

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 718**

51 Int. Cl.:

A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12735100 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2731676**

54 Título: **Nuevos compuestos que modulan la actividad de FXR (NR1H4)**

30 Prioridad:

13.07.2011 EP 11005722
13.07.2011 US 201161507153 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2016

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

KINZEL, OLAF;
STEENECK, CHRISTOPH y
KREMOSER, CLAUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 718 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

Nuevos compuestos que modulan la actividad de FXR (NR1H4)

La presente invención se refiere a compuestos que se unen al receptor NR1H4 (FXR) y actúan como agonistas o moduladores de FXR. La invención además se refiere al uso de los compuestos para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades y/o dolencias a través de la unión a dicho receptor nuclear por dichos compuestos.

Los organismos multicelulares son dependientes de mecanismos avanzados de transmisión de información entre células y compartimientos del cuerpo. La información que se transmite puede ser altamente compleja y puede resultar en la alteración de programas genéticos involucrados en la diferenciación, proliferación o reproducción celular. Las señales, u hormonas, son generalmente moléculas de bajo peso molecular, tales como péptidos, ácidos grasos, o derivados de colesterol.

Muchas de estas señales producen sus efectos cambiando en última instancia la transcripción de genes específicos. Un grupo bien estudiado de proteínas que median la respuesta de una célula a una variedad de señales es la familia de factores de transcripción conocidos como receptores nucleares, denominados a partir de ahora en el presente documento como "NR". Miembros de este grupo incluyen receptores para hormonas esteroides, vitamina D, ecdisona, ácido retinoico cis y trans, hormona tiroidea, ácidos biliares, derivados del colesterol, ácidos grasos (y otros proliferadores peroxisomales), así como los denominados receptores huérfanos, proteínas que son estructuralmente similares a otros miembros de este grupo, pero para los que no se conoce ningún ligando. Los receptores huérfanos pueden ser indicadores de caminos de señalización en la célula desconocidos o pueden ser receptores nucleares que funcionan sin la activación del ligando. La activación de la transcripción mediante algunos de estos receptores huérfanos puede ocurrir en ausencia de un ligando exógeno y/o a través de las rutas de transducción de señales que se originan de la superficie celular (D. J. Mangelsdorf y col., *Cell* 1995, 83, 835; R. M. Evans, *Mol. Endocrinol.* 2005, 19, 1429).

En general, se han definido tres dominios funcionales en NR. Se cree que un dominio amino terminal tiene alguna función reguladora. Va seguido por un dominio de unión al ADN, denominado a partir de ahora en el presente documento como "DBD", que usualmente comprende dos elementos de dedo de zinc y reconoce un elemento de respuesta a hormonas específico, denominado a partir de ahora en el presente documento como "HRE", dentro de los promotores de genes de respuesta. Los restos de aminoácidos específicos del DBD han mostrado que confieren especificidad de unión a la secuencia de ADN (M. Schena y K. R. Yamamoto, *Science* 1988, 241, 965). Un dominio de unión a ligando, denominado a partir de ahora en el presente documento como "LBD" se encuentra en la región del extremo carboxilo de los NR conocidos.

En ausencia de hormona, el LBD parece interferir con la interacción del DBD con su HRE. La unión de la hormona parece dar como resultado un cambio conformacional en el NR y así abre esta interferencia (A. M. Brzozowski y col., *Nature* 1997, 389, 753). Un NR sin el LBD constitutivamente activa la transcripción, pero a un nivel bajo.

Se proponen coactivadores o activadores transcripcionales como conexión entre los factores de transcripción específicos de secuencia, la maquinaria de transcripción base y además alteran la estructura de la cromatina de una célula diana. Varias proteínas como SRC-1, ACTR, y Grip1 interactúan con los NR en una forma mejorada por ligandos (D. M. Heery y col., *Nature* 1997, 387, 733; T. Heinzl y col., *Nature* 1997, 387, 43; K. W. Nettles y G. L. Greene, *Annu. Rev. Physiol.* 2005, 67, 309).

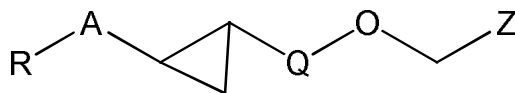
Los moduladores de receptores nucleares como las hormonas esteroides afectan el crecimiento y la función de células específicas mediante la unión a receptores intracelulares y la formación de complejos receptor nuclear a ligando. Los complejos de hormona a receptor nuclear así interactúan con un HRE en la región de control de genes específicos y altera la expresión de genes específicos (A. Aranda y A. Pascual, *Physiol. Rev.* 2001, 81, 1269).

El receptor X farnesoide alfa (en adelante, también denominado a partir de ahora en el presente documento NR1H4 al hacer referencia al receptor humano) es un receptor nuclear prototípico tipo 2 que activa los genes al unirse a la región promotora de los genes diana de una forma heterodimérica con el receptor X retinoide (B. M. Forman y col., *Cell* 1995, 81, 687). Los ligandos fisiológicos relevantes del NR1H4 son los ácidos biliares (D. J. Parks y col., *Science* 1999, 284, 1365; M. Makishima y col., *Science* 1999, 284, 1362). El más potente es el ácido quenodeoxicólico (CDCA), que regula la expresión de varios genes que participan en la homeostasis del ácido biliar. Se describió inicialmente que el farnesol y sus derivados, en conjunto llamados farnesoides activaban el ortólogo de rata a elevada concentración, pero no activan el receptor humano o de ratón. El FXR se expresa en el hígado, en todo el tracto gastrointestinal, incluido el esófago, estómago, duodeno, intestino delgado, colon, ovario, glándula adrenal e hígado. Además de controlar la expresión intracelular de los genes, el FXR también parece estar involucrado en la señalización parácrina y endócrina mediante la regulación positiva de la expresión del factor 15 de crecimiento de fibroblastos de citoquina (roedores) o 19 (monos, humanos, J. A. Holt y col., *Genes Dev.* 2003, 17, 1581; T. Inagaki y col., *Cell Metab.* 2005, 2, 217).

Compuestos de molécula pequeña que actúan como moduladores de FXR se han divulgado en las siguientes publicaciones: WO 2000/037077, WO 2003/015771, WO 2004/048349, WO 2007/076260, WO 2007/092751, WO 2007/140174, WO 2007/140183, WO 2008/051942, WO 2008/157270, WO 2009/005998, WO 2009/012125, WO

2008/025539, y WO 2008/025540. Recientemente se han reseñado otros moduladores de FXR de molécula pequeña (R. C. Buijsman y col., Curr. Med. Chem 2005, 12, 1017).

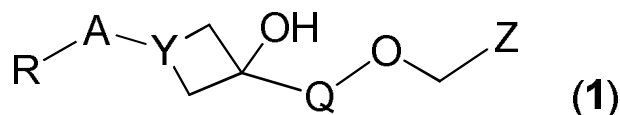
En el documento WO 2011/020615 se divulgan compuestos ciclopropilideno quirales de la siguiente fórmula general



5 en la que las variables se definen de manera similar a como lo están en la presente solicitud.

El problema subyacente a la presente invención es generar agonistas de FXR con propiedades fisicoquímicas mejoradas en general, y una hidrofobia reducida, una solubilidad acuosa mejorada y mejor permeabilidad para membranas, en particular, en comparación con los compuestos reivindicados en el documento WO 2011/020615.

10 Dicho problema ha sido resuelto mediante un compuesto de acuerdo con la siguiente Fórmula (1), un enantiómero, diastereómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos



en la que

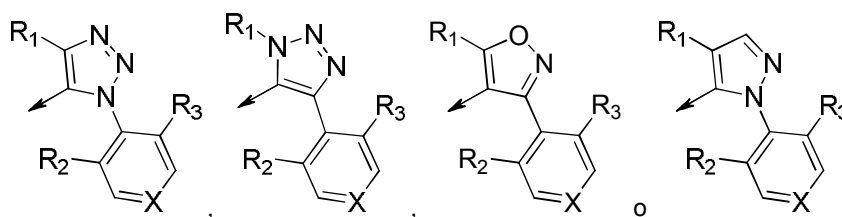
15 R se selecciona del grupo que consiste de COOR₆, CONR₇R₈, tetrazolilo, SO₂NR₇R₈, alquilo C₁₋₆, SO₂-alquilo C₁₋₆ e H, con R₆ independientemente seleccionado del grupo que consiste de H o alquilo C₁₋₆, y R₇ y R₈ seleccionados independientemente entre sí del grupo que consiste de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₁₋₆-R₉, SO₂-alquilo C₁₋₆, en las que R₉ se selecciona del grupo que consiste de COOH, OH y SO₃H;

20 A se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indolilo, tienilo, benzotienilo, indazolilo, bencisoxazolilo, benzofuranilo, benzotriazolilo, furanilo, benzotiazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste de OH, O-alquilo C₁₋₆, O-haloalquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y halógeno;

25 Q se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, tiazolilo, tiofenilo, pirimidilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, halógeno y CF₃;

Y se selecciona de N o CH;

Z se selecciona de



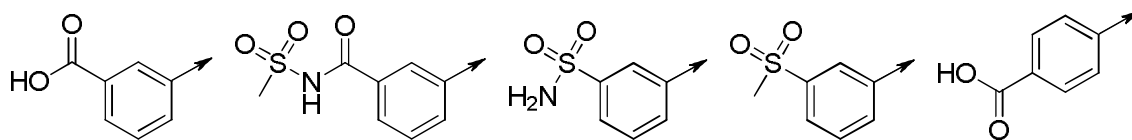
en las que

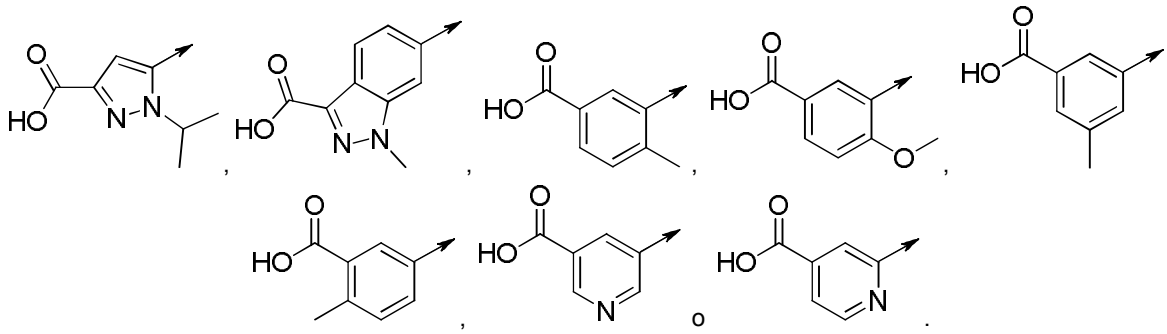
30 X = CH, N, NO;

R₁ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₆, alquilocicloalquilo C₄₋₅, en donde alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo o alcoxi C₁₋₆;

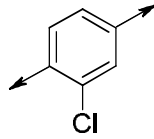
R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y halógeno.

35 En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R-A en el compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) se selecciona de



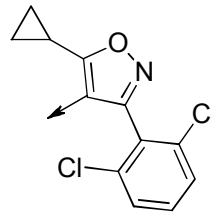


En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, Q en el compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) es



