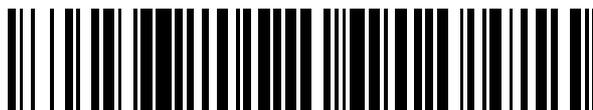


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 591**

51 Int. Cl.:

**C07J 9/00** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

**C07J 31/00** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007 E 07809913 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2040713**

54 Título: **Derivados de ácidos biliares como ligandos de FXR para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR**

30 Prioridad:

**27.06.2006 US 816635 P**

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

**27.11.2014**

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
421 HUDSON STREET, SUITE 212  
NEW YORK, NEW YORK 10014, US**

72 Inventor/es:

**PELLICCIARI, ROBERTO;  
FIORUCCI, STEFANO y  
PRUZANSKI, MARK**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 523 591 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

Derivados de ácidos biliares como ligandos de FXR para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moduladores del receptor farnesoide X (FXR) que pueden usarse para el tratamiento de trastornos colestáticos, en particular a derivados de ácidos biliares en los que el C<sub>6</sub> contiene un etilo y el grupo carboxilo C<sub>24</sub> se transforma en un grupo sulfato.

10

**Antecedentes de la invención**

El receptor farnesoide X (FXR) es un receptor nuclear huérfano identificado inicialmente a partir de una biblioteca de ADNc de hígado de rata (BM. Forman, *et al.*, Cell 81: 687-693 (1995)) que está lo más estrechamente relacionado con el receptor de ecdisona de insectos. El FXR es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando que incluye receptores para las hormonas esteroideas, retinoideas y tiroideas (DJ. Mangelsdorf, *et al.*, Cell 83: 841-850 (1995)). El análisis *in situ* y de tipo Northern muestra que FXR se expresa de la manera más abundante en el hígado, el intestino, el riñón y la glándula suprarrenal (BM. Forman, *et al.*, Cell 81: 687-693 (1995) y W. Seol, *et al.*, Mol. Endocrinol. 9: 72-85 (1995)). El FXR se une al ADN como un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR). El heterodímero FXR/RXR se une preferentemente a elementos de respuesta compuestos por dos hemisítos del receptor nuclear del consenso AG(G/T)TCA organizados como una repetición invertida y separados por un único nucleótido (motivo IR-1) (BM. Forman, *et al.*, Cell 81: 687-693 (1995)). Un informe reciente mostró que FXR de rata se activa mediante concentraciones micromolares de farnesoides tales como farnesol y hormona juvenil (BM. Forman, *et al.*, Cell 81: 687-693 (1995)). Sin embargo, estos compuestos no pudieron activar el FXR humano ni el de ratón, dejando en duda la naturaleza del ligando de FXR endógeno. Varios ácidos biliares que se producen de manera natural se unen a y activan FXR a concentraciones fisiológicas (documento PCT WO 00/37077, publicado el 29 de junio de 2000)). Tal como se comenta en el mismo, los ácidos biliares que sirven como ligandos de FXR incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA) y los conjugados con taurina y glicina de estos ácidos biliares.

15

20

25

30

Los ácidos biliares son metabolitos del colesterol que se forman en el hígado y se secretan al duodeno del intestino, donde tienen importantes papeles en la solubilización y absorción de lípidos y vitaminas de la dieta. La mayor parte de los ácidos biliares (~95%) se reabsorben posteriormente en el íleon y regresan al hígado por medio del sistema circulatorio enterohepático. La conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado está bajo una regulación por retroalimentación: los ácidos biliares regulan por disminución la transcripción de citocromo P450 7a (CYP7a), que codifica para la enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos biliares. Existen datos como para sugerir que FXR está implicado en la represión de la expresión de CYP7a por ácidos biliares, aunque el mecanismo preciso sigue sin estar claro (DW. Russell, *Cell* 97: 539-542 (1999)). En el íleon, los ácidos biliares inducen la expresión de la proteína de unión a ácido biliar intestinal (IBABP), una proteína citoplasmática que se une a ácidos biliares con alta afinidad y que puede estar implicada en el tráfico y la captación celulares. Dos grupos han demostrado ahora que los ácidos biliares median en sus efectos sobre la expresión de IBABP a través de la activación de FXR, que se une a un elemento de respuesta de tipo IR-1 que está conservado en los promotores génicos de IBABP de ser humano, rata y ratón. Por tanto, FXR está implicado en tanto la estimulación (IBABP) como la represión (CYP7a) de genes diana implicados en la homeostasis del colesterol y los ácidos biliares.

35

40

45

El documento EP 1392714 da a conocer ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-6 $\alpha$ -etil-5 $\beta$ -colan-24-oico (también denominado ácido 6-etil-quenodesoxicólico, 6-EDCA, a continuación en el presente documento), solvatos y conjugados con aminoácido del mismo como agonistas de FXR, que pueden usarse en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR.

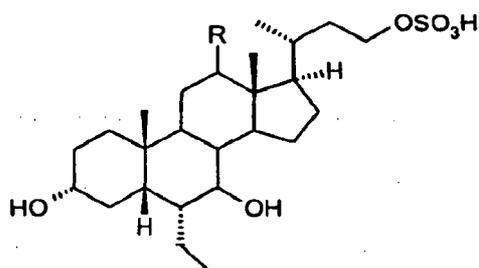
50

El documento EP 1568706 da a conocer derivados de ácido 6-etil-ursodesoxicólico (6-EUDCA) como agonistas de FXR y su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR.

55

**Breve resumen de la invención**

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I):



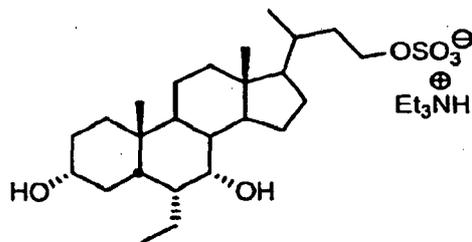
en la que R es hidrógeno o alfa-hidroxilo,

5 el grupo hidroxilo en posición 7 está en la posición alfa o beta;

y conjugados con aminoácido, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

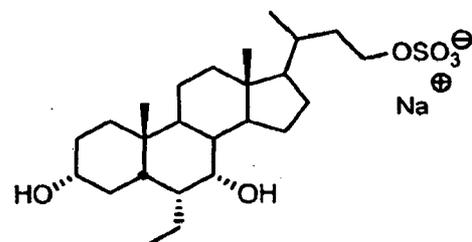
10 En una realización, el compuesto de fórmula (I) está en forma de un derivado de ácido quenodesoxicólico. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) está en forma de un derivado de ácido ursodesoxicólico. Todavía en otra realización, el compuesto de fórmula (I) está en forma de un derivado de ácido cólico.

En otra realización, el compuesto de fórmula (I) está en forma de una sal de trietilamonio:



15

6. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) está en forma de una sal de sodio:



20

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos reivindicados para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o estado mediado por FXR. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I). La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o estado mediado por FXR.

30

35 En determinadas realizaciones, la enfermedad o estado mediado por FXR es enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, arteriosclerosis, hipercolesterolemia o hiperlipidemia, enfermedad hepática crónica, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, cáncer (es decir, cáncer colorrectal) o indicaciones neurológicas tales como accidente cerebrovascular. En determinadas realizaciones, la enfermedad hepática crónica es cirrosis biliar primaria (CBP), xantomatosis cerebrotendinosa (XCT), colangitis esclerosante primaria (CEP), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (CANP), colestasis asociada a septicemia o sobrecrecimiento bacteriano, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad de injerto contra huésped asociada a trasplante de hígado, regeneración de hígado para trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumor maligno intra o extrahepático, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis o deficiencia en alfa 1-antitripsina. En determinadas realizaciones, la enfermedad gastrointestinal es enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), síndrome del intestino irritable (SII), sobrecrecimiento bacteriano, malabsorción, colitis posradiación o colitis microscópica. En determinadas realizaciones, la enfermedad renal es nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis

40

crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica o enfermedad renal poliquística. En determinadas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia. En determinadas realizaciones, la enfermedad metabólica es resistencia a la insulina, diabetes tipo I y tipo II, u obesidad.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) y conjugados con aminoácido, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

### Breve descripción de las figuras

15 La figura 1 muestra el resultado del ensayo de transactivación en un formato de gráfico. Cada punto de datos es el promedio de ensayos por triplicado. CTRL: control; INT-747: 6-ECDCA; UPF-987.

La figura 2 muestra la respuesta a la dosis de INT-747 y UPF-987 en el ensayo de transactivación.

20 La figura 3 muestra la expresión de genes diana de FXR *in vitro*. El resultado es la media de dos experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa.

La figura 4 muestra la expresión de genes diana de FXR representativa en células derivadas de hígado de ratón *in vivo*. Los datos son la media de dos experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa.

25 La figura 5 muestra el efecto de UPF-987 sobre la pérdida de peso inducida por TNBS.

La figura 6 muestra el efecto de UPF-987 sobre la consistencia de las heces.

30 La figura 7 muestra el efecto de UPF-987 sobre la puntuación del daño en la mucosa.

La figura 8 muestra el efecto de UPF-987 sobre la expresión de genes de colon de ratón. El resultado es la media de dos experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa.

35 La figura 9 muestra el efecto de UPF-987 sobre la bilirrubina plasmática en colestasis inducida por ANIT.

La figura 10 muestra el efecto de UPF-987 sobre AST plasmática en colestasis inducida por ANIT.

La figura 11 muestra el efecto de UPF-987 sobre ALP plasmática en colestasis inducida por ANIT.

40 La figura 12 muestra el efecto de UPF-987 sobre gammaGT plasmática en colestasis inducida por ANIT.

La figura 13 muestra el efecto de UPF-987 sobre el colesterol plasmático en colestasis inducida por ANIT.

45 La figura 14 muestra el efecto de UPF-987 sobre el peso corporal en colestasis inducida por ANIT.

La figura 15 muestra el efecto de UPF-987 sobre el peso del hígado en colestasis inducida por ANIT.

50 La figura 16 muestra el efecto de UPF-987 sobre la expresión de genes diana de FXR en el hígado de rata colestásica inducida por ANIT. El resultado es la media de dos experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa.

La figura 17 muestra el efecto de INT-1103 sobre la bilirrubina plasmática en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

La figura 18 muestra el efecto de INT-1103 sobre AST plasmática en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

55 La figura 19 muestra el efecto de INT-1103 sobre ALT plasmática en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

La figura 20 muestra el efecto de INT-1103 sobre ALP plasmática en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

60 La figura 21 muestra el efecto de INT-1103 sobre gammaGT plasmática en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

La figura 22 muestra el efecto de INT-1103 sobre el peso corporal en ratas colestásicas inducidas por ANIT.

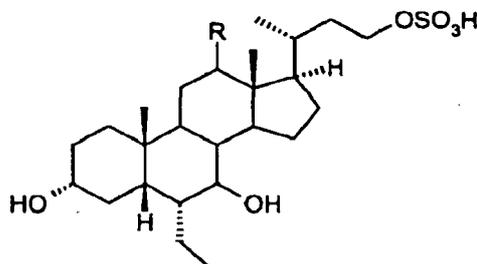
La figura 23 muestra la razón hepática resultante (peso del hígado/peso corporal x 100).

65 La figura 24 muestra el efecto de INT-1103 sobre la bilirrubina plasmática en ratas colestásicas inducidas por BDL.

- La figura 25 muestra el efecto de INT-1103 sobre AST plasmática en ratas colestásicas inducidas por BDL.
- La figura 26 muestra el efecto de INT-1103 sobre ALT plasmática en ratas colestásicas inducidas por BDL.
- 5 La figura 27 muestra el efecto de INT-1103 sobre ALP plasmática en ratas colestásicas inducidas por BDL.
- La figura 28 muestra el efecto de INT-1103 sobre gammaGT plasmática en ratas colestásicas inducidas por BDL.
- 10 La figura 29 muestra el efecto de INT-1103 sobre el peso corporal en ratas colestásicas inducidas por BDL.
- La figura 30 muestra la razón hepática resultante (peso del hígado/peso corporal x 100).
- La figura 31 muestra el efecto de INT-1103 e INT-747 sobre el flujo de bilis en ratas sin tratamiento previo.
- 15 La figura 32 muestra el efecto de INT-1103 e INT-747 sobre el flujo de bilis en ratas colestásicas con estrógenos.
- La figura 33 muestra el efecto de INT-1103 e INT-747 sobre la razón hepática en ratas colestásicas con estrógenos.
- 20 La figura 34 muestra el efecto de INT-1103 e INT-747 sobre el peso corporal en ratas colestásicas con estrógenos.
- La figura 35 muestra la expresión génica de insulina resultante mediante PCR en tiempo real cuantitativa.
- La figura 36 muestra la tensión superficial (dina/cm) representada gráficamente frente al logaritmo de la concentración de sales biliares (mM) en agua.
- 25 La figura 37 muestra la tensión superficial (dina/cm) representada gráficamente frente al logaritmo de la concentración de sales biliares (mM) en NaCl 0,15 M.
- La figura 38 muestra la tasa de secreción de INT-747 conjugado con taurina. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 30 La figura 39 muestra la tasa de secreción de INT-747 conjugado con glicina. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 35 La figura 40 muestra la tasa de secreción de INT-747. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- La figura 41 muestra la tasa de secreción de epímeros de INT-747. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 40 La figura 42 muestra la tasa de secreción de epímeros de INT-747 conjugados con taurina. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- La figura 43 muestra la tasa de secreción de INT-1103. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 45 La figura 44 muestra la tasa de secreción de INT-1103 y su metabolito principal 3-glucurónidos. La cantidad relativa se expresa como señal analítica. Se notifican los datos como concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 50 La figura 45 muestra la tasa de secreción de metabolitos principales de INT-1103 identificados en bilis usando espectrometría de masas. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 55 La figura 46 muestra la tasa de secreción de metabolitos principales de INT-1103 identificados en bilis usando presentación en aumento de espectrometría de masas. Se notifican los datos como la concentración en bilis y deben corregirse mediante el volumen de bilis.
- 60 La figura 47 muestra la estabilidad metabólica de INT-747 e INT-1103 en cultivos de heces humanas. Se usó ácido quenodesoxicólico como análogo natural de referencia.
- 65 La figura 48 muestra la estabilidad metabólica de INT-1103 en líquido pancreático simulado. Se usó aceite de oliva como referencia tal como se notifica en el protocolo de la USP. El compuesto es muy estable y el enlace éster (sulfato) no se hidroliza por esterasas pancreáticas, lo que sugiere una alta estabilidad en el contenido del intestino superior y duodenal humano.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I):



en la que R es hidrógeno o alfa-hidroxilo,

el grupo hidroxilo en posición 7 está en la posición alfa o beta;

y conjugados con aminoácido, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El experto en la técnica determinará fácilmente sales farmacéuticamente aceptables adecuadas según la presente invención e incluirán, por ejemplo, sales básicas tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas hechas de N,N'-dibenciletilendiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. También pueden usarse sales con aminas farmacéuticamente aceptables tales como lisina, arginina, trometamina, trietilamina y similares. Tales sales de los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse usando técnicas convencionales, a partir del compuesto de fórmula (I) haciendo reaccionar, por ejemplo, la base apropiada con el compuesto de fórmula (I).

Cuando se usan en medicina, las sales de un compuesto de fórmula (I) deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse convenientemente sales farmacéuticamente inaceptables para preparar la correspondiente base libre o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, el término "solvato" es una forma de cristal que contiene el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad o bien estequiométrica o bien no estequiométrica de un disolvente. Los disolventes, a modo de ejemplo, incluyen agua, metanol, etanol o ácido acético. A continuación en el presente documento, la referencia a un compuesto de fórmula (I) es a cualquier forma física de ese compuesto, a menos que se especifique una forma, una sal o un solvato particular del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugados con aminoácido" se refiere a conjugados de los compuestos de fórmula (I) con cualquier aminoácido adecuado. Preferiblemente, tales conjugados con aminoácido adecuados de los compuestos de fórmula (I) tendrán la ventaja añadida de integridad potenciada en bilis o líquidos intestinales. Los aminoácidos adecuados incluyen pero no se limitan a glicina y taurina. Por tanto, la presente invención abarca los conjugados con glicina y taurina de cualquiera de los compuestos de fórmula (I).

En una realización, el compuesto de fórmula I es un derivado de ácido quenodesoxicólico, en el que el grupo hidroxilo en 7 está en la posición alfa y R es hidrógeno.

En otra realización, el compuesto de fórmula I es un derivado de ácido ursodesoxicólico, en el que el grupo hidroxilo en 7 está en la posición beta y R es hidrógeno.

En otra realización, el compuesto de fórmula I es un derivado de ácido cólico, en el que el grupo hidroxilo en 7 está en la posición alfa y R es alfa-hidroxilo.

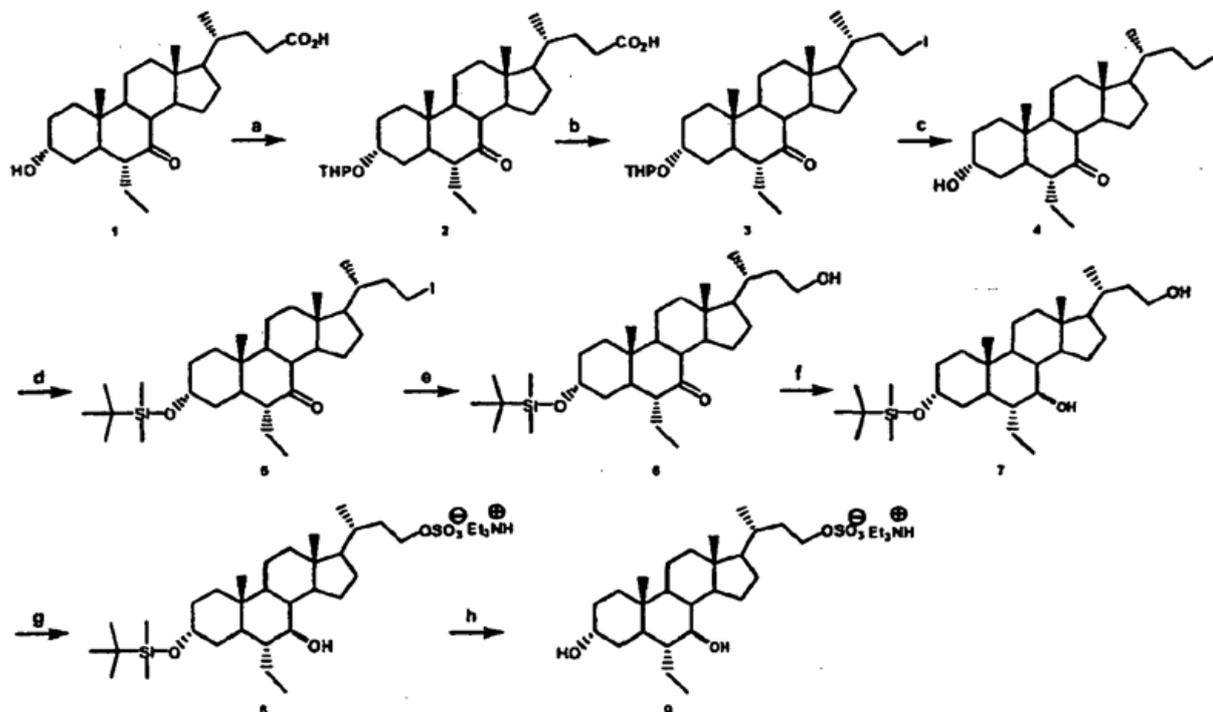
A continuación en el presente documento todas las referencias a "compuestos de fórmula (I)" se refieren a compuestos de fórmula (I) tal como se describió anteriormente junto con sus y conjugados con aminoácido, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de fórmula I pueden prepararse partiendo de los ácidos 6-etil-7-ceto-cólicos, preparados tal como se da a conocer en los documentos EP 1392714 y EP 1568706, protegidos adecuadamente en el resto 3-hidroxilo, mediante una secuencia de reacción que comprende la transformación del grupo carboxilo C24 en un átomo de yodo, la conversión de este último en un grupo hidroxilo, la reducción del grupo 7-ceto para dar el correspondiente grupo 7-alfa o 7-beta-hidroxilo, la sulfatación selectiva del grupo hidroxilo C23 y la desprotección del grupo 3-hidroxilo.

El esquema de reacción y los reactivos usados en cada etapa se notifican en el siguiente esquema que muestra la

preparación de 24-nor-5 $\beta$ -colan-23-sulfato de 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,23-trihidroxi-6 $\alpha$ -etilo en forma de sal de trietilamonio (UPF-987 o compuesto (9) a continuación). El mismo esquema puede adaptarse, sustituyendo adecuadamente los reactivos y/o materiales de partida y opcionalmente también cambiando las secuencias de reacción y los grupos protectores, para la preparación de otros compuestos de fórmula I.

5

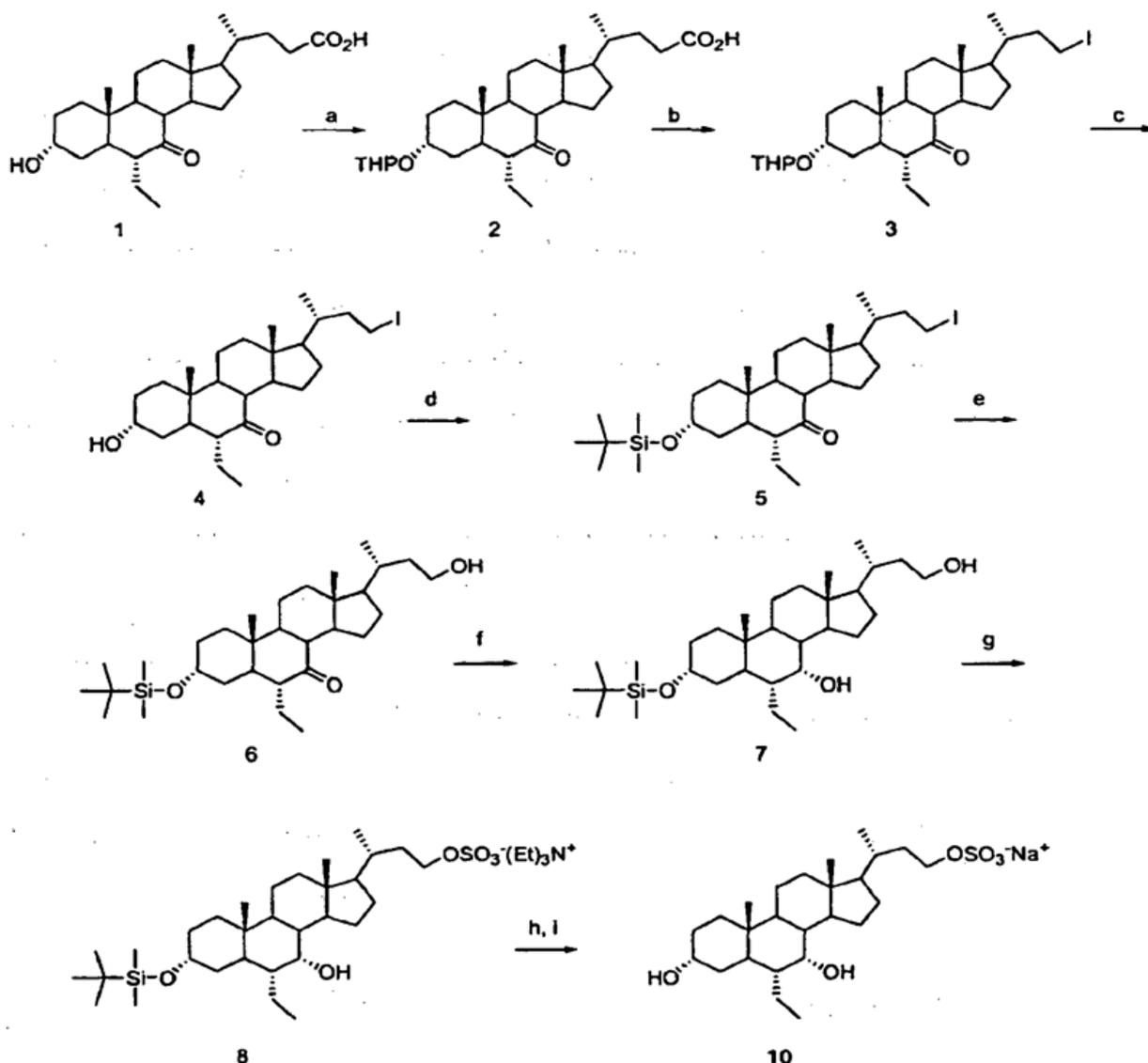


a) 3,4-dihidro-2H-pirano, p-TsOH, dioxano, t.a.; b) I<sub>2</sub>, Pb(AcO)<sub>4</sub>, hv, CCl<sub>4</sub>; c) HCl<sub>conc.</sub>, THF; d) TBDMSiCl, imidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a.; e) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona, H<sub>2</sub>O, reflujo; f) NaBH<sub>4</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, t.a.; g) ClSO<sub>3</sub>H, (Et)<sub>3</sub>N, THF; h) CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>

10

El esquema de reacción y los reactivos usados en cada etapa se notifican en el siguiente esquema a continuación que muestra la preparación de 24-nor-5 $\beta$ -colan-23-sulfato de 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,23-trihidroxi-6 $\alpha$ -etilo en forma de sal de sodio (INT-1103 o compuesto (10) a continuación). El mismo esquema puede adaptarse, sustituyendo adecuadamente los reactivos y/o materiales de partida y opcionalmente también cambiando las secuencias de reacción y los grupos protectores, para la preparación de otras formas de sal farmacéuticamente aceptables de fórmula I.

15



a) 3,4-dihidro-2H-pirano, p-TsOH, dioxano, t.a.; b) I<sub>2</sub>, Pb(AcO)<sub>4</sub>, hv, CCl<sub>4</sub>; c) HCl<sub>gas</sub>, DME; d) TBDMSCl, imidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a.; e) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona, H<sub>2</sub>O, reflujo; f) NaBH<sub>4</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, t.a.; g) ClSO<sub>3</sub>H, (Et)<sub>3</sub>N, THF; h) H<sub>2</sub>O, acetona; PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>, i) NaOH, MeOH

5

Tal como se explica en mayor detalle en la sección experimental, se sometió a prueba el compuesto 9 en un ensayo libre de células y un ensayo de transactivación en una línea celular de hepatocitos humanos e *in vivo* en ratones intactos y ratas que se volvieron colestásicas mediante la administración de isotiocianato de alfa-naftilo (ANIT). En el ensayo de FRET, se encontró que el compuesto era aproximadamente 1000 veces más potente que el ácido quenodesoxicólico (CDCA) en la activación de FXR. En el ensayo de transactivación, el compuesto 9 provocó una inducción de 2 veces en el transportador de ácidos biliares, BSEP (bomba de exportación de sales biliares) y la pareja heterodimérica pequeña (SHP, un receptor nuclear atípico que carece de dominio de unión a ADN). Además suprimió de manera potente Cyp7A1, SREPB-1c y la ácido graso sintasa (FAS), indicando por tanto que la activación de FXR por el compuesto de la invención permite la modulación selectiva de genes implicados en la síntesis de ácidos biliares así como en el metabolismo de lípidos, colesterol y glucosa. Por tanto, compuestos de fórmula (I) actúan como moduladores selectivos de los transportadores de ácidos biliares y aumentan el flujo de ácidos biliares en el hígado; además, regulan de manera potente genes implicados en el metabolismo de lípidos y colesterol y por este motivo pueden usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR, que incluyen enfermedad hepática crónica (que implica una o más de colestasis, esteatosis, inflamación, fibrosis y cirrosis), enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular y enfermedad metabólica. Las enfermedades hepáticas crónicas que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos de fórmula (I) incluyen pero no se limitan a cirrosis biliar primaria (CBP), colangitis esclerosante primaria (CEP), xantomatosis cerebrotendinosa (XCT), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (CANP), colestasis asociada a septicemia o sobrecrecimiento

10

15

20

25

bacteriano, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad de injerto contra huésped asociada a trasplante de hígado, regeneración de hígado para trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumor maligno intra o extrahepático, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis y deficiencia en alfa 1-antitripsina. Las enfermedades gastrointestinales que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos de fórmula (I) incluyen pero no se limitan a enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), síndrome del intestino irritable (SII), sobrecrecimiento bacteriano, malabsorción, colitis posradiación y colitis microscópica. Las enfermedades renales que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos de fórmula (I) incluyen pero no se limitan a nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística. Las enfermedades cardiovasculares que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos de fórmula (I) incluyen pero no se limitan a aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Las enfermedades metabólicas que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos de fórmula (I) incluyen pero no se limitan a resistencia a la insulina, diabetes tipo I y tipo II, y obesidad.

Los métodos que emplean los compuestos de la presente invención comprenden la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I). Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de fórmula (I) que es suficiente para lograr el efecto establecido. Por consiguiente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) usado en un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR será una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad o estado mediado por FXR. De manera similar, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) para su uso en un método para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas o aumentar el flujo de bilis será una cantidad suficiente para aumentar el flujo de bilis al intestino.

La cantidad del compuesto de fórmula (I) que se requiere para lograr el efecto biológico deseado dependerá de varios factores tales como el uso para el que está destinado, los medios de administración y el receptor, y estará en última instancia al criterio del veterinario o médico encargado. En general, una dosis diaria típica para el tratamiento de enfermedades y estados mediados por FXR, por ejemplo, puede esperarse que se encuentre en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. Esta dosis puede administrarse como una única dosis unitaria o como varias dosis unitarias separadas o como una infusión continua. Serán aplicables dosificaciones similares para el tratamiento de otras enfermedades, estados y terapias incluyendo la profilaxis y el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) junto, y/o en mezcla, con al menos un portador o diluyente farmacéutico. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse en la profilaxis y el tratamiento de las enfermedades o estados anteriores.

El portador debe ser farmacéuticamente aceptable y debe ser compatible con, es decir, no tener un efecto perjudicial sobre, los otros componentes en la composición. El portador puede ser un sólido o líquido y se formula preferiblemente como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido que puede contener desde el 0,05 hasta el 95% en peso del principio activo. Si se desea, también pueden incorporarse otros principios fisiológicamente activos en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Las formulaciones posibles incluyen las adecuadas para administración oral, sublingual, bucal, parenteral (por ejemplo subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal, tópica incluyendo transdérmica, intranasal e inhalación. Los medios más adecuados de administración para un paciente particular dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o estado que está tratándose o de la naturaleza de la terapia que está usándose y de la naturaleza del compuesto activo, pero cuando sea posible, se prefiere una administración oral para la prevención y el tratamiento de enfermedades y estados mediados por FXR.

Pueden proporcionarse formulaciones adecuadas para administración oral como unidades diferenciadas, tales como comprimidos, cápsulas, cachets, pastillas para chupar, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvos o gránulos; como disoluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; o como emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite.

Las formulaciones adecuadas para administración sublingual o bucal incluyen pastillas para chupar que comprenden el compuesto activo y, normalmente, una base aromatizada, tal como azúcar y goma arábiga o tragacanto y pastillas que comprenden el compuesto activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden normalmente disoluciones acuosas estériles que contienen una concentración predeterminada del compuesto activo; la disolución es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor previsto. Las formulaciones adicionales adecuadas para administración

parenteral incluyen formulaciones que contienen agentes de complejación y/o codisolventes fisiológicamente adecuados tales como tensioactivos y ciclodextrinas. Emulsiones de aceite en agua también son formulaciones adecuadas para formulaciones parenterales. Aunque tales disoluciones se administran preferiblemente por vía intravenosa, también pueden administrarse mediante inyección intramuscular o subcutánea.

