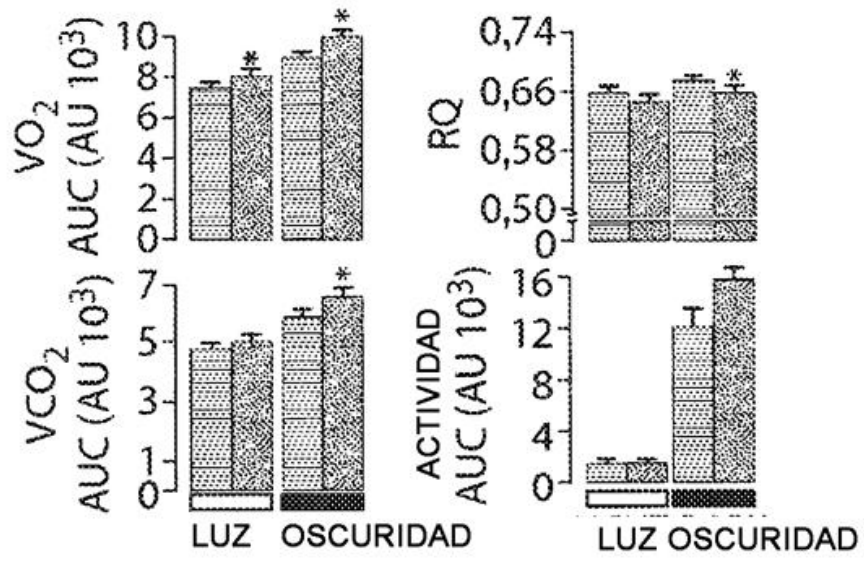


Fig. 20F

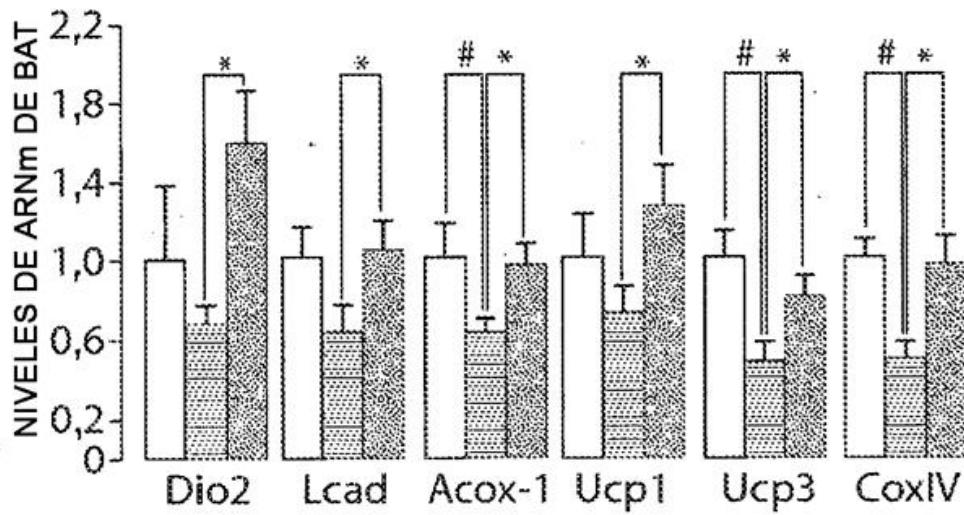


Fig. 20G

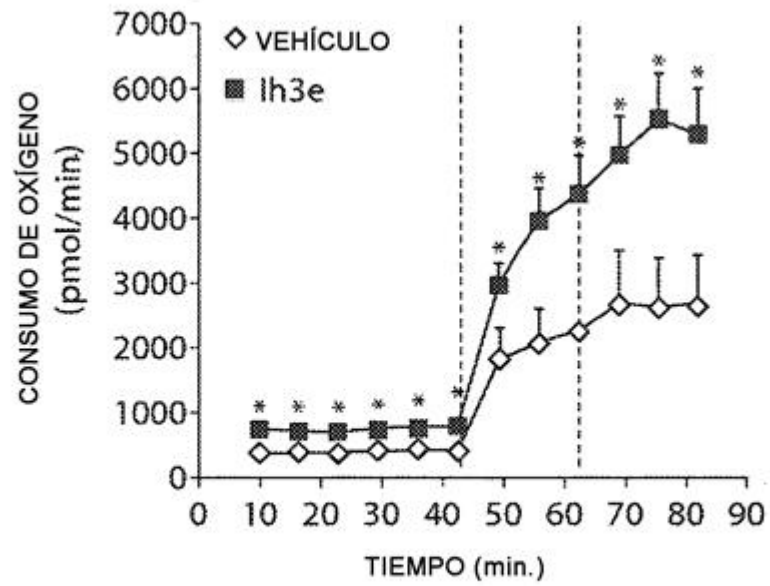