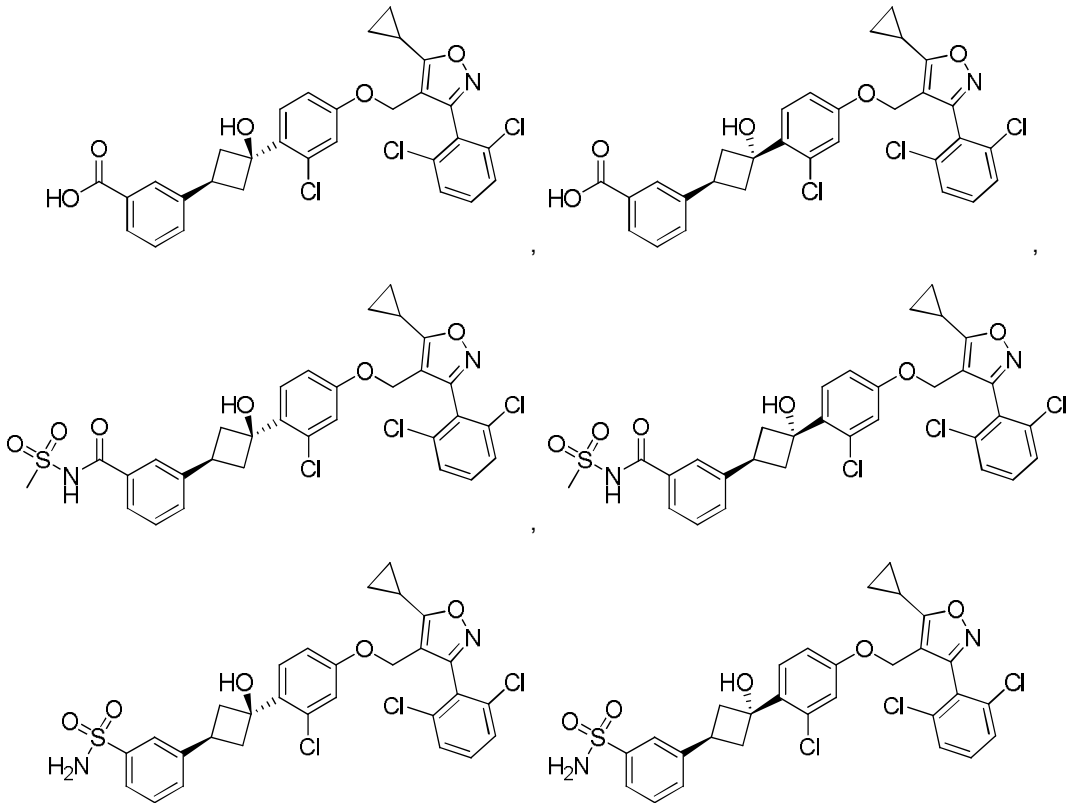
5

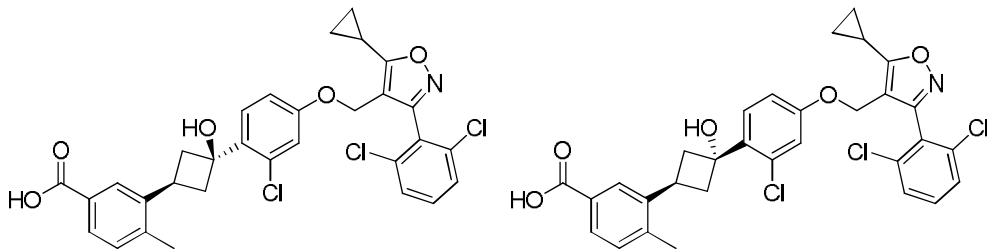
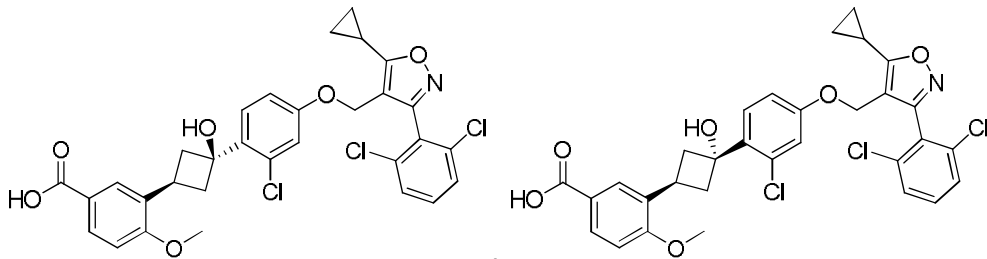
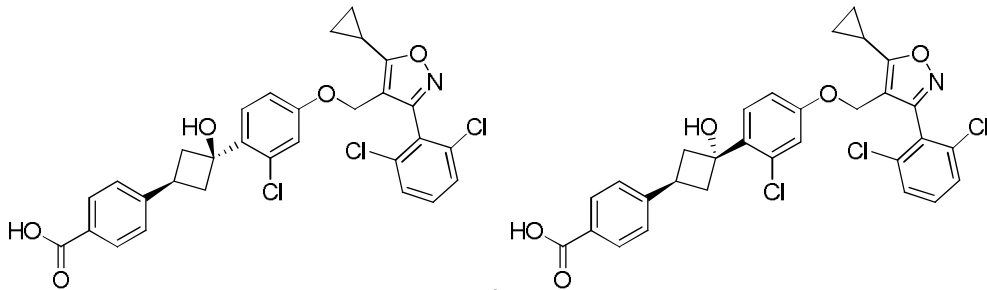
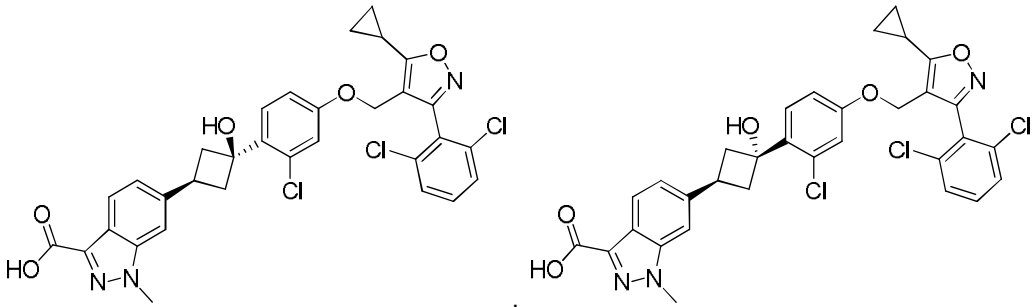
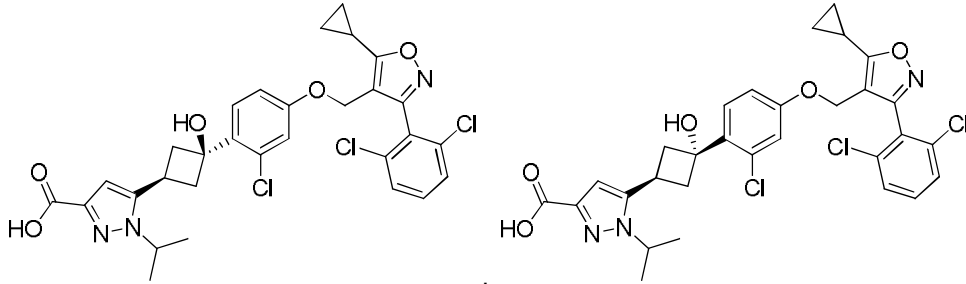
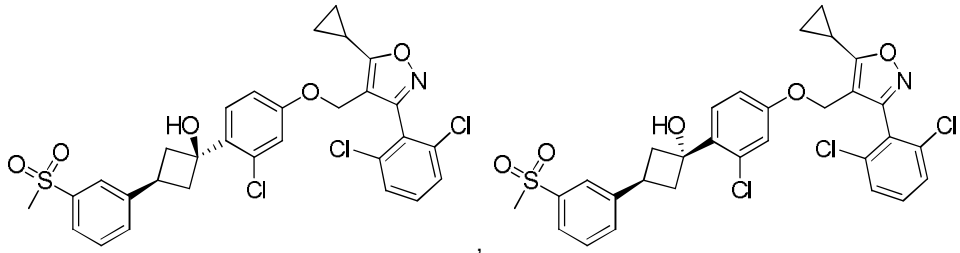
En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, Z en el compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) es

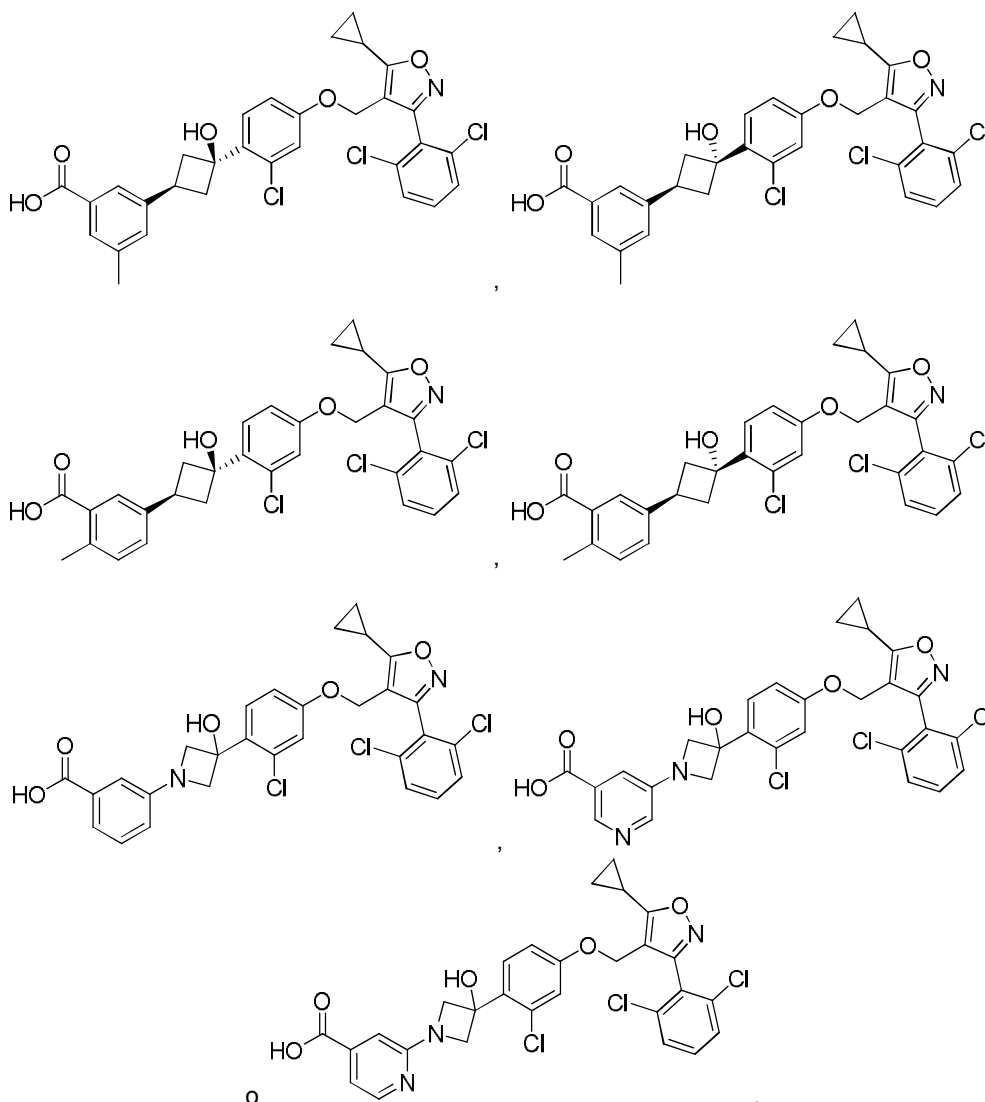


10

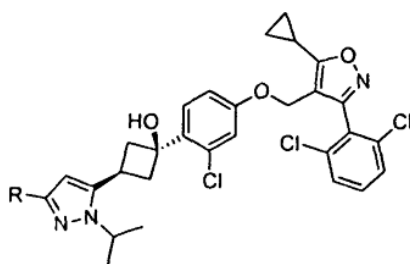
En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) se selecciona de







5 En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) es



en la que R se selecciona del grupo que consiste de CO₂H, CONHSO₂Me, y tetrazolilo.

10 En otra realización, la presente invención está dirigida a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) para su uso como medicamento.

En otra realización, la presente invención está dirigida a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

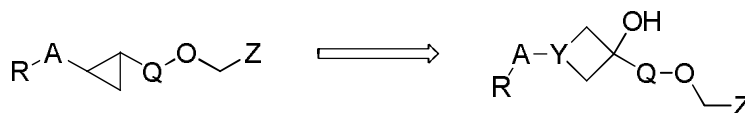
En otra realización, la presente invención está dirigida al uso de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

5 En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad es seleccionada de trastornos colestáticos crónicos intrahepáticos o algunas formas extrahepáticas; fibrosis hepática; trastornos inflamatorios obstructivos o crónicos del hígado; cirrosis hepática; esteatosis hepática y síndromes asociados, efectos colestáticos o fibróticos que están asociados con cirrosis inducida por alcohol o con formas virales de hepatitis; fallo hepático o isquemia hepática luego de hepatectomía mayor; esteatohepatitis asociada con quimioterapia (CASH, por sus siglas en inglés); fallo hepático agudo; y/o enfermedad inflamatoria intestinal.

10 En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad es seleccionada de trastornos de lípidos y lipoproteínas, de diabetes de Tipo II y complicaciones clínicas de diabetes de Tipo I y Tipo II, incluyendo nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y otros efectos observados de diabetes manifestada clínicamente por largo tiempo; trastornos y enfermedades que resultan de degeneración crónica de grasas y fibrótica de órganos debido a la acumulación forzosa de lípidos y específicamente triglicéridos y la subsiguiente activación de las rutas profibróticas, tales como enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD por sus siglas en inglés), o esteatosis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés); obesidad o síndrome metabólico (trastornos combinados de dislipidemia, diabetes e índices de masa corporal anormalmente elevados); y/o de infarto agudo de miocardio, de un accidente cerebrovascular agudo, de trombosis que ocurre como culminación de aterosclerosis obstructiva crónica.

20 En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad es seleccionada de trastornos hiperproliferativos no malignos, de trastornos hiperproliferativos malignos, específicamente de carcinoma hepatocelular, adenoma de colon y poliposis, adenocarcinoma de colon, cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas, esófago de Barret u otras formas de enfermedades neoplásicas del tracto gastrointestinal y del hígado.

Las propiedades físico-químicas mejoradas se han logrados mediante la introducción de un grupo hidroxilo polar en un grupo 1,3-ciclobutilideno o 1,3-azetidilideno en sustitución del anillo 1,2-ciclopropilideno original.



25 Sorprendentemente, los compuestos resultantes mantuvieron su actividad en el receptor FXR, pero demostraron propiedades físico-químicas mejoradas, tales como una mayor solubilidad en agua y/o permeabilidad de membrana.