5 Las formulaciones adecuadas para administración rectal se proporcionan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria que comprenden el principio activo en uno o más portadores sólidos que forman la base de supositorios, por ejemplo, manteca de cacao.

10 Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica o intranasal incluyen pomadas, cremas, lociones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles y aceites. Los portadores adecuados para tales formulaciones incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, y combinaciones de los mismos.

15 Pueden prepararse formulaciones de la invención mediante cualquier método adecuado, normalmente mezclando uniforme e íntimamente el compuesto activo con líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, en las proporciones requeridas y entonces, si es necesario, conformando la mezcla resultante para dar la conformación deseada.

20 Por ejemplo, puede prepararse un comprimido comprimiendo una mezcla íntima que comprende un polvo o gránulos del principio activo y uno o más componentes opcionales, tales como un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte o un agente de dispersión tensioactivo, o moldeando una mezcla íntima de un principio activo en polvo y un diluyente líquido inerte.

25 Las formulaciones adecuadas para administración mediante inhalación incluyen nebulizaciones o polvos de partícula fina que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores de dosis medida.

30 Para administración pulmonar por medio de la boca, el tamaño de partícula del polvo o las gotitas está normalmente en el intervalo de 0,5-10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 1-5  $\mu\text{m}$ , para garantizar la administración al árbol bronquial. Para administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula en el intervalo 10-500  $\mu\text{m}$  para garantizar la retención en la cavidad nasal.

35 Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados, que contienen normalmente una formulación de suspensión o disolución del principio activo en un propelente licuado. Durante su uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido, normalmente de desde 10 hasta 150  $\mu\text{l}$ , para producir una pulverización de partículas finas que contienen el principio activo. Los propelentes adecuados incluyen determinados compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno más codisolventes, por ejemplo, tensioactivos de etanol, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.

40 Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman disoluciones o suspensiones del principio activo en una nebulización de aerosol terapéutica o bien por medio de aceleración de un gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un orificio Venturi estrecho, o bien por medio de agitación ultrasónica. Formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores consisten en el principio activo en un portador líquido y comprenden hasta el 40% p/p de la formulación, preferiblemente menos del 20% p/p. El portador es normalmente agua o una disolución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente isotónica con líquidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara de manera estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes de tamponamiento y tensioactivos.

50 Las formulaciones adecuadas para administración mediante insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden administrarse por medio de un insuflador o tomarse en la cavidad nasal de la manera de un rapé. En el insuflador, el polvo está contenido en cápsulas o cartuchos, hechos normalmente de gelatina o plástico, que o bien se perforan o bien se abren *in situ* y el polvo se administra mediante el aire extraído a través del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste o bien únicamente en el principio activo o bien en una combinación de polvo que comprende el principio activo, un diluyente de polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El principio activo comprende normalmente desde el 0,1 hasta el 100 p/p de la formulación.

60 Además de los componentes mencionados de manera específica anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes conocidos por los expertos en la técnica de farmacia, considerando el tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes y las formulaciones adecuadas para administración intranasal pueden incluir perfumes.

65 Por tanto, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de los compuestos de fórmula (I) en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por

FXR.

La invención se ilustrará a continuación en el presente documento en más detalle en los siguientes ejemplos.

## 5 **Ejemplo 1**

Química. Se determinaron los puntos de fusión con un aparato electrotérmico Buchi 535 y no están corregidos. Se obtuvieron los espectros de RMN con un espectrómetro Bruker AC 200 MHz y se notifican los desplazamientos químicos en partes por millón (ppm). Las abreviaturas usadas son las siguientes: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; dd, doble doblete; m, multiplete; q, cuartete, t, triplete. Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida usando gel de sílice 60 de Merck (0,040-0,063 mm). Se llevó a cabo la CCF sobre placas de CCF recubiertas previamente con gel de sílice 60 F-254 (Merck). Se visualizaron las manchas con reactivo de fosfomolibdato (disolución al 5% en EtOH). Se llevaron a cabo las reacciones bajo una atmósfera de nitrógeno.

### 15 **Ácido 3 $\alpha$ -tetrahidropirani-7-ceto-5 $\beta$ -colan-24-oico (2)**

Se hizo gotear lentamente 3,4-dihidro-2H-pirano (1,74 ml, 19 mmol) en dioxano (12 ml) en una disolución de ácido *p*-toluenosulfónico (115 mg, 0,6 ml) y ácido 6 $\alpha$ -etil-7-cetolítico (5,0 g, 12 mmol) en dioxano (55 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se añadió agua (40 ml), y se concentró parcialmente la mezcla a vacío y se extrajo con EtOAc (4 x 25 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con salmuera (1 x 50 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron a vacío para proporcionar 6 g de compuesto 2. Se usó el derivado en bruto para la siguiente etapa sin purificación adicional.

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0,68 (3H, s, C-18 Me); 0,8 (3H, t,  $J$  = 4 Hz, C-26); 0,98 (3H, d,  $J$  = 6,5, C-21 Me); 1,17 (3H, s, C-19 Me); 3,4-3,7 (4H, m, C-23 CH<sub>2</sub>, C-6'); 3,8-3,9 (1H, m, C-3); 2,6-2,8 (1H, m, C-6).

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 212,41, 179,42, 54,75, 52,10, 21,79, 18,30, 12,04.

### 30 **3 $\alpha$ -Tetrahidropirani-7-ceto-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-I (3)**

Bajo irradiación con una lámpara de tungsteno de 300 w, se añadió gota a gota yodo (5 g, 20 mmol) en CCl<sub>4</sub> (75 ml) a una disolución de 2 (5,5 g, 11 mmol) y tetraacetato de plomo (4,9 g, 11 mmol) en CCl<sub>4</sub> (200 ml). Se agitó la mezcla de reacción hasta que el color era permanente (18 h). Se enfrió la mezcla y se filtró sobre Celite. Se lavó la fase orgánica con una disolución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 5%, NaOH al 5%, salmuera (15 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice usando una mezcla de petróleo ligero/EtOAc 95/5 como fase móvil para dar 4,6 g de compuesto 3 (rendimiento del 40%).

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0,54 (3H, s, C-18 Me); 0,68 (3H, t,  $J$  = 7,36 MHz, C-25); 0,79 (3H, d,  $J$  = 5,2 MHz, C-21); 1,09 (3H, s, C-19); 2,55 (1H, m, C-26); 2,96 (1H, m, C-23); 3,16 (1H, m, C-23); 3,20 (1H, m, C-6'); 3,76 (1H, m, C-6'); 4,59 (1H, m, C-2').

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 212,50, 96,56, 95,99, 74,90, 74,60, 62,63, 54,63, 52,08, 50,78, 50,58, 49,84, 48,91, 43,38, 42,70, 40,11, 38,90, 36,92, 35,81, 34,34, 34,10, 31,07, 30,06, 29,61, 28,26, 27,85, 25,97, 25,42, 24,54, 23,49, 21,75, 19,76, 19,59, 18,88, 17,84, 12,05, 11,98, 5,26.

### 45 **3 $\alpha$ -Hidroxi-6 $\alpha$ -etil-7-ceto-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-I (4)**

Se agitó el compuesto 3 (2,2 g, 3,8 mmol) en una disolución de HCl al 37% en THF (50 ml) durante la noche a temperatura ambiente. Se lavó la mezcla de reacción con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 ml), H<sub>2</sub>O (20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a vacío para proporcionar 1,4 g de compuesto 4 (rendimiento del 80%). Se usó el derivado en bruto para la siguiente etapa sin purificación adicional:

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0,68 (3H, s, C-18 Me); 0,82 (3H, t,  $J$  = 7,36 MHz, C-21); 0,93 (3H, t,  $J$  = 5,2 Hz, C-21 Me); 1,26 (3H, s, C-19 Me); 3,08 (1H, m, C-23); 3,37 (1H, m, C-23); 3,61 (1H, m, C-3).

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 212,81, 71,09, 54,63, 51,93, 50,60, 49,84, 48,93, 43,64, 42,70, 40,11, 38,92, 36,92, 35,63, 34,19, 31,71, 31,06, 29,78, 28,25, 27,89, 25,96, 25,42, 24,51, 23,48, 21,79, 19,56, 18,77, 18,22, 17,85, 12,02, 11,95, 5,22.

### 60 **3 $\alpha$ -*terc*-Butildimetilsililoxi-6 $\alpha$ -etil-7-ceto-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-I (5)**

A una disolución de 4 (1,4 g, 2,8 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), se le añadieron cloruro de *terc*-butildimetilsililo (496 mg, 3,22 mmol) e imidazol (230 mg, 3,36 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se lavó la mezcla de reacción con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 ml), salmuera (30 ml) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se evaporó la fase orgánica a vacío para proporcionar 1,5 g de compuesto 5 (rendimiento del 87%). Se usó

el derivado en bruto para la siguiente etapa sin purificación adicional.

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,02 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si); 0,65 (3H, s, C-18 Me); 0,85 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi); 1,19 (3H, s, C-19); 3,16 (1H, m, C-23); 3,30 (1H, m, C-23); 3,48 (1H, m, C-3).

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 212,56, 71,93, 54,63, 51,89, 50,62, 49,81, 48,90, 43,34, 42,72, 40,11, 38,89, 36,92, 35,62, 34,37, 31,97, 30,34, 28,26, 25,83, 25,61, 24,57, 23,48, 21,77, 18,81, 17,84, 12,02, 11,92, 5,27, -4,70.

3α-*terc*-Butildimetilsililoxi-6α-etil-7-ceto-24-nor-5β-colan-23-ol (6)

A una disolución de 5 (1,2 g, 1,96 mmol) en acetona (12 ml), se le añadió Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,1 g, 3,9 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante la noche y entonces se enfrió hasta t.a., se filtró sobre Celite, se lavó con acetona y se concentraron las fases orgánicas combinadas para producir 1 g de compuesto 6. Se usó el derivado en bruto para la siguiente etapa sin purificación adicional.

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,02 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si); 0,65 (3H, s, C-18 Me); 0,88 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi); 3,16 (1H, m, C-23); 3,37 (1H, m, C-3); 3,69 (2H, m, C-23).

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 212,64, 71,96, 60,84, 55,27, 50,66, 49,87, 48,94, 43,37, 42,69, 38,94, 35,64, 34,39, 32,70, 32,00, 30,36, 29,68, 28,53, 25,85, 24,64, 23,50, 21,80, 18,84, 12,01, 11,94, -4,68.

3α-*terc*-Butildimetilsililoxi-7α-hidroxi-6α-etil-24-nor-5β-colan-23-ol (7)

A una disolución de 6 (1 g, 1,96 mmol) en una mezcla de THF (50 ml) y H<sub>2</sub>O (12,5 ml), se le añadió NaBH<sub>4</sub> (740 mg, 19,6 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. Se concentró parcialmente la disolución de reacción a vacío y se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1 x 50 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron a vacío. Se purificó el residuo en bruto mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice usando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 99:1 como fase móvil para dar 0,8 g de 7 (rendimiento del 81%).

<sup>1</sup>H-RMN: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,04 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si); 0,66 (3H, s, C-18 Me); 0,88 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi); 3,16 (1H, m, C-23); 3,37 (1H, m, C-3); 3,69 (1H, m, C-7, 2H, m, C-23).

<sup>13</sup>C-RMN (50,3 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 73,30, 70,85, 60,82, 56,31, 50,55, 45,28, 42,77, 41,17, 40,03, 39,62, 38,95, 35,74, 35,52, 34,10, 33,14, 32,93, 31,01, 28,40, 25,98, 23,70, 23,18, 22,22, 20,72, 18,79, 11,62, -4,60.

Sal de trietilamonio de 24-nor-5β-colan-23-sulfato de 3α-*terc*-butildimetilsililoxi-7α-hidroxi-6α-etilo (8)

A una disolución de 7 (0,5 g, 0,99 mmol) en THF (7 ml) enfriada a -3°C, se le añadió Et<sub>3</sub>N (0,3 ml, 2,1 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 10 min. Se añadió ClSO<sub>3</sub>H (0,1 ml, 1,5 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Entonces se añadió agua (10 ml) y se extrajo la mezcla con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 15 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a vacío. Se usó el derivado de sulfato en bruto para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Sal de trietilamonio de 24-nor-5β-colan-23-sulfato de 3α,7α,23-trihidroxi-6α-etilo (9)

A una disolución de 8 (0,5 g, 0,77 mmol) en acetona (8 ml), se le añadió PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub> (10 mg, 0,05 eq.) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró la mezcla de reacción, se concentró a vacío y se purificó mediante Lichroprep RP-8 a presión media usando una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O 8/2 como fase móvil para proporcionar 0,115 g de 9, p.f. 118-121°C.

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 0,70 (3H, s, C-18 Me); 0,91 (3H, m, C-21 Me, 3H, C-25); 0,98 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, C-19 Me); 1,32 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N); 3,20 (6H, q, *J* = 7,31 Hz, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N); 3,31 (1H, m, C-3); 3,65 (1H, sa, C-7); 4,03 (2H, m, CH<sub>2</sub>-23).

<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ: 9,23, 12,05, 12,19, 19,14, 21,97, 23,52, 23,76, 24,57, 34,23, 34,51, 36,56, 36,65, 36,79, 41,06, 41,55, 43,13, 47,73, 50,28, 51,68, 57,80, 67,19, 71,16, 73,23.

Sal de sodio de 24-nor-5β-colan-23-sulfato de 3α,7α,23-trihidroxi-6α-etilo (10)

A una disolución de 8 (0,4 g, 0,72 mmol) en una mezcla de acetona (4 ml) y H<sub>2</sub>O (0,08 ml), se le añadió PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub> (10 mg, 0,05 eq.) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró la mezcla de reacción sobre Celite y se concentró a vacío. Se trató el residuo resultante con una disolución metanólica de NaOH al 10% durante 2 h. Se concentró la mezcla resultante a vacío y se sometió a purificación a presión media de líquido usando una mezcla de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (7:3) como fase móvil para proporcionar 0,09 g de 10 (rendimiento del

25%).

## Ejemplo 2

### 5 Actividades biológicas

Se llevaron a cabo en primer lugar pruebas con el fin de verificar si UPF-987 modula genes regulados por FXR, en comparación con ácido quenodesoxicólico (CDCA). El CDCA es un ácido biliar primario que funciona como ligando endógeno del receptor farnesoide X (FXR; NR1H4). Se sometió a prueba en primer lugar la actividad biológica de UPF-987 sobre la actividad de FXR en un ensayo *in vitro* usando el ensayo libre de células de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), descrito en Pellicciari R., *et al.* J Med Chem. 2002 15; 45: 3569-72.

En resumen, las reacciones contenían anticuerpo anti-GST marcado con europio y alofococianina conjugada con estreptavidina, proteínas de fusión FXR GST-LBD y péptido sensor SRC1 biotinilado. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 1 h en tampón de FRET (Hepes 10 mM, pH 7,9, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,1 mg/ml). Se midió FRET en un contador multimarcador Víctor 1420.

En el ensayo libre de células de FRET, el reclutamiento de Scr-1, un factor de coactivación para FXR, se produce a una concentración de compuesto que es casi 300 veces inferior a la requerida para el ligando de FXR natural CDCA (tabla 1).

**Tabla 1. Actividad de UPF-987 sobre FXR humano en FRET**

Compuesto sometido a prueba	CE <sub>50</sub> de ensayo libre de células (µM)	Eficacia <sup>1</sup>
UPF-987	0,014	111
CDCA	4	100 ± 3
<sup>1</sup> Reclutamiento relativo del péptido SRC1 frente a FXR cuando CDCA = 100%. Todos los datos son las media ± EE, n = 4.		

También se evaluó si UPF-987 modulaba genes regulados por FXR en un ensayo celular usando una línea celular de hepatocitos humanos (HepG2). En un ensayo de transfección celular usando la línea celular HepG2, UPF-987 demostró ser un potente ligando de FXR. La exposición de células HepG2 a UPF-987 transactiva FXR. En otros experimentos usando células hepáticas transfectadas con constructos virales que portan el gen de FXR u otros receptores nucleares clonados en el sentido de 5' con respecto al gen de luciferasa, se encontró que UPF-987 funciona como ligando de FXR selectivo en hepatocitos de ratón, rata y ser humano. Puede encontrarse una descripción detallada de estos métodos en la siguiente referencia: Fiorucci S., *et al.* Gastroenterology 2004.

En resumen, para el ensayo de luciferasa, se cultivaron células HepG2 en E-MEM complementado con penicilina/estreptomina al 1%, L-glutamina al 1% y suero bovino fetal al 10% (alto contenido en glucosa) (CELBIO). Se hicieron crecer las células a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron todas las transfecciones usando un método de coprecipitación con fosfato de calcio en presencia de cloroquina 25 µM como inhibidor para la degradación del ADN. Se realizó la transfección transitoria usando 500 ng de vector indicador phsp27-TKLUC, 200 ng de pCMV-βgal, como control interno para determinar la eficacia de transfección, y 50 ng de cada plásmido de expresión de receptor pSG5-FXR, pSG5-RXR. Se añadió el vector pGEM para normalizar las cantidades de ADN transfectado en cada ensayo (2,5 µg). Se evaluó la eficacia de transfección mediante la expresión de β-gal, obtenida cotransfectando las células con plásmido pCMV-βgal. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se estimularon las células HepG2 con UPF-987 1 µM durante 18 h. Los cultivos control recibieron vehículo (DMSO al 0,1%) solo. Se lisaron las células en 100 µl de tampón de lisis indicador diluido (Promega) y se sometieron a ensayo 0,2 µl de lisado celular para determinar la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega). Se midió la luminiscencia usando un luminómetro automatizado. Se normalizaron las actividades luciferasa para las eficacias de transfección dividiendo las unidades relativas de luz entre la actividad β-galactosidasa.

### Regulación de la expresión de genes diana de FXR mediante UPF-987 en células HepG2

Para establecer si UPF-987 es un modulador de FXR y ejerce actividades diferenciales, se expusieron células HepG2 humanas a UPF-987, CDCA (ligando de FXR natural) y a su derivado de 6-etilo, 6-ECDCA, que es un potente ligando de FXR. Entonces se investigaron los efectos de estos ligandos sobre genes sensibles a FXR mediante PCR con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR).

En resumen, se diseñaron todos los cebadores de PCR usando el software PRIMER3-OUTPUT usando datos de secuencias publicados a partir de la base de datos del NCBI. Se aisló el ARN total (reactivo TRIzol, Invitrogen sr1, Milán, Italia) de muestras tomadas de hígados. Se trató un microgramo de ARN purificado con ADNasa I durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido por incubación a 95°C durante 3 minutos en presencia de EDTA 2,5 mmol/l. Se transcribió de manera inversa el ARN con Superscript III (Invitrogen, Carsbad, CA) en un volumen de reacción de 20 µl usando cebadores al azar. Para la RT-PCR cuantitativa, se disolvieron 100 ng de molde en 25 µl

que contenían 0,3 µmol/l de cada cebador y 12,5 µl de mezcla maestra de PCR 2X SYBR Green (mezcla para qPCR Fynnzimes-DyNAmo SYBRR Green). Se realizaron todas las reacciones por triplicado y las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 2 minutos a 95°C, seguido por 50 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos en un instrumento iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA). Se calculó el valor medio de las réplicas para cada muestra y se expresó como el ciclo umbral (CT; número de ciclo al que cada reacción PCR alcanza un umbral de fluorescencia predeterminado, fijado dentro del intervalo lineal de todas las reacciones). Entonces se calculó la cantidad de expresión génica como la diferencia (ACT) entre el valor de CT de la muestra para el gen diana y el valor de CT medio de esa muestra para el control endógeno (GAPDH). Se calculó la expresión relativa como la diferencia ( $\Delta\Delta CT$ ) entre los valores de ACT de la muestra control de prueba para cada gen diana. Se mostró la expresión de ARNm relativa como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (figura 3). Los cebadores usados en la PCR en tiempo real fueron:

hGAPDH: gaaggtgaaggtcggagt y catgggtggaatcatattgga;

hCYP7A1: caccttgaggacggttctca y cgaatcaaaggcatgtagt;

hSHP: gctgtctggagtccttctgg y ccaatgataggcgaaagaagag;

hBSEP: gggccattgtacgagatcctaa y tgcaccgtctttcactttctg;

hSREBP1c: gcaaggccatcgactacatt y ggtcagtgtgtcctccacct.

En contraposición a la figura 3, un experimento *in vitro* diferente usando PCR con transcripción inversa cuantitativa demostró que aunque no se observó toxicidad celular directa tras la exposición a cualquiera de estos ligandos, la exposición de células HepG2 a CDCA y su derivado 6-ECDCA dio como resultado una inducción de 2-3 veces de SHP, un gen regulado por FXR. Por el contrario, a pesar del hecho de que UPF-987 es un ligando de FXR (véase anteriormente), estimula la expresión de SHP. Todos los ligandos de FXR sometidos a prueba, concretamente CDCA, 6-ECDCA y UPF-987 ejercieron el mismo efecto sobre CYP7a1 (todos los agentes provocaron una reducción del 60-70% de la expresión de ARNm de CYP7 $\alpha$ 1). Además, la exposición a UPF-987 indujo la expresión de ARNm de BSEP y SHP (aproximadamente una inducción de 2-3 veces). Este efecto era significativamente más pronunciado con UPF-987 que con los otros ligandos de FXR. Además, de manera similar a los otros ligandos, la exposición a UPF-987 dio como resultado una potente inhibición de la expresión de ARNm de SREPB-1c y FAS. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que UPF-987 es un modulador de FXR que funciona como potente ligando de FXR e inesperadamente altera genes regulados por FXR, provocando una inducción significativa de transportadores de ácidos biliares (por ejemplo BSEP) y una potente supresión de genes relacionados con lípidos. Además, UPF-987 reprime la expresión de Cyp7 $\alpha$ 1, un gen que está implicado de manera crítica en la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol. La regulación de estos genes diana de FXR sugiere que UPF-987 es un ligando de FXR selectivo de genes que puede inhibir la biosíntesis de ácidos biliares a través de la ruta clásica al mismo tiempo que aumenta la secreción de ácidos biliares a partir de hepatocitos, sin interferir con la expresión de SHP. Este efecto es deseable, puesto que restringe las actividades farmacológicas de estos ligandos de FXR, y podría prevenir la activación metabólica asociada normalmente con la inducción de SHP.

En la tabla 2 a continuación, se muestran los resultados de estudios farmacológicos *in vitro* sobre UPF-987.

**Tabla 2. Estudios farmacológicos *in vitro* sobre UPF-987**

Células	Artículo de prueba	Dosis	Especie	Criterios de valoración	Resumen de los hallazgos
Ensayo libre de células	UPF-987 CDCA	Concentraciones que oscilan entre 1 nM y 100 µM	n/a	Potencia de UPF-987 como ligando de FXR en un ensayo libre de células usando ensayo de FRET	Los resultados de estos experimentos muestran que UPF-987 es un potente ligando de FXR (CE <sub>50</sub> ~ 14 nM)
Línea celular de hepatoma (HepG2)	UPF-987 CDCA 6- ECDCA	Concentraciones que oscilan entre 1 y 100 µM	Ser humano	Potencia sobre la regulación de FXR y genes regulados por FXR (SHP, CYP7 $\alpha$ 1, CYP8 $\beta$ 1, SREPB1c, FAS y BSEP)	UPF-987 provoca transactivación de FXR. UPF-987 es un potente inductor de BSEP y SHP. UPF-987 es un potente inhibidor de la expresión de ARNm de Cyp7A1 y SREBP1c

Pruebas <i>in vivo</i> Ratón intacto	UPF-987  CDCA 6ECDCA	5 mg/kg intraperitoneal  4 días	Ratones	Regulación de genes relacionados con FXR (SHP, CYP7 $\alpha$ 1, CYP8 $\beta$ 1, SREPB1c, FAS y BSEP) <i>in vivo</i>	La administración de UPF-987 induce expresión en el hígado de BSEP y SHP e inhibe la expresión de ARNm de Cyp7A1, SREBP1c y FAS en el hígado
Pruebas <i>in vivo</i> Colestasis inducida por ANIT	UPF-987	Administración oral de 7 días 5 mg/kg	Ratas	Evaluación bioquímica de la colestasis	La administración de UPF-987 reduce la colestasis inducida por ANIT medida mediante enzimas del hígado en suero (AST, bilirrubina, A1c. fosfatasa y colesterol) y modula la expresión en el hígado de la expresión de ARNm de NTCP, BSEP y CYP7A1

**Ejemplo 3**

Regulación de genes diana de FXR mediante UPF-987 *in vivo*

5

Antecedentes

El compuesto 9 también se denomina UPF-987. El FXR desempeña un papel clave en la regulación transcripcional de genes implicados en el metabolismo de ácidos biliares y la homeostasis de lípidos/colesterol y glucosa. La regulación de estas interacciones es altamente compleja y contiene múltiples bucles de retroalimentación para autorregular los circuitos transcripcionales. La gama solapante de ligandos agonistas y antagonistas, así como de genes diana compartidos por FXR con otros receptores nucleares metabólicos incluyendo PPAR y LXR, puede servir como mecanismo de seguridad redundante para provocar una respuesta protectora de modo que incluso cuando una ruta se ve comprometida, una ruta de rescate asume el control. Cruciales para la complejidad de supuestas funciones convergentes y divergentes de los receptores nucleares metabólicos son sus coactivadores y correpresores transcripcionales, que se reclutarán de diversas maneras a partir de moduladores de FXR.

10

15

Se usarán moduladores de FXR para el tratamiento de los trastornos de hígado inflamatorios, colestáticos, fibróticos y trastornos metabólicos incluyendo estados hipertrigliceridémicos e hipercolesterolémicos y, por extensión, aterosclerosis y sus complicaciones.

20

En conclusión, el FXR está apareciendo como una diana terapéutica particularmente intrigante, no sólo por la aplicación prometedora asociada con su modulación sino también por su peculiar mecanismo de reconocimiento del ligando y activación génica.

25

Materiales y métodos

Animales

Se obtuvieron ratones Balb/c hembra de seis a ocho semanas de edad de Charles River (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA). Se alimentaron los animales con una dieta en gránulos de pienso convencional, tenían libre acceso al agua y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Todos los procedimientos en este estudio se aprobaron por los Comités de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia (Italia) según las directrices gubernamentales para el cuidado de animales. Se trataron los animales durante 5 días mediante inyección intraperitoneal de 6-ECDCa 5 mg/kg/día, mientras que se trataron los animales control con vehículo solo (metilcelulosa). Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se extrajo el hígado para realizar el análisis mediante PCR en tiempo real de genes diana de FXR.

30

35

PCR en tiempo real cuantitativa

40

Se realizó la PCR en tiempo real cuantitativa como anteriormente (véase 1.1 Materiales y métodos). Los cebadores usados fueron:

mGAPDH: ctgagtatgctgtggagtctac y gttgtgtgtgcaggatgcattg

mBSEP: aaatcggatggttactgc y tgacagcgagaatcaccaag

mSHP: tctctctccgccctatca y aagggtctgctggacagta

mCYP7A1: aagccatgatgcaaacctc y gccggaataactgtgcaaa

mSREBP1c: gatcaaagaggagccagtgc y tagatggtggctgctgagtg

10 Resultados

La administración *in vivo* del UPF-987 a ratones intactos durante 4 días a la dosis de 5 mg/kg dio como resultado una potente inducción de BSEP y SHP en el hígado. A pesar de unos datos de expresión de genes diana alentadores aunque no consecuentes con los ensayos *in vitro* preliminares comentados anteriormente, los datos *in vivo* observados sugieren una potente regulación por disminución (reducción del 60-70%) de Cyp7a1. UPF-987 también provocó una inhibición del 90% de SREBP-1c y redujo la expresión de ARNm de FAS en el hígado (figura 5).

20 **Ejemplo 4**

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de UPF-987 en el modelo de ratón con TNBS de colitis

Materiales y métodos

25 Modelos de colitis

La aplicación intracolónica del hapteno TNBS provoca colitis aguda y crónica en roedores. La inflamación de la mucosa en la colitis por TNBS tiene un infiltrado neutrofílico relevante, pero también comprende un flujo de entrada de macrófagos y monocitos CCR1+ y CCR5+ así como una activación de linfocitos T (Th1) dependiente de IL-12 e IFN relevante. Las características histopatológicas se asemejan a enfermedad de Crohn humana, inflamación transmural, granulomas, úlceras de fisuración y "lesiones a distancia" (regiones de ulceración separadas por regiones de mucosa normal). La colitis por TNBS sirve como modelo preclínico útil para someter a prueba tratamientos establecidos e innovadores para la enfermedad de Crohn.

35 Animales

Se monitorizaron los animales diariamente para detectar la aparición de diarrea, pérdida de peso corporal y supervivencia. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones supervivientes, se recogieron muestras de sangre mediante punción cardiaca y se cortó un segmento de colon de 7 cm, se pesó y se evaluó el daño macroscópico.

40

Inducción de colitis y diseño del estudio

Se indujo colitis en ratones BALB/c (8 semanas de edad) mediante administración intrarrectal de TNBS (0,5 mg/ratón). Comenzando tres horas más tarde y continuando a intervalos de 24 h durante cinco días, se les administró a los ratones por vía intraperitoneal UPF-987 (0,3-1-3 mg/kg) o vehículo (metilcelulosa al 1%). Cada grupo consistía en 5 ó 7 ratones. Se sacrificaron los ratones 18 h tras la administración final del fármaco de prueba o vehículo. Se puntuó la gravedad de la colitis evaluando el aspecto macroscópico. Este último es un índice de la infiltración de granulocitos en el tejido. La puntuación macroscópica de la colitis se ha descrito en detalle por Fiorucci *et al* e implicaba puntuación ciega en una escala de 0 (normal) a 4 (daño grave). Se registraron el peso corporal y la consistencia de las heces al inicio y al final del estudio. Se recogieron muestras de tejido del colon distal de cada ratón y se procesaron, tal como se describió anteriormente.

50

Graduación macroscópica de la colitis

55

Se examinaron los colones bajo un microscopio de disección (x 5) y se graduaron para determinar lesiones macroscópicas en una escala de desde 0 hasta 10 basándose en criterios que reflejan la inflamación, tales como hiperemia, engrosamiento del intestino y el grado de ulceración.