Fig. 20H

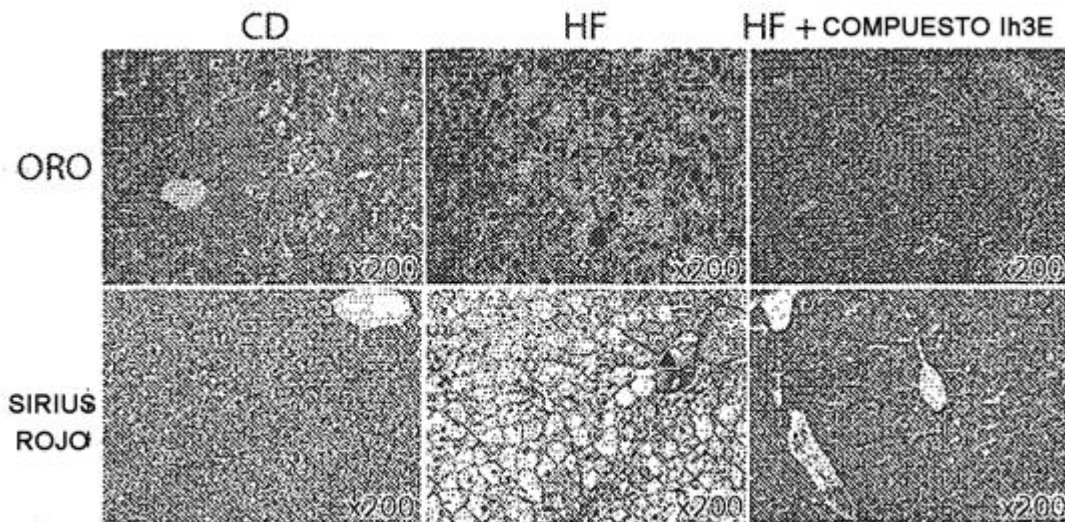


Fig. 20I

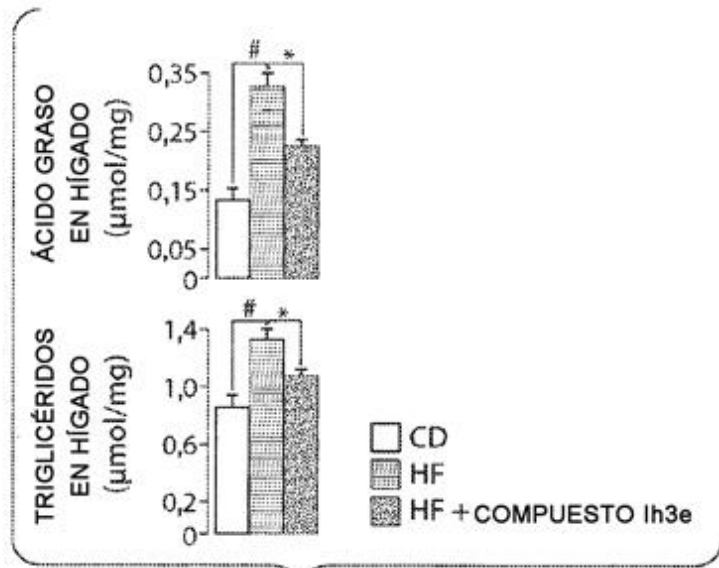


Fig. 20J