Los compuestos de la presente invención comparten una estructura química común de acuerdo con la Fórmula (1) en la reivindicación 1.

30 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la presente invención está dirigida a un enantiómero, diastereómero o sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1).

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R en la Fórmula (1) se selecciona del grupo que consiste de COOR₆, CONR₇R₈, SO₂NR₇R₈, y SO₂-alquilo C₁₋₆.

35 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₆ en la Fórmula (1) es H.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₇ y R₈ en la Fórmula (1) se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste de H y SO₂-alquilo C₁₋₆.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₇ en la Fórmula (1) es H.

40 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₈ en la Fórmula (1) es SO₂-alquilo C₁₋₆.

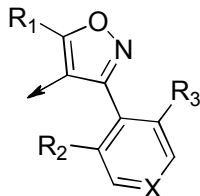
En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indazolilo, y oxadiazolilo.

45 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A está sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₆, más preferentemente alquilo C₁₋₃. En otra realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A no está sustituido.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, Q es fenilo.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, Q está sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de halógeno, más preferentemente un grupo seleccionado de halógeno, en particular Cl.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, Z es



5

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, X = CH.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₁ es cicloalquilo C₃₋₆, en particular ciclopropilo.

10 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de halógeno, en particular Cl.

Cuando puede ocurrir tautomerismo, como por ejemplo el tautomerismo ceto-enólico, de los compuestos de la presente invención o sus profármacos, las formas individuales, como por ejemplo la forma ceto y enólica, están cada una comprendida en el alcance de la invención, así como sus mezclas en cualquier proporción. Lo mismo se aplica para estereoisómeros, como por ejemplo enantiómeros, isómeros cis/trans, conformeros y lo similar.

15 Si se desea, se pueden separar los isómeros mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por cromatografía líquida. Lo mismo se aplica para los enantiómeros al utilizar, por ejemplo, fases estacionarias quirales. Adicionalmente, se pueden aislar los enantiómeros al convertirlos en diastereómeros, es decir, acoplándolos a un compuesto auxiliar enantioméricamente puro, seguido por la separación de los diastereómeros resultantes y escisión del resto auxiliar. Alternativamente, se puede obtener cualquier enantiómero de un compuesto
20 de la presente invención a partir de la síntesis estereoselectiva utilizando materiales de partida ópticamente puros. Otra forma de obtener enantiómeros puros a partir de mezclas racémicas utilizaría cristalización enantioselectiva con contraiones quirales.

Los compuestos de la presente invención pueden estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluso bases o ácidos inorgánicos y bases o ácidos orgánicos. En caso de que los compuestos de la presente invención contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprenderá sus correspondientes sales farmacéutica o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. De esta forma, los compuestos de la presente invención que contienen grupos ácidos
30 pueden estar presentes en estos grupos y pueden utilizarse de acuerdo con la invención, por ejemplo, como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o sales de amonio. Ejemplos más precisos de dichas sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoníaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los compuestos de la presente invención que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que pueden ser protonados, pueden estar presentes y pueden ser utilizados de acuerdo con la invención en la forma de sus sales de adición con ácidos
35 inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfáminico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico,
40 ácido cítrico, ácido adípico, y otros ácidos conocidos para la persona experta en la técnica. Si los compuestos de la presente invención simultáneamente contienen grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sales mencionadas, sales internas o betaínas (ion híbrido). Las sales respectivas se pueden obtener por procedimientos habituales que son conocidos por la persona experta en la técnica como, por ejemplo, al poner en contacto a estas con un ácido o base orgánica o inorgánica en un disolvente o dispersante, o por intercambio de aniones o intercambio de cationes con otras sales. La presente invención también incluye todas
45 las sales de los compuestos de la presente invención que, debido a la baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en productos farmacéuticos pero que pueden utilizarse, por ejemplo, como compuestos intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

50 Asimismo, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

"Composición farmacéutica" significa uno o más principios activos y uno o más ingredientes inertes que conforman el transportador, así como cualquier producto que resulta, directa o indirectamente, de la combinación, la formación de complejos o la agregación de dos o más de cualquiera de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. De acuerdo con

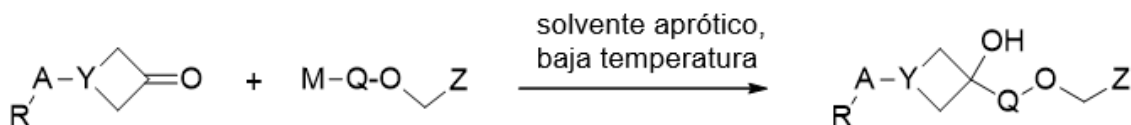
ello, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden cualquier composición obtenida al mezclar al menos un compuesto de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención además puede comprender uno o más de otros compuestos como principios activos como un compuesto profármaco u otros moduladores de receptores nucleares.

Las composiciones son adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y severidad de los trastornos que se estén tratando y de la naturaleza del principio activo. De manera conveniente, se las puede presentar en forma de dosificación unitaria y se las puede preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante una combinación de los procedimientos descritos en los Esquemas I a III. Como se ilustra en el Esquema I, una cetona cíclica de 4 miembros, sustituida con el sustituyente A en la posición 3 puede reaccionar con un anillo aromático o heteroaromático metalado M-Q-O-CH₂Z (M = metal, por ejemplo Li) en disolventes apróticos y preferentemente a bajas temperaturas para producir un anillo de 4 miembros hidroxisustituido que incluye los sustituyentes A y Q. En el caso en que Y es CH pueden formarse dos isómeros (A y Q transanulares cis o trans uno respecto al otro). Bajo dolencias óptimas puede lograrse la formación de principalmente uno de los dos isómeros. Los dos isómeros pueden separarse mediante procedimientos apropiados conocidos en la técnica como por ejemplo cromatografía en gel de sílice o RP-HPLC preparativa.

Esquema I



En el Esquema II se resumen procedimientos que se han utilizado usados para preparar las cetonas cíclicas de 4 miembros necesarias para la síntesis de los compuestos de esta invención. En la opción a) un compuesto intermedio transportador de vinilo, por ejemplo preparado por vinilación de un material de partida que contiene el halógeno correspondiente de fórmula R-A-X (X = halógeno) puede reaccionar con α,α -dicloroceteno formado in situ para formar una 2,2-diclorociclobutanona. Tras la deshalogenación, por ejemplo con Zn en ácido acético a temperatura de reflujo, se obtienen las ciclobutanonas 3-sustituidas deseadas. Alternativamente, los vinil-compuestos intermedios pueden reaccionar con ceteno no sustituido generado in situ para producir en un paso los compuestos intermedios ciclobutanona deseados. En la opción b) se usa como material de partida 3-metilenciclobutancarbonitrilo. Se pueden construir heterociclos sustituidos a partir del grupo ciano en varios pasos mediante procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Las ciclobutanonas deseadas pueden obtenerse por escisión oxidativa del doble enlace exocíclico utilizando dolencias y reactivos conocidos del experto en la técnica, por ejemplo mediante el uso de OsO₄, ozono o RhCl₃/NaIO₄ como oxidantes. La opción c) muestra los procedimientos usados para preparar las azetidionas sustituidas. El acoplamiento cruzado C-N catalizado por Cu o Pd entre la 3-hidroxiacetidina y los anillos haloaromáticos o haloheteroaromáticos produce las azetidinas 3-hidroxi N-sustituidas que se pueden transformar en las azetidionas deseadas por oxidación.

complicaciones clínicas de diabetes de Tipo I y Tipo II, de trastornos y enfermedades que resultan de degeneración crónica de grasas y fibrótica de órganos debido a la acumulación forzosa de lípidos y específicamente triglicéridos y la subsiguiente activación de las rutas profibróticas, de obesidad y síndrome metabólico (dolencias combinadas de dislipidemia, diabetes e índices de masa corporal anormalmente elevados), de infarto agudo de miocardio, de un accidente cerebrovascular agudo, de trombosis que ocurre como culminación de aterosclerosis obstructiva crónica, de infecciones persistentes por bacterias intracelulares o protozoos parasitarios, de trastornos hiperproliferativos no malignos, de trastornos hiperproliferativos malignos, de adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular, en particular, de esteatosis de hígado y síndromes relacionados, de falla de hígado o malfuncionamiento del hígado como resultado de enfermedades crónicas del hígado o de hepatectomía, de infección por hepatitis B, de infección por hepatitis C y/o de colestasis o efectos fibróticos que son asociados con la cirrosis inducida por alcohol o con formas virales de hepatitis.

Los medicamentos como los que se citan en el presente documento se pueden preparar mediante procedimientos convencionales, incluida la combinación de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Se propone que el FXR es un sensor nuclear de ácido biliar. Como resultado, modula tanto la producción sintética de los ácidos biliares en el hígado y su reciclado en el intestino (al regular las proteínas de unión del ácido biliar). Pero más allá de la fisiología del ácido biliar, parece que el FXR está involucrado en la regulación de muchos procedimientos fisiológicos diversos que son relevantes en la etiología y para el tratamiento de enfermedades tan diversas como cálculos biliares de colesterol, trastornos metabólicos tales como Diabetes de Tipo II, dislipidemias u obesidad, enfermedades inflamatorias crónicas tales como Enfermedad Inflamatoria Intestinal o formas intrahepáticas crónicas de colestasis y muchas otras enfermedades (T. Claudel y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 2020; Y. D. Wang y col., *Cell Res.* 2008, 18, 1087).

El FXR regula un patrón complejo de genes de respuesta en el hígado y en el tracto gastrointestinal. Los productos génicos alteran diferentes procesos fisiológicos. En el curso del análisis funcional del FXR, la primera red regulatoria que se analizó fue la regulación de la síntesis de ácidos biliares. Mientras que los LXR inducen las enzimas clave de la conversión del colesterol a ácidos biliares, Cyp7A1, a través de la inducción del receptor nuclear regulador LRH-1, el FXR reprime la inducción de Cyp7A1 a través de la regulación positiva del ARNm que codifica SHP, un receptor nuclear adicional que es represivo dominante sobre LRH-1. Debido a que el FXR se une a los productos finales de esta ruta, los ácidos biliares primarios tales como ácido cólico (CA) o CDCA, esto puede ser tomado como un ejemplo de inhibición de retroalimentación en el nivel de expresión del gen (B. Goodwin y col., *Mol. Cell* 2000, 6, 517; T. T. Lu y col., *Mol. Cell* 2000, 6, 507). En paralelo a la represión de la síntesis del ácido biliar a través de SHP, el FXR induce una gama de los llamados transportadores ABC (por sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette*, cassette de unión a ATP) que son responsables de la exportación de los ácidos biliares tóxicos desde el citosol del hepatocito hacia los canalículos, las ramificaciones de los pequeños ductos biliares donde se origina la bilis. Esta función hepatoprotectora del FXR fue evidente primero con el análisis de ratones con inactivación génica del FXR (C. J. Sinal y col., *Cell* 2000, 102, 731) donde se observó expresión defectiva o excesiva de varios transportadores ABC en el hígado. Un análisis detallado adicional reveló que la bomba excretora principal de sales biliares BSEP o ABCB11 (M. Ananthanarayanan y col., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28857; J. R. Plass y col., *Hepatology* 2002, 35, 589) así como la enzima clave que media la transferencia de lípidos desde lipoproteínas a fosfolípidos, PLTP (N. L. Urizar y col., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 39313), y los dos transportadores clave de la membrana canalicular para fosfolípidos, MRP-2 (ABCC4) (H. R. Kast y col., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 2908) y MDR-3 (ABCB4) (L. Huang y col., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51085) son dianas directas para la activación transcripcional dirigida por ligandos mediante FXR (reseñado en: M. Miyata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 312, 759; G. Rizzo y col., *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005, 5, 289).

El hecho de que el FXR parece ser el principal sensor de metabolitos y regulador de la síntesis, exportación y recirculación de los ácidos biliares sugirió el uso de los ligandos de FXR para inducir el flujo de bilis y cambiar la composición del ácido biliar hacia una composición más hidrofílica. Con el desarrollo del primer ligando sintético de FXR, el GW4064 (P. R. Maloney y col., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 2971; T. M. Willson y col., *Med. Res. Rev.* 2001, 21, 513), como un compuesto herramienta y del ligando de ácido biliar semisintético artificial 6-alfa-etil-CDCA, se pudieron analizar los efectos de la superestimulación de FXR por agonistas potentes. Se ha demostrado que ambos ligandos inducen el flujo de bilis en animales con ducto biliar ligado. Asimismo, además de los efectos coleréticos, también se pudieron demostrar los efectos hepatoprotectores (R. Pellicciari y col., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3569; Y. Liu y col., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1678). Este efecto hepatoprotector quedó adicionalmente limitado a un efecto antifibrótico que resulta de la represión de los inhibidores de tejidos de las metaloproteinasas de Matriz, TIMP-1 y 2, la inducción de las metaloproteinasas 2 de matriz que determinan el depósito de colágeno en las células estrelladas hepáticas y la subsiguiente reducción del ARNm de alfa-colágeno y del ARNm de factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), que son ambos factores profibróticos, mediante agonistas de FXR (S. Fiorucci y col., *Gastroenterology* 2004, 127, 1497; S. Fiorucci y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 314, 584). Asimismo, se demostró la actividad anticolestática en los modelos animales con conducto biliar ligado, así como en modelos animales de colestasis inducida por estrógenos (S. Fiorucci y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 313, 604).