PCR en tiempo real cuantitativa

60

Se evaluó la expresión de genes de colon de ratón mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) como se describió anteriormente. Se aisló el ARN total de muestras tomadas del colon distal. Se diseñaron los siguientes cebadores usando el software PRIMER3-OUTPUT, usando datos de secuencias publicados de la base de datos del NCBI:

65

mGAPDH: ctgagatgtcgtggagtctac y gttggtggtgcaggatgcattg

mTNF $\alpha$ : acggcatggatctcaaagac y gtgggtgagcacgtagt

mIL1 $\beta$ : tcacagcagcacatcaacaa y tgtcctcatctcgaaggtc

5 mIL6: ccggagaggagacttcacag y tccacgattcccagagaac

mINF $\gamma$ : gctttgcagctctctcat y gtcaccatcctttgcccagt

10 miNOS: acgagacggataggcagaga y cacatgcaaggaaggaact

mTGF $\beta$ 1: ttgctcagctccacagaga y tgggttagagggcaaggac

mFXR: tgtgagggtgcaaaggtt y acatccccatctctgcac

15 **Ejemplo 5**

Evaluación de la eficacia de UPF-987 en modelo colestásico de rata (ANIT)

20 Antecedentes

20 La colestasis da como resultado la acumulación intrahepática de ácidos biliares citotóxicos que provocan lesión en el hígado que conduce en última instancia a fibrosis biliar y cirrosis. El daño colestásico en el hígado se contrarresta mediante una variedad de mecanismos hepatoprotectores intrínsecos. Tales mecanismos de defensa incluyen represión de la captación de ácidos biliares hepáticos y de la síntesis de ácidos biliares *de novo*. Además, se induce detoxificación de ácidos biliares de fase I y II haciendo que los ácidos biliares sean más hidrófilos. Además de la exportación "ortógrada" por medio de sistemas de exportación canaliculares, estos compuestos también se excretan por medio de sistemas de exportación "alternativos" basolaterales a la circulación sistémica seguido por eliminación renal. La filtración glomerular pasiva de ácidos biliares hidrófilos, la secreción tubular renal activa y la represión de la reabsorción de ácidos biliares tubular facilitan la eliminación de ácidos biliares renales durante la colestasis. Los mecanismos moleculares subyacentes están mediados principalmente a un nivel transcripcional por medio de una red compleja que implica receptores nucleares y otros factores de transcripción. Hasta la fecha, se han identificado el receptor farnesoide X FXR, el receptor de pregnano X PXR y el receptor de vitamina D VDR como receptores nucleares para ácidos biliares. Sin embargo, la respuesta adaptativa intrínseca a ácidos biliares no puede prevenir completamente la lesión en el hígado en la colestasis. Por tanto, se necesitan estrategias terapéuticas adicionales tales como activación dirigida de receptores nucleares para potenciar la defensa hepática frente a ácidos biliares tóxicos.

40 Materiales y métodos

40 Animales

Se aprobaron estudios en ratas Wistar por el Comité de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia. Se obtuvieron ratas Wistar macho (200-250 g) de Charles River Breeding Laboratories (Portage, MI) y se mantuvieron con pienso de rata de laboratorio convencional en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

45 Modelos colestásicos: Método: isotiocianato de alfa-naftilo (ANIT)

Se trató el primer grupo de ratas (N = 6), diariamente, mediante ANIT 100 mg/kg por medio de sonda nasogástrica (inductor colestásico), se trataron los grupos segundo y tercero (N = 6) mediante ANIT 100 mg/kg por medio de sonda nasogástrica más UPF-987 5 y 3 mg/kg por vía intraperitoneal diariamente. Se les administró a ratas control (N = 4) vehículo (disolución fisiológica I.P.). Al final del estudio, se sacrificaron las ratas bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg por vía i.p.) y se les extrajo sangre de manera terminal mediante punción cardíaca; se extrajo el hígado y se pesó para su examen y se tomaron muestras de sangre.

55 PCR en tiempo real cuantitativa

Se evaluó la expresión de genes de rata mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) tal como se describió anteriormente en el presente documento. Se diseñaron los siguientes cebadores de PCR usando el software PRIMER3-OUTPUT usando datos de secuencias publicados de la base de datos del NCBI:

60 rGAPDH: atgactctaccacggcaag y atgactctaccacggcaag

rSHP: cctggagcagccctcgtctcag y aacctgtatgcaaccgagga

65 rBSEP: aaggcaagaactcgagataccag y tttcacttcaatgtccaccaac

rCYP7A1: ctgcagcgagctttatccac y cctgggtgctaagggactc  
 rCYPBB1: cccctatctctcagtagacacatgg y gaccataaggaggacaaaggtct  
 5 rNTCP: gcatgatgccactcctcttatac y tacatagtggtggcctttggact  
 rMdr1: cgttgctacatccagggtt y gccattgctgaaagaacat  
 rMdr2: gttctcgctgggtctcttgg y cgtctgtggcgagtcttga  
 10 rMMP2: gatggatacccgtttgatgg y tgaacaggaaggggaacttg

Resultados

15 Se sometió a prueba UPF-987 *in vivo* para determinar su capacidad para proteger frente a colestasis inducida en rata mediante isotiocianato de  $\alpha$ -naftilo (ANIT). La administración de ANIT conduce a una colestasis grave, estudios previos de Fiorucci *et al.* (no publicados) han mostrado que 6-ECDCa no es eficaz en la reducción de la lesión en el hígado en este modelo. La administración de UPF-987 atenúa la lesión en el hígado en ratas tratadas con ANIT, tal como se mide evaluando los niveles en plasma de AST,  $\gamma$ GT y fosfatasa alcalina, tres marcadores de colestasis y  
 20 colesterol en plasma. Además UPF-987 modula la expresión de NTCP, CYP7A1 y BSEP.

**Ejemplo 6**

Evaluación de la eficacia de INT-1103 en modelo colestásico de rata (ANIT)

25 Antecedentes

INT-1103 es un derivado de sulfuro de ácido 6-etil-quenodesoxicólico (6E-CDCA o INT-747), que se da a conocer en la patente estadounidense n.º 7.138.390 y se incorpora como referencia en el presente documento.

30 Material y métodos

Modelos colestásicos: Ratas Wistar con isotiocianato de alfa-naftilo (ANIT)

35 Se aprobaron los estudios por el Comité de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia. Se obtuvieron ratas Wistar macho (200-250 g) de Charles River Breeding Laboratories (Portage, MI) y se mantuvieron con pienso de rata de laboratorio convencional en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se trató el primer grupo (N = 8), diariamente, mediante ANIT 100 mg/kg por medio de sonda nasogástrica (inductor colestásico), se trataron los grupos segundo y  
 40 tercero (N = 8) mediante ANIT 100 mg/kg por medio de sonda nasogástrica más INT-1103 5 mg/kg por vía intraperitoneal diariamente. Se les administró a las ratas control (N = 8) vehículo (disolución fisiológica I.P.). Al final del estudio, se sacrificaron las ratas bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg por vía i.p.) y se les extrajo sangre de manera terminal por medio de punción cardiaca; se pesó el hígado y se extrajo para su examen y se tomaron muestras de sangre.

45 PCR en tiempo real cuantitativa

Se evaluó la expresión de genes diana de FXR de rata mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) tal como se describió anteriormente en el presente documento. Se diseñaron los siguientes cebadores de PCR usando el software PRIMER3-OUTPUT usando datos de secuencias publicados de la base de  
 50 datos del NCBI:

rGAPDH: atgactctacccacggcaag y atgactctacccacggcaag  
 rSHP: cctggagcagccctcgtctcag y aacctgtatgcaaaccgagga  
 55 rBSEP: aaggcaagaactcgagataccag y ttctacttcaatgtccaccaac  
 rCYP7A1: ctgcagcgagctttatccac y cctgggtgctaagggactc  
 rCYP8B1: cccctatctctcagtagacacatgg y gaccataaggaggacaaaggtct  
 60 rNTCP: gcatgatgccactcctcttatac y tacatagtggtggcctttggact  
 rMdr1: cgttgctacatccagggtt y gccattgctgaaagaacat  
 65 rMdr2: gttctcgctgggtctcttgg y cgtctgtggcgagtcttga

rMMP2: gatggatacccggttgatgg y tgaacaggaaggggaacttg

### **Ejemplo 7**

5 Evaluación de la eficacia de INT-1103 en modelo colestásico de rata (BTL)

#### Material y métodos

10 Se indujo el modelo colestásico hepático (BTL) mediante ligación del conducto biliar (BDL) de ratas Wistar macho ancianas de 225-250 g. Ratas operadas de manera simulada (N = 8) recibieron el mismo procedimiento laparoscópico, excepto porque se manipuló el conducto biliar, pero no se ligó ni se seccionó. En total, se operaron 24 animales. Tres días tras la cirugía, se aleatorizaron las ratas supervivientes para recibir placebo, por vía intraperitoneal, (disolución fisiológica) (N = 6) o INT-1103 5 mg/kg (N = 8). Entonces se trataron los animales durante 15 7 días. Al final del estudio, se sacrificaron las ratas bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg por vía i.p.) y se les extrajo sangre de manera terminal por medio de punción cardiaca; se pesó el hígado y extrajo para su examen y se tomaron muestras de sangre.

### **Ejemplo 8**

20 Evaluación de la eficacia de INT-1103 e INT-747 en el flujo de bilis en rata sin tratamiento previo

#### Material y métodos

25 Se usaron ratas Wistar macho adultas que pesaban de 200 a 250 g a lo largo de todo el estudio.

Antes de los experimentos, se mantuvieron los animales con pienso convencional y agua a voluntad y se alojaron en una sala de temperatura (21-23°C) y humedad (el 45-50%) controladas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se aprobaron todos los estudios por el Comité de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia. Para la medición del flujo de bilis, se anestesiaron los animales con una única dosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal) y se mantuvieron en esta condición a lo largo de todo el experimento. Tras la cateterización de la vena yugular usando un tubo de polietileno PE-50 (Intramedic; Clay Adams, Parsippany, NJ), se realizó una incisión abdominal media y se canuló también el conducto biliar común (PE-10, Intramedic; Clay Adams). Se mantuvo la temperatura corporal a de 37,0 a 38,5°C con una lámpara de calentamiento para prevenir alteraciones hipotérmicas del flujo de bilis. Se recogieron las muestras de bilis mediante la fístula biliar externa cada 30 15 min durante 195 min y entonces se pesaron con el fin de determinar el flujo de bilis. Se determinó el flujo de bilis mediante gravimetría, suponiendo una densidad de la bilis de 1,0 g/ml. La recogida de bilis comenzó entre las 9:00 y las 11:00 AM para minimizar la influencia de las variaciones circadianas. Se realizó la administración de los fármacos mediante cánula yugular a las dosis de 3 µmol/kg/min, el grupo control recibió vehículo solo (BSA al 2% en disolución fisiológica).

40

### **Ejemplo 9**

Evaluación de la eficacia de INT-1103 e INT-747 en el flujo de bilis en rata colestásica por estrógenos

45 Material y métodos

Se usaron ratas Wistar macho adultas que pesaban de 300 a 350 g a lo largo de todo el estudio.

50 Antes de los experimentos, se mantuvieron los animales con pienso convencional y agua a voluntad y se alojaron en una sala de temperatura (21-23°C) y humedad (el 45-50%) controladas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se aprobaron todos los estudios por el Comité de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia. Se dividieron los animales aleatoriamente en 4 grupos experimentales:

55 1. Sin tratamiento previo, (N = 5).

2. 17-etinilestradiol 5 mg/kg durante 5 días intraperitoneal, (N = 8).

3. 17-etinilestradiol 5 mg/kg + INT-747 5 mg/kg intraperitoneal, durante 5 días (N = 7);

60 4. 17-etinilestradiol 5 mg/kg + INT-1103 5 mg/kg intraperitoneal, durante 5 días (N = 7).

Para la recogida de bilis, se realizaron procedimientos quirúrgicos en el sexto día (1 día tras la administración de la última dosis de E217). Para la medición del flujo de bilis, se anestesiaron los animales con una única dosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal) y se mantuvieron en esta condición a lo largo de todo el experimento. Se realizó una incisión abdominal media y se canuló también el conducto biliar común (PE-10, Intramedic; Clay Adams). Se mantuvo la temperatura corporal a de 37,0 a 38,5°C con una lámpara de

65

calentamiento para prevenir alteraciones hipotérmicas del flujo de bilis. La recogida de bilis comenzó entre las 9:00 y las 11:00 AM para minimizar la influencia de las variaciones circadianas. Se recogió bilis a intervalos de 15 min durante 120 min y se determinó gravimétricamente el flujo de bilis. Al final de los experimentos se pesaron el cuerpo y el hígado de las ratas.

5

### **Ejemplo 10**

Estudio *in vitro* de la regulación génica de la insulina mediante INT-747 frente a INT-1103

#### 10 Material y métodos

Para el ensayo de RT-PCR, se cultivaron células Beta-TC6 pancreáticas en D-MEM complementado con penicilina/estreptomicina al 1%, L-glutamina al 1% y suero bovino fetal al 10% (alto contenido en glucosa) (CELBIO). Se hicieron crecer las células a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub> y se trataron con INT-1103 e INT-747, a la concentración final de 1 µM, durante 18 horas. Al final de los experimentos se recogieron las células para la extracción del ARN.

15

#### PCR en tiempo real

Se realizó la cuantificación de la expresión de genes de ratón mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR). Se diseñaron todos los cebadores de PCR usando el software PRIMER3-OUTPUT usando datos de secuencias publicados de la base de datos del NCBI. Se aisló el ARN total (reactivo TRizol, Invitrogen srl, Milán, Italia) de muestras tomadas de hígados. Se trató un microgramo de ARN purificado con ADNasa I durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido por incubación a 95°C durante 3 minutos en presencia de EDTA 2,5 mmol/l. Se transcribió de manera inversa el ARN con Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen de reacción de 20 µl usando cebadores al azar. Para RT-PCR cuantitativa, se disolvieron 100 ng de molde en 25 µl que contenían 0,3 µmol/l de cada cebador y 12,5 µl de mezcla maestra de PCR 2X SYBR Green (mezcla para qPCR Fynnzimes-DyNAmo SYBRR Green). Se realizaron todas las reacciones por triplicado y las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 2 minutos a 95°C, seguido por 50 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos en un instrumento iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA). Se calculó el valor medio de las réplicas para cada muestra y se expresó como el ciclo umbral (CT; número de ciclo al que cada reacción PCR alcanza un umbral de fluorescencia predeterminado, fijado dentro del intervalo lineal de todas las reacciones). Entonces se calculó la cantidad de expresión génica como la diferencia (ACT) entre el valor de CT de la muestra para el gen diana y el valor de CT medio de esa muestra para el control endógeno (GAPDH). Se calculó la expresión relativa como la diferencia ( $\Delta\Delta CT$ ) entre los valores de ACT de la muestra control de prueba para cada gen diana. Se mostró la expresión de ARNm relativa como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Los cebadores usados en la PCR en tiempo real fueron:

35

mGAPDH: gaaggtgaaggtcggagt y catgggtggaatcatattgaa;

40

mSHP: gctgtctggagtccttctgg y ccaatgataggcgaaagaagag;

mSREBP1c: gcaaggccatcgactacatt y ggtcagtgtgtcctccacct.

45

mINS: tgttggtgcacttctaccc y ttgttccactgtgggtcct

mSHP: aaggctgtggtgacagtta y tctcttctcctccctatca

mGLUT2: ccctgggtactcttccacaa y gccaaagtaggatgtgccaat

50

### **Ejemplo 11**

Propiedades fisicoquímicas de INT-747 e INT-1103

#### Antecedentes

55

Se admitieron los dos análogos de ácidos biliares, INT-747 e INT-1103, en una caracterización completa de las propiedades fisicoquímicas siguiendo protocolos desarrollados previamente y optimizados en el laboratorio y aplicados previamente para un examen completo de una gran serie de análogos de ácidos biliares (análogos de UDCA) desarrollados en el laboratorio de R. Pellicciari. Se seleccionaron las propiedades fisicoquímicas para definir de manera precisa el comportamiento en disoluciones acuosas y en líquidos biológicos y para establecer su posible toxicidad para membranas biológicas, su farmacocinética y farmacodinámica y biodistribución en los diferentes líquidos y órganos biológicos. También se realizaron y comentaron datos comparativos con análogos naturales.

60

#### Solubilidad en agua

65

Se estudiaron BA INT-747, CDCA y UDCA carboxilados en la cadena lateral sólo. Se suspendieron BA sólidos 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 (d.i. de 150 mm x 2 mm, 4 µm) y fases móviles de agua que contenían ácido acético 15 mM pH 5 y acetonitrilo. La velocidad de flujo era de 150 µl/min. Se realizó la adquisición de 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 µmol/litro.

Tabla 3: Solubilidad en agua de los ácidos biliares estudiados

Ácido biliar	Solubilidad en agua (µM)*
INT-747	9,0
INT-103	-
CDCA	32
UDCA	7,5
* la solubilidad en agua se refiere a BA como especie protonada y por tanto no se evaluó para INT-1103	

Se midió la solubilidad en agua para la especie protonada insoluble de ácidos biliares carboxilados a un pH 1. Se ioniza el compuesto de sulfato, UPF-1103 incluso a pH bajo y en condiciones fisiológicas es siempre soluble en todos los líquidos biológicos. La solubilidad en agua de INT-747 es 9 µM, inferior a CDCA, y comparable con la de UDCA. Puesto que la CMC de INT-747 es relativamente baja (véase el siguiente párrafo), la baja solubilidad en agua de INT-747 no compromete el comportamiento del compuesto en una fase micelar; en el caso de UDCA, la baja solubilidad en agua asociada con una alta CMC compromete el pH al que el ácido protonado pasa a disolución para formar micelas. El CMpH es, de hecho, para UDCA 8,4, que es demasiado alto si no está presente una alcalinización posprandial en el contenido del duodeno.

#### 20 Concentración micelar crítica (CMC)

Se determinó este valor mediante mediciones de la tensión superficial usando un método de presión de burbuja máxima. El tensiómetro fue un Sensadyne 6000 (Chem-Dina Research Corp., Milwaukee, WI) equipado con dos sondas de vidrio de diámetros de 0,5 y 4,0 mm conectados a una fuente de nitrógeno. La frecuencia de burbujas fue de 1 burbuja/segundo en agua destilada a 26°C (P = 2,7 atm) y se realizó la calibración con agua doblemente destilada y metanol. Se midió la tensión superficial de disoluciones de sales de sodio de BA tanto en agua como en NaCl 0,15 M a diversos intervalos de concentraciones, 0,2-75 mM y 0,3-100 mM respectivamente. 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.

Tabla 4: Concentración micelar crítica de los ácidos biliares estudiados

Ácido biliar	CMC (mM)		ST <sub>CMC</sub>	ST <sub>50</sub>
	H <sub>2</sub> O	NaCl 0,15 M	Dina/cm	Dina/cm
INT-747	4,5	2,9	48,8	43,2
INT-1103	3,9	1,3	47,9	43,3
CDCA	7,5	3,0	55,6	48,5
UDCA	26	6,0	63,0	50,4
TUDCA	8,0*	2,2*	-	-
TCDCA	7,0*	3,0*	-	-
ST <sub>CMC</sub> : Tensión superficial a CMC en agua, ST <sub>50</sub> : Tensión superficial de disolución acuosa 50 mM; *: valores de la bibliografía				

Las CMC, tal como se evaluó mediante mediciones de la tensión superficial en condiciones de no equilibrio, es decir, en condiciones en las que las impurezas no afectan a los resultados, de INT-747 e INT-1103 son relativamente bajas, similares al análogo natural de CDCA. INT-1103 presenta la menor CMC tanto en agua como en presencia de Na<sup>+</sup> 150 mM. El bajo valor de CMC de INT-747 está relacionado con la distribución topográfica de los grupos etilo e hidroxilo: el grupo etilo en la posición 6 está orientado en la cara β, la parte de atrás del esteroide, contribuyendo al aumento en el grado lipófilo y el área de la superficie este resto y por tanto la tendencia a formar micelas. INT-1103 presenta la menor CMC como resultado del grupo etilo en posición 6 y el sulfato 23 en la cadena lateral. Las peculiares propiedades del grupo sulfato dieron a INT-1103 propiedades similares a un tensioactivo aniónico (como dodecilsulfato de sodio) como resultado de una cabeza cargada negativa y una cola lipófila con un resto lipófilo de superficie. Los valores de la actividad de tensión superficial tanto a CMC como en fase micelar (50 mM) están de acuerdo con los presentes datos de CMC, ambos compuestos son tensioactivos y pueden disminuir la tensión superficial en un grado grande con respecto a UDCA y TUDCA. Estos datos apoyan adicionalmente el concepto de que estos compuestos son detergentes como el análogo de CDCA e incluso más. INT-747 a una concentración relativamente alta de >60 mM y en presencia de Na<sup>+</sup> 0,15 M forma una fase de gel y esto explica los

datos de ST relativamente inexactos encontrados en esas condiciones (figura 1). Estos resultados no son sorprendentes puesto que otros BA naturales detergentes como ácido desoxicólico se comportan de manera similar formando este gel (habitualmente viscoelástico) particularmente para el efecto de contraiones como Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>. Esta fase evoluciona hasta una fase micelar con una cinética relativamente baja. Además este fenómeno se produce a una concentración no fisiológica muy alta.

Coeficiente de reparto en octanol/agua.

Se evaluó el coeficiente de reparto en 1-octanol/agua (log P) usando un procedimiento de matraz de agitación convencional. Se llevaron a cabo los experimentos en disolución de sales biliares 0,1 mM tamponada a pH 8 con tampón fosfato 0,1 M para garantizar una ionización completa del BA; los valores de log P se refieren al BA en forma ionizada, no a la especie protonada, 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 de agua con HPLC-ESI-EM/EM usando una columna C18 (d.i. de 150 mm x 2 mm, 4 µm) y fases móviles: A: agua que contenía ácido acético 15 mM pH 5, B: acetonitrilo. La velocidad de flujo era de 150 µl/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.

Tabla 5: Coeficiente de reparto en 1-octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas

Ácido biliar	LogP <sub>A<sup>-</sup></sub>
INT-747	2,5
INT-1103	2,0
CDCA	2,2
UDCA	2,2
TCDCA	0,9
TUDCA	1,0*
*: valor de la bibliografía	

Se calculó el coeficiente de reparto en 1-octanol/agua para la especie ionizada para facilitar la comparación entre los ácidos biliares de carboxilo y sulfato puesto que estos últimos no están protonados incluso a pH muy bajo. INT-747 presenta una lipofilicidad ligeramente superior con respecto a otros ácidos biliares de dihidroxilo tales como UDCA y CDCA. El aumento de la lipofilicidad es el resultado de la introducción de un grupo etilo en la posición 6. Por tanto la tendencia a distribuirse en un dominio lipídico es superior. El UPF-1103 muestra un logP de 2,0, valor ligeramente inferior a INT-747 y análogos de CDCA y UDCA naturales y esto explica la contribución del grupo sulfato y la longitud de cadena lateral. Además, la lipofilicidad de INT-1103 es todavía similar a un BA no conjugado y superior a un conjugado con taurina como TCDCA que presenta un logP de 0,9. Contrariamente a un conjugado con taurina que permanece preferentemente en un dominio acuoso, INT-1103 tiene una tendencia a acumularse en un dominio lipídico como INT-747.

Unión a albúmina

Se evaluó la unión a albúmina mediante diálisis en equilibrio a una razón de BA-albúmina fijada. Se disolvió BA a una concentración de 100 µM en albúmina sérica bovina al 5%-solución salina y se dejó reposar durante 24 h a 25°C. Se dializaron dos ml 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 durante 72 h a 25°C. Se determinaron las concentraciones de BA de la disolución dializada y de la disolución de partida con HPLC-ESI-EM/EM en las mismas condiciones del análisis previo.

Tabla 6: Unión a albúmina de los ácidos biliares estudiados \*: valores de la bibliografía

Ácido biliar	% de unión
INT-747	96
INT-1103	85
CDCA	93
UDCA	94
TUDCA	67
CA	40*

Tanto INT-747 como UPF-1103 presentan una fuerte interacción con albúmina bastante similar a un ácido biliar de dihidroxilo natural como CDCA y UDCA lo que sugiere una cinética similar en la captación hepática. Ácidos biliares de trihidroxilo como ácido cólico o ácidos biliares conjugados con taurina muestran una menor interacción con albúmina y esto explica la menor concentración en suero a una captación intestinal similar como resultado de un

aclaramiento de primer paso superior. La fracción no unida (como para muchos fármacos) modula la captación en el hígado: a medida que la fracción aumenta mayor es la captación. INT-747 e INT-1103 presentan una baja fracción no unida y por tanto su concentración en suero es superior como resultado de un aclaramiento de primer paso relativamente bajo, y su comportamiento es similar a análogos naturales.

5 pH micelar crítico

Este valor puede determinarse experimentalmente evaluando el pH al que un BA dado comienza a precipitar a partir de una disolución micelar. Puede calcularse a partir de la solubilidad en agua de CMC de la especie protonada y del pKa usando la fórmula:

10  $CMpH = pKa + \log CMC/WS$ . En la tabla I se notifica el CMpH de los compuestos estudiados en comparación con los análogos naturales.

15 Tabla 7: pH micelar crítico de los ácidos biliares estudiados

Ácido biliar	CMpH
UPF-747	7,7
UPF-1103	-
CDCA	7,6
UDCA	8,4
TCDCA	-

El valor de CMpH de INT-747 es similar al de CDCA e inferior a UDCA. Según este valor, INT-747 no presenta problemas de solubilidad intestinal y requiere un pH de 7,6 que es fisiológico para pasar a disolución. Por ejemplo UDCA con un CMpH de 8,4 requiere una alcalinización superior del contenido del duodeno y sólo se solubiliza en fase posprandial en una fase micelar. UP 1103 que tiene un grupo sulfato no presenta estos problemas puesto que es siempre soluble en el pH fisiológico desde 2 hasta 9 puesto que el pKa es muy bajo y el compuesto no se protona para formar una molécula insoluble. Su comportamiento es similar a ácidos biliares conjugados con taurina.

## 25 **Ejemplo 12**

Metabolismo hepático y secreción de INT-747 e INT-1103 en rata tras infusión i.v. de una hora a una dosis de 3  $\mu\text{mol/kg/min}$

30 Antecedentes

Se administraron los BA mediante infusión a una rata con fístula biliar y se recogió bilis a intervalos de 15 min durante 7 horas. Se midió el flujo de bilis y se analizó la bilis usando HPLC-ES-EM-EM para la identificación de la tasa de secreción biliar y para evaluar los metabolitos hepáticos principales.

35 Método de HPLC-ES-EM/EM

Se determinaron los ácidos biliares y sus metabolitos mediante un método de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (HPLC-EM/EM) usando una fuente de electrospray (ESI) en modo de ionización negativa. Se llevaron muestras de bilis de rata hasta temperatura ambiente y se diluyeron 1:100 v/v - 1:1000 v/v con tampón acetato de amonio 15 mM (pH = 5). Entonces, se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  en la columna cromatográfica. Se realizó cromatografía de líquidos usando un módulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado con un inyector automático. Se analizaron los ácidos biliares usando una columna Synergi Hidro-RP C18 (d.i. de 150 x 2,0 mm, tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$ ), protegida por una precolumna SecurityGuard ODS d.i. de 4 x 2,0 mm, ambas suministradas por Fenomenex. Se separaron los ácidos biliares en gradiente de elución 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 12 min, luego hasta el 70% en 8 min, y finalmente se llevó hasta el 100% en 10 min y se mantuvo constante durante 1 min. La velocidad de flujo era de 150  $\mu\text{l/min}$  y se mantuvo la columna a 45°C. Se analizó el efluente de la columna mediante ESI-EM/EM usando un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple Quattro-LC (Micromass) que funcionaba en el modo de adquisición de monitorización de reacción múltiple (MRM). Se usó el software MassLynx versión 4.0 para la adquisición y el procesamiento de datos.

Resultados

55 INT-747 se secreta a la bilis principalmente como un conjugado con taurina y su recuperación es casi completa: a la dosis administrada, se secreta más del 99% de la molécula infundida a la bilis tal como se muestra en la figura 3. En el último punto de recogida de bilis todavía se secreta a la bilis una cantidad relativamente alta del compuesto conjugado con taurina. Se logra la tasa de secreción máxima tras 120 minutos justo al final de la infusión. Se mantiene una concentración en estado estacionario durante 30 minutos adicionales. El proceso de conjugación con

taurina comienza muy temprano y parece eficaz a la dosis administrada. Una cantidad traza del compuesto también se conjuga con glicina, se secreta menos del 0,2% y una cantidad similar como tal a la bilis. El comportamiento de INT-747 es similar al de los análogos de dihidroxilo naturales tales como CDCA o UDCA que se secretan a la bilis sólo como conjugados con taurina y glicina. De manera diferente, BA de trihidroxilo tal como CA, también puede secretarse parcialmente en forma no conjugada. El grado de un BA que puede secretarse sin modificar se refiere a su lipofilicidad y depende de la dosis y la especie.

El comportamiento en cuanto a captación hepática y secreción de esta molécula es bastante similar al análogo natural como CDCA y la tasa de secreción hepática está relacionada con la de la conjugación con taurina mediada por una activación con CoA y la disponibilidad en el hígado de taurina. La conjugación preferente con taurina es peculiar para rata y otras especies (perro, ratones,...) y en el hombre este compuesto está amidado principalmente con glicina. Según estos datos parece que INT-747 se capta y se secreta eficazmente por el hígado. El metabolismo hepático de INT-747 produce principalmente la forma de conjugado con taurina. Se secreta una cantidad traza de conjugado con glicina en bilis y también se secreta una cantidad muy baja como tal (figuras 37 y 38). Están presentes en la bilis epímeros minoritarios de tanto formas no conjugadas como conjugadas con taurina (figuras 39 y 40).

INT-1103 se secreta en la bilis parcialmente sin modificar tal como se notifica en la figura 41. La cantidad de INT-1103 secretada en la bilis es de aproximadamente el 30-40% de la dosis administrada y su tasa de secreción es relativamente baja y al final del periodo de recogida se secreta todavía a la bilis una cantidad relativamente alta de la molécula. El metabolito hepático principal de INT-1103 en rata a la dosis administrada es el 3-glucurónido tal como se notifica en la figura 42. La cantidad de este compuesto no tiene que cuantificarse puesto que el patrón de referencia puro no está disponible. Se secretan otros metabolitos a la bilis tal como se notifica en la figura 43 y en más detalles en la figura 43 y la figura 44. Los principales metabolitos identificados son el conjugado con 3-sulfato, un análogo de hidroxilo (un hidroxilo más), derivados de ceto y epímeros de INT-1103. La cantidad exacta de este compuesto no se cuantificó puesto que los patrones aún no están disponibles.

Estos datos sugieren que INT-1103 puede secretarse en la bilis como tal y su comportamiento es diferente de análogos de dihidroxilo naturales tales como CDCA y INT-747 que requieren una conjugación con taurina y glicina para secretarse a la bilis. Este es un requisito principal para moléculas con esta lipofilicidad. Por el contrario, pueden secretarse BA de trihidroxilo tales como CA o UCA en la bilis también parcialmente como tales. El grupo sulfato presente en INT-1103 facilita el proceso de secreción incluso si la molécula es todavía bastante lipófila y el comportamiento es entre un ácido biliar no conjugado y conjugado con taurina. Además el hígado metaboliza fuertemente este compuesto formando compuestos más hidrófilos tales como 3-glucurónidos, 3-sulfatos y análogos hidroxilados. El extenso metabolismo del compuesto retenido está relacionado con la especie animal y con la dosis administrada y según estos datos puede especularse que este compuesto presenta un metabolismo más similar a "esteroides de ácidos" ligeramente diferentes de un ácido biliar común, pero quizá compartiendo las mismas propiedades. No se conoce el metabolismo en seres humanos pero su comportamiento es más similar a un esteroide puede experimentar 3-glucuronidación incluso en seres humanos. Se administró el compuesto por vía i.v. y se requieren datos de adición para evaluar el grado de su absorción intestinal, es decir, pasiva o activa como un conjugado con taurina.