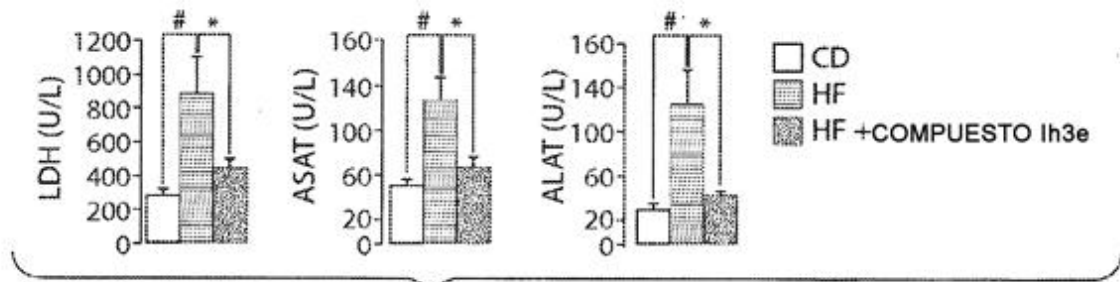


Fig. 20K

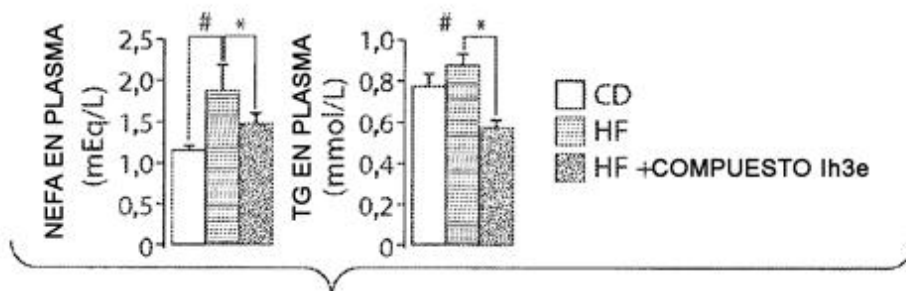


Fig. 20L

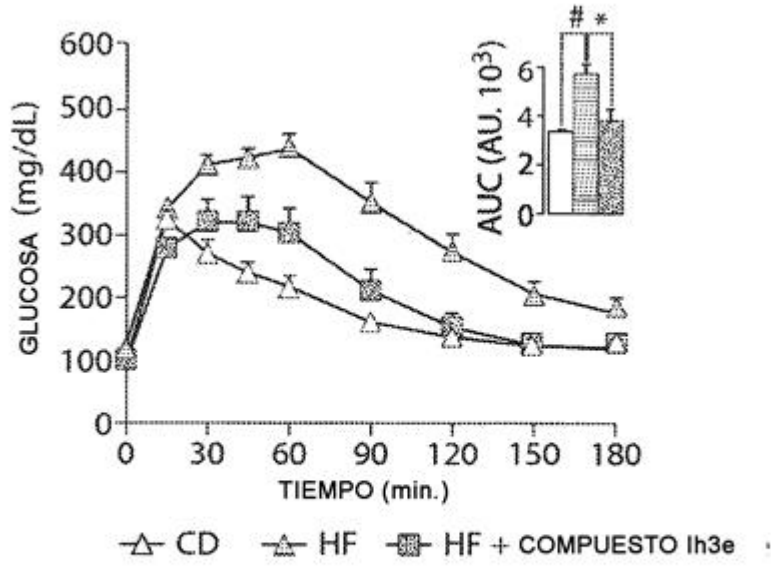