Estudios genéticos demuestran que en las formas hereditarias de colestasis (colestasis intrahepática familiar progresiva = PFIC, Tipo I – IV), se reduce la localización nuclear del propio FXR como consecuencia de una

mutación en el gen FIC1 (en PFIC Tipo I, también llamada enfermedad de Byler) (F. Chen y col., *Gastroenterology* 2004, 126, 756; L. Álvarez y col., *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 2451) o se reducen los niveles del gen diana FXR que codifica la bomba de exportación de fosfolípido MDR-3 (en PFIC Tipo III). Tomadas en conjunto, un número creciente de pruebas indica que los compuestos de unión a FXR demostrarán utilidad clínica sustancial en el régimen terapéutico de dolencias colestáticas crónicas tales como cirrosis biliar primaria (CBP) o colangitis esclerosante primaria (CEP) (reseñado en: G. Rizzo y col. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005, 5, 289; G. Zollner y col., *Mol. Pharm.* 2006, 3, 231; S. Y. Cai y col., *Expert Opin. Ther. Targets* 2006, 10, 409).

El impacto profundo que tiene la activación de FXR en el metabolismo y la excreción del ácido biliar no solamente es relevante para los síndromes colestáticos sino aún más directamente para un tratamiento contra la formación de cálculos biliares. Los cálculos biliares de colesterol se forman debido a la baja solubilidad del colesterol que se bombea activamente fuera de la célula hepática hacia el lumen de los canalículos. Lo que determina la formación de micelas mixtas y, de esta forma, la solubilidad aparente del colesterol libre en la bilis, es el porcentaje relativo del contenido de los tres componentes principales, ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol libre. Los polimorfismos de FXR se cartografían como loci de un rasgo cuantitativo, como factor que contribuye a la enfermedad de cálculos biliares (H. Wittenburg, *Gastroenterology* 2003, 125, 868). Utilizando el compuesto herramienta sintética de FXR GW4064 se pudo demostrar que la activación del FXR conduce a una mejora del índice de saturación del colesterol (ISC) y directamente a la supresión de la formación de cálculos biliares en ratones susceptibles a cálculos biliares C57L mientras que el tratamiento con fármacos en ratones con FXR inactivado genéticamente no muestra efecto alguno en la formación de cálculos biliares (A. Moschetta y col., *Nature Medicine* 2004, 10, 1352).

Estos resultados califican al FXR como buena diana para el desarrollo de agonistas de molécula pequeña que pueden utilizarse para prevenir la formación de cálculos biliares de colesterol o para prevenir que se vuelvan a formar los cálculos biliares tras la extracción quirúrgica o litotripsia por ondas de choque (tratado en: S.A. Doggrell, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2006, 7, 344).

Así, en una realización de la invención, el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) y las composiciones farmacéuticas que comprenden dicho compuesto se utilizan para la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos inflamatorios obstructivos o crónicos que surgen de composiciones biliares inadecuadas tales como colelitiasis también conocida como cálculos biliares de colesterol.

Además de los efectos hepatoprotectores y coleréticos, así como antifibróticos que el FXR muestra sobre la activación estimulada por moléculas pequeñas en el hígado, el FXR parece tener un rol en la protección del intestino contra la transformación neoplásica y contra el desarrollo de pólipos y su transición a adenocarcinoma en el intestino (S. Modica y col., *Cancer Res.* 2008, 68, 9589 y R. R. Maran y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009, 328, 469). Análogamente a la situación en el intestino, la ausencia de FXR conduce a un importante aumento en la formación de carcinoma hepatocelular (HCC), la forma más prominente de cáncer de hígado (I. Kim y col., *Carcinogenesis* 2007, 28, 940 y F. Yang y col., *Cancer Res.* 2007, 67, 863). Mientras que un FXR funcional previene la formación de adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular, la activación de FXR induce la regeneración del hígado tras la hepatectomía (W. Huang y col., *Science* 2006, 312, 233).

Los efectos hepatoprotectores antineoplásicos combinados y los efectos regenerativos del hígado asociados con la activación del FXR se pueden aprovechar terapéuticamente para el uso de agonistas de FXR en el tratamiento de enfermedades graves del hígado. En una realización, los compuestos de acuerdo con la invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos se utilizan en el tratamiento de enfermedades del hígado tales como HCC, la estimulación de la regeneración del hígado y el mejoramiento de efectos secundarios asociados con una hepatectomía mayor, cirrosis de hígado independiente de la etiología y la prevención o el tratamiento de isquemia de hígado en el transcurso del trasplante de hígado o una cirugía hepática mayor.

Desde el descubrimiento del primer agonista de FXR sintético y su administración a roedores, se hizo evidente que el FXR es un regulador clave de los triglicéridos séricos (P. Maloney y col., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 2971; T. Willson y col., *Med. Res. Rev.* 2001, 21, 513). Durante los últimos seis años se ha publicado evidencia acumulada sobre la activación de FXR por agonistas sintéticos que conducen a la reducción significativa de triglicéridos séricos, principalmente en la forma de VLDL reducido, y también para la reducción del colesterol sérico total (H. R. Kast y col., *Mol. Endocrinol.* 2001, 15, 1720; N. L. Urizar y col., *Science* 2002, 296, 1703; G. Lambert y col., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 2563; M. Watanabe y col., *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 1408; A. Figge y col., *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 2790; S. Bilz y col., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, 290, E716).

Sin embargo, la disminución de triglicéridos séricos no es un efecto independiente. El tratamiento de ratones db/db u ob/ob con el agonista de FXR sintético GW4064 da como resultado una reducción marcada y combinada de los triglicéridos séricos, colesterol total, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos tales como 3-OH Butirato. Además, la activación de FXR está involucrada en la ruta de señalización de insulina intracelular en hepatocitos, lo que deriva en la reducción de la producción de glucosa a partir de la gluconeogénesis hepática, pero produce el incremento concomitante del glicógeno hepático. La sensibilidad a insulina, así como la tolerancia a la glucosa, tuvieron un impacto positivo con el tratamiento de FXR (K. R. Stayrook y col., *Endocrinology* 2005, 146, 984; Y. Zhang y col., *PNAS* 2006, 103, 1006; B. Cariou y col., *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 11039; K. Ma y col., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1102; D. Duran-Sandoval y col., *Biochimie* 2005, 87, 93). También se observó recientemente un efecto en la

reducción del peso corporal en los ratones sobrealimentados con una dieta elevada en lípidos (C. Lihong y col., American Diabetes Association (ADA) 66^a sesiones científicas anuales, junio de 2006, resumen número 856-P). Este efecto de pérdida de peso puede ser el resultado de la inducción de FGF-19 del FXR, un factor de crecimiento fibroblástico que es conocido por conducir a la pérdida de peso y fenotipo de atleta (J. Holt y col., Genes Dev. 2003, 17, 1581; E. Tomlinson y col., Endocrinology 2002, 143, 1741). En solicitudes de patente recientes, se demostró el efecto del agonista de FXR sobre la reducción del peso corporal (WO 2004/087076; WO 2003/080803).

Tomados en conjunto, estos efectos farmacológicos de los agonistas de FXR pueden aprovecharse de diferentes formas terapéuticas: se cree que los compuestos de unión de FXR son buenos candidatos para el tratamiento de la diabetes de Tipo II debido a su sensibilidad a la insulina y efectos glicogenogénicos y de disminución de lípidos.

En una realización, los compuestos de acuerdo con la invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos se utilizan en la profilaxis y/o el tratamiento de la diabetes de Tipo II que puede ser superada mediante la regulación positiva mediada por FXR, de la sensibilidad sistémica a la insulina y la señalización intracelular a la insulina en el hígado, el incremento en la utilización y la metabolización de glucosa periférica, el incremento del almacenamiento de glicógeno en el hígado, la disminución de la producción de glucosa en suero a partir de la gluconeogénesis originada en el hígado.

En una realización adicional, dichos compuestos y composiciones farmacéuticas se utilizan para la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos intrahepáticos crónicos, tal como cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis familiar progresiva (PFIC), cirrosis inducida por alcohol y colestasis asociada, y algunas formas de trastornos extrahepáticos colestáticos, o fibrosis hepática resultante de trastornos colestáticos crónicos o trastornos colestáticos intrahepáticos agudos tal como colestasis inducida por estrógenos o fármacos.

La invención también se refiere a un compuesto de la Fórmula (I) o a la composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para la profilaxis y/o el tratamiento de dolencias gastrointestinales con un consumo reducido de grasa dietaria y vitaminas dietarias solubles en grasa que pueden superarse por incremento de los niveles intestinales de los ácidos biliares y fosfolípidos.

En una realización adicional, dicho compuesto o composición farmacéutica se utiliza para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de trastornos de lípidos y lipoproteínas tales como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, y aterosclerosis como una condición clínicamente manifiesta que puede mejorarse mediante el efecto beneficioso del FXR sobre la disminución del colesterol plasmático total, reduciendo los triglicéridos séricos, aumentando la conversión de colesterol hepático a ácidos biliares e incrementando la eliminación y la conversión metabólica de VLDL y otras lipoproteínas en el hígado.

En una realización adicional, dicho compuesto y composición farmacéutica se utilizan para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades donde la combinación de la disminución de lípidos, los efectos antiolestáticos y antifibróticos de los medicamentos dirigidos a FXR se puede explotar para el tratamiento de esteatosis hepática y síndromes asociados tales como esteatohepatitis no alcohólica ("NASH") o para el tratamiento de los efectos colestáticos y fibróticos que se asocian a la cirrosis inducida por alcohol, o con formas de hepatitis originadas por virus.

Junto con los efectos hipolipidémicos, también se demostró que la pérdida de FXR funcional conduce a un incremento en aterosclerosis en ratones knock-out ApoE (E. A. Hanniman y col., J. Lipid Res. 2005, 46, 2595). Por consiguiente, los agonistas de FXR podrían tener utilidad clínica como fármacos anti-ateroescleróticos y cardioprotectores. La regulación negativa de Endotelina-1 en las Células del Músculo Liso Vascular también podría contribuir a dichos efectos terapéuticos beneficiosos (F. He y col., Circ. Res. 2006, 98, 192).

La invención también se refiere a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para tratamiento preventivo y postraumático de trastornos cardiovasculares tales como infarto agudo del miocardio, accidente cerebrovascular grave, o trombosis que ocurre como culminación de aterosclerosis obstructiva crónica.

Además de controlar la formación de pólipos intestinales y colónicos, el FXR parece expresarse en el tejido y las líneas celulares del cáncer de mama pero no en el tejido sano de mama y parece interactuar con el receptor de estrógeno en las células de cáncer de mama ER positivo (K. E. Swales y col., Cancer Res. 2006, 66, 10120 y F. Journe y col., Breast Cancer Res. Treat. 2009, 115, 523).

Esto permitiría considerar al FXR también como una diana potencial para el tratamiento de enfermedades proliferativas, especialmente formas de cáncer metastásico que expresan una forma de FXR que responde a moléculas pequeñas.

En una realización adicional, dichos compuestos y composiciones farmacéuticas se utilizan para la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos hiperproliferativos malignos tales como diferentes formas de cáncer, específicamente ciertas formas de cáncer de mama, hígado o colon, donde la interferencia con un ligando de FXR tendrá un impacto beneficioso.

Finalmente, el FXR también parece estar involucrado en el control de las defensas antibacterianas en el intestino (T. Inagaki y col., PNAS. 2006, 103, 3920) aunque no se proporciona un mecanismo exacto. Sin embargo, a partir de estos datos publicados, se puede concluir que el tratamiento con agonistas de FXR podría tener un impacto beneficioso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), en particular aquellas formas donde la parte superior (ileal) del intestino es afectada (por ejemplo, enfermedad ileal de Crohn) ya que esta parece ser el sitio de acción del control de FXR sobre el crecimiento bacteriano. En las IBD, la desensibilización de la respuesta inmune adaptativa es de alguna forma perjudicada en el sistema inmune intestinal. El sobrecrecimiento bacteriano podría ser, entonces, el detonante causal del establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica. Así, la reducción del crecimiento bacteriano por mecanismos originados por FXR podría ser un mecanismo clave para prevenir episodios inflamatorios agudos.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad de Crohn o Colitis ulcerosa. Se cree que la restauración mediada por FXR de la función de la barrera intestinal y la reducción en la carga bacteriana no comensal son útiles para la reducción de la exposición de antígenos bacterianos al sistema inmune intestinal y puede, por lo tanto, reducir las respuestas inflamatorias.

La invención se refiere además a un compuesto o una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de la obesidad y trastornos relacionados tales como síndromes metabólicos (dolencias combinados de dislipidemias, diabetes e índices de masa corporal anormalmente elevados) que pueden superarse por la disminución mediada por FXR de triglicéridos séricos, glucosa en sangre e incremento de la sensibilidad de insulina y la pérdida de peso mediada por FXR.