### **Ejemplo 13**

Estabilidad metabólica *in vitro* en cultivo de heces humanas

Estabilidad frente a bacterias intestinales; 7 $\alpha$ -deshidroxilación

Se transfirieron heces humanas recientes homogeneizadas (500 mg) a viales estériles a los que se les añadieron 5 ml de medio de carne picada-glucosa (Scott Lab., Fiskville, RI). Entonces se añadieron BA a una concentración final de 0,05 mM. Se incubaron los viales a 37°C; entonces, a las 0, 4, 8, 16, 20, 24 y 72 h tras la adición de los BA, se detuvo la reacción con 150 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 m de grosor (Merck, Darmstadt, Alemania), como primera prueba de examen. El sistema de disolventes usado para la separación de BA conjugados estaba compuesto por ácido propiónico/acetato de isoamilo/agua/N-propanol (3:4:1:2, v/v/v/v; disolvente I) y el de los BA no conjugados 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 en etanol de ácido fosfomolibdico al 5%. Tanto INT-747 como INT-1103 son muy estables cuando se incuban en cultivos de heces humanas e incluso tras 24 horas puede recuperarse más del 85% de los compuestos sin modificar tal como se notifica en la figura 45. Por el contrario, el análogo natural de referencia CDCA presenta un tiempo de semivida de casi una hora y tras 8 horas de incubación se metaboliza casi completamente (7-deshidroxilado) para formar ácido litocólico.

Resultados

Estos datos, mostrados en la figura 46, sugieren que la presencia del grupo etilo en la posición 6 protege al grupo hidroxilo en 7 frente a la oxidación o eliminación por impedimento estérico. Además ambos análogos son muy estables y particularmente INT-1103. El enlace éster de la cadena lateral es bastante estable en el cultivo de heces humanas. No se han encontrado metabolitos minoritarios mediante HPLC-ES-EM/EM.

5

#### **Ejemplo 14**

Estabilidad metabólica *in vitro* en líquido duodenal/pancreático simulado (especificación de la USP)

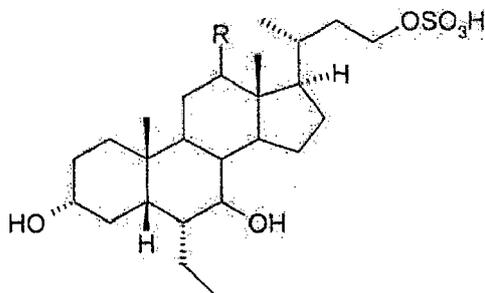
#### 10 Material y métodos

Se ha realizado este estudio sólo para INT-1103 puesto que contiene un enlace éster en la cadena lateral y el objetivo era verificar la estabilidad en presencia de enzimas esterazas como las presentes en el jugo duodenal y pancreático. Se preparó líquido pancreático simulado disolviendo pancreatina 10 g/l (Sigma P8096: pancreatina de páncreas porcino, actividad 1x especificaciones de la USP) en tampón fosfato 0,05 M, pH =  $7,2 \pm 0,1$ . Entonces, se añadieron alícuotas de 4 ml del líquido pancreático simulado de INT-1103 50  $\mu$ M y se incubaron durante diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min) a 37°C. Tras la incubación, se añadió una alícuota de 2 ml de cada disolución con 2 ml de NaOH 0,1 M y se sometió a extracción de ácidos biliares mediante SPE y análisis mediante cromatografía en capa fina y espectrometría de masas tal como se describió anteriormente.

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



5

en la que R es hidrógeno o alfa-hidroxilo;

el grupo hidroxilo en posición 7 está en la posición alfa o beta;

10

o un conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que:

15

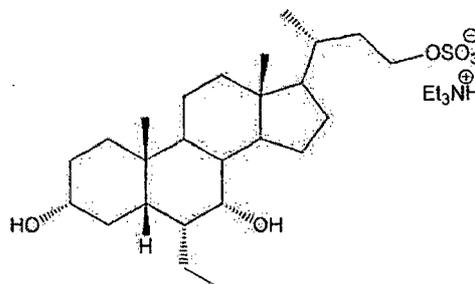
(i) el grupo hidroxilo en 7 está en la posición alfa y R es hidrógeno;

(ii) el grupo hidroxilo en 7 está en la posición beta y R es hidrógeno; o

(iii) el grupo hidroxilo en 7 está en la posición alfa y R es alfa-hidroxilo.

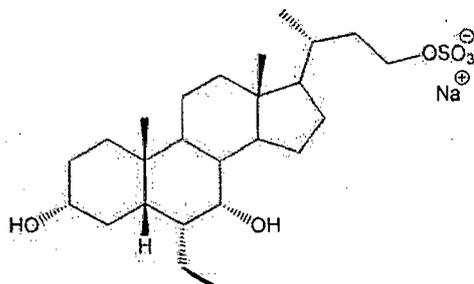
20

3. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es:



25

4. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es:



30

5. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o un conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

6. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en medicina.

35

7. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, o conjugado con aminoácido, solvato o sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado mediado por FXR.

- 5 8. Uso de un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o estado mediado por FXR.
- 10 9. Compuesto según la reivindicación 7, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad o estado mediado por FXR se selecciona del grupo que consiste en enfermedad hepática crónica, enfermedad hepática colestásica, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular y enfermedad metabólica.
- 15 10. Compuesto según la reivindicación 9, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad hepática colestásica o enfermedad hepática crónica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (CBP), xantomatosis cerebrotendinosa (XCT), colangitis esclerosante primaria (CEP), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (CANP), colestasis asociada a septicemia o sobrecrecimiento bacteriano, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad de injerto contra huésped asociada a trasplante de hígado, regeneración de hígado para trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumor maligno intra o extrahepático, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis y deficiencia en alfa 1-antitripsina.
- 20 11. Compuesto según la reivindicación 9, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable (SII), sobrecrecimiento bacteriano, malabsorción, colitis posradiación y colitis microscópica.
- 25 30 12. Compuesto según la reivindicación 9, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad renal se selecciona del grupo que consiste en nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.
- 35 40 13. Compuesto según la reivindicación 9, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperlipidemia.
- 45 14. Compuesto según la reivindicación 9, o conjugado con aminoácido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en resistencia a la insulina, diabetes tipo I y tipo II, y obesidad.