Fig. 21A

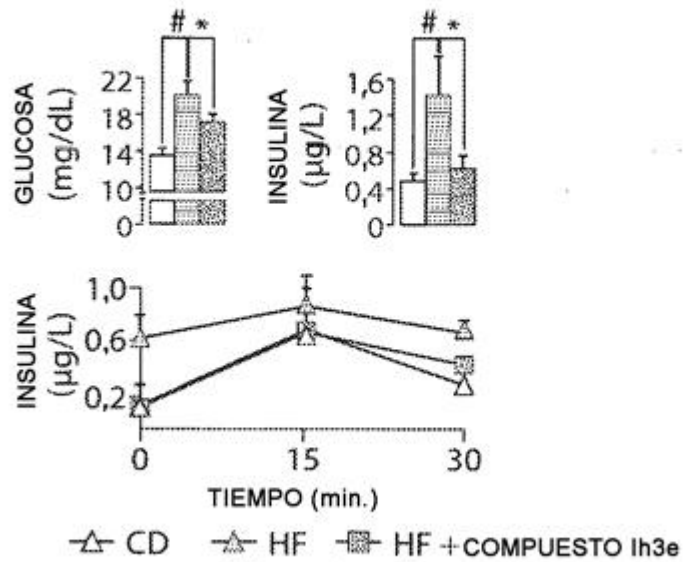


Fig. 21B

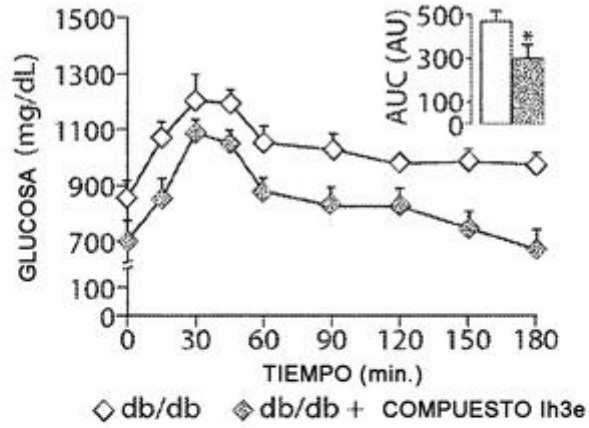


Fig. 21C

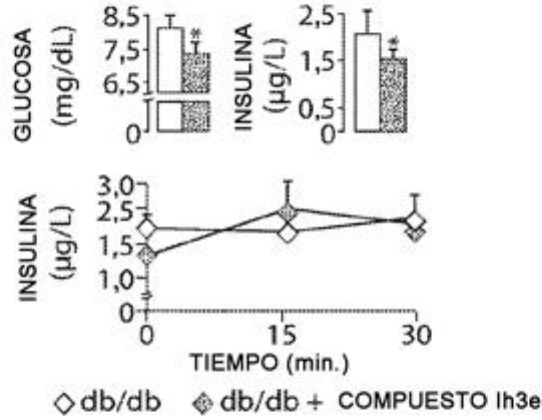