En una realización adicional, los compuestos o la composición farmacéutica de la presente invención son útiles en la prevención y/o el tratamiento de complicaciones clínicas de la diabetes de Tipo I y Tipo II. Son ejemplos de dichas complicaciones la nefropatía diabética, la retinopatía diabética, la neuropatía diabética, o la enfermedad vascular periférica oclusiva (PAOD). La presente invención también abarca otras complicaciones clínicas de la diabetes.

Asimismo, también se pueden evitar y/o tratar las dolencias y enfermedades que sean resultado de la degeneración crónica de grasas y fibrótica de órganos debido a la acumulación forzosa de lípidos y específicamente triglicéridos y subsiguiente activación de las rutas profibróticas mediante la aplicación de los compuestos o composición farmacéutica de la presente invención. Dichas dolencias y enfermedades abarcan esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y dolencias colestáticas crónicas en el hígado, glomeruloesclerosis y nefropatía diabética en el riñón, degeneración macular y retinopatía diabética del ojo y enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer en el cerebro, o neuropatías diabéticas en el sistema nervioso periférico.

En uso práctico, los compuestos de la presente invención pueden combinarse como principio activo en mezcla completa con un transportador farmacéutico de acuerdo con técnicas de formulación farmacéutica convencionales. El transportador puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de composiciones para forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, preservantes, agentes colorantes y lo similar en el caso de preparaciones orales líquidas, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o portadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y lo similar en el caso de preparaciones sólidas tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas duras y blandas, siendo las preparaciones orales sólidas preferidas sobre las preparaciones líquidas.

Debido a su fácil administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosificación unitaria oral más ventajosa en cuyo caso obviamente se utilizan transportadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas usuales acuosas o no acuosas. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1 por ciento de principio activo. El porcentaje de principio activo en estas composiciones puede, desde luego, ser variado y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 60 por ciento de peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación efectiva. Los principios activos también pueden administrarse intranasalmente como, por ejemplo, gotas líquidas o aerosol.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente endulzante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo que antecede, un transportador líquido tal como un aceite graso.

Otros muchos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del principio activo, sacarosa como un agente endulzante, metil y propilparabenos como preservantes, un colorante y un saborizante tal como sabor a cereza o naranja.

Como los compuestos de la presente invención mayormente representan ácidos carboxílicos o isómeros aniónicos similares de los mismos, y debido a que es bien conocido que las formas salinas de los compuestos de fármaco iónicos pueden afectar sustancialmente la biodisponibilidad de los compuestos de fármaco, también se pueden utilizar los compuestos de la presente invención como sales con varios contracciones para proporcionar una formulación oralmente disponible. Tales cationes farmacéuticamente aceptables pueden ser, entre otros, iones monovalentes o bivalentes tales como amonio, los metales alcalinos sodio o potasio o los metales alcalinotérreos magnesio o calcio, ciertas aminas farmacéuticamente aceptables tales como tris(hidroxilometil)aminometano, etilendiamina, dietilamina, piperazina u otras, o ciertos aminoácidos catiónicos tales como lisina o arginina.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse parenteralmente. Se pueden preparar soluciones o suspensiones de estos principios activos en agua adecuadamente mezclados con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En dolencias normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un preservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida como para permitir una fácil aplicación por jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Se puede emplear cualquier ruta adecuada de administración para proporcionar a un mamífero, especialmente un ser humano, una dosis eficaz de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, se puede emplear la vía oral, rectal, tópica, parenteral, ocular, pulmonar, nasal, y lo similar. Las formas de dosificación incluyen comprimidos, pastillas para chupar, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, ungüentos, aerosoles, y similares. Preferentemente los compuestos de la presente invención se administran oralmente.

La dosificación eficaz del principio activo empleado puede variar dependiendo del compuesto particular utilizado, el modo de administración, el trastorno que está siendo tratado y la gravedad del trastorno que está siendo tratado. Una persona experta en la técnica puede fácilmente determinar dicha dosificación.

Al tratar o prevenir los trastornos mediados por FXR para los que se indican los compuestos de la presente invención, en general se obtienen resultados satisfactorios cuando se administran los compuestos de la presente invención en una dosificación diaria de aproximadamente 0,1 miligramos hasta aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del animal, preferentemente administrada como una dosis única diaria o en dosis divididas dos a seis veces por día, o en forma de liberación continua. Para la mayoría de los mamíferos grandes, la dosificación total diaria es de aproximadamente 1,0 miligramos hasta aproximadamente 1000 miligramos, preferentemente de aproximadamente 1 miligramo hasta aproximadamente 50 miligramos. En el caso de un ser humano adulto de 70 kg, la dosis diaria total generalmente será de aproximadamente 7 miligramos hasta aproximadamente 350 miligramos. Este régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

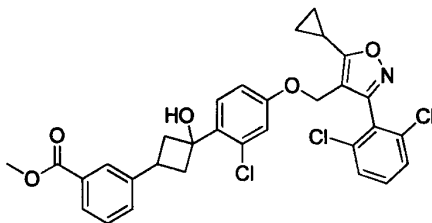
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos de los siguientes esquemas y ejemplos, utilizando los materiales adecuados e ilustrados adicionalmente en los siguientes Ejemplos específicos. Además, al utilizar los procedimientos descritos en la presente memoria, junto con las técnicas habituales de la materia, se pueden preparar fácilmente compuestos adicionales de la presente invención reivindicados en la presente memoria. Sin embargo, los compuestos ilustrados en los Ejemplos no se deben interpretar como parte del único género considerado como invención. Los Ejemplos ilustran además los detalles para la preparación de los compuestos de la presente invención. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que se pueden utilizar variaciones conocidas de condiciones y procedimientos de los siguientes procedimientos de preparación a fin de preparar estos compuestos. En general, se aíslan los presentes compuestos en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como aquellas que se describen anteriormente.

Se pueden generar las bases de amina libre que corresponden a las sales aisladas mediante neutralización con una base adecuada, tal como carbonato de sodio hidrógeno, carbonato de sodio, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio acuoso, y extracción de la base de amina libre liberada a un disolvente orgánico, seguido de evaporación. La base de amina libre, aislada de esta manera, puede convertirse además en otra sal farmacéuticamente aceptable mediante disolución en un disolvente orgánico, seguido del agregado del ácido adecuado y la subsiguiente evaporación, precipitación o cristalización. Los ácidos carboxílicos libres correspondientes a las sales aisladas se pueden generar por neutralización con un ácido adecuado, tal como ácido clorhídrico, sulfato de sodio hidrógeno y fosfato de sodio dihidrógeno acuosos, y extracción del ácido carboxílico libre liberado a un disolvente orgánico, seguido de evaporación. El ácido carboxílico, aislado de esta manera, puede convertirse además en otra sal farmacéuticamente aceptable mediante disolución en un disolvente orgánico, seguido del agregado de la base adecuada y la subsiguiente evaporación, precipitación o cristalización.

A continuación se muestra una ilustración de la preparación de los compuestos de la presente invención. A menos que se indique lo contrario en los Esquemas, las variables tienen el mismo significado que el descrito anteriormente. Los Ejemplos presentados a continuación están dirigidos a ilustrar realizaciones particulares de la invención. Los materiales de partida, los bloques de construcción y los reactivos adecuados empleados en la síntesis como se describe a continuación se encuentran disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich o Acros Organics, por ejemplo, o pueden ser preparados rutinariamente mediante los procedimientos descritos en la literatura, por ejemplo en "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, y Structure", 5ª edición; John Wiley & Sons o T. Eicher, S. Hauptmann "The Chemistry de Heterocíclicos; Structures, Reactions, Synthesis y Application", 2da edición, Wiley-VCH 2003; Fieser y col. "Fieser's Reagents for Organic Synthesis" John Wiley & Sons 2000.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: 3-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoato de metilo (**1**)



Etapa 1: 4-((4-Bromo-3-clorofenoxi)metil)-5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)-isoxazol (1a)

15 A una solución de (5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metanol (13 g, 45,8 mmol) en CH₂Cl₂ (DCM) (200 ml) se añadió gota a gota SOCl₂ (40 ml, 336 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se retiraron los disolventes bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (200 ml) y se añadieron 4-bromo-3-clorofenol (9,7 g, 47 mmol), K₂CO₃ (40 g, 290 mmol) y NaI (12 g, 80 mmol) a esta solución. Se agitó la mezcla a 60 °C durante la noche, a continuación se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (1000 ml) y se extrajo con acetato de etilo (EA) (500 ml × 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 ml × 3), se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (CC) para proporcionar el compuesto **1a** del título (19 g, 88 %) como un sólido blanco.

Etapa 1: 3-(2,2-dicloro-3-oxociclobutil)benzoato de metilo (1b)

25 En un matraz de tres bocas de fondo redondo, bajo atmósfera de nitrógeno, provisto de un condensador, un cabezal agitador y embudo de adición con compensación de presión, se disolvió 3-vinilbenzoato de metilo (5 g, 31 mmol) en Et₂O anhidro (150 ml). A este matraz se añadió polvo de zinc (6 g, 3 eq) y la reacción se sometió a ultrasonidos durante 30 min. Después de este tiempo se añadió gota a gota una solución de cloruro de tricloroacetilo (8,7 ml, 2,5 eq) en Et₂O anhidro (50 ml) mientras continuaba la sonicación durante los siguientes 30 min. Durante el procedimiento la mezcla de reacción se calentó a 35 °C. Se continuó la sonicación durante 2,5 h a temperatura de reflujo y la reacción pareció estar completa por análisis de RMN ¹H. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se inactivó con agua (~50 ml). Esto se hizo de gota a gota intermitente varias veces durante unos pocos minutos ya que ocurrió una reacción exotérmica demorada. Después de 20 min de agitar en agua, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y se enjuagó con Et₂O. La capa orgánica se lavó con porciones de agua (2 x 250 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 250 ml) y salmuera (1 x 250 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto **1b** como un aceite espeso amarillo oscuro. (crudo 8,7 g).

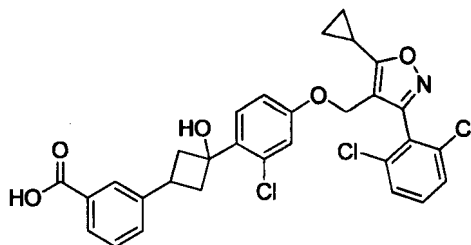
Etapa 2: 3-(3-oxociclobutil)benzoato de metilo (1c)

40 El compuesto crudo **1b** (8,7 g) se disolvió en ácido acético glacial (55 ml) en un matraz de fondo redondo bajo una atmósfera de nitrógeno. A este matraz se le añadió polvo de zinc (4,6 g, 2,2 eq) y la reacción se agitó y se calentó a 120 °C durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite, que se lavó con porciones de EA. La solución combinada se concentró bajo presión reducida antes de disolverse en EA (500 ml), se lavó con salmuera (150 ml x 2) y luego se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró nuevamente. La mezcla cruda se agitó durante 5 min en cloroformo (250 ml) y se filtró a través de un embudo sinterizado. El filtrado se concentró para proporcionar el producto bruto como un aceite amarillo pálido. El producto bruto se purificó mediante CC en (PE/EA = 9:1, PE = éter de petróleo) para proporcionar el producto deseado **1c** (2,5 g, 38 % por 2 etapas) como un aceite amarillo pálido.

Etapa 3: 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoato de metilo (1)

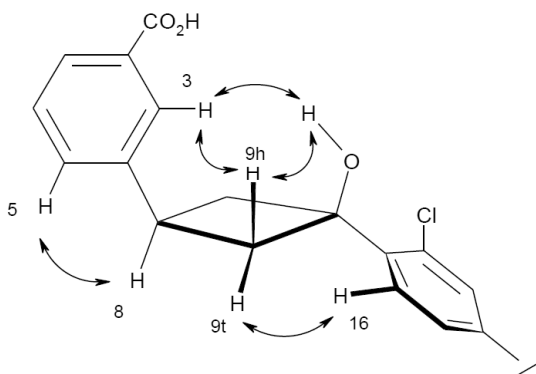
A una solución agitada del compuesto **1a** (1,67 g, 3,5 mmol) en THF anhidro (30 ml) se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexano, 1,2 eq, 1,69 ml) gota a gota durante 10 min a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno. Este se agitó durante 1 h a esta temperatura antes de añadir una solución del compuesto **1c** (0,72 g, 1 eq) en THF anhidro (10 ml) gota a gota y agitando durante 1 h a esta temperatura. Se dejó entibiar la mezcla de reacción a temperatura ambiente lentamente y se dejó agitando toda la noche. La reacción se inactivó con una solución saturada de cloruro de amonio (50 ml) y EA (250 ml).

Se separó la capa orgánica y la capa acuosa se lavó con EA (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto bruto como un aceite pardo. El producto se aisló mediante CC con PE/EA (19:1 a 3:1). La reacción y purificación se repitió dos veces en la misma escala y el producto combinado (3,13 g) se purificó bajo las mismas condiciones para lograr el producto final **1** (1,7 g, 19%). RMN ^1H (CDCl_3): 7,93 (m, 1H), 7,90-7,85 (m, 1H), 7,50-7,30 (m, 5H), 6,88 (s, 1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,20-3,10 (m, 1H), 3,00-2,91 (m, 2H), 2,60-2,49 (m, 2H), 2,15-2,08 (m, 1H), 1,30-1,25 (m, 2H), 1,15-1,10 (m, 2H).