Figura 1

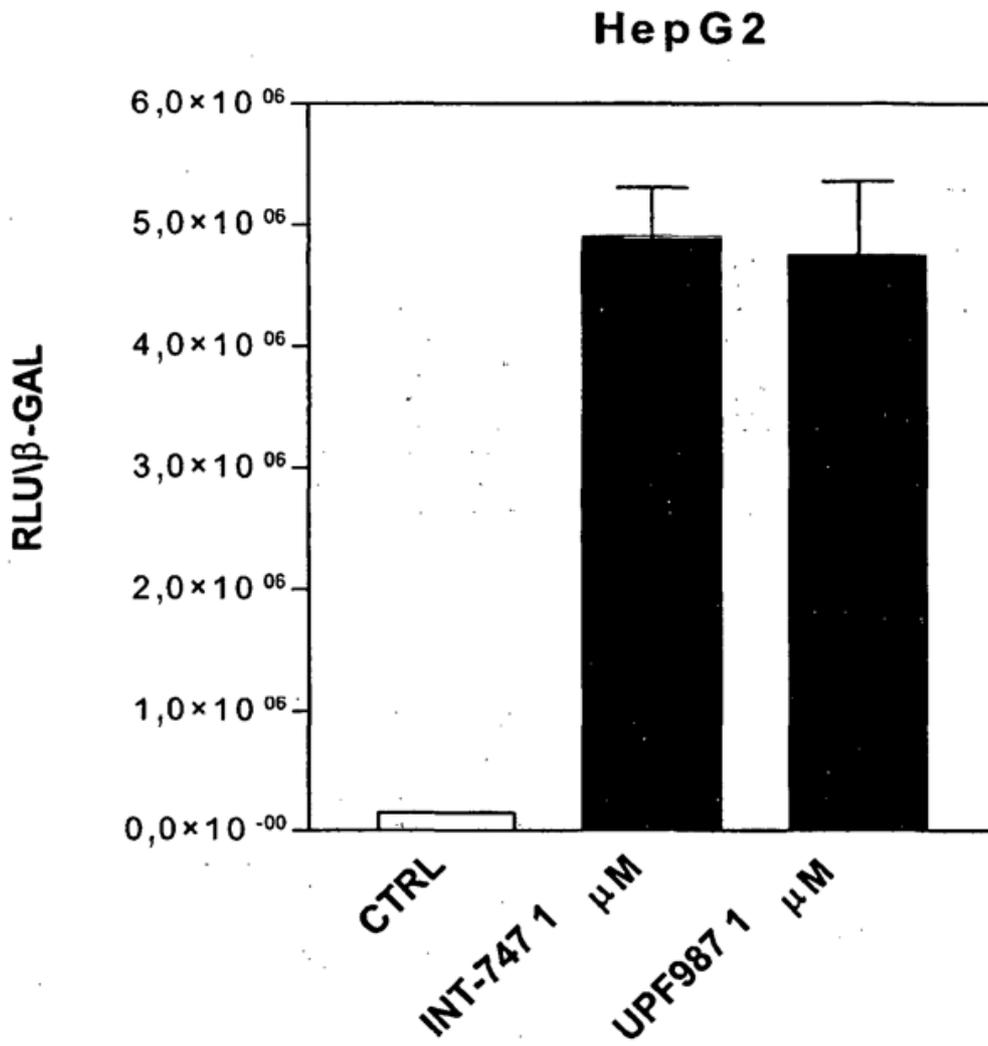


Figura 2

**HepG2**

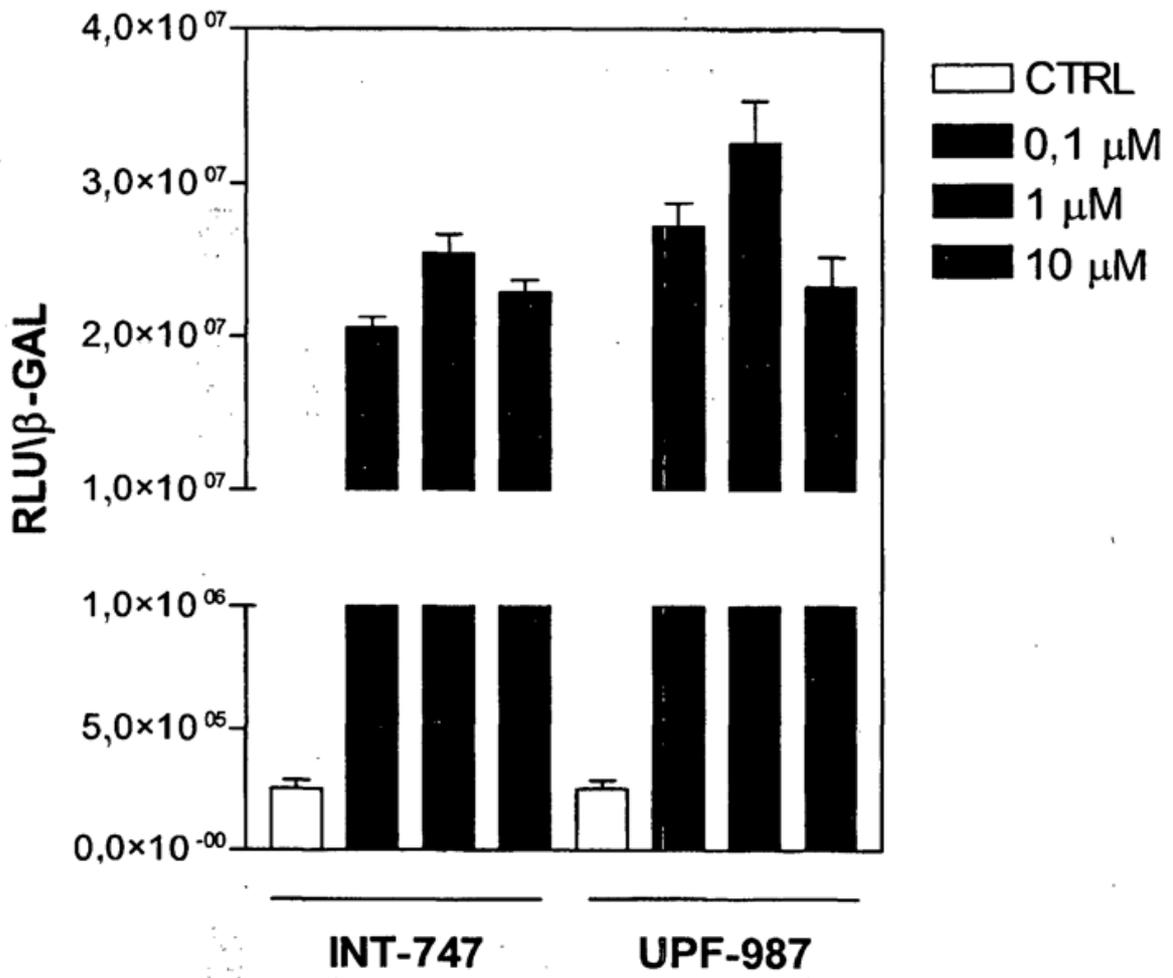


Figura 3

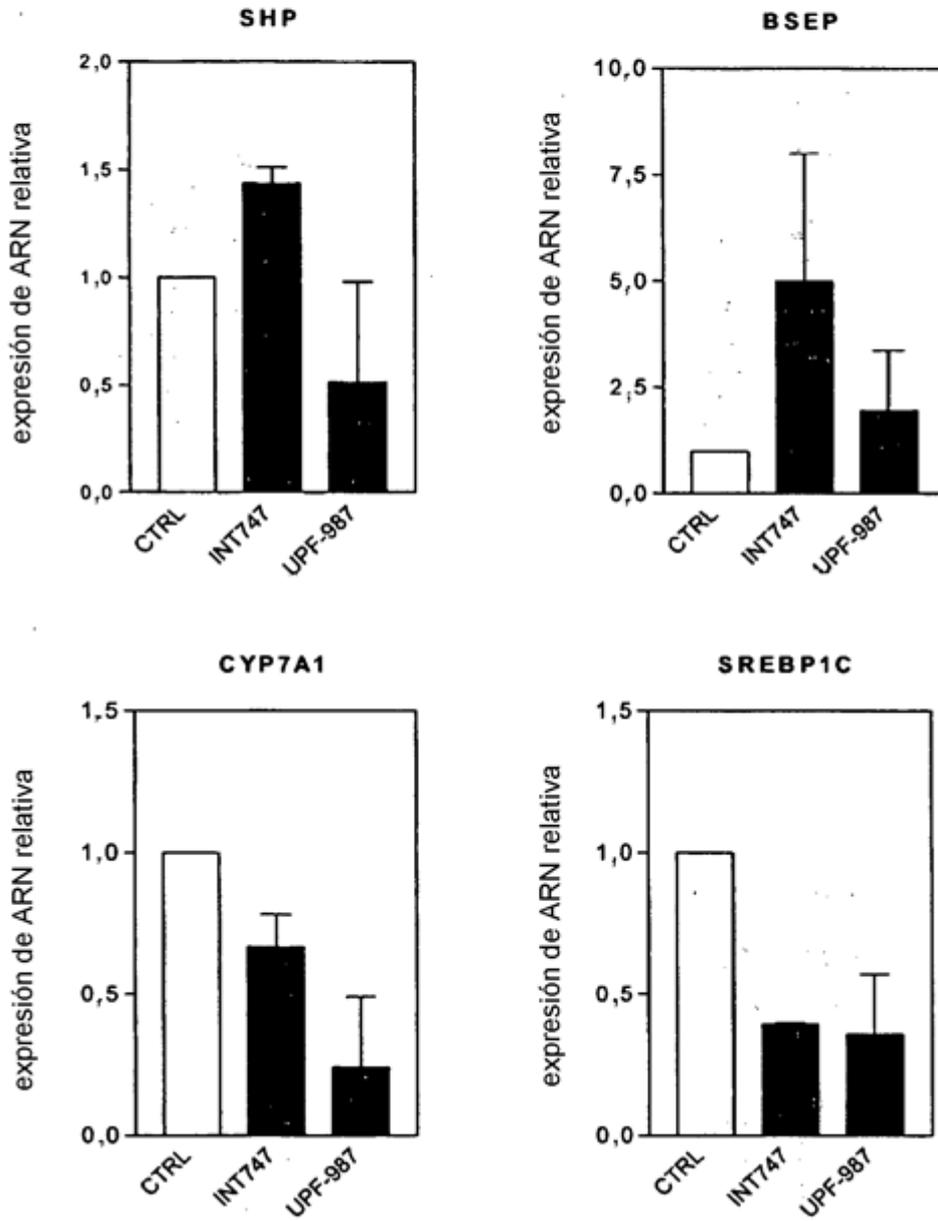


Figura 4

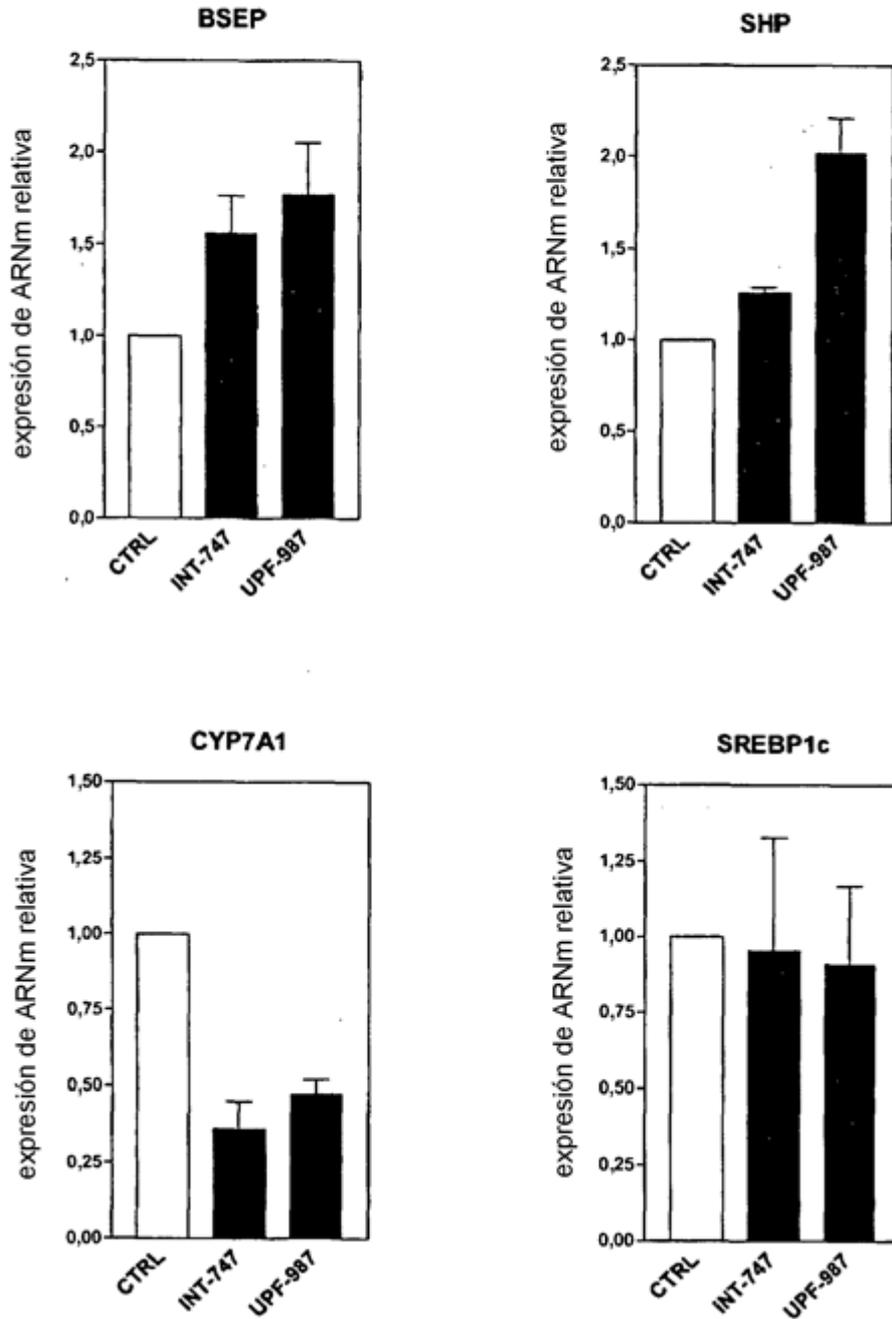


Figura 5

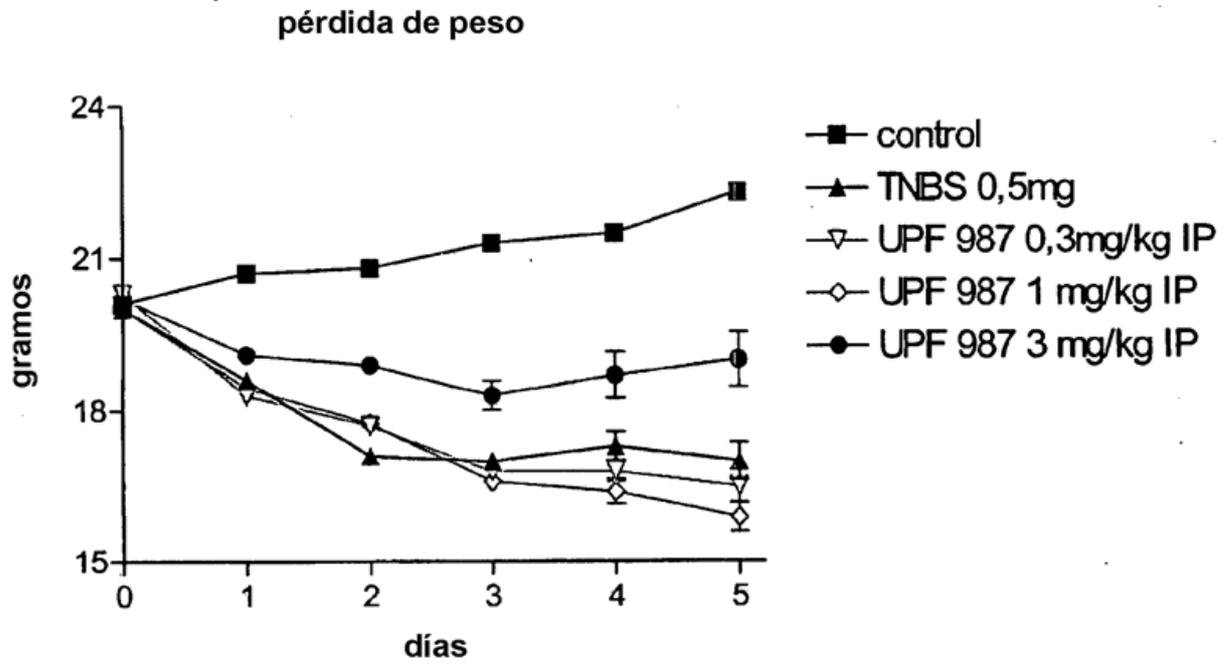


Figura 6

Consistencia de las heces

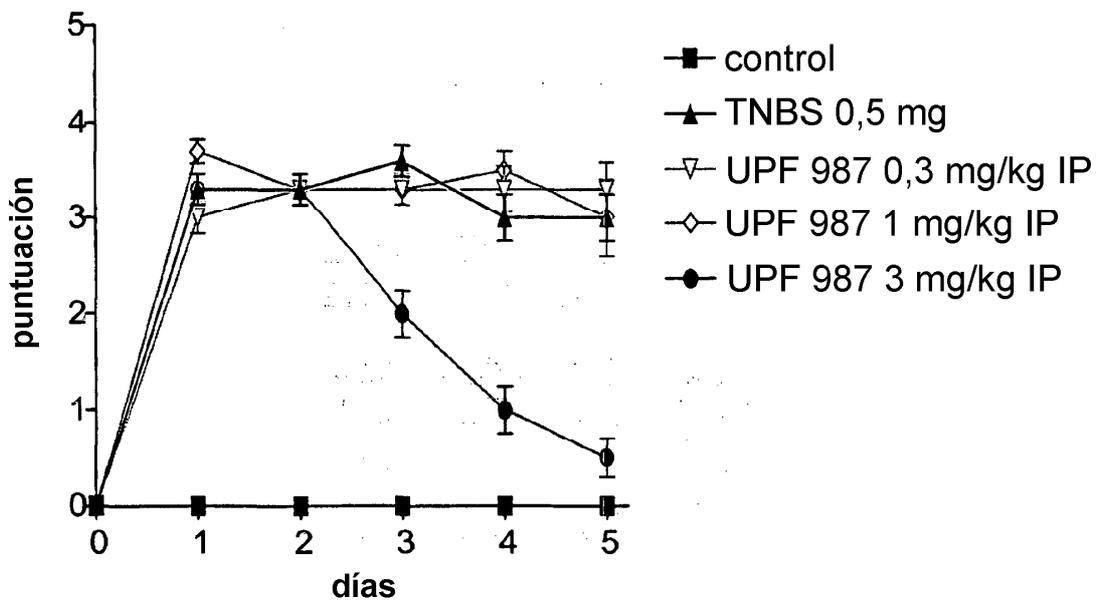


Figura 7

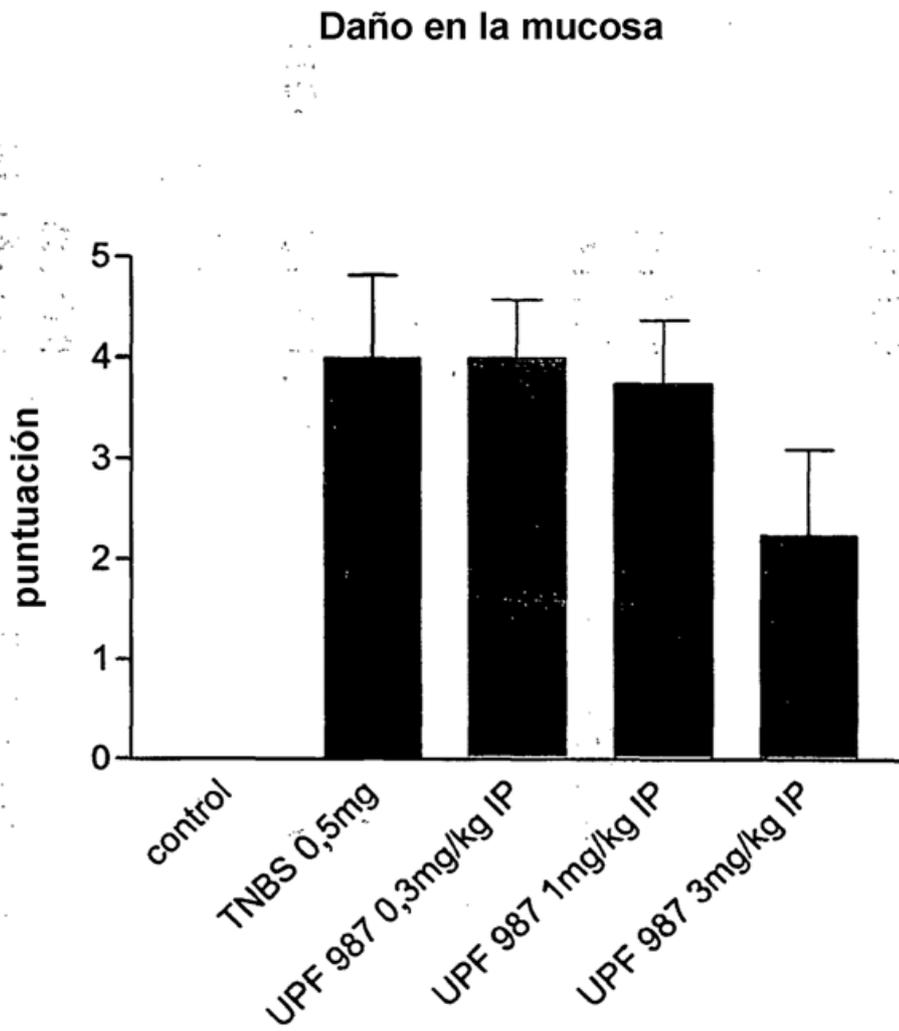


Figura 8

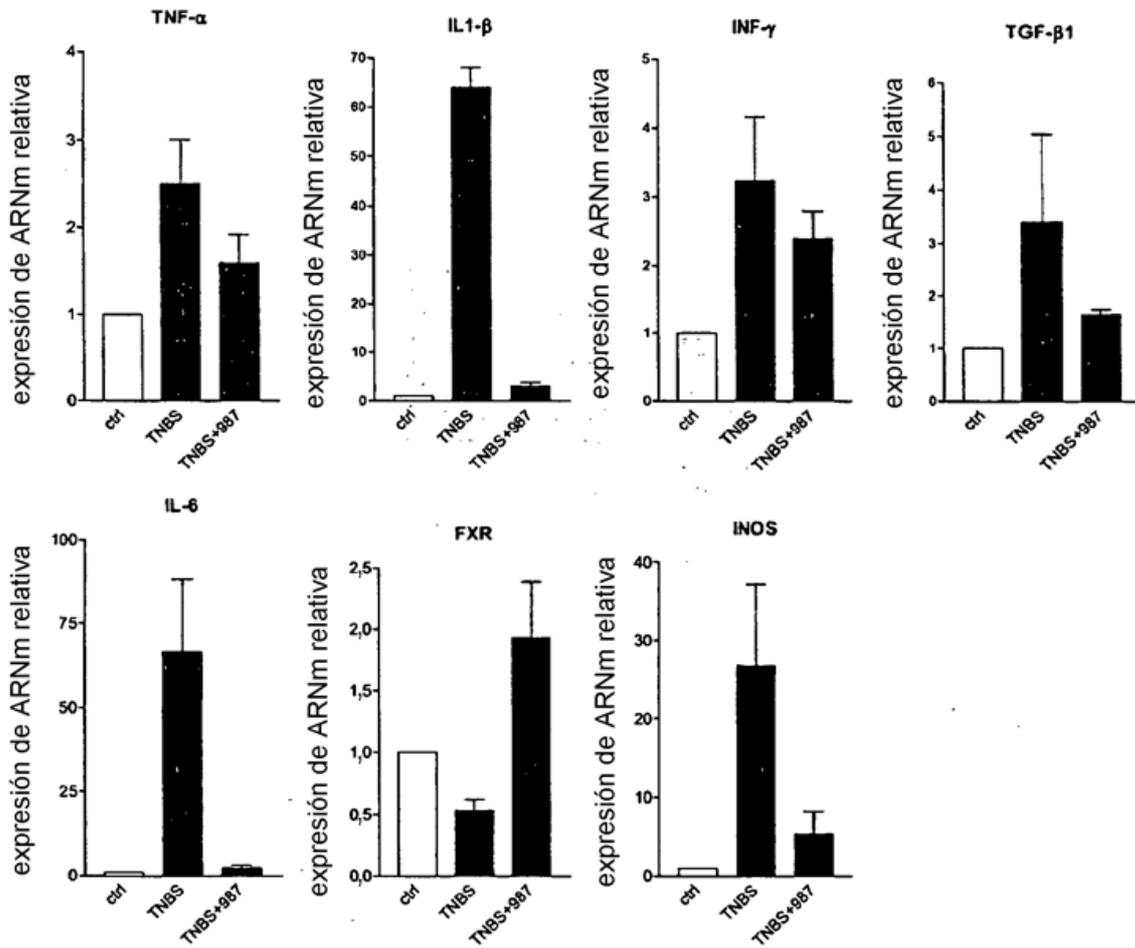


Figura 9

**Bilirrubina**

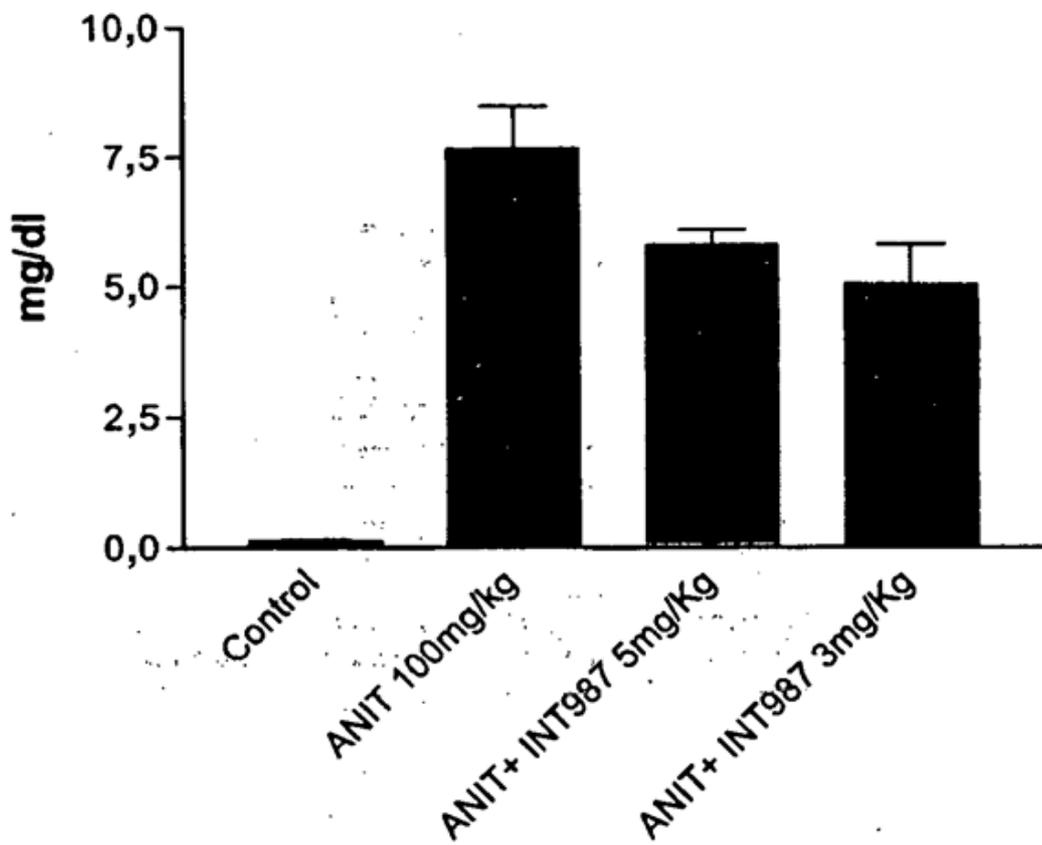


Figura 10

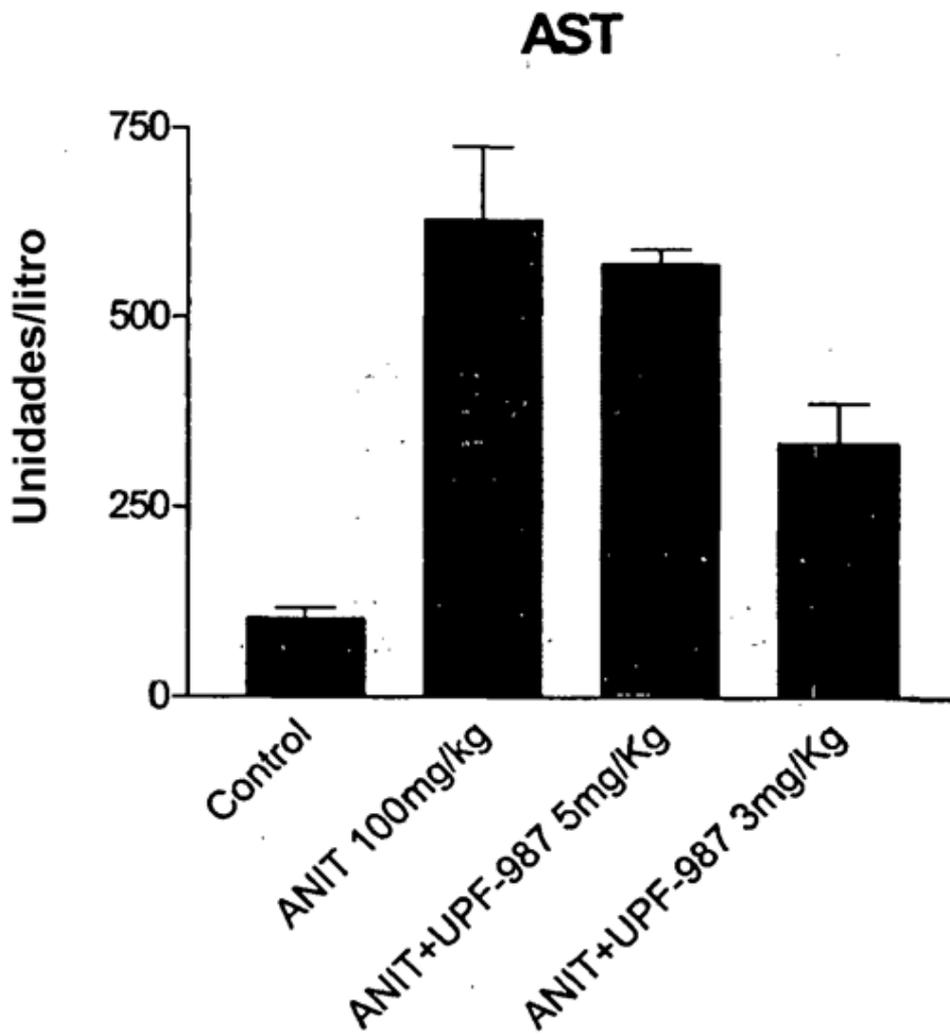


Figura 11

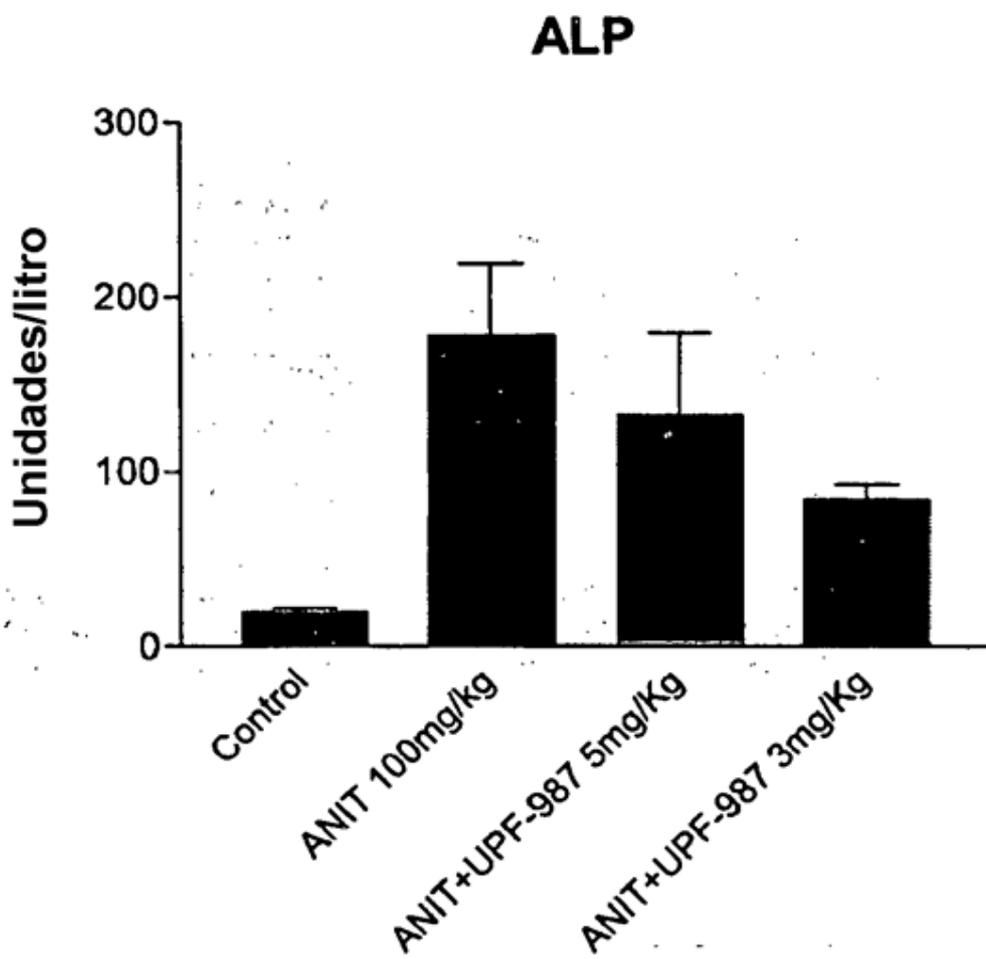


Figura 12

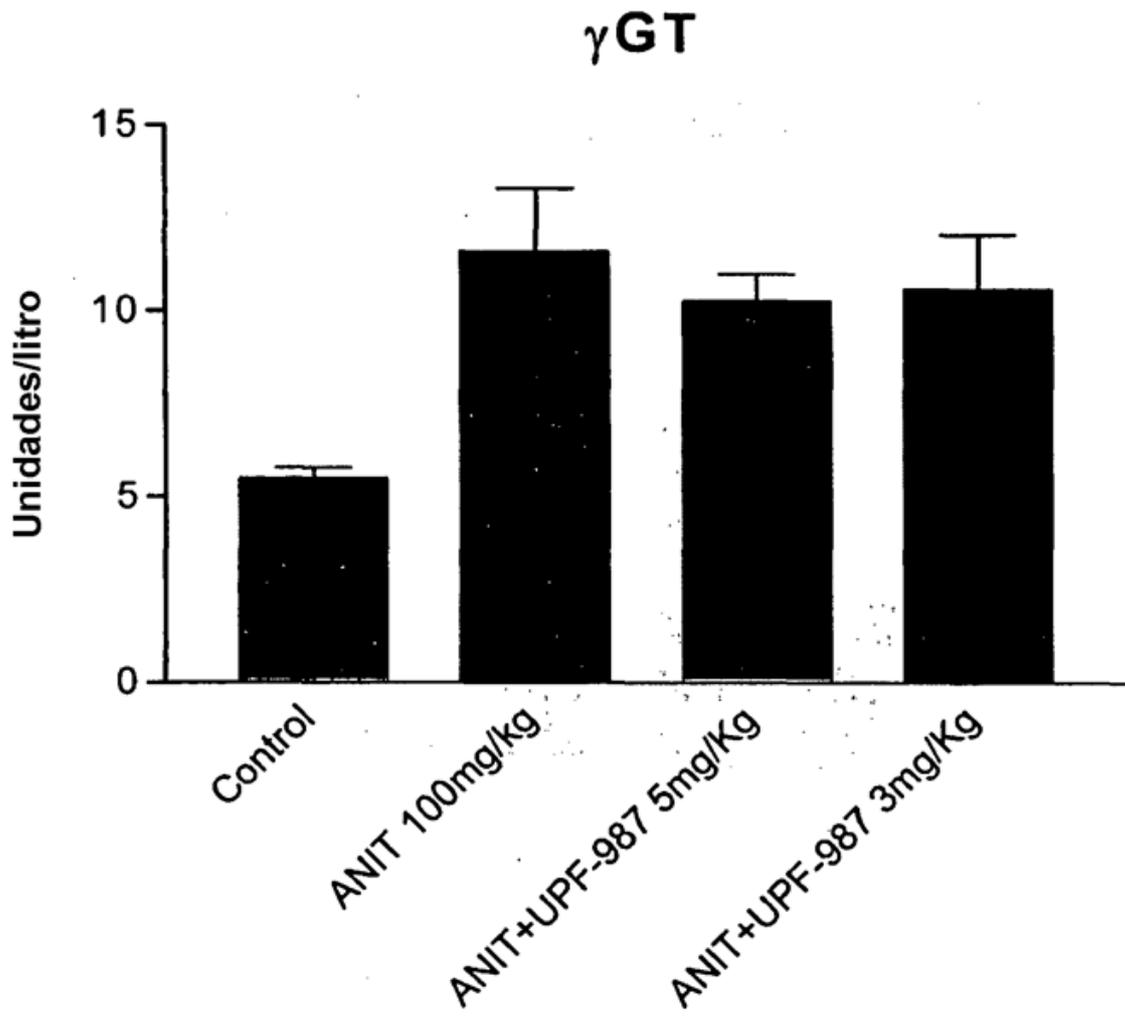