Fig. 21D

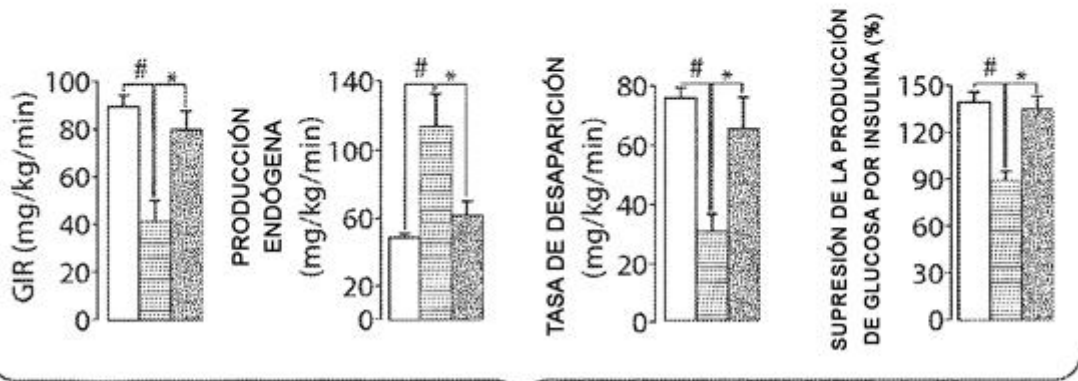


Fig. 21E

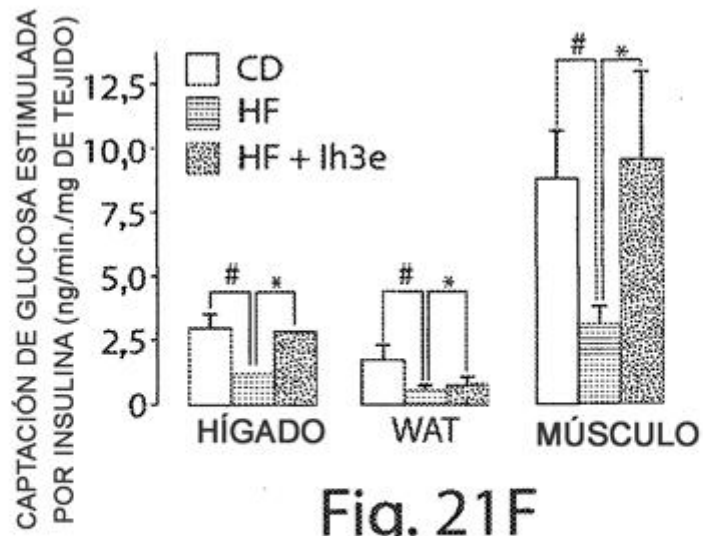


Fig. 21F