Ejemplo 2: Acido 3-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoico (2)

Se disolvió el compuesto **1** (1,7 g, 2,84 mmol) en THF (100 ml) a temperatura ambiente. Se añadió una solución de LiOH (285 mg, 4,2 eq) en agua (20 ml) y la solución se agitó y se entibió a 35°C durante tres días. Después de este tiempo se eliminó el THF bajo presión reducida. La solución acuosa remanente se diluyó con agua (25 ml) y se lavó con Et_2O (2 x 50 ml). Se transfirió luego la capa acuosa a un matraz de fondo redondo y se acidificó hasta pH 6 utilizando HCl 1N. El precipitado blanco formado se filtró y se secó bajo presión reducida a 50°C para proporcionar el compuesto **2** del título (1,3 g, 78%, isómero único por RMN ^1H y CL-EM) como un sólido blanco. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,98 (s, 1H), 7,86 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,58-7,46 (m, 5H), 7,41 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 6,80 (dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,29-3,25 (m, 2H), 2,96 (m, 1H), 2,55-2,49 (m, 2H), 2,37 (m, 1H), 1,24-1,22 (m, 4H). MS (IEN $^-$) m/z : 584 (582) $[\text{M}-1]^-$.

Las intensidades NOE de relevancia (obtenidas a partir de espectros ROESY; ver flechas abajo) indican que los dos grupos moleculares aromáticos están orientados 1,3-trans en el Ejemplo 2.

**Ruta alternativa al Ejemplo 2**Etapa 1: 3-(3-Bromofenil)ciclobutanona (2a)

Se disolvió *N,N*-dimetilacetamida (9,0 g, 103 mmol) en 1,2-dicloroetano (200 ml). La solución se enfrió a 0°C antes de añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (63 g, 223 mmol). Se agitó la reacción durante 60 min más a 0°C . A continuación se añadieron 1-bromo-3-vinilbenceno (15 g, 81,9 mmol) y 2,4,6-colidina (10,5 g, 86,6 mmol). Se calentó a temperatura de reflujo la reacción durante la noche, se inactivó mediante la adición de agua (300 ml) y se agitó

durante 2 h a temperatura ambiente. Se extrajo la mezcla con DCM (300 ml \times 3). Se secaron las capas orgánicas combinadas con Na₂SO₄ y se concentró *in vacuo*. La purificación mediante CC (EA/PE = 1:20) proporcionó el compuesto **2a** del título (5,0 g, 27 %) como un sólido amarillo pálido.

Etapa 2: 3-(3-Bromofenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (**2b**)

5 A una solución del compuesto **1a** (14 g, 29,6 mmol) en THF anhidro (500 ml) a -78 °C se añadió gota a gota n-BuLi (18,5 ml, 1,6 M en hexano, 29,6 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h adicional a -78 °C y se añadió gota a gota una solución del compuesto **2a** (6,5 g, 28,9 mmol) en THF anhidro (50 ml). La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 1 h y después se entibió a temperatura ambiente y se inactivó con solución acuosa saturada de NH₄Cl (500 ml). Se extrajo la mezcla con EA (500 ml \times 2), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron *in vacuo*. Se purificó el residuo mediante CC (EA/PE = 1:5) para proporcionar el compuesto **2b** del título (6,5 g, 37 %) como un sólido blanco.

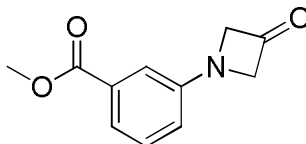
Etapa 3: 3-(3-Cianofenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (**2c**)

15 A una solución del compuesto **2b** (3,1 g, 5 mmol) en DMF (50 ml) se añadieron, bajo atmósfera de argón, Zn(CN)₂ (500 mg, 4,3 mmol), Pd₂(dba)₃ (300 mg, 0,33 mmol) y Xantphos (150 mg, 0,31 mmol). Se agitó la mezcla durante 10 h a 115 °C bajo irradiación con microondas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua (250 ml) y se extrajo con EA (250 ml \times 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml \times 3) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Se purificó el residuo mediante CC (EA/PE) para proporcionar el compuesto **2c** del título (1,2 g, 42 %) como un sólido amarillo.

20 Etapa 4: Acido 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoico (**2**)

A una solución del compuesto **2c** (15 g, 24,2 mmol) en EtOH (750 ml) se añadió una solución acuosa de NaOH (40 g en 100 ml de agua). La mezcla resultante se calentó a temperatura de reflujo durante la noche y después se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se concentró *in vacuo* para remover el disolvente volátil, se diluyó con agua (1000 ml) y se ajustó el pH a 2 con una solución acuosa de HCl diluido (1 N). El precipitado formado se recogió mediante filtración para proporcionar el producto bruto como un sólido amarillo (13,8 g). La purificación mediante HPLC preparativa de fase inversa (RP-HPLC) proporcionó el compuesto **2** del título (8,0 g, 56 %, isómero único por ¹H-NMR) como un sólido blanco.

Ejemplo Preparativo 3

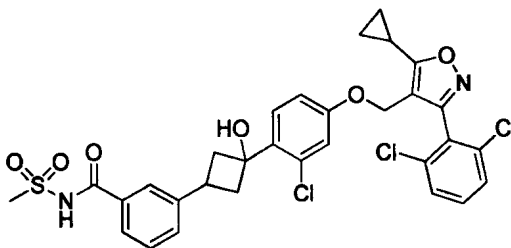


30 Etapa 1: 3-(3-hidroxiacetidin-1-il)benzoato de metilo (**3a**)

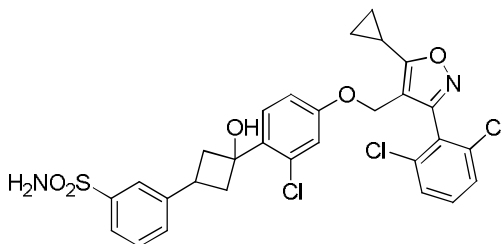
A una solución de 3-yodobenzoato de metilo (4,5 g, 17,2 mmol) en DMSO (30 ml) se añadió sal de clorhidrato de 3-azetidín-3-ol (1,3 g, 11,8 mmol), Cs₂CO₃ (9,5 g, 29,2 mmol), CuI (446 mg, 2,3 mmol) y L-prolina (540 mg, 4,7 mmol) y luego la mezcla se calentó a 90 °C durante 18 h bajo atmósfera de argón. La solución se diluyó con EA y agua, y la capa orgánica se lavó con salmuera tres veces, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante CC (PE/EA = 2:1) para proporcionar el compuesto **3a** (1,6 g, 66 %) como un sólido amarillo.

Etapa 2: 3-(3-oxoacetidin-1-il)benzoato de metilo (**3**)

40 A una solución del compuesto **3a** (1,60 g, 7,7 mmol) en DCM anhidro (30 ml) se añadió peryodinano de Dess-Martin (6,5 g, 15,4 mmol) a 0 °C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h bajo atmósfera de N₂. La mezcla se inactivó con solución saturada de bicarbonato de sodio y se diluyó con EA. La parte orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante CC (PE/EA = 4:1) para proporcionar el compuesto **3** (1,2 g, 75 %) como un sólido blanco.

Ejemplo 4: 3-(3-(2-Cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-N-(metilsulfonil)benzamida (4)

5 A la solución del compuesto **2** (100 mg, 0,17 mmol) en DCM (5 ml) se añadió EDCI·HCl (100 mg, 0,52 mmol), DMAP (100 mg, 0,81 mmol) y MeSO₂NH₂ (40 mg, 0,42 mmol). Se agitó la mezcla a 30 °C durante una noche y a continuación se diluyó con EA y se lavó con H₂O, salmuera y se secó con Na₂SO₄ anhidro. La concentración *in vacuo* y purificación mediante TLC preparativa proporcionó el producto bruto del compuesto buscado como un sólido amarillo claro. La purificación mediante RP-HPLC proporcionó el compuesto **4** del título (38 mg, 33 %) como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ: 7,87 (s, 1H), 7,74 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,61-7,53 (m, 4H), 7,50-7,46 (m, 2H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,80 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,30-3,26 (m, 2H), 3,01 (m, 1H), 2,57-2,51 (m, 2H), 2,37 (m, 1H), 1,25-1,23 (m, 4H). MS (IEN⁻) m/z: 659 [M-1]⁻.

Ejemplo 5: 3-(3-(2-Cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzensulfonamida (5)**Etapa 1: 3-(3-(Benciltio)fenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (5a)**

15 A una solución del compuesto **2b** (619 mg, 1 mmol) en tolueno (20 ml) bajo atmósfera de argón se añadió K₂CO₃ (276 mg, 2 mmol), fenilmetanotiol (125 mg, 1 mmol), Pd₂(dba)₃ (200 mg, 0,22 mmol) y Xantphos (75 mg, 0,16 mmol). A continuación se agitó la mezcla a 115 °C durante 4 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con EA (100 ml × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml × 2), se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron hasta sequedad. La purificación mediante CC proporcionó el compuesto **5a** (200 mg; 30 %) como un sólido amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,36-7,32 (m, 3H), 7,28-7,07 (m, 9H), 7,01 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,66 (dd, J = 8,8, 2,0 Hz, 1H), 4,75 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,06-3,00 (m, 2H), 2,84-2,78 (m, 2H), 2,44-2,38 (m, 3H), 2,09 (m, 1H), 1,24-1,18 (m, 2H), 1,11-1,08 (m, 2H). MS (IEN⁺) m/z: 662 [M+1]⁺.

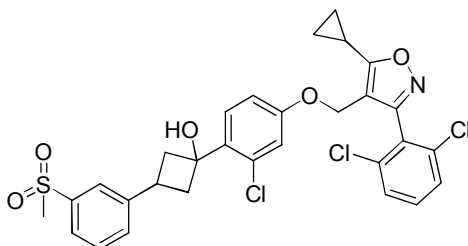
Etapa 2: Cloruro de 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzen-1-sulfonilo (5b)

25 A una solución del compuesto **5a** (34 mg, 0,05 mmol) en CH₃CN/HOAc/H₂O (1 ml/37 μl/25 μl) se añadió 2,4-dicloro-5,5-dimetilhidantoína (20 mg, 0,1 mmol). Se agitó la mezcla a 0-5 °C durante 2 h. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución NaHCO₃ al 5 %, salmuera y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. La concentración a sequedad proporcionó el producto bruto **5b** (30 mg) como un aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en la siguiente etapa.

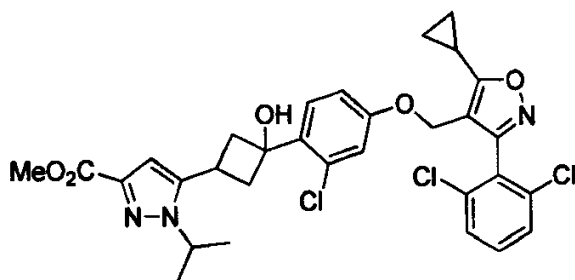
Etapa 3: 3-(3-(2-Cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzensulfonamida (5)

35 A la solución del compuesto **5b** (30 mg) en CH₃CN (2 ml) se añadió NH₄OH (0,3 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. La concentración a sequedad y la purificación mediante RP-HPLC preparativa, proporcionó el compuesto **5** del título (3,5 mg, 10 % para dos etapas) como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,85 (s, 1H), 7,77 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,54-7,41 (m, 5H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H), 4,77 (s, amplio, 2H), 3,20 (t, J = 10,4 Hz, 2H), 3,04 (m, 1H), 2,58 (t, J = 10,6 Hz, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,31-1,30 (m, 2H), 1,20-1,16 (m, 2H). MS (IEN⁻) m/z: 617 [M-1]⁻.

40

Ejemplo 6: 1-(2-Cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-(3-(metilsulfonil)fenil)ciclobutanol (6)

A la solución del compuesto **2b** (200 mg, 0,32 mmol) en DMSO, se añadió metanosulfonato de sodio (50 mg, 0,46 mmol), CuI (20 mg, 0,1 mmol), *L*-prolina (37 mg, 0,32 mmol) y diisopropiletilamina (DIEA) (41 mg, 0,32 mmol). La mezcla se agitó a 95 °C durante una noche y a continuación se diluyó con agua y se extrajo con EA. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y se secaron con Na₂SO₄. La concentración a sequedad bajo presión reducida y purificación mediante RP-HPLC preparativa, proporcionó el compuesto **6** del título como un sólido blanco (35 mg, 21 %, isómero único mediante RMN ¹H y CL-EM). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,84 (s, 1H), 7,79 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,53 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,44-7,41 (m, 3H), 7,34 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,75 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H), 3,24-3,19 (m, 2H), 3,08-3,04 (m, 4H), 2,62-2,56 (m, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,31-1,29 (m, 2H), 1,20-1,16 (m, 2H). MS (IEN+) m/z: 618 (620) [M+1]⁺, 600 (602) [M-H₂O+1]⁺.