Figura 13

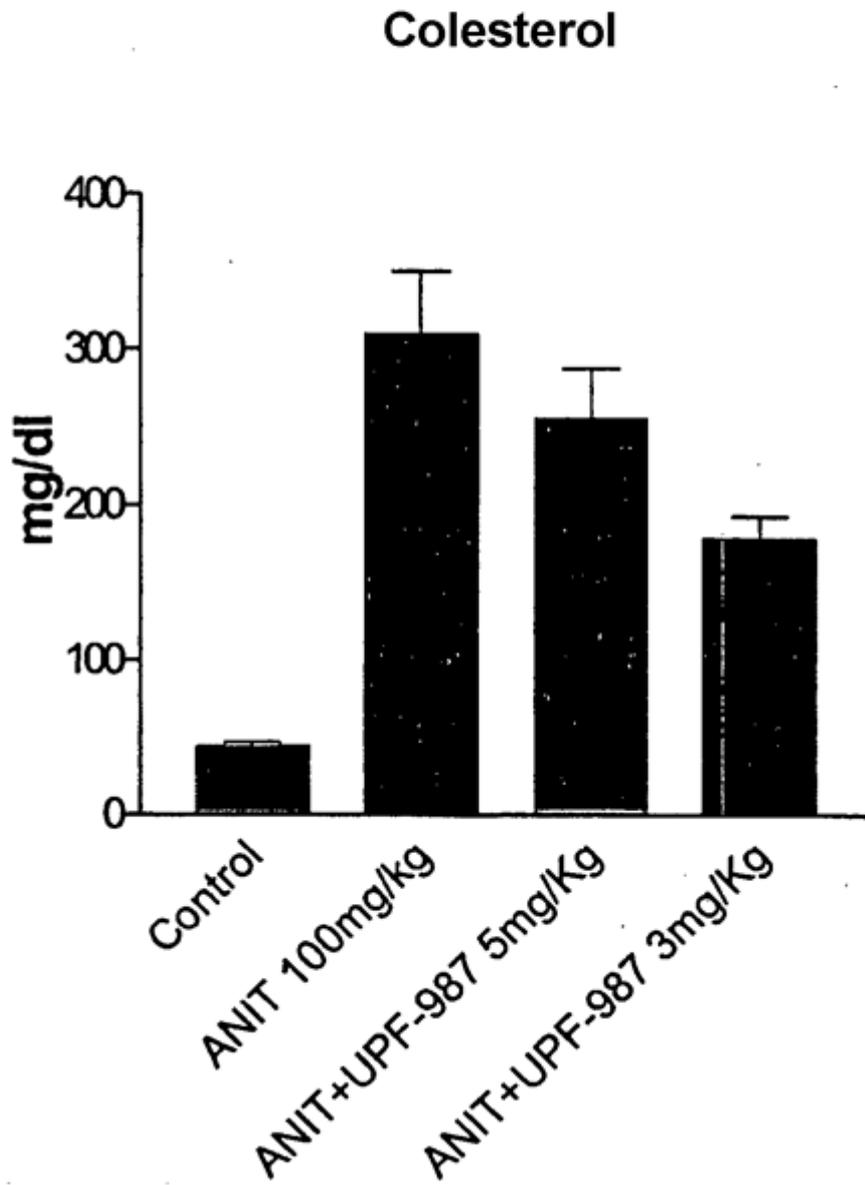


Figura 14

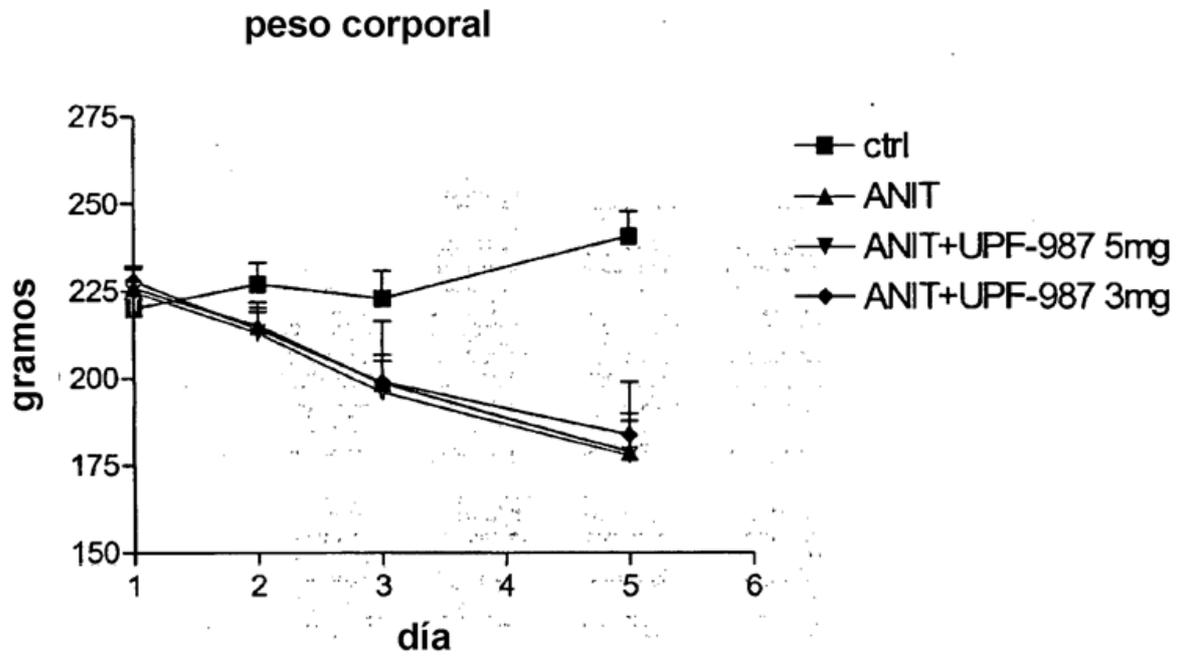


Figura 15

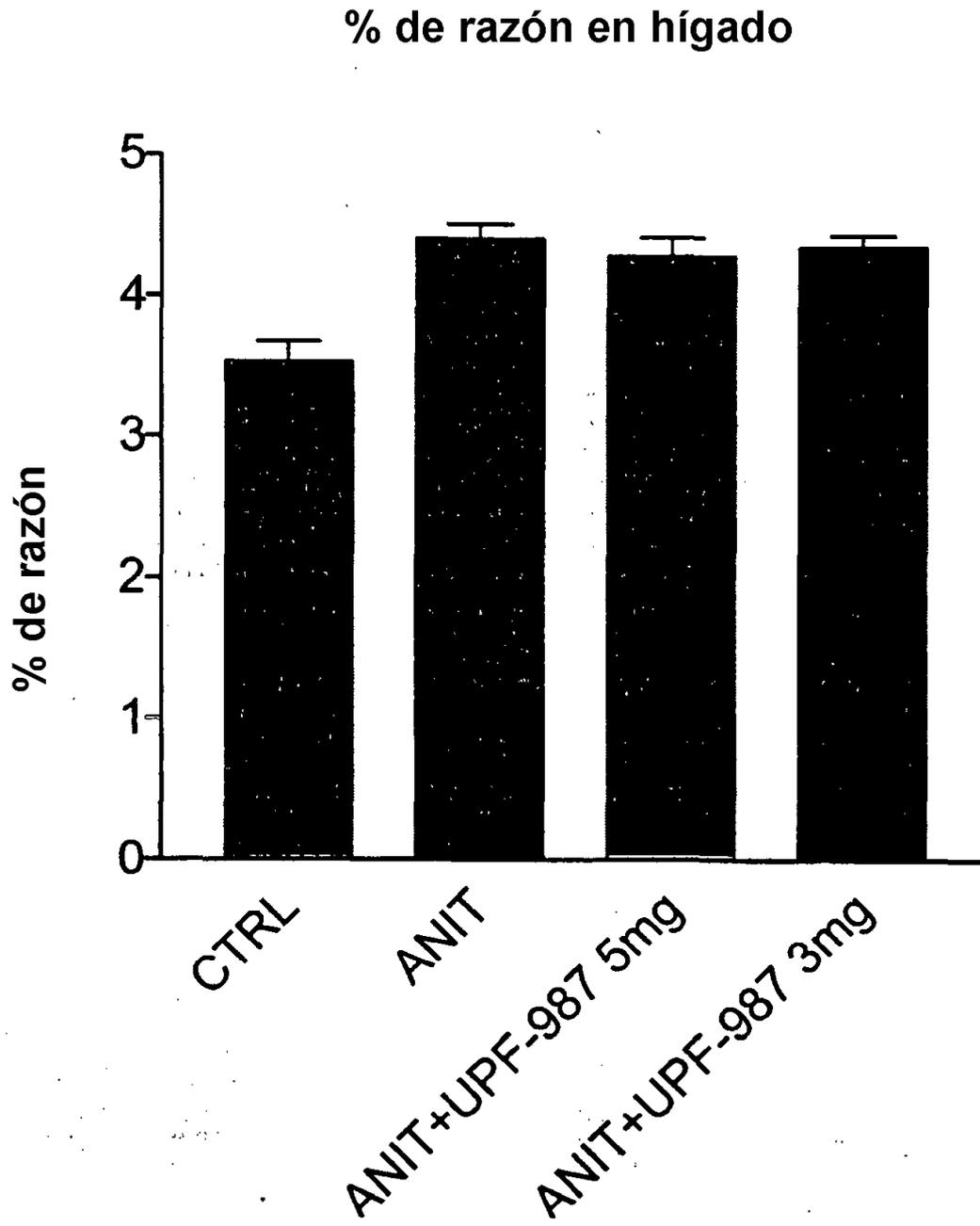


Figura 16

Tejido de hígado

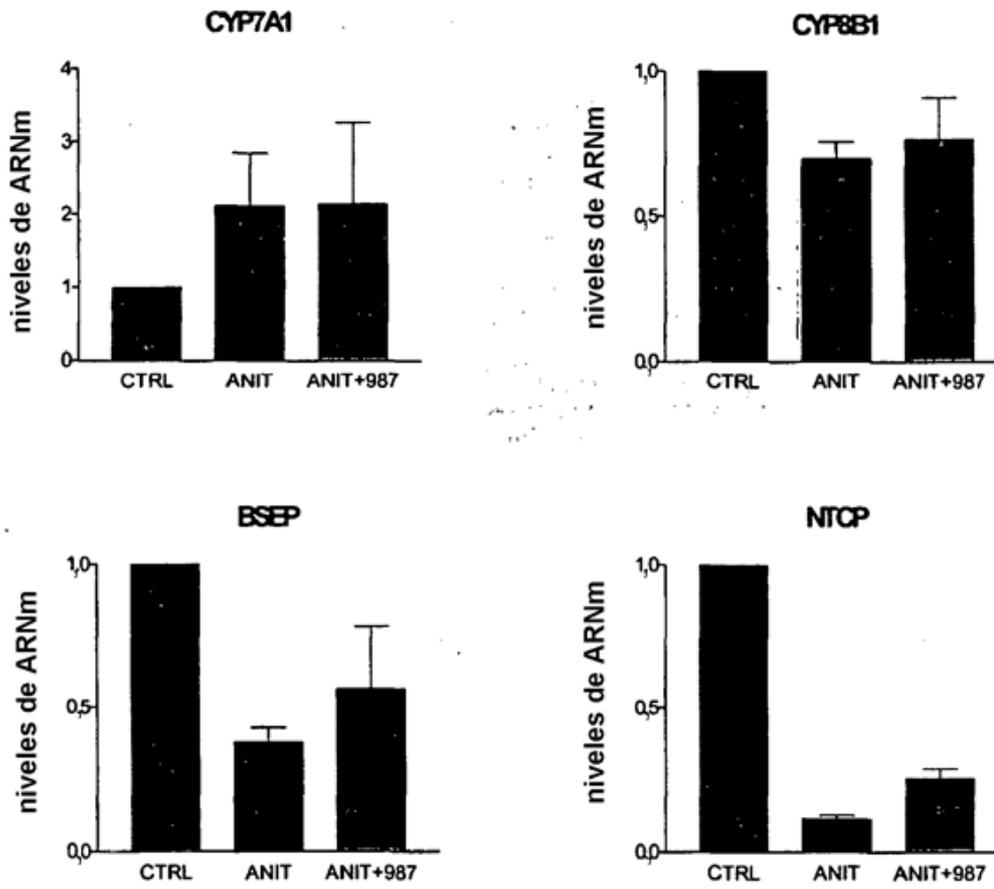


Figura 17

### Bilirrubina

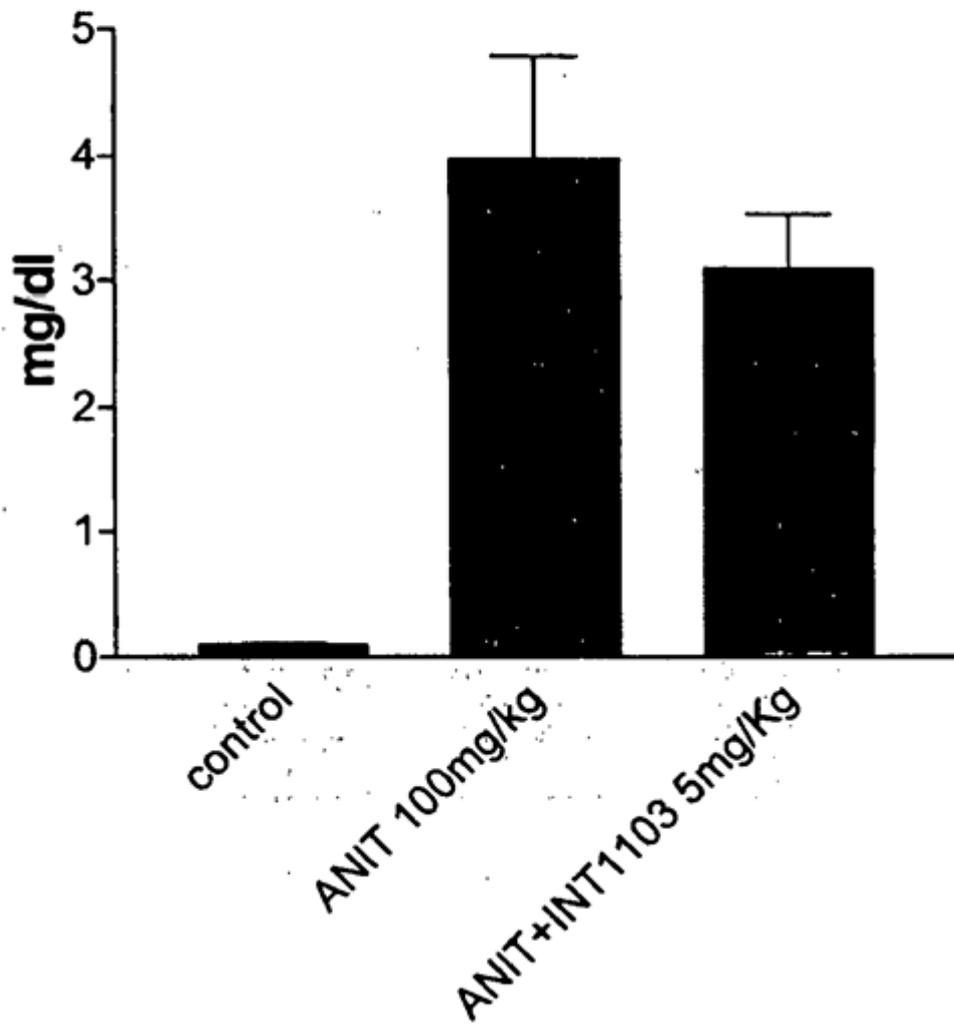


Figura 18

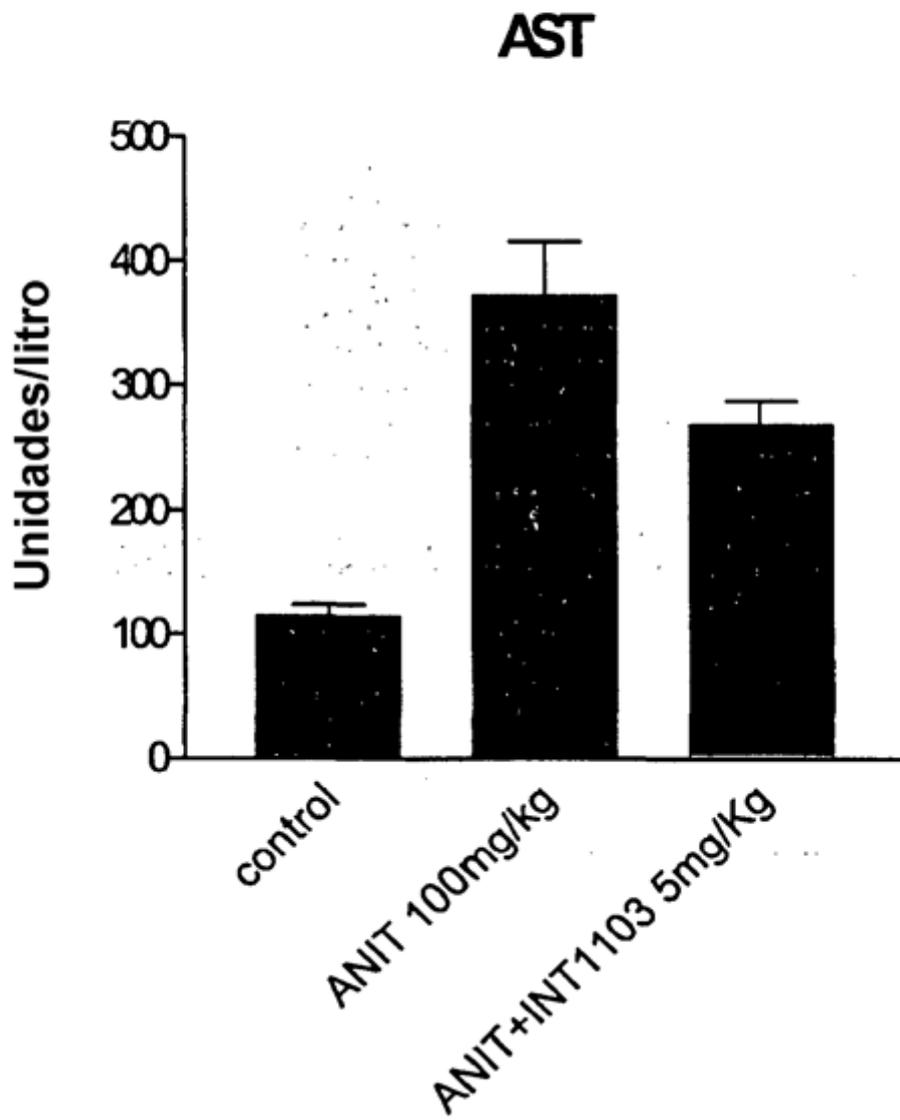


Figura 19

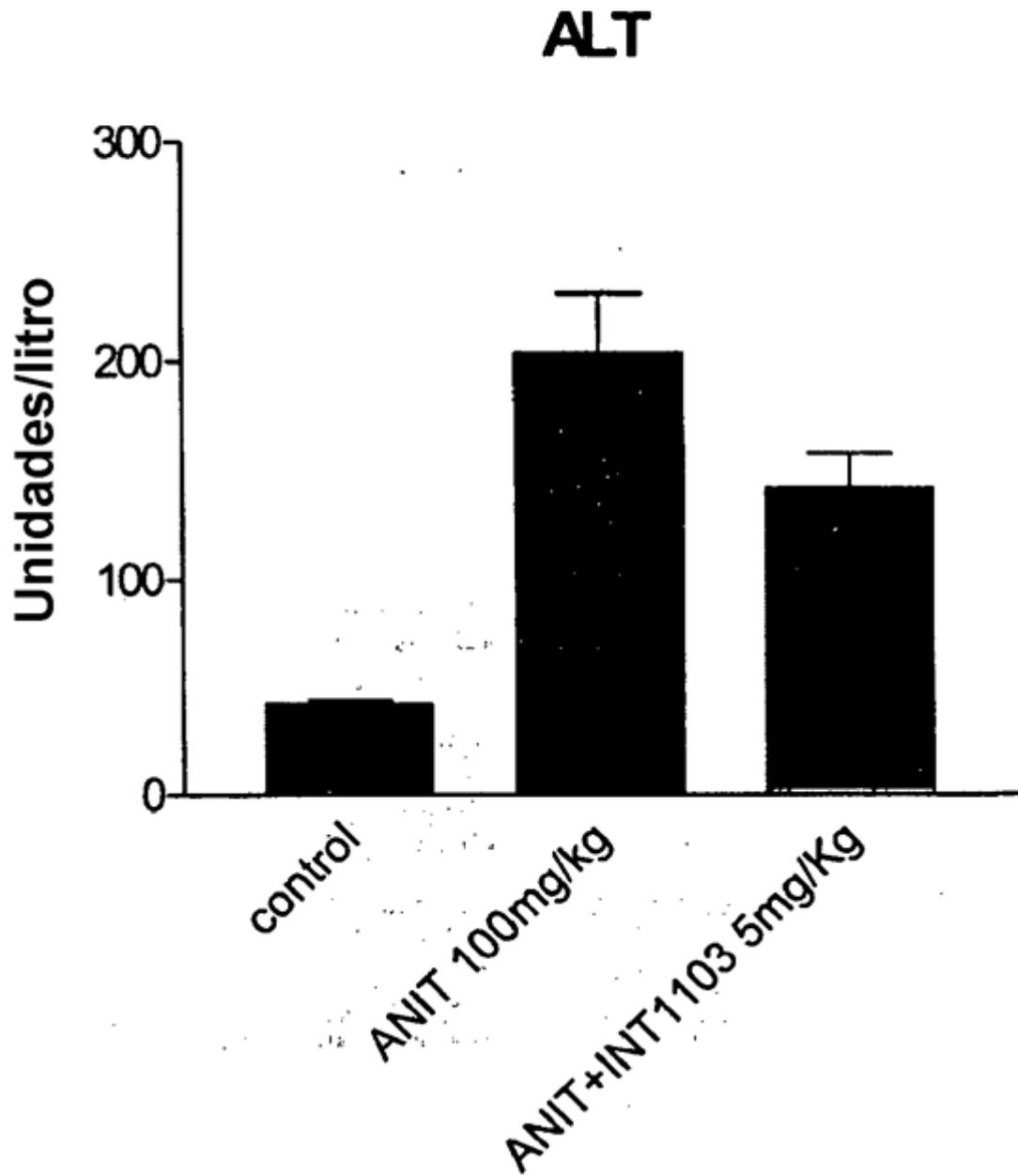


Figura 20

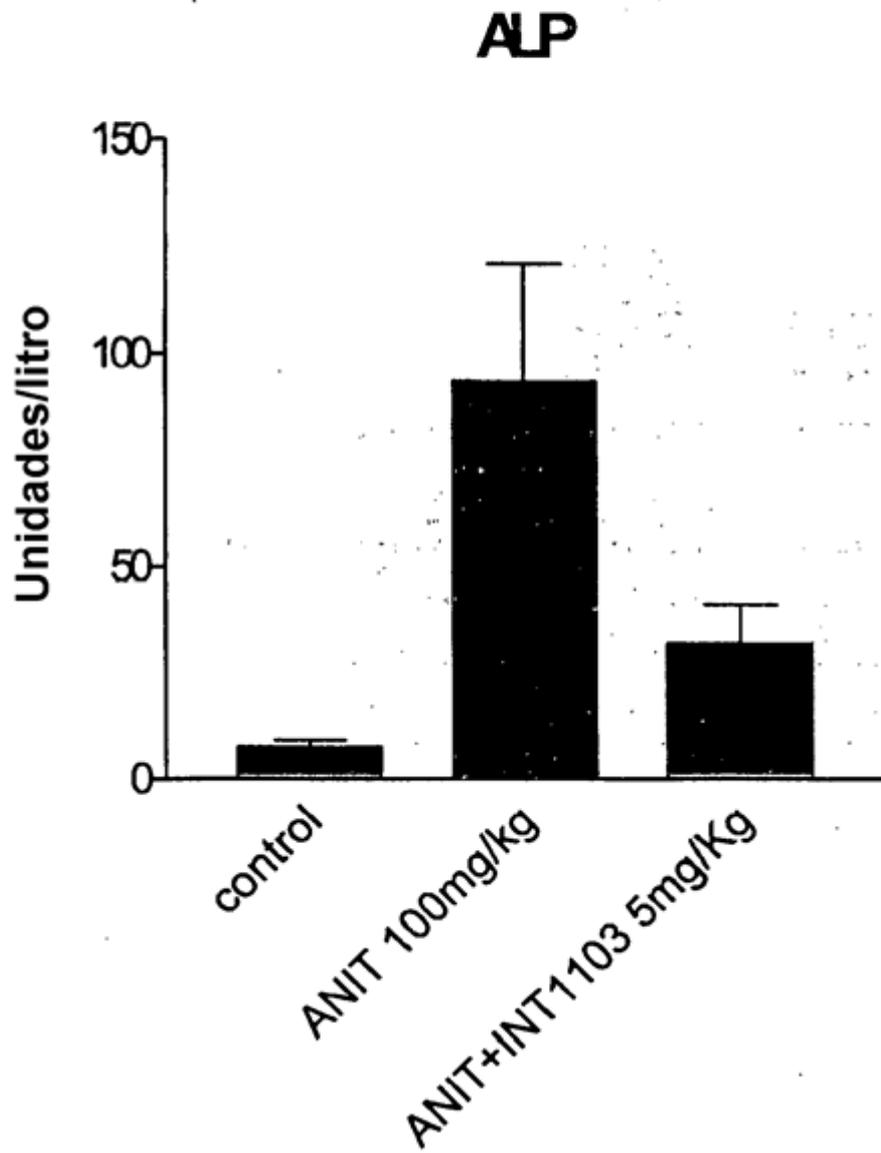


Figura 21

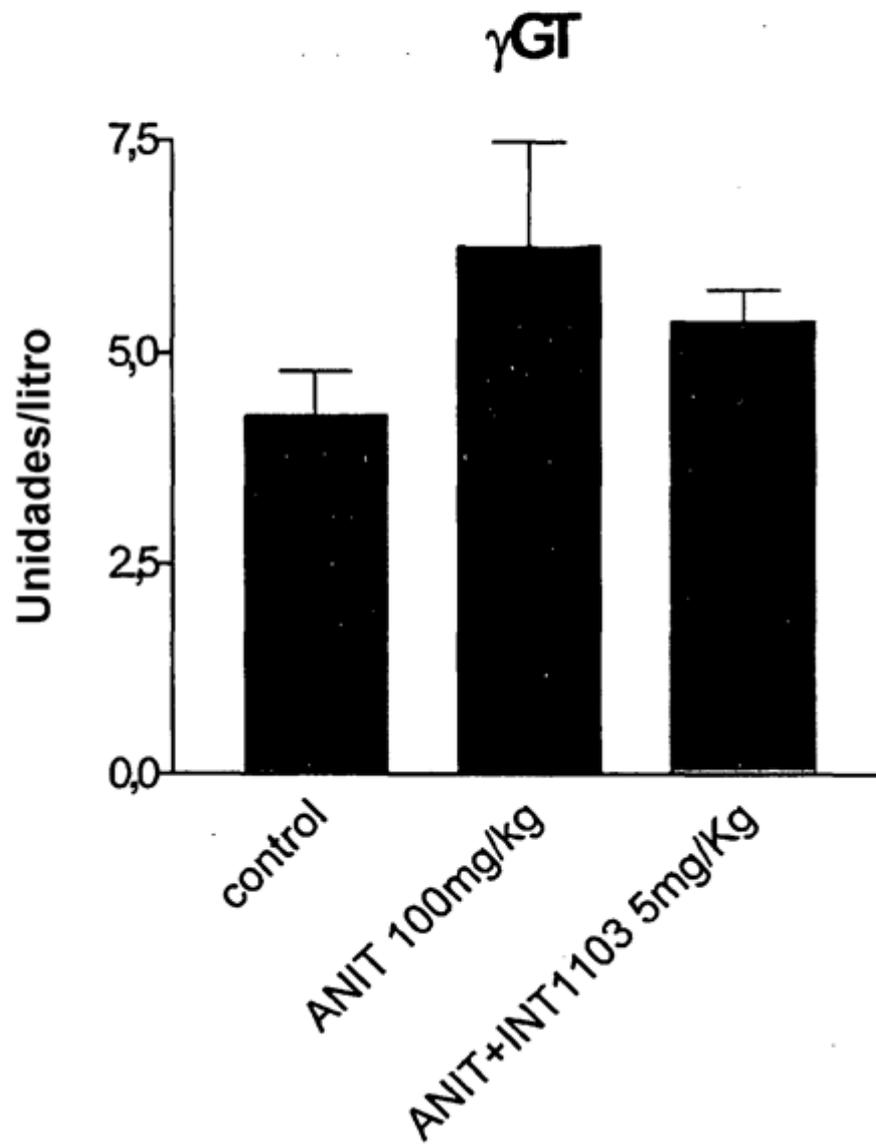


Figura 22

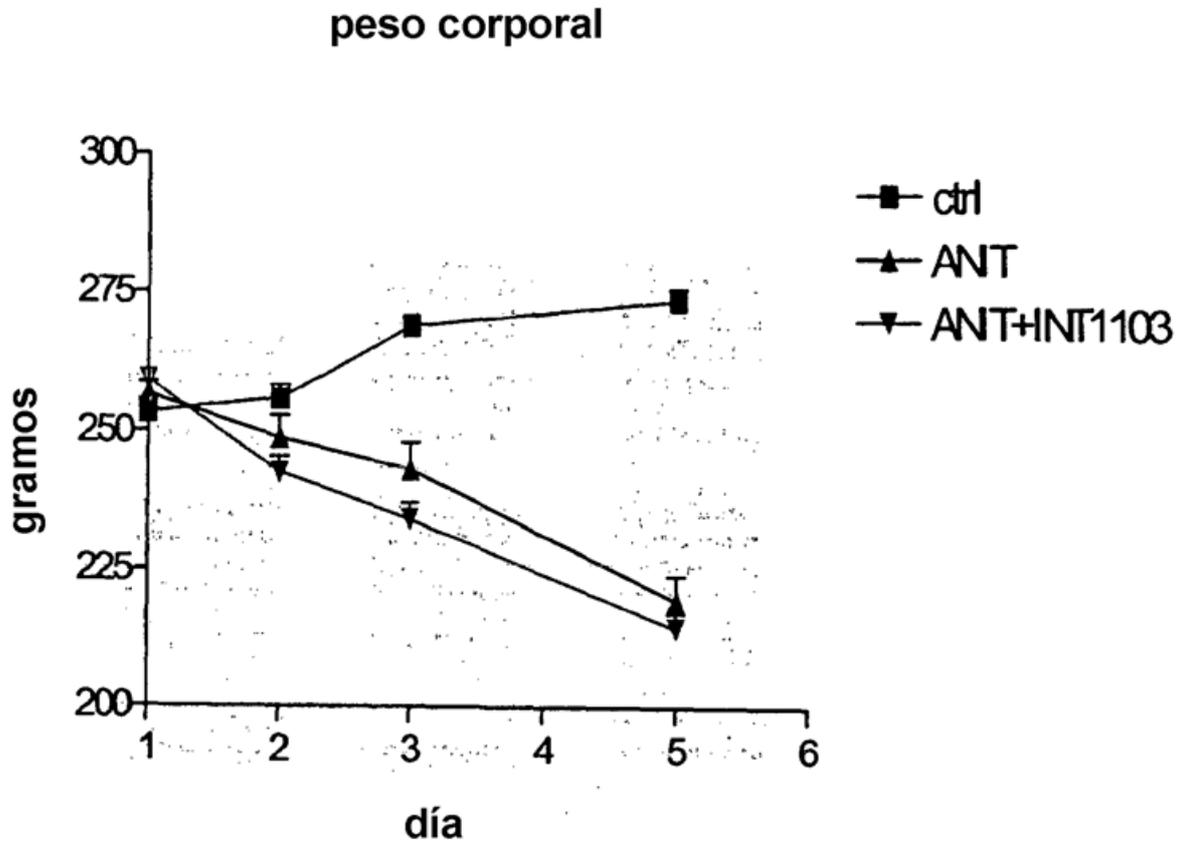


Figura 23

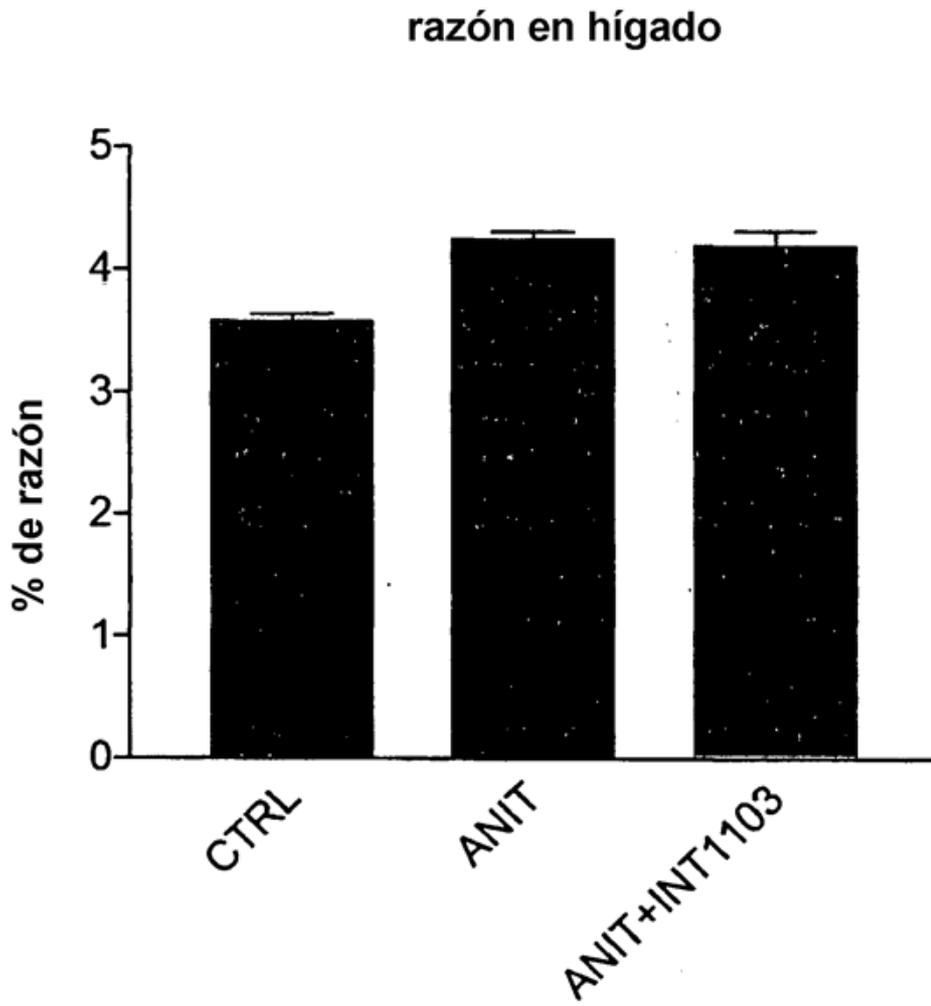


Figura 24