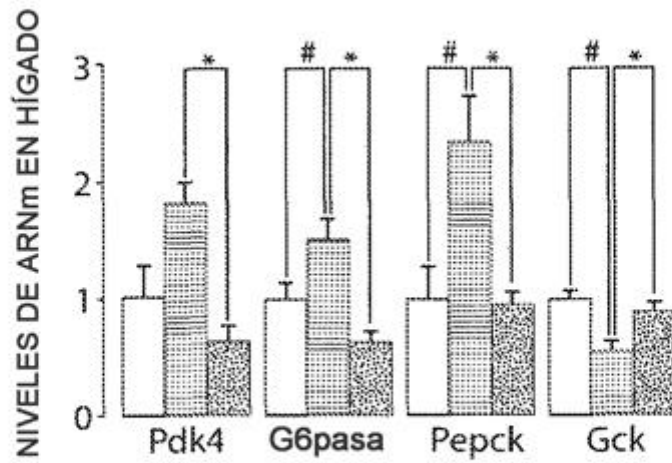


Fig. 21G

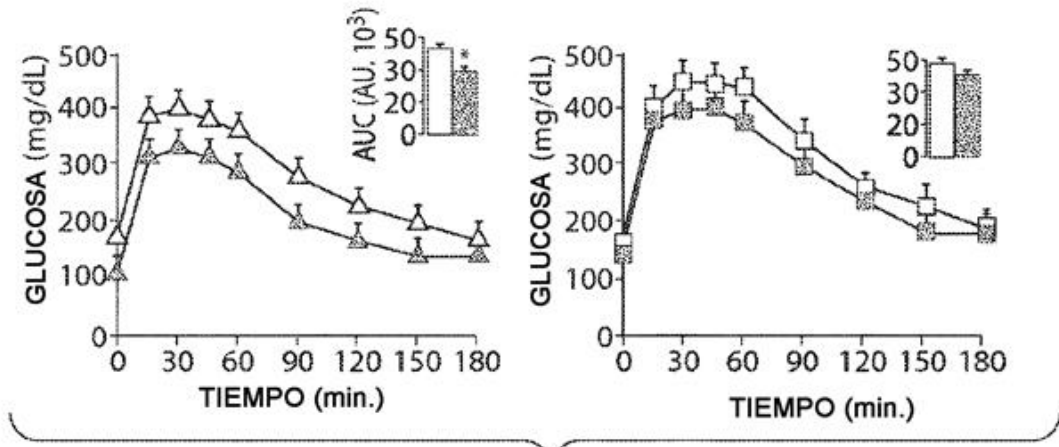


Fig. 22A

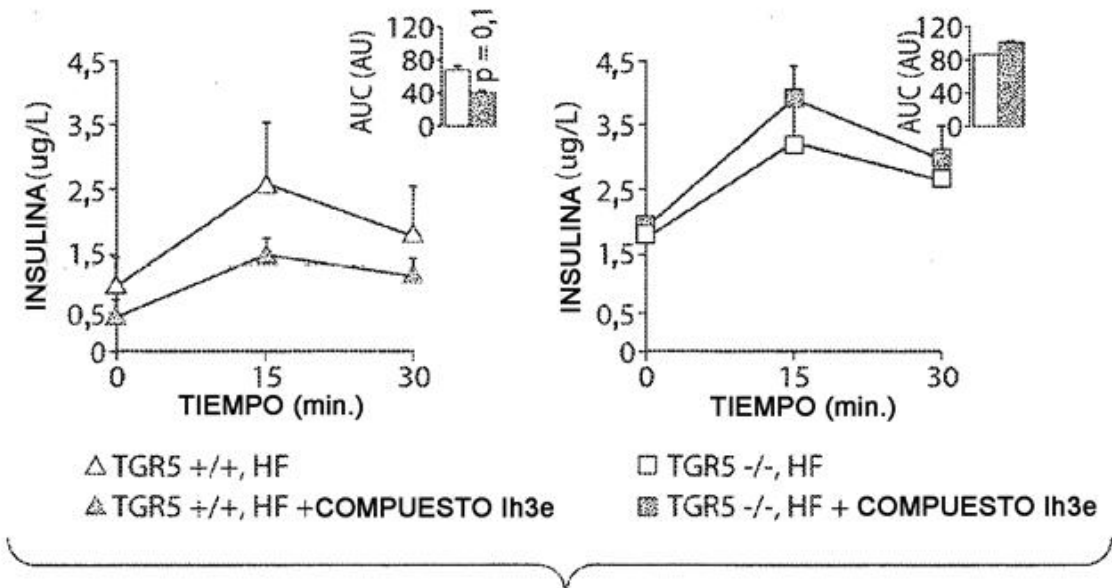