Ejemplo 7: 5-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7)**Etapas 1: 1-isopropil-5-vinil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7a)**

Una suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (2,69 g, 7,52 mmol) en THF anhidro (40 ml) se enfrió a -78 °C y se añadió gota a gota *n*-butillitio (solución en hexano 1,6 M, 3,7 ml, 5,91 mmol). Se agitó la suspensión amarilloraranja a -78 °C durante 50 min y a continuación se añadió gota a gota una solución de 5-formil-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (preparado como se describe en el documento WO 2011/020615, 1,05 g, 5,37 mmol) en THF anhidro (10 ml). Se agitó la mezcla a -78 °C durante 1,75 h, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla (suspensión blancuzca) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se repartió a continuación entre una solución acuosa diluida de NaHCO₃ (150 ml) y EA (150 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con EA (50 ml cada una) y la capa orgánica combinada se lavó dos veces con agua (50 ml cada una) y se concentró sin secar para proporcionar 2,74 g de un aceite amarillo el cual cristalizó lentamente. El producto bruto se purificó mediante CC (preadsorción con CH₂Cl₂, hexano/EA 4:1) para proporcionar el alqueno **7a** (590 mg, 57 %) como un aceite incoloro. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,02 (s, 1H), 6,87 (dd, J = 17,3, 11,2 Hz, 1H), 5,94 (dd, J = 17,3, 1,3 Hz, 1H), 5,45 (dd, J = 11,2, 1,3 Hz, 1H), 4,80 (sept, J = 6,6 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 1,38 (d, J = 6,6 Hz, 6H). C₁₀H₁₄N₂O₂ (194,23). CL-EM (IEN): 195 [M+H]⁺.

Etapas 2: 1-isopropil-5-(3-oxociclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7b)

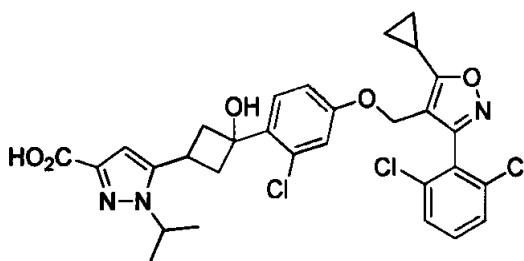
La reacción se llevó a cabo en dos tubos secos sellados (dos lotes de igual cantidad). Los lotes se combinaron para su procesamiento y purificación. Procedimiento en lote único: a una solución de *N,N*-dimetilacetamida (0,22 ml, 2,34 mmol) en 1,2-dicloroetano (12 ml) bajo nitrógeno a -15 a -20 °C se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (0,43 ml, 2,57 mmol), formando una suspensión opaca. La mezcla se agitó a -15 °C durante 10 min, y se añadió una solución del alqueno **7a** (151 mg, 0,78 mmol) y simcolidina (0,42 ml, 3,12 mmol) en 1,2-dicloroetano (3 ml), gota a gota (formando una solución amarilla). Al completarse la adición, se retiró el baño de enfriamiento, la mezcla se dejó entibiar a temperatura ambiente (solución turbia naranja) y se selló el tubo. La mezcla se agitó después a 90 °C durante 15 h (mezclas pardas). Se añadió agua (5 ml) a temperatura ambiente y las mezclas se agitaron a 100 °C durante 2 h (soluciones turbias de dos fases). Después de enfriar a temperatura ambiente, las mezclas se combinaron y se repartieron entre una solución acuosa diluida de NaHCO₃ y CH₂Cl₂ y la capa acuosa se extrajo tres veces con CH₂Cl₂ (30 ml cada vez). La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se

filtró y se concentró para proporcionar un aceite pardo (2,2 g). La purificación mediante CC (6×13 cm, preadsorción con CH₂Cl₂, tolueno/EA 3:1) proporcionó la ciclobutanona **7b** (115,5 mg, 31 %) como un aceite amarillo. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 6,81 (s, 1H), 4,58 (sept, J = 6,5 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,85-3,73 (m, 1H), 3,59-3,45 (m, 2H), 3,37-3,24 (m, 2H, parcialmente superpuesta por la señal de agua), 1,39 (d, J = 6,6 Hz, 6H). C₁₂H₁₆N₂O₃ (236,27). CL-EM (IEN): 237 [M+H]⁺.

Etapa 3: 5-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7** – ambos isómeros)**

Se enfrió a -78 °C una solución del bromuro **1a** (368 mg, 0,78 mmol) en THF anhidro (6 ml) y se añadió gota a gota una solución 1,6 M de *n*-butilitio en hexanos (0,48 ml, 0,76 mmol). Se agitó la mezcla a -78 °C durante 20 min y se añadió gota a gota una solución de la ciclobutanona **7b** (164 mg, 0,69 mmol) en THF anhidro (4 ml). La mezcla se agitó a -78 °C durante 2,5 h y se añadió gota a gota solución acuosa saturada de NH₄Cl (1 ml) a esta temperatura. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se dejó entibiar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. Se añadió luego la mezcla a una solución diluida acuosa de NH₄Cl y se extrajo tres veces con EA. La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar 516 mg de un aceite casi incoloro. La purificación mediante CC (4,5×23 cm, preadsorción con CH₂Cl₂, eluyente hexano/acetona = 2:1) proporcionó la ciclobutanona **7b** recuperada (31,3 mg, 19 %, aceite levemente amarillo) y producto impuro (333 mg). La repurificación mediante CC (4×22 cm, hexano/EA = 1:1) o TLC preparativa proporcionó el producto puro **7** (isómero principal) (210 mg, 48 %) como una espuma blanca y el producto **7** (isómero secundario) (5,1 mg, 1 %) como un sólido blancuzco. **7** (isómero secundario) RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,83 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,23 (tipo t dd, J = 8,1 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,93-6,87 (m, 1H), 6,79 (dd, J = 8,4 Hz, 2,0, 1H), 6,69 (s, 1H), 5,80 (s, 1H), 4,91 (tipo q m, J = 17,3, 8,3 Hz, 2H), 4,43 (tipo quint m, J = 6,6 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,27-2,95 (m, 3H, parcialmente superpuesta por la señal de agua), 2,60-2,35 (m, 3H, parcialmente superpuesta por la señal de DMSO), 1,33 (d, J = 6,6 Hz, 6H), 1,29-1,08 (m, 4H). C₃₁H₃₀Cl₃N₃O₅ (630,95). CL-EM (IEN): 630, 632 [M+H]⁺. **7** (isómero principal) RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,65 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,59-7,48 (m, 2H), 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 8,6, 2,6 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,92 (s, 2H), 4,42 (tipo quint m, J = 6,5 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,24-3,11 (m, 2H, parcialmente superpuesta por la señal de agua), 3,04-2,90 (m, 1H), 2,54-2,33 (m, 3H, parcialmente superpuesta por la señal de DMSO), 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 6H), 1,26-1,08 (m, 4H). C₃₁H₃₀Cl₃N₃O₅ (630,95). CL-EM (IEN): 630, 632 [M+H]⁺.

Ejemplo 8: Acido 5-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxílico (8**)**



Se disolvió el éster **7** (isómero principal) (98,3 mg, 0,156 mmol) en una mezcla de THF (7,5 ml), MeOH (2,5 ml) y agua (2,5 ml) y se añadió LiOH·H₂O (65 mg, 1,56 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se repartió entre una solución acuosa diluida de NH₄Cl y EA y la capa orgánica se lavó una vez con agua. La capa acuosa combinada se extrajo dos veces con EA. La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para proporcionar 103 mg de un sólido casi blanco. El producto se purificó mediante CC (3×3,5 cm, EA/EtOH = 10:1 a 1:4) para proporcionar **8** (94,8 mg, 99 %) como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,66-7,60 (m, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,59-7,49 (m, 2H), 6,91 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 8,6, 2,4 Hz, 1H), 6,38 (s, 1H), 5,51 (s, 1H, intercambiable con D₂O), 4,92 (s, 2H), 4,31 (tipo quint m, J = 6,5 Hz, 1H), 3,25-3,08 (m, 2H, parcialmente superpuesta por la señal de agua), 2,93-2,77 (m, 1H), 2,57-2,43 (m, 1H, oculto por la señal de DMSO), 2,43-2,29 (m, 2H, parcialmente superpuesta por la señal de DMSO), 1,29 (d, J = 6,5 Hz, 6H), 1,26-1,08 (m, 4H). La señal de CO₂H no aparece en el espectro. C₃₀H₂₈Cl₃N₃O₅ (616,92). CL-EM (IEN): 616, 618 [M+H]⁺.

Ruta alternativa al Ejemplo 8 (isómero principal)

Etapa 1: 1-(3-Metilenociclobutil)etanona (8a**)**

Se disolvió metilenciclobutano carbonitrilo (5,0 g, 53,7 mmol) en Et₂O seco (25 ml), se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota MeMgBr (26,8 ml, 80,5 mmol, 3 M sol. en Et₂O). Se dejó agitando la mezcla durante la noche a temperatura ambiente, se enfrió a 0 °C, se inactivó cuidadosamente con solución acuosa de NaHSO₄ al 15 % (100 ml), se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y luego las capas fueron separadas. La fase acuosa se extrajo con pentano (50 ml) y Et₂O (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron con Na₂SO₄. Se evaporaron los disolventes cuidadosamente sin calentar y se obtuvo el producto bruto **8a** (5,6 g) como

un líquido amarillento. RMN ¹H (CDCl₃), δ: 4,81-4,79 (m, 2H), 3,27-3,19 (m, 1H), 2,92-2,40 (m, 4H), 2,13 (s, 3H).

Etapa 2: 4-(3-metilenciclobutil)-2,4-dioxobutanoato de etilo (8b)

Se disolvió sodio (1,15 g, 49,9 mmol) en EtOH seco (30 ml, desnaturalizado con éter al 5 %). El compuesto crudo **8a** (5,5 g, 50 mmol) se disolvió en EtOH seco (45 ml) y se añadió la solución anteriormente preparada de etóxido de sodio. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y a continuación se añadió oxalato de dietilo (6,8 ml, 50 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se introdujo en un baño de aceite precalentado (a 67 °C) y se agitó a esta temperatura durante 4,5 h. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante la noche y luego la mezcla de reacción se evaporó, se añadieron EA (100 ml) y HCl 1 N (70 ml) y se separó la fase orgánica y la fase acuosa se volvió a extraer con EA (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera y se secaron con Na₂SO₄. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó sobre sílice utilizando hexanos/MTBE 9:1 como eluyente, brindando el producto puro **8b** (6,29 g, 56 % sobre dos etapas). ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 6,36 (s, 1H, tautómero enol), 4,84-4,82 (m, 2H), 4,34 (q, 2H), 3,33-3,25 (m, 1H), 3,03-2,75 (m, 4H), 1,36 (t, 3H) MS: 211,2 [M+H]⁺.

Etapa 3: 1-isopropil-5-(3-metilenciclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (8c)

Se disolvió el compuesto **8b** (6,29 g, 29,9 mmol) en EtOH seco (65 ml, desnaturalizado con 5 % de MeOH) y se añadió clorhidrato de isopropil hidrazina (3,97 g, 35,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. El análisis CLEM indicó la conversión completa y la presencia de aprox. 1 % del otro isómero. Se evaporó la mezcla de reacción y al residuo oleoso se añadieron EA (100 ml), agua (50 ml) y solución saturada de NaHCO₃ (50 ml). Se separaron las capas y la fase acuosa se volvió a extraer con EA (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (70 ml) y se secaron con Na₂SO₄. El disolvente se evaporó en un equipo de evaporación con rotación y el residuo se secó bajo presión reducida para obtener el producto bruto **8c** (7,0 g). RMN ¹H (CDCl₃), δ: 6,62 (s, 1H), 4,86-4,84 (m, 2H), 4,40-4,18 (m, 3H), 3,55-3,47 (m, 1H), 3,15-3,08 (m, 2H), 2,88-3,80 (m, 2H), 1,49 (d, 6H), 1,37 (t, 3H). MS: 249,5 [M+H]⁺.

Etapa 4: 1-isopropil-5-(3-oxociclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (8d)

Se disolvió el compuesto crudo **8c** (6,45 g, 26,0 mmol) en una mezcla de MeCN (77 ml) y agua (13 ml) y se enfrió en un baño de hielo. A esta solución se añadió RuCl₃·xH₂O (0,19 g, 0,86 mmol), seguido por la adición en porciones de NaIO₄ (19,4 g, 90,9 mmol). Se observó exotermia durante esta adición. La suspensión espesa obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. Se diluyó la mezcla de reacción con solución acuosa de Na₂S₂O₃ (10 %, 260 ml), agua (50 ml) y diclorometano (100 ml). Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2×70 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de Na₂S₂O₃ (10 %, 50 ml), agua (100 ml), salmuera (100 ml) y se secaron con Na₂SO₄. El producto bruto (6,5 g) se purificó sobre sílice, se eluyó con hexanos/MeOtBu para proporcionar el producto puro **8d** (5,8 g, 78 % en dos etapas) como un aceite que solidificó con el almacenamiento en el refrigerador. ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ: 6,78 (s, 1H), 4,61-4,54 (m, 1H), 4,26 (q, 2H), 3,82-3,73 (m, 1H), 3,55-3,45 (m, 2H), 3,35-3,26 (m, 2H), 1,39 (d, 6H), 1,28 (t, 3H). MS: 251,3 [M+H]⁺.