### Bilirrubina

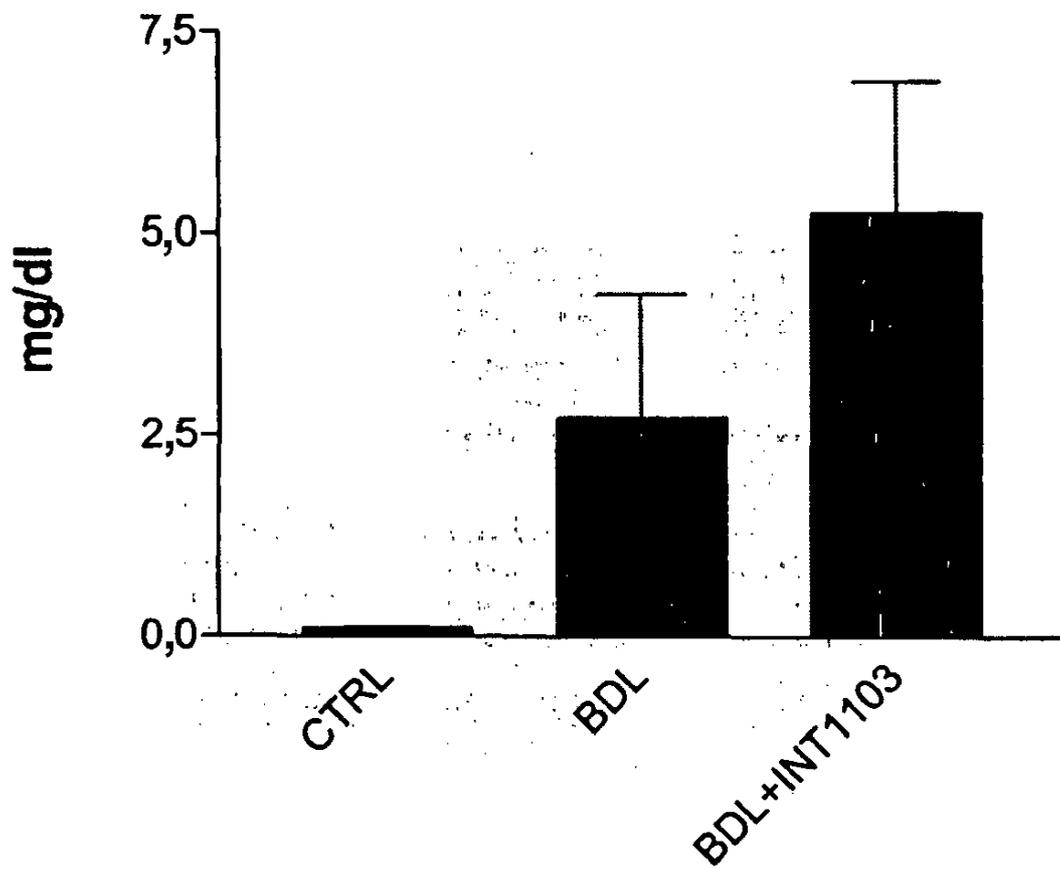


Figura 25

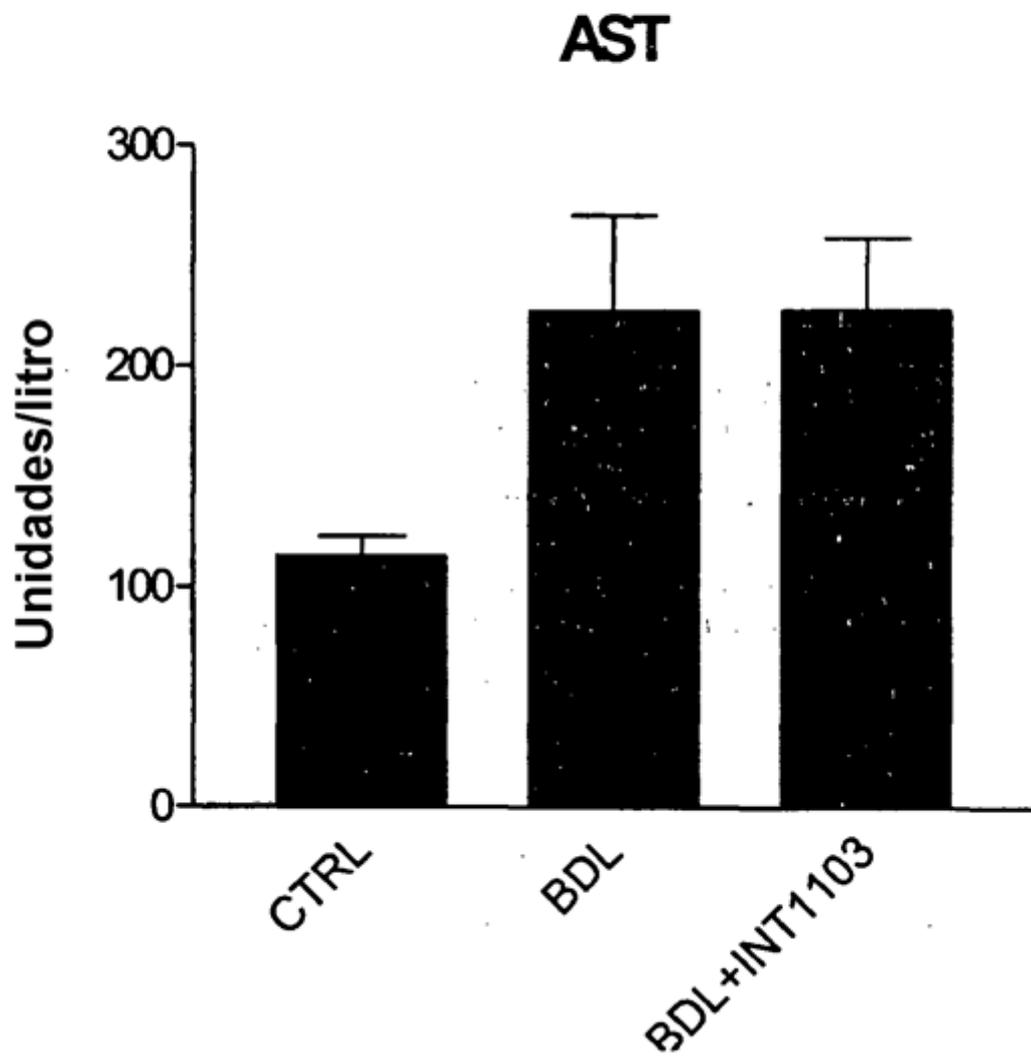


Figura 26

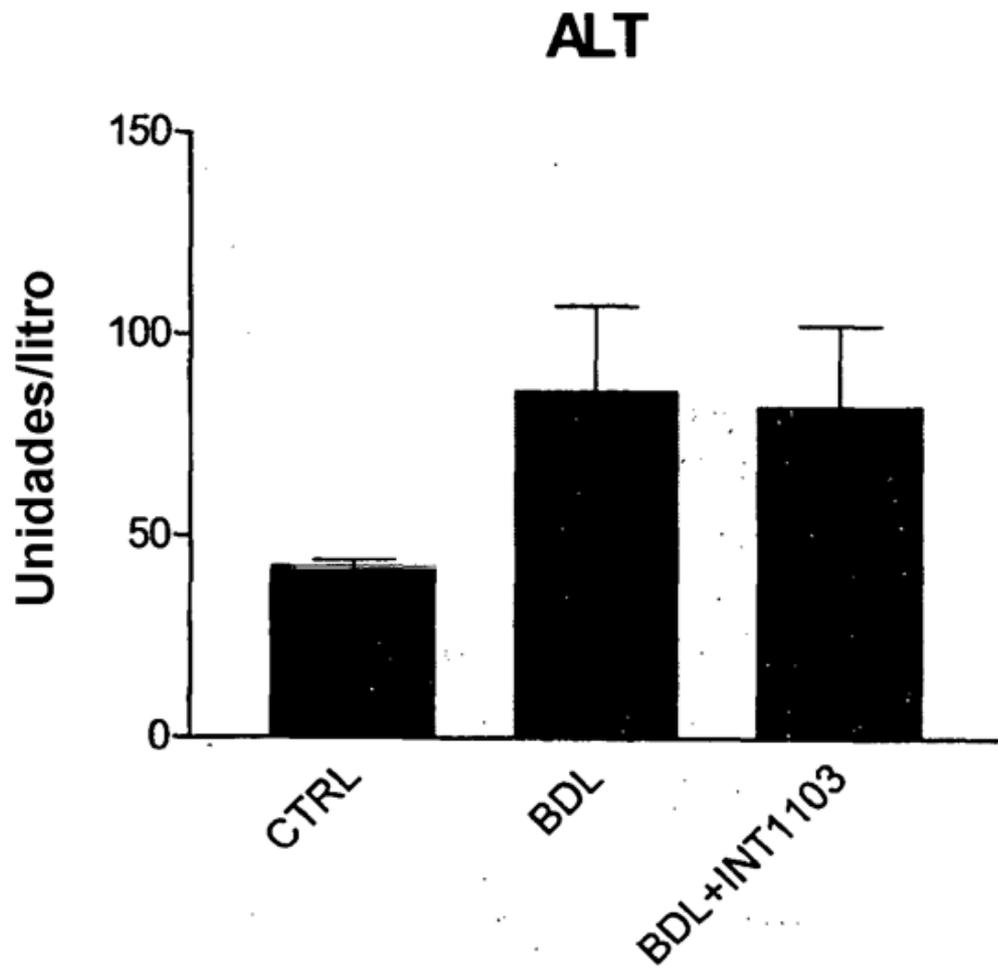


Figura 27

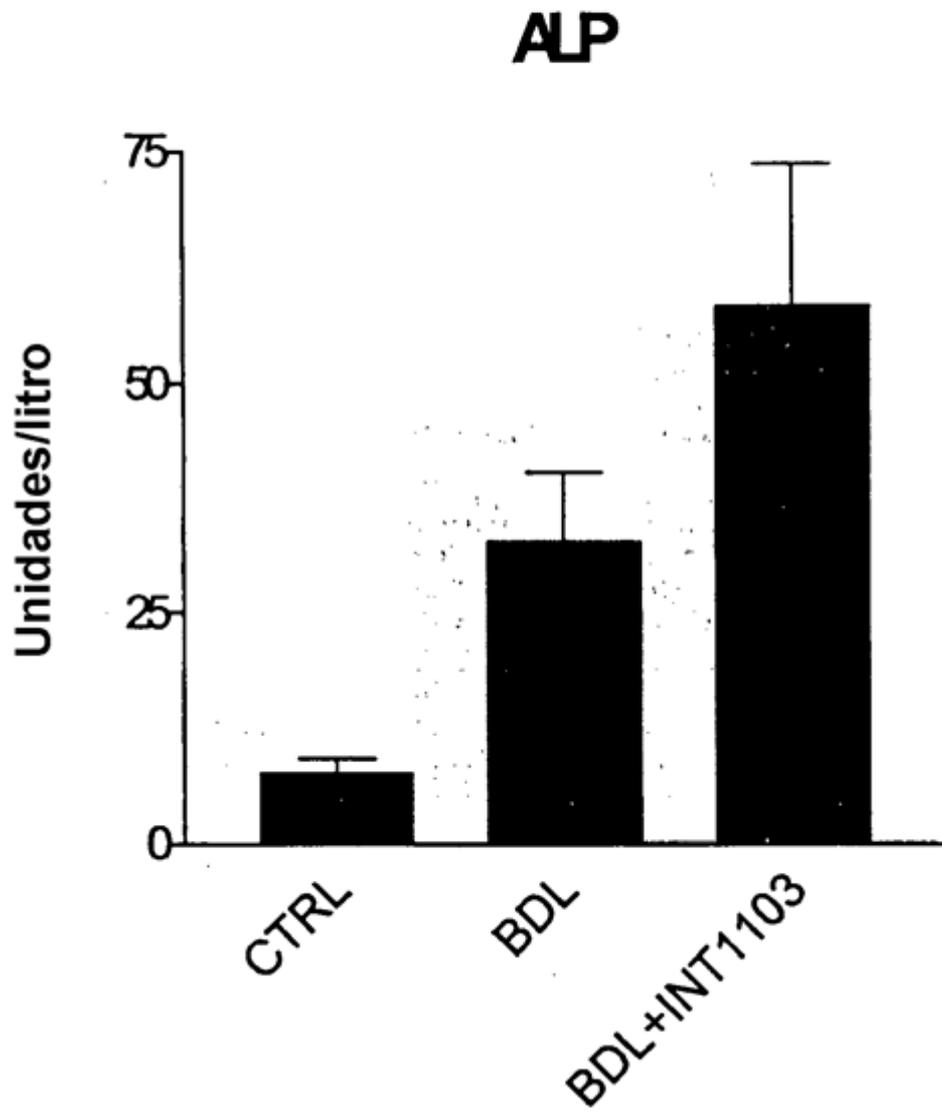


Figura 28

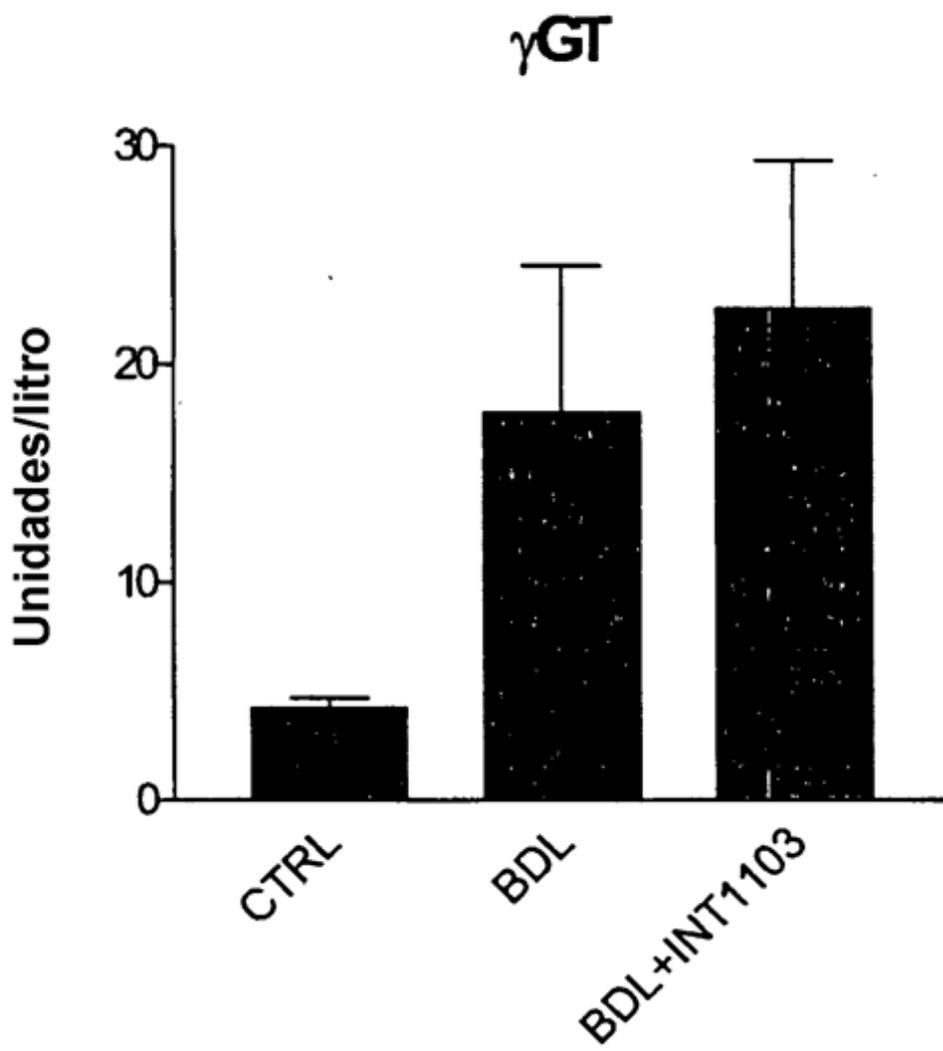


Figura 29

Peso corporal

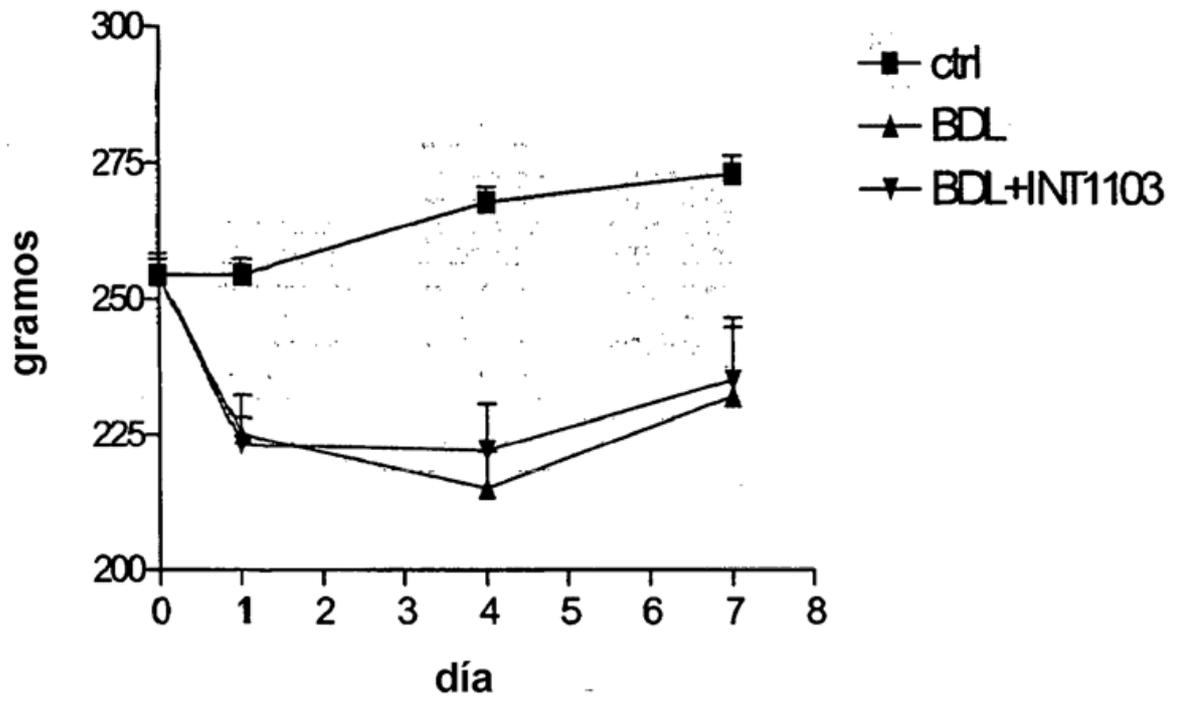


Figura 30

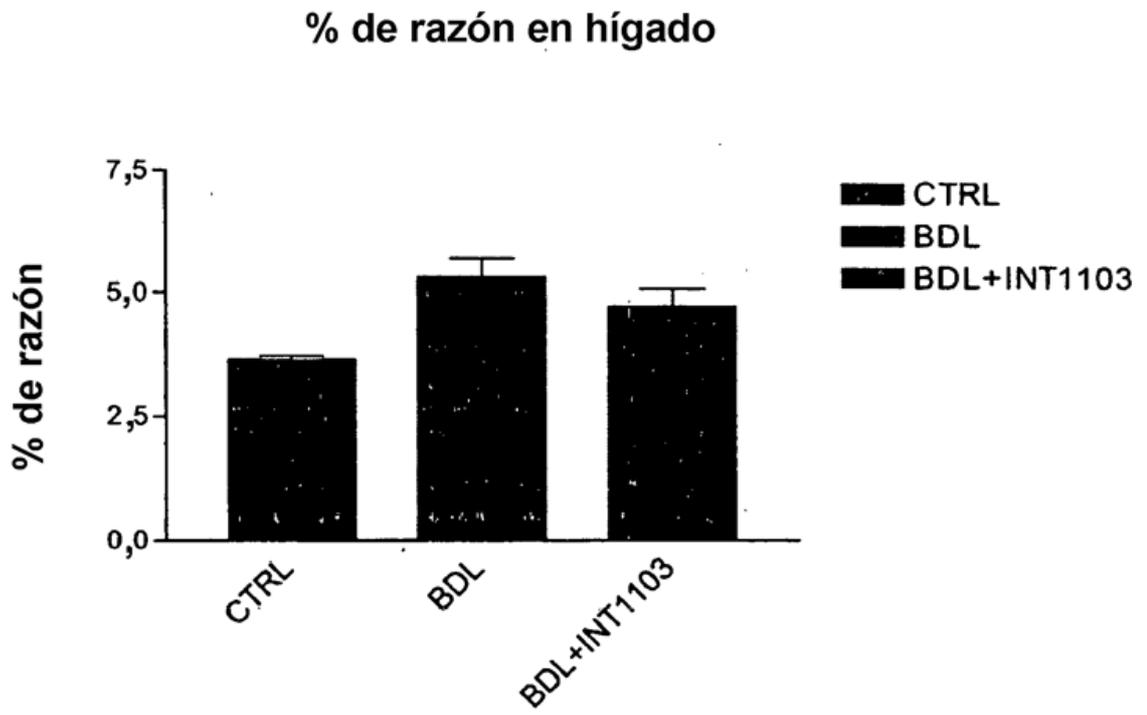


Figura 31

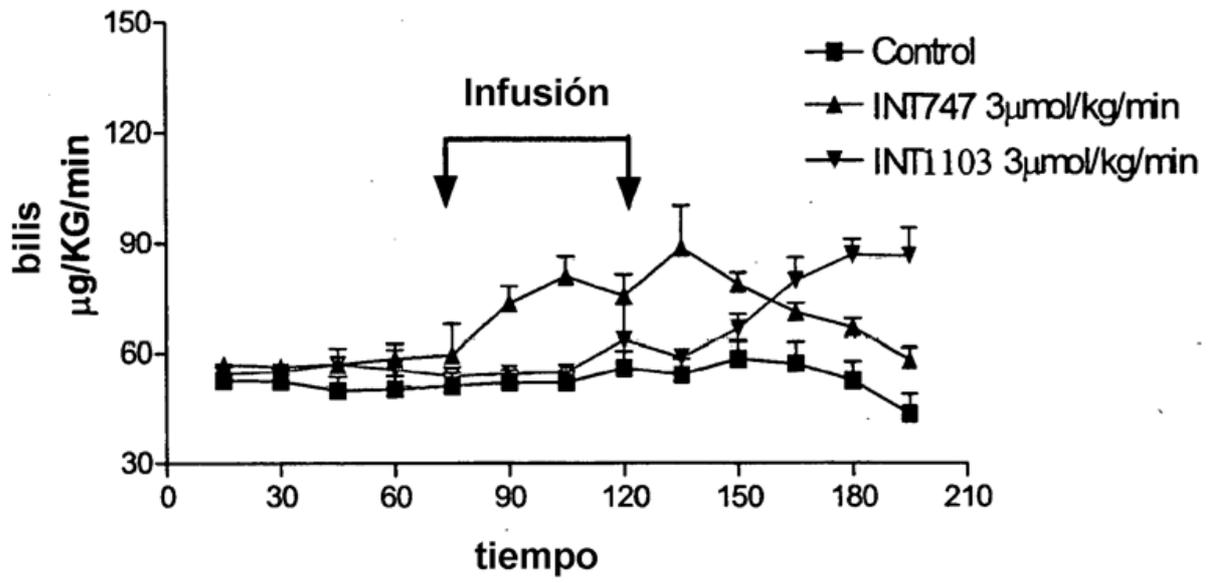


Figura 32

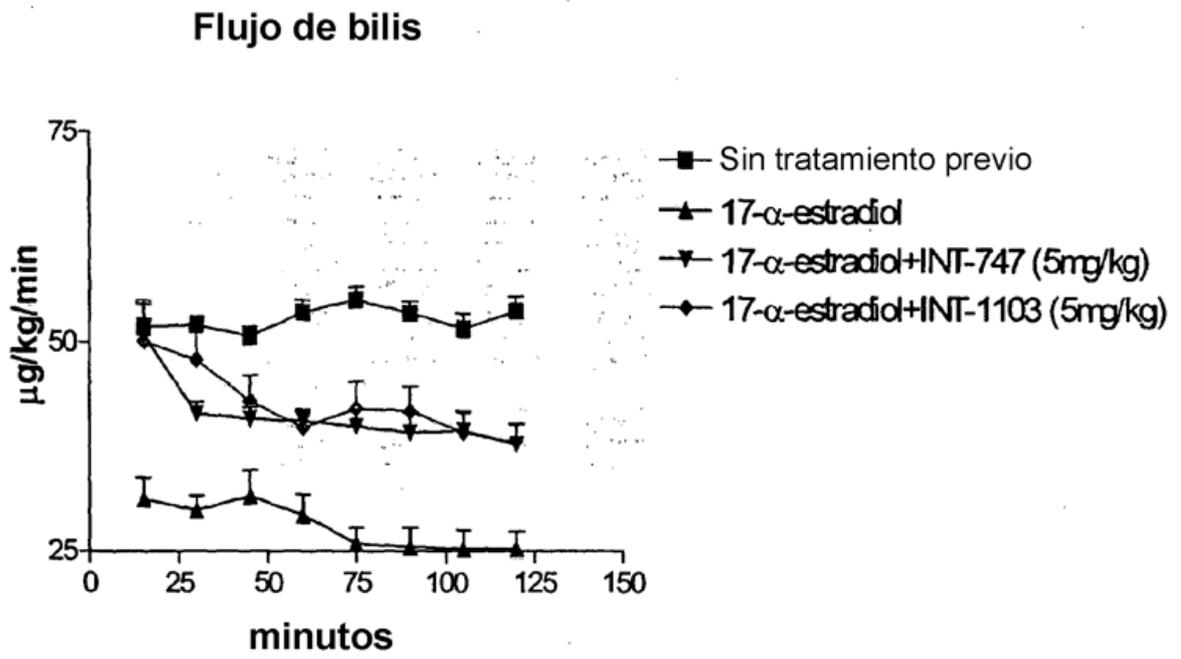


Figura 33

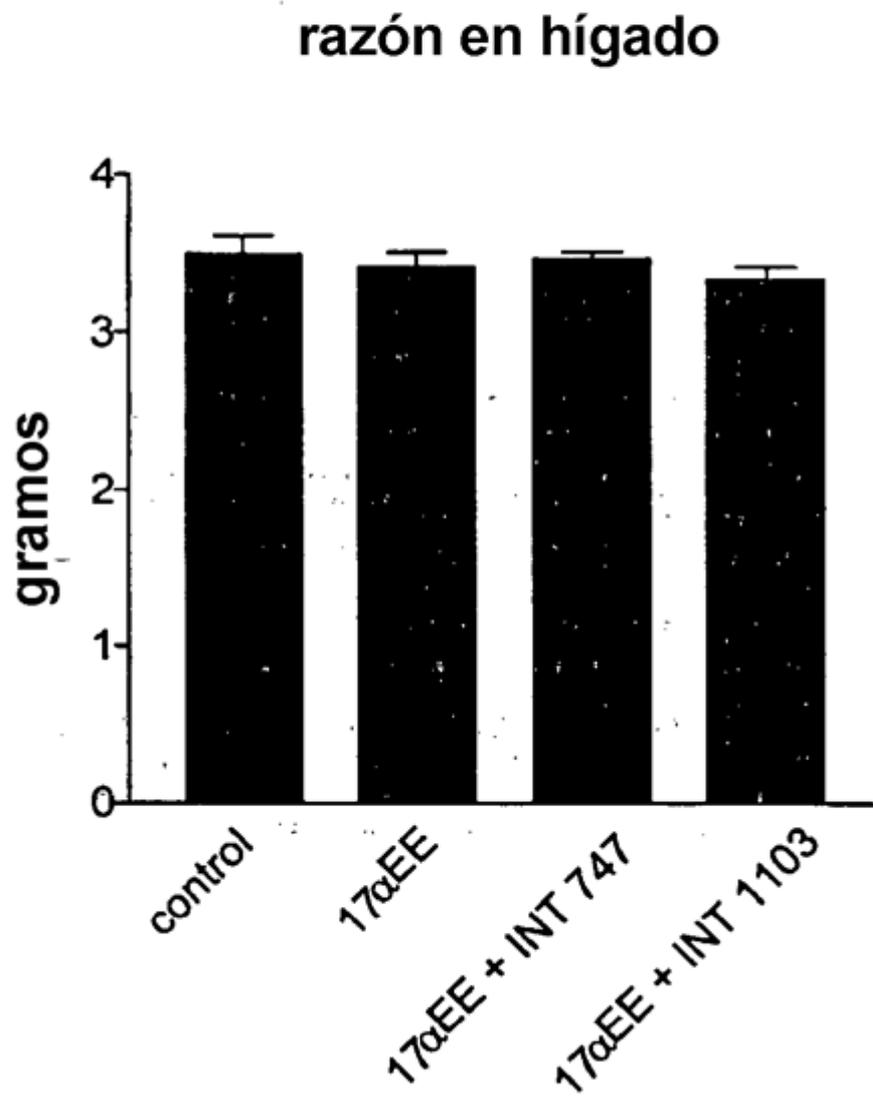


Figura 34

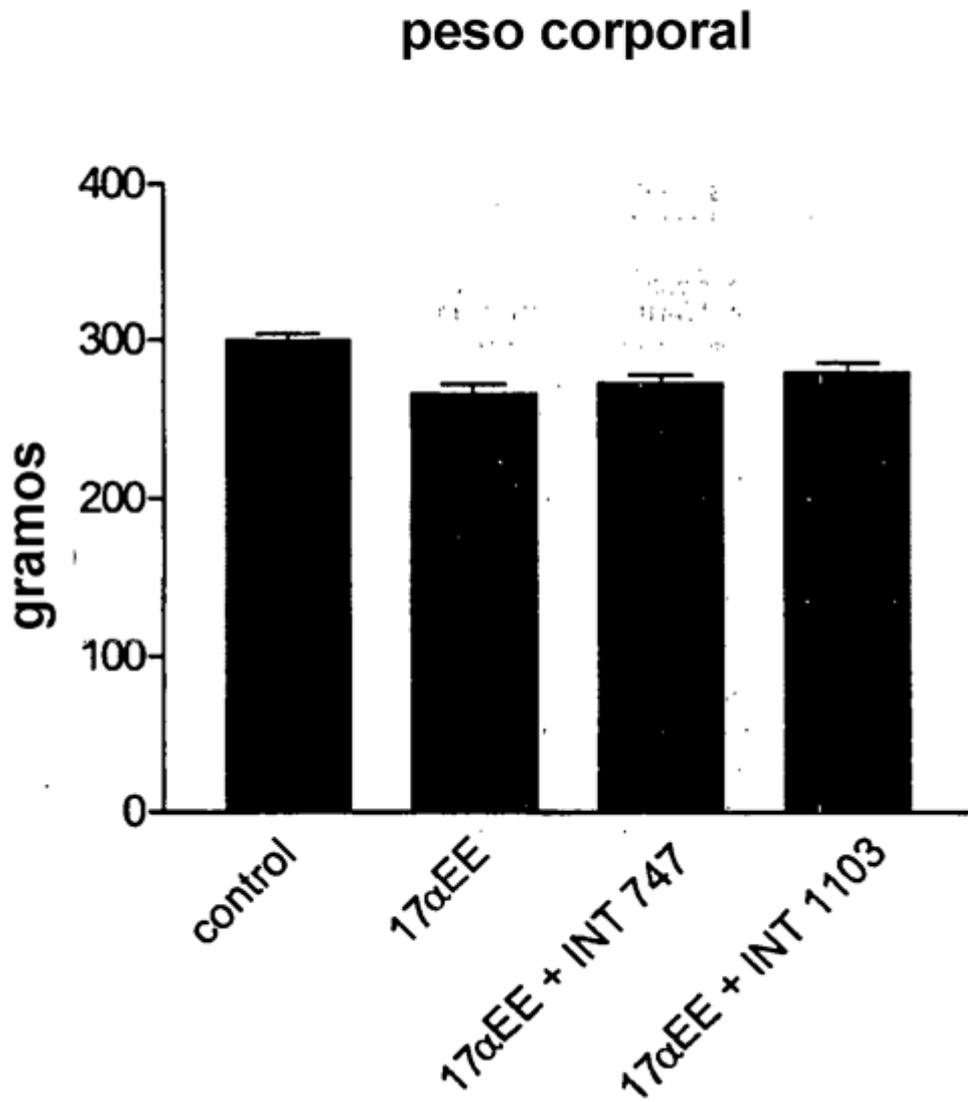


Figura 35

**Células  $\beta$  de ratón**

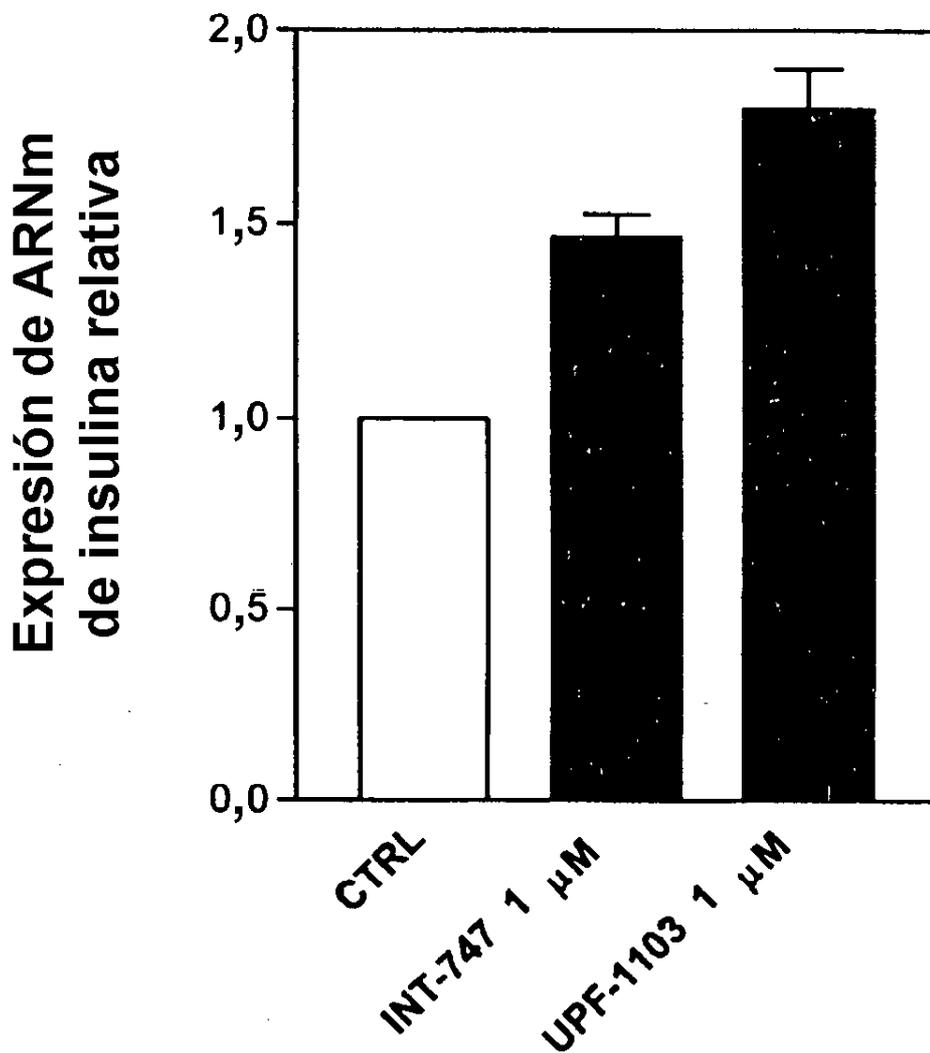