Fig. 22B

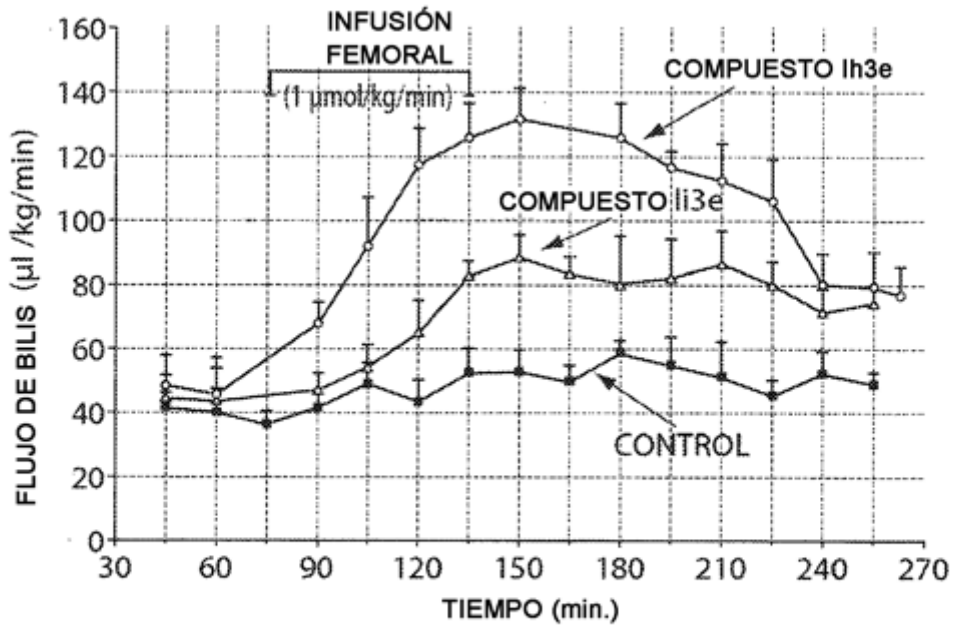


Fig. 23

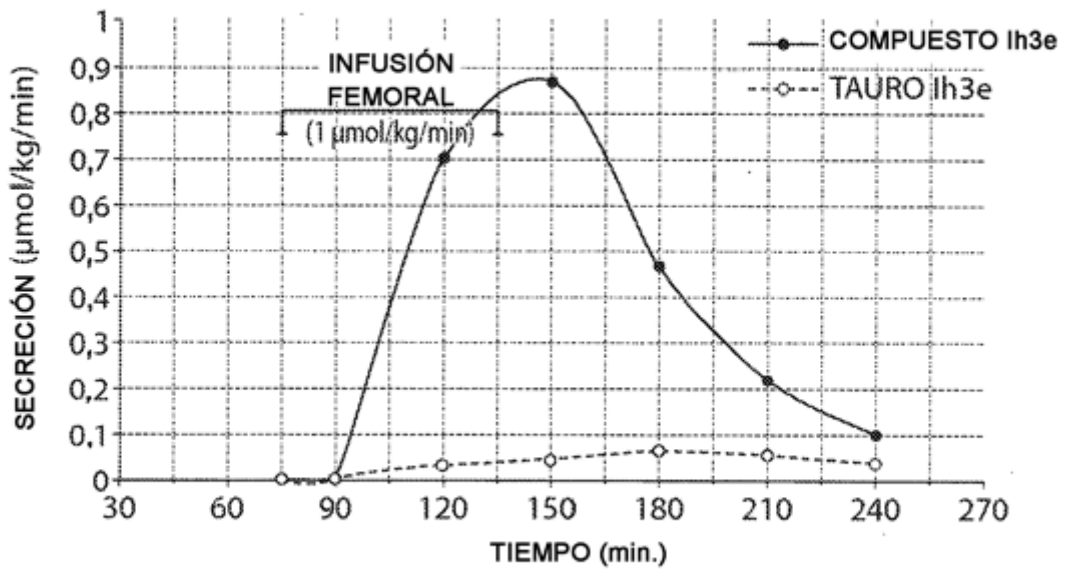


Fig. 24