Figura 36

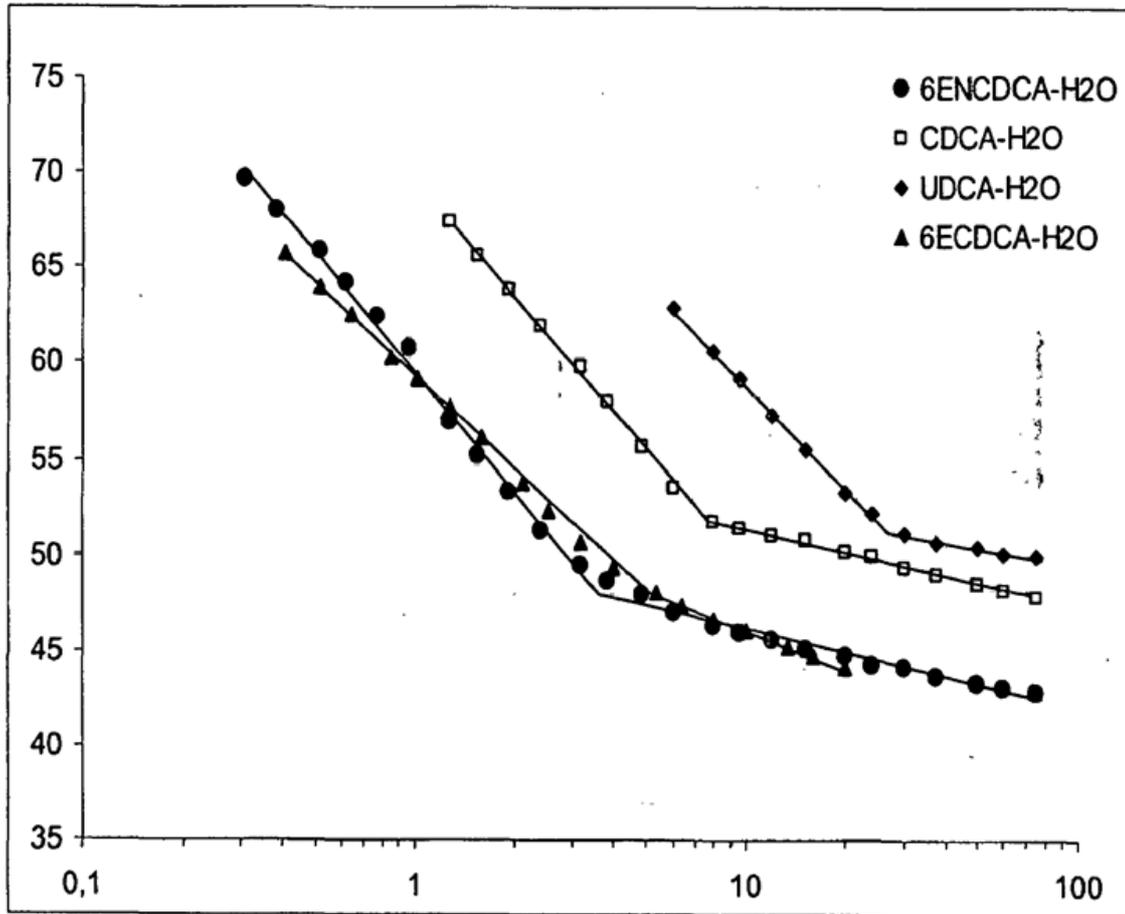


Figura 37

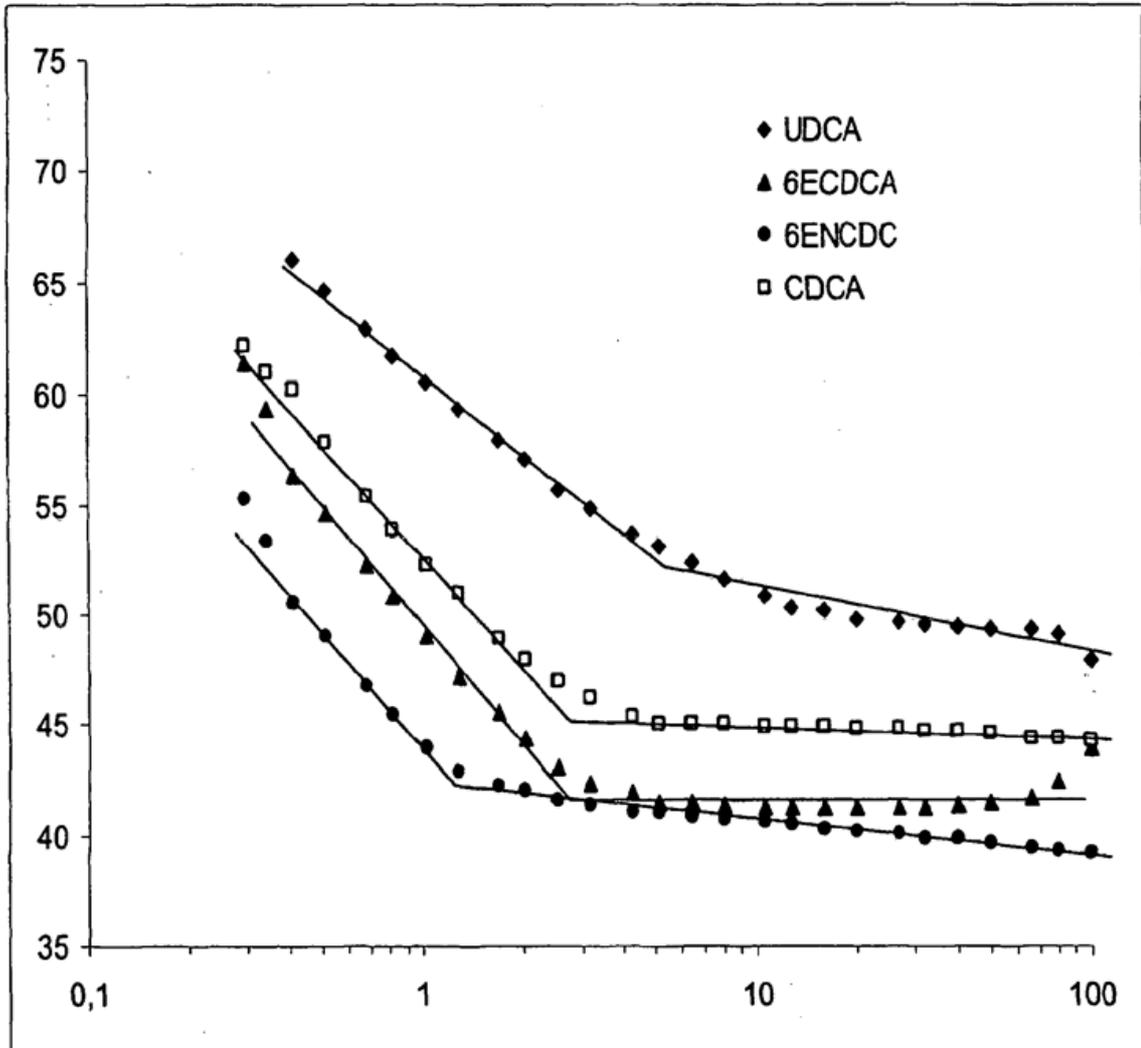


Figura 38

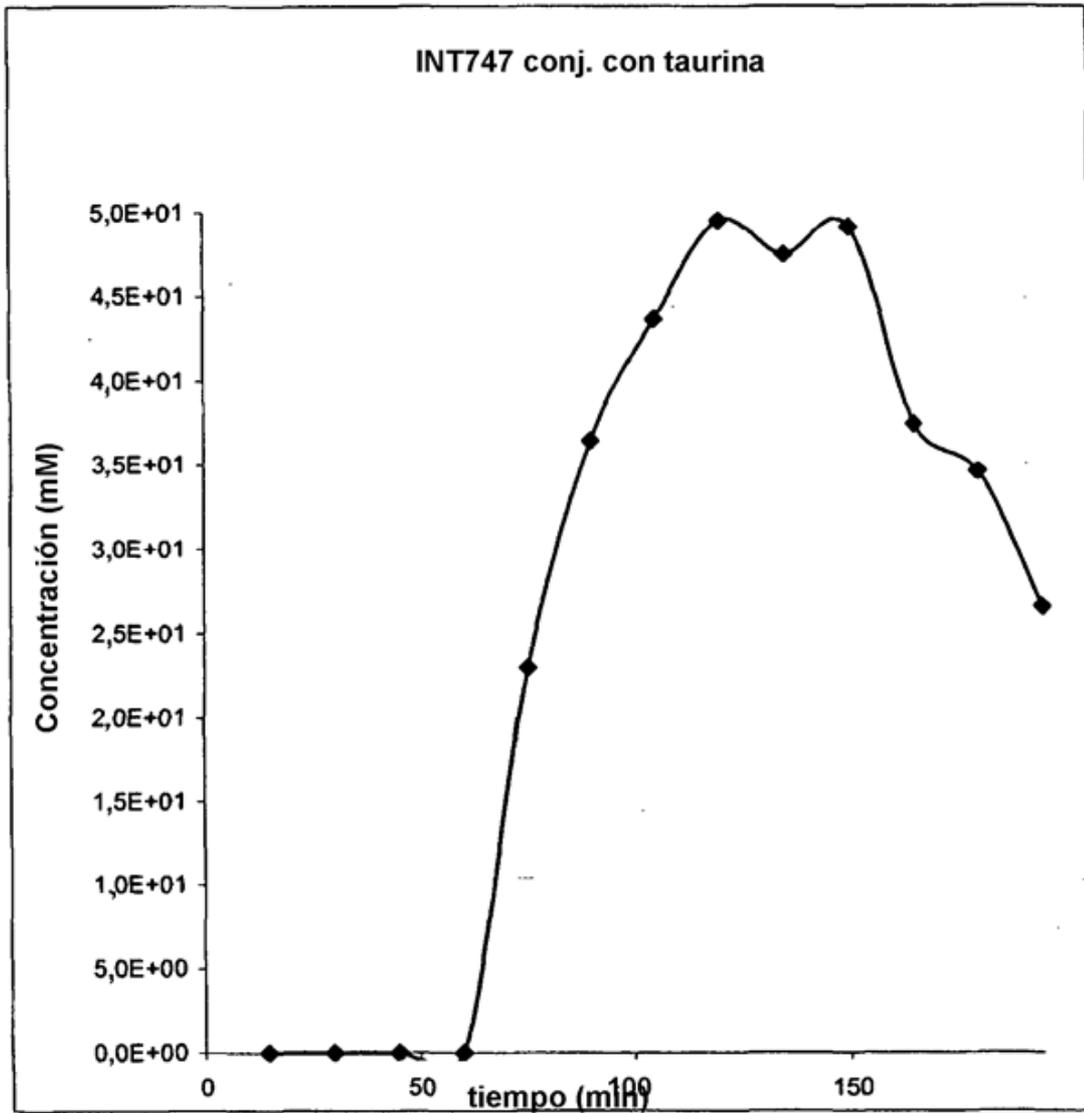


Figura 39

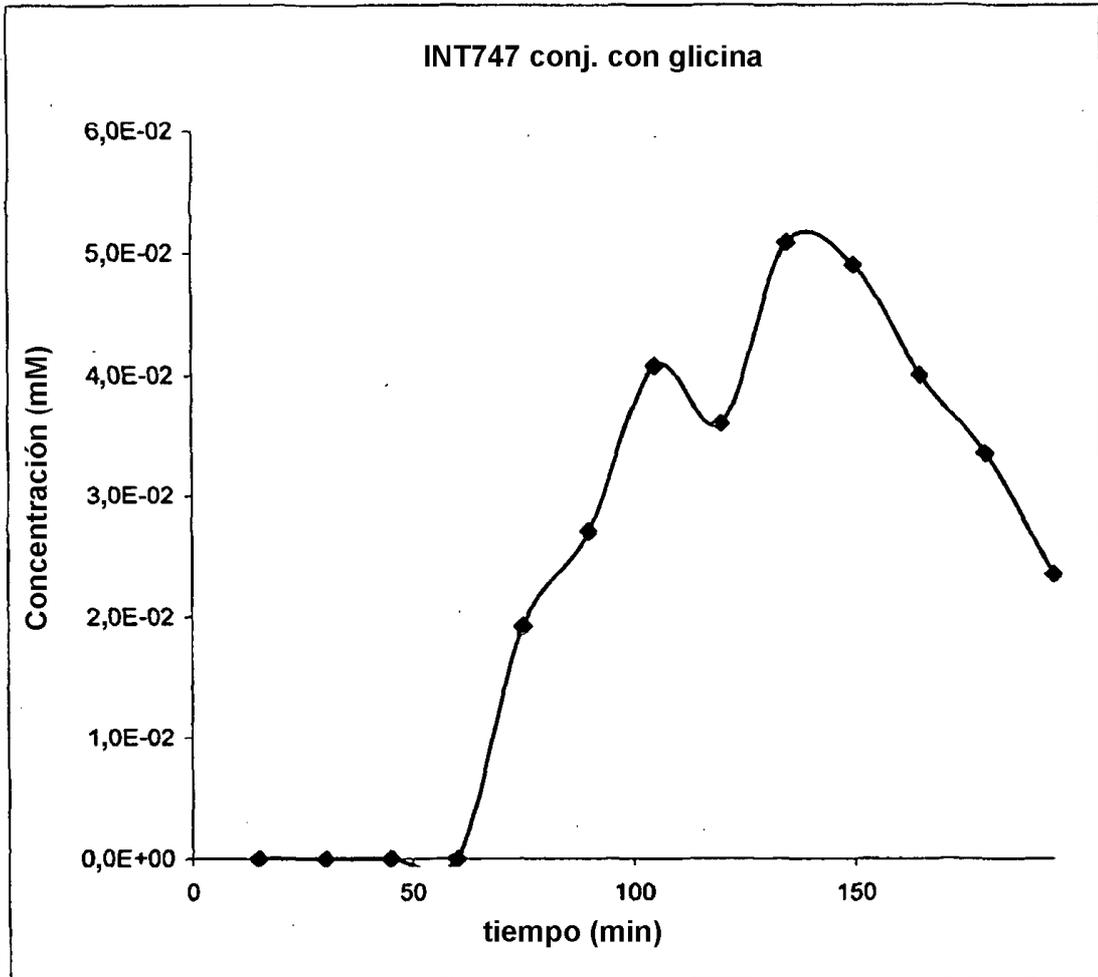


Figura 40

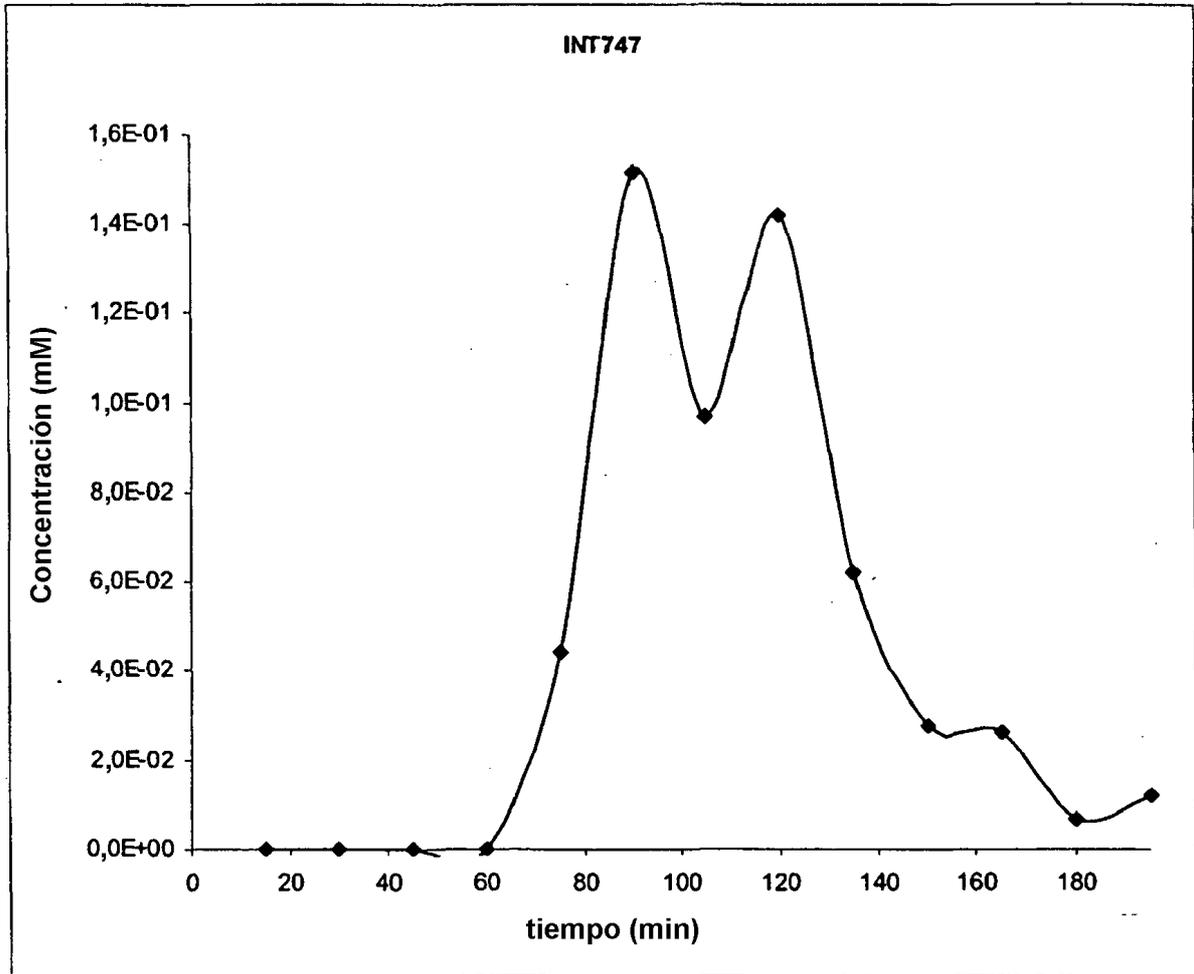


Figura 41

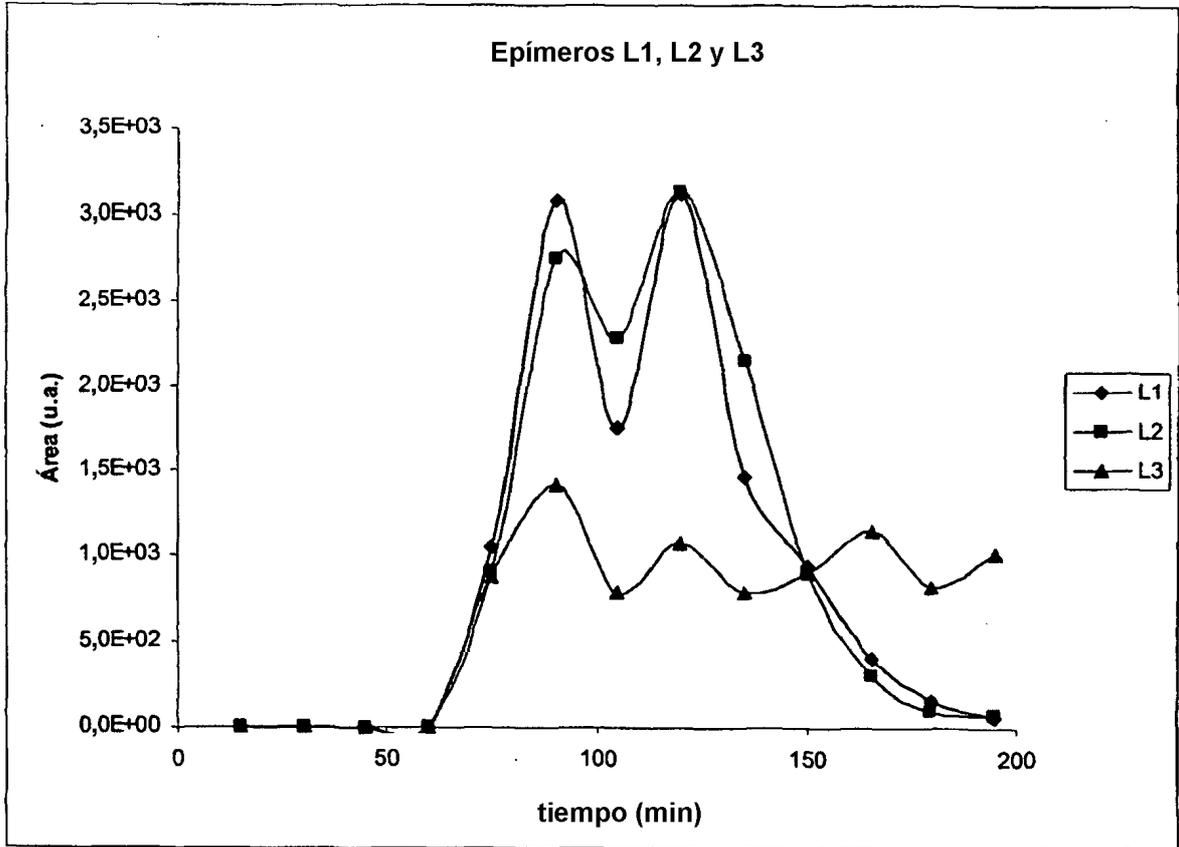


Figura 42

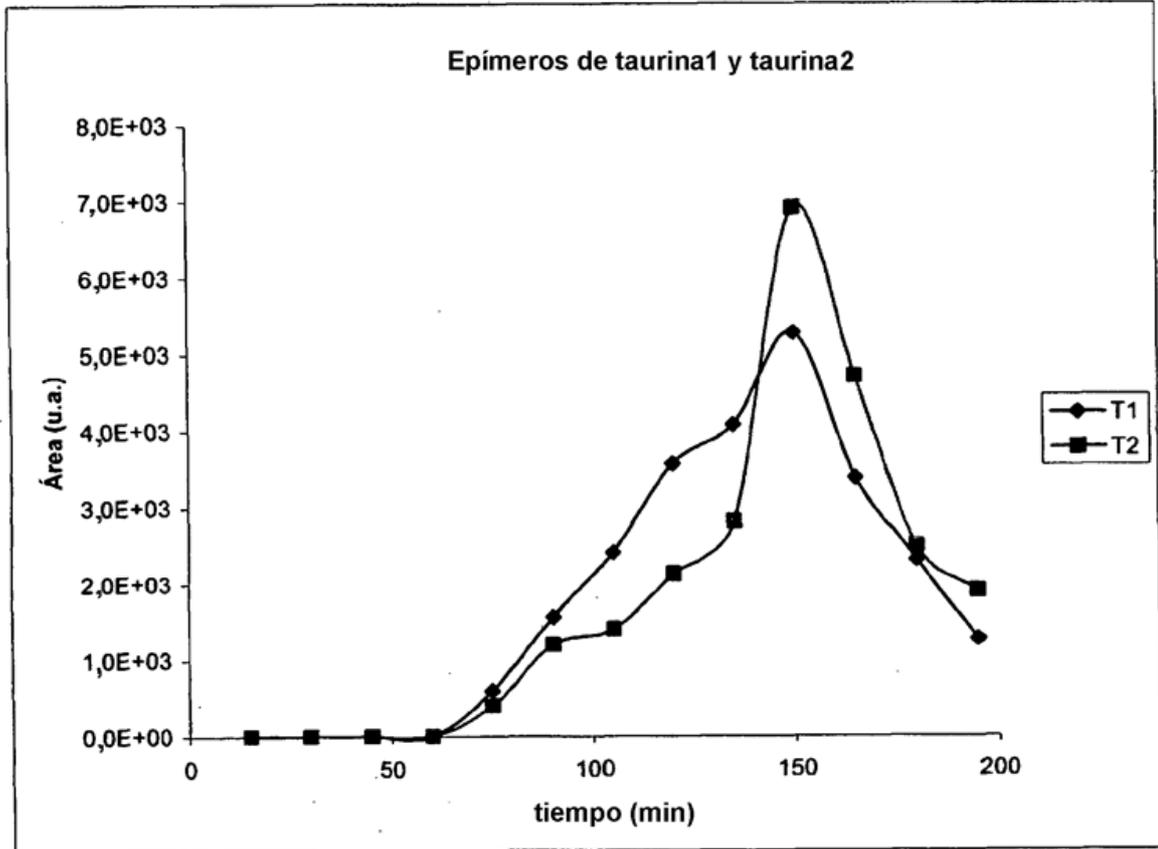


Figura 43

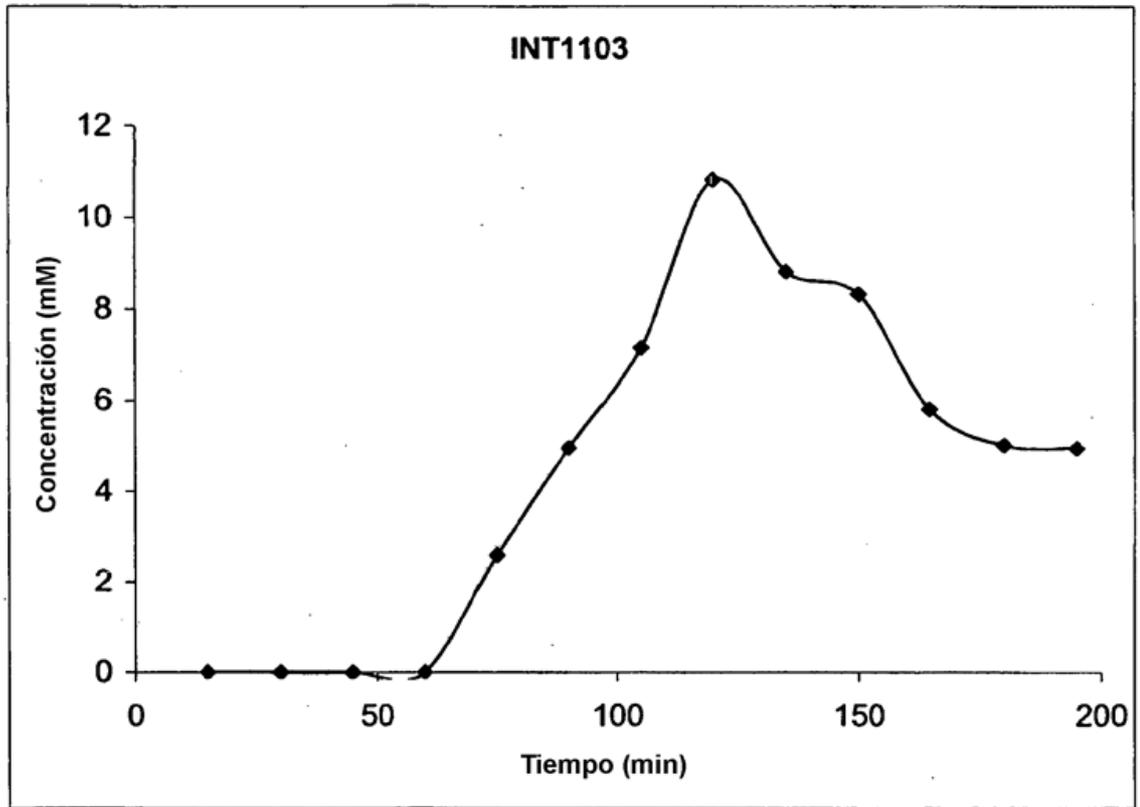


Figura 44

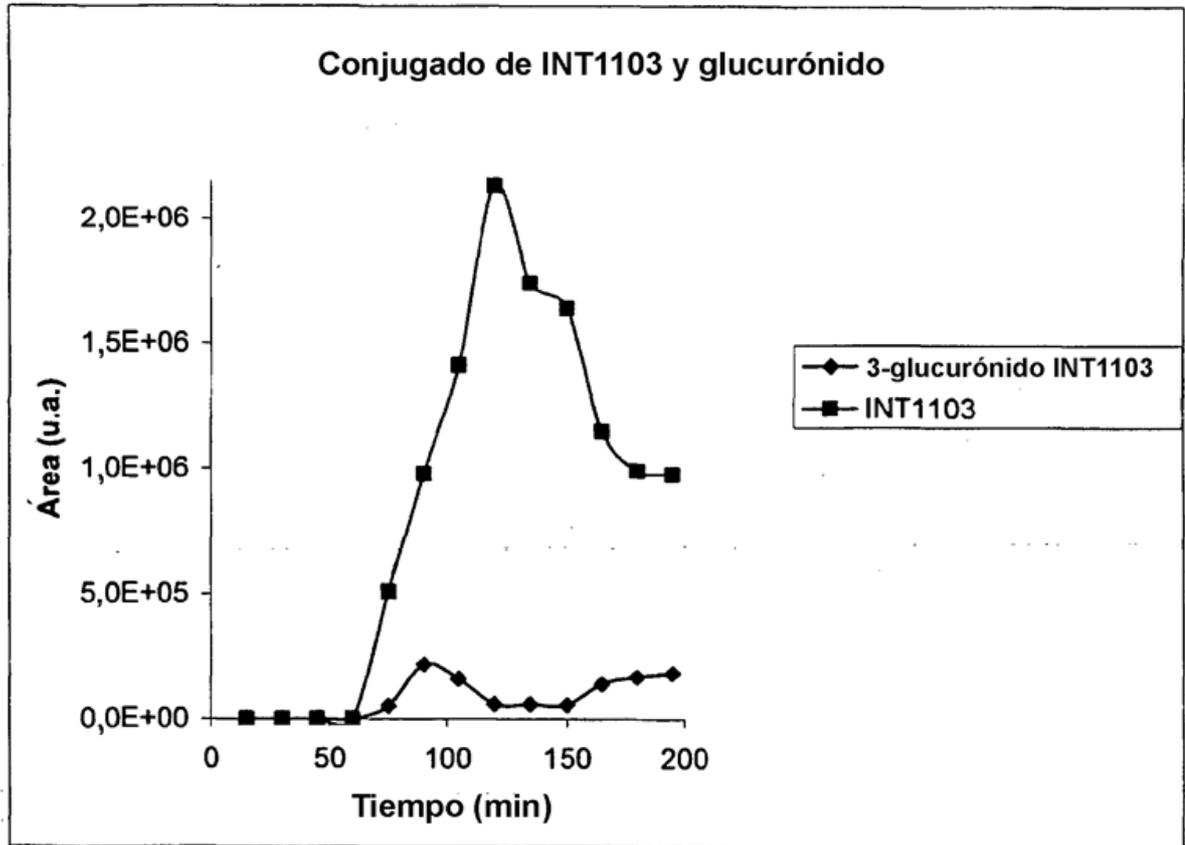


Figura 45

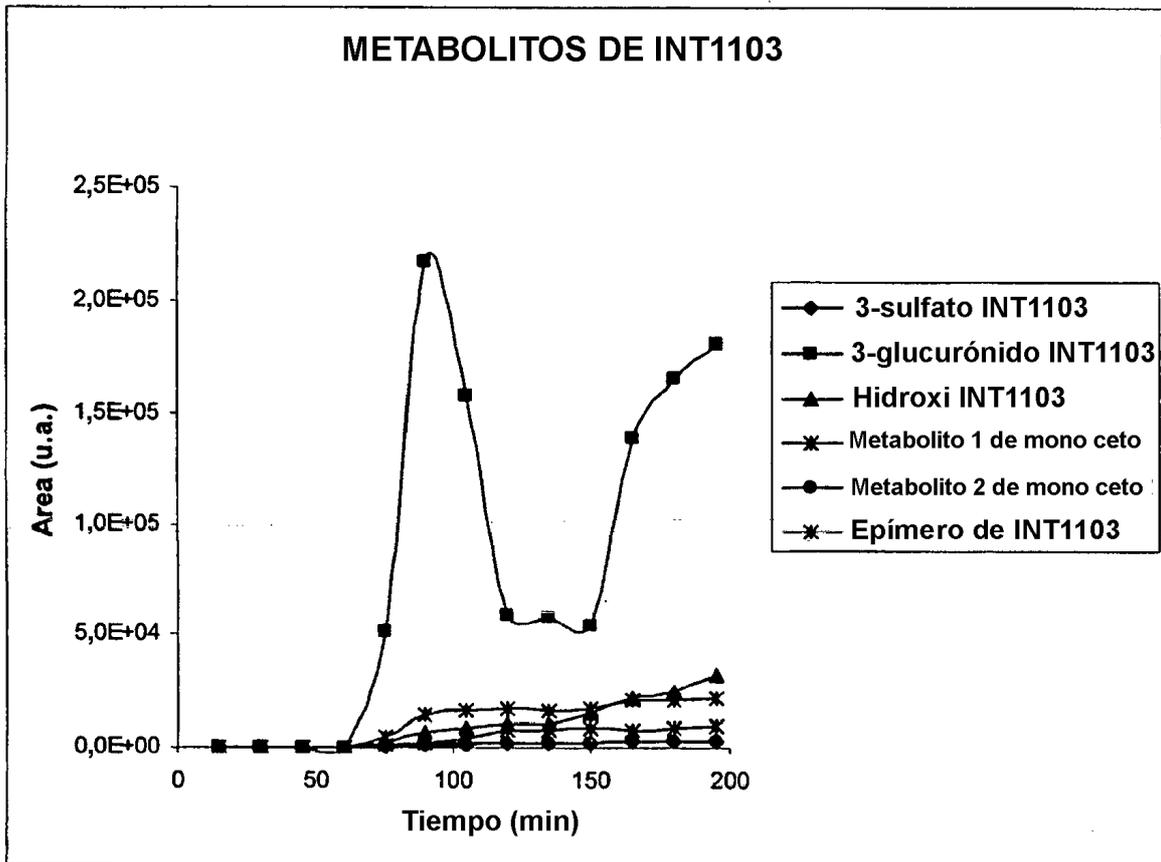


Figura 46

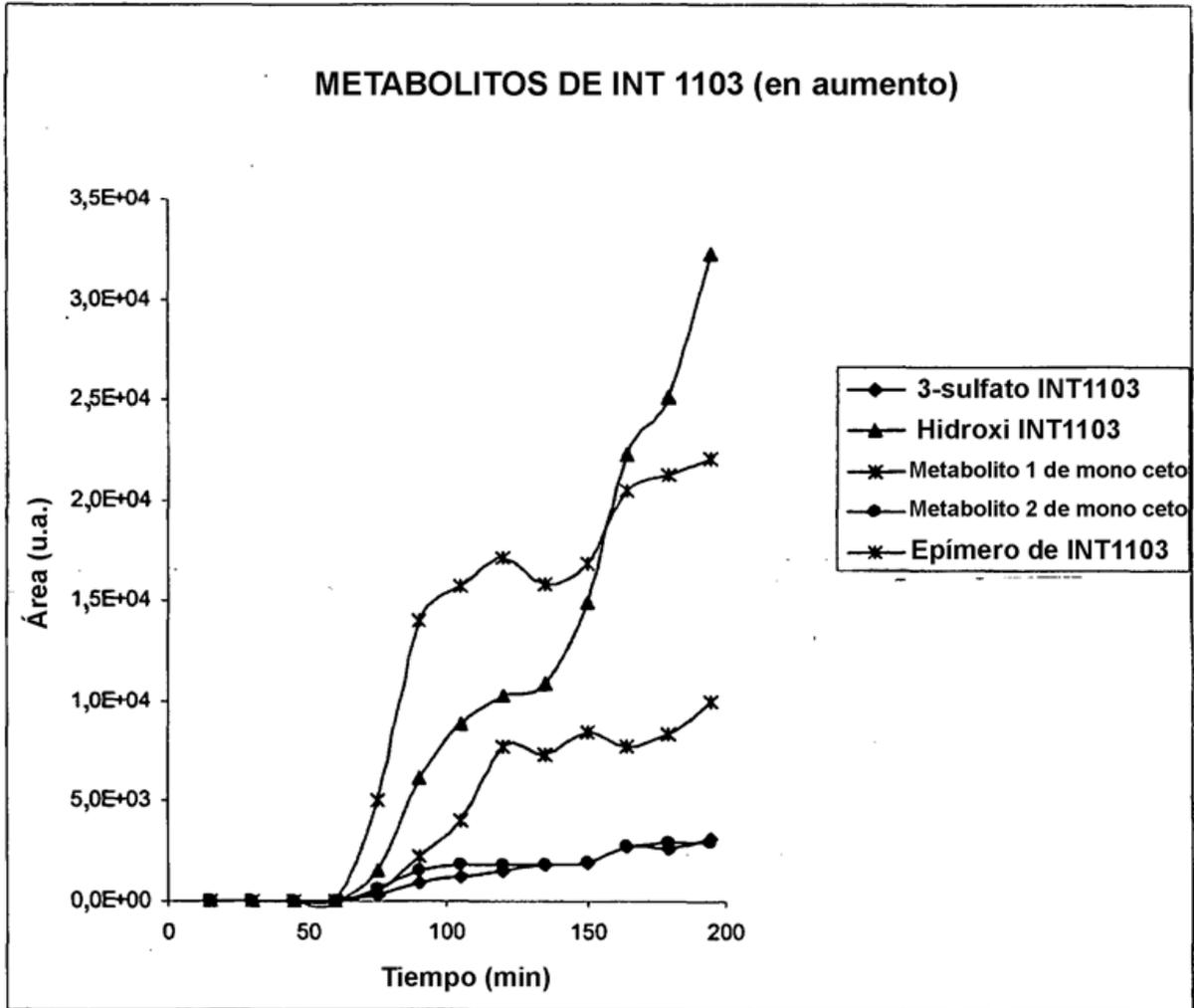


Figura 47

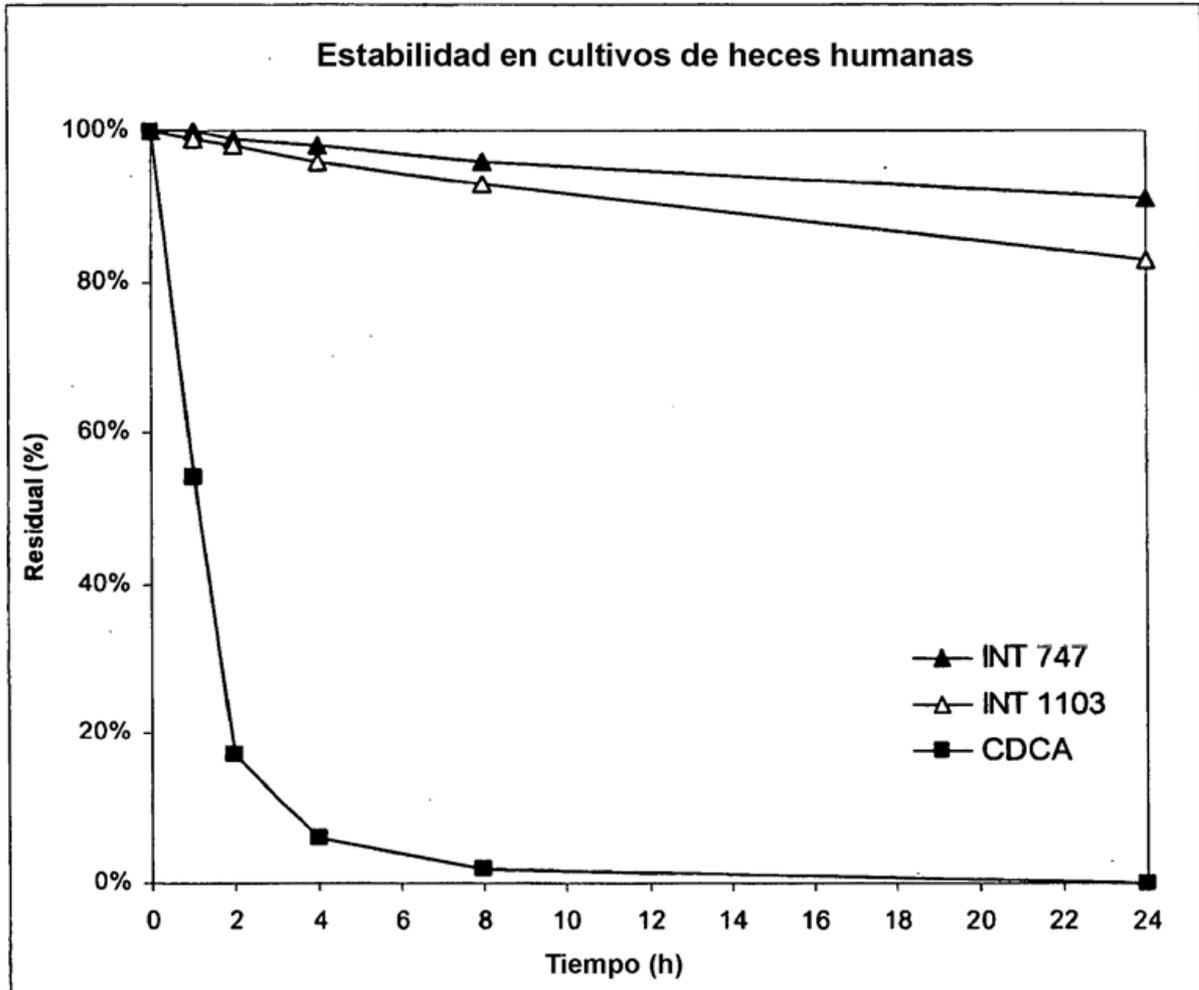


Figura 48