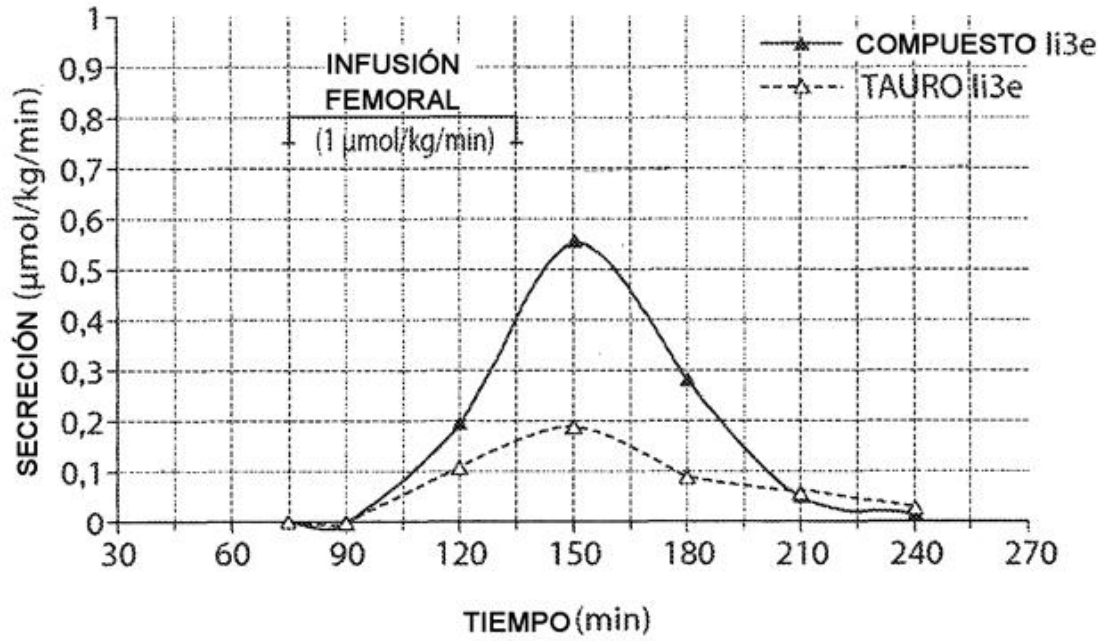


Fig. 25

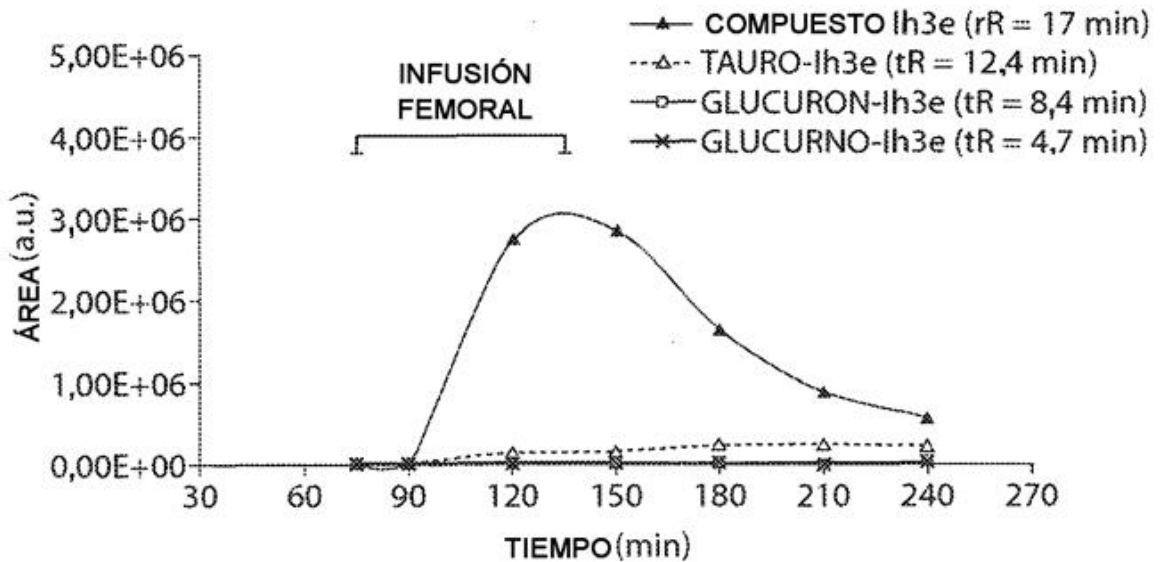


Fig. 26

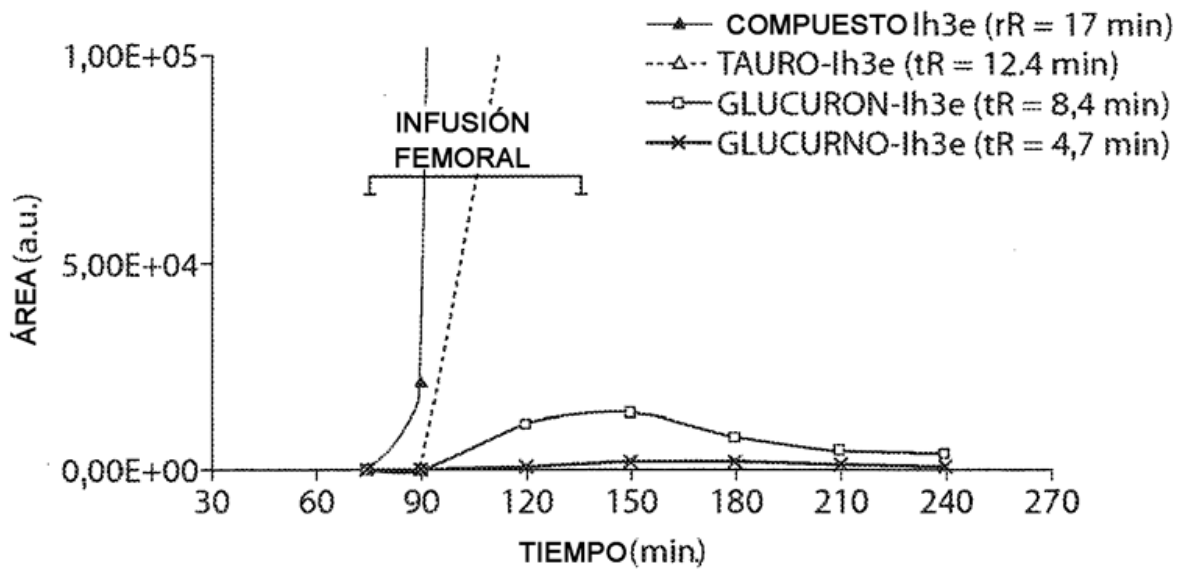


Fig. 27