Etapa 5: 4-((4-Bromo-3-clorofenoxi)metil)-5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol (8e)

Se mezcló cloro-4-bromofenol (3,8 g, 18,3 mmol) con (5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metanol (3,47 g, 12,2 mmol) y trifenilfosfina (6,41 g, 24,4 mmol) en tolueno (150 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua y se añadió DIAD (4,8 ml, 24,4 mmol) gota a gota en forma de disolución en tolueno (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 h y los disolventes se eliminaron en un equipo de evaporación con rotación dejando un residuo oleoso amarillo. Este se disolvió en DCM (200 ml), se añadió sílice (~20 g) y la mezcla se evaporó a sequedad. Este material se cargó en la parte superior de una columna de gel de sílice y se purificó eluyendo con hexanos/MTBE 9:1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y el disolvente se eliminó a presión reducida, dejando el producto puro **8e** como un aceite incoloro, que cristalizó tras su secado al vacío durante la noche. Rendimiento: 5,07 g (88 %). RMN ¹H (CDCl₃), δ (ppm): 7,45-7,30 (m, 4H), 6,90 (s, 1H), 6,60-6,55 (m, 1H), 2,15-2,07 (m, 1H), 1,32-1,25 (m, 2H), 1,20-1,11 (m, 2H).

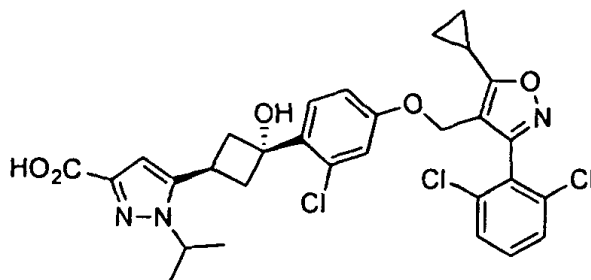
Etapa 6: 5-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (8f)

Se disolvió LiCl (684 mg, 16,2 mmol) en THF (20 ml) a temperatura ambiente y se añadió ⁱPrMgCl (2,0 M en THF, 8,1 ml, 16,2 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, se enfrió en un baño de hielo y se añadió una solución de bromuro **1a** (2,55 g, 5,38 mmol) en THF (20 ml) a lo largo de 5 min. El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se enfrió la mezcla a -10 °C y se añadió rápidamente una solución del compuesto **8d** (1,48 g, 5,92 mmol) en THF (16 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 90 min y a continuación se añadió NaHSO₄ acuoso 0,5 M (35 ml) y EA (50 ml). La mezcla resultante se agitó durante 10 min, se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con EA (30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ acuoso (50 ml), salmuera (50 ml) y se secaron con Na₂SO₄. Purificación en columna de sílice, eluyendo con hexanos/EA 3:2 para proporcionar el producto puro **8e** (1,62 g 49 %) como una espuma sólida. RMN ¹H es de acuerdo con los espectros obtenidos en el Ejemplo 7. MS: 646,9 [M+H]⁺.

Etapa 7: Acido 5-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxílico (8)

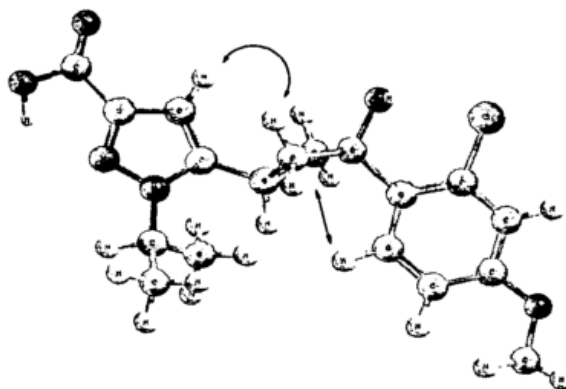
Se disolvió el compuesto **8e** (1,60 g, 2,48 mmol) en THF (100 ml), a continuación se añadieron secuencialmente MeOH (50 ml), agua (50 ml) y LiOH·H₂O (1,04 g, 24,8 mmol). La mezcla se agitó durante 4,5 h a temperatura ambiente y a continuación se colocó en un equipo de evaporación con rotación para remover MeOH y THF. Se acidificó la solución acuosa remanente mediante la adición de Una solución acuosa de HCl 1 N (24 ml) hasta alcanzar un pH de 4,05 (control de pH con electrodo). A un pH de aproximadamente 7 ya comenzó a formarse un precipitado. Se separó por filtración el sólido formado, se lavó sobre el filtro con agua y se secó bajo vacío a temperatura ambiente para proporcionar el producto **8** (1,40 g 92 %) como un polvo blanco.

Ejemplo 8A: 5-((1r,3r)-3-(2-Cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato (8A)

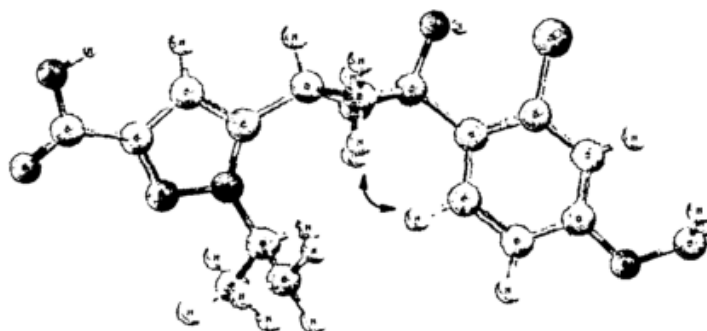


El ejemplo **8A** se puede preparar sometiendo el producto bruto **8f** a hidrólisis del éster como se ha descrito para **8** y aislamiento del producto **8** bruto como isómero minoritario mediante RP-HPLC preparativa. RMN ¹H (CDCl₃), δ (ppm): 7,42-7,30 (m, 2H), 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,75-6,65 (m, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,79 (s, 2H), 4,50-4,41 (m, 1H), 3,96-3,85 (m, 1H), 2,98-2,90 (m, 2H), 2,67-2,57 (m, 2H), 2,20-2,09 (m, 1H), 1,51 (d, J = 8,0 Hz, 6H), 1,32-1,14 (m, 4H). RMN ¹³C (CDCl₃), δ (ppm): 172,6, 166,2, 159,2, 158,4, 147,4, 141,2, 135,7, 134,6, 132,8, 131,3, 128,1, 127,7, 127,5, 116,8, 113,5, 110,0, 105,8, 75,1, 59,8, 51,2, 41,8, 25,4, 22,6, 8,5, 7,8, EM (IEN⁺) m/z: 616,3 [M+1]⁺.

La configuración transanular del isómero principal (compuesto **8**) y del isómero minoritario (compuesto **8A**) se confirmaron mediante experimentos NOE. Los NOE detectados indicativos entre protones se indican en las siguientes imágenes mediante las flechas dobles:

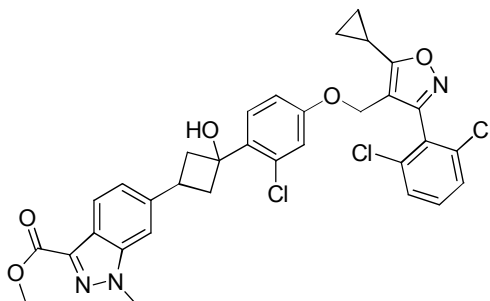


NOE detectados para el ejemplo 8, con una configuración transanular 1,3-trans de los restos aromáticos



NOE detectados para el ejemplo 8A, con una configuración transanular 1,3-cis de los restos aromáticos

Ejemplo 9: 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1H-indazol-3-carboxilato de metilo (9)



5 Etapa 1: 1-metil-6-vinil-1H-indazol-3-carboxilato de metilo (9a)

A la solución de 6-bromo-1-metil-1H-indazol-3-carboxilato de metilo (60 mg, 0,22 mmol) en DMF (10 ml), se añadió tributil(vinil)estaño (99 µl, 0,34 mmol), Pd(Ph₃)₄ (11 mg, 9 µmol). Después de completar la adición, la mezcla se agitó a 90 °C durante 4 h bajo Ar. Después, el disolvente se eliminó bajo presión reducida. La purificación mediante CC proporcionó el compuesto **9a** (52 mg, 88 %).

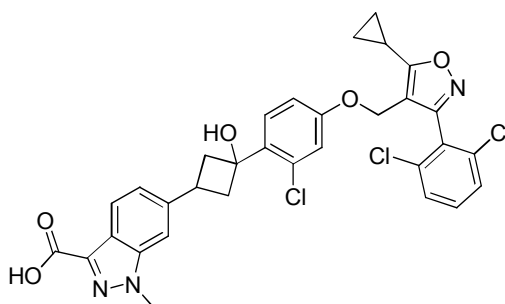
10 Etapa 2: 1-metil-6-(3-oxociclobutil)-1H-indazol-3-carboxilato de metilo (9b)

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7/Etapa 2, se obtuvo el compuesto **9b** a partir de **9a** con 57 % de rendimiento. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,14 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,23 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,13 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 3,87-3,79 (m, 1H), 3,58-3,51 (m, 2H), 3,33-3,26 (m, 2H). m/z: 259 [M+1]⁺.

15 Etapa 3: 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1H-indazol-3-carboxilato de metilo (9)

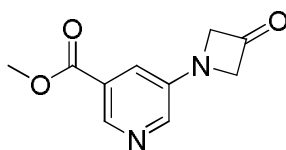
Siguiendo el procedimiento como se describe en el Ejemplo 7/Etapa 3, se obtuvo el compuesto **9** a partir de **9b** con 40 % de rendimiento.

Ejemplo 10: ácido 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1H-indazol-3-carboxílico (10)



20 Siguiendo el procedimiento como se describe en el Ejemplo 8, se obtuvo el compuesto **10** a partir del compuesto **9** con 45 % de rendimiento como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,14 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,43-7,32 (m, 4H), 7,29 (m, 1H), 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 7,2 Hz, 2,4 Hz, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,18 (s, 3H), 3,45-3,40 (m, 1H), 3,28-3,23 (m, 2H), 3,19-3,10 (m, 1H), 2,68-2,63 (m, 2H), 2,21-2,14 (m, 1H), 1,33-1,29 (m, 2H), 1,20-1,15 (m, 2H). m/z: 638 [M+1]⁺.

Ejemplo preparativo 11



Etapa 1: 5-(3-hidroxiacetidin-1-il)nicotinato de metilo (11a)

Una mezcla de 5-bromonicotinato de metilo (2,00 g, 9,26 mmol), azetidin-3-ol (1,01 g, 9,26 mmol), Cs₂CO₃ (9,06 g,

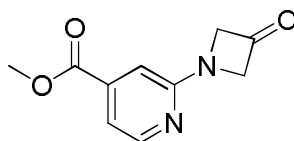
27,8 mmol), BINAP (1,15 g, 1,85 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,44 g, 1,85 mmol) en dioxano seco (115 ml) se calentó durante una noche a 85 °C bajo atmósfera de N₂. La mezcla resultante se filtró, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto **11a** (250 mg, 13 %) como un sólido amarillo.

Etapas 2: 5-(3-oxoazetidín-1-il)nicotinato de metilo (11)

- 5 A una solución del compuesto **11a** (250 mg, 1,20 mmol) en DCM anhidro (15 ml) se le añadió peryodinato de Dess-Martin (1,014 g, 2,40 mmol) a 0 °C bajo atmósfera de N₂ y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución resultante se inactivó con solución saturada de bicarbonato de sodio y se diluyó con EA. La parte orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante CC (DCM/MeOH = 150:1) para proporcionar el compuesto **11** (140 mg, 57 %) como un sólido amarillo.

10 **Ejemplo preparativo 12**

Utilizando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo preparativo **11** se preparó el siguiente compuesto:



12

Ejemplo 13/1 a 13/9

- 15 La siguiente tabla lista ejemplos adicionales preparados de acuerdo a los ejemplos preparativos y ejemplos anteriormente mencionados. Todos los compuestos se prepararon como isómeros únicos.

n.º	Estructura	Datos analíticos
13/1		RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,15-1,25 (m, 4H), 2,35-2,50 (m, 5H, parcialmente bajo la señal del disolvente), 2,80-2,91 (m, 1H), 3,11-3,20 (m, 2H), 4,93 (s, 2H), 6,72-6,81 (m, 1H), 6,93 (s, 1H), 7,40-7,51 (m, 2H), 7,52-7,60 (m, 2H), 7,62-7,66 (m, 2H), 7,85-7,90 (m, 2H). MS Calculado: 583; MS Encontrado: 584 [M+H] ⁺ .
13/2		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,05-1,12 (m, 4H), 2,18-2,34 (m, 9H), 2,62-2,71 (m, 1H), 2,99-3,09 (m, 2H), 4,78 (s, 2H), 6,60-6,64 (m, 1H), 6,72-6,78 (m, 1H), 6,85 (s, 2H), 7,30-7,42 (m, 4H). MS Calculado: 611; MS Encontrado: 612 [M+H] ⁺ .
13/3		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,10-1,23 (m, 4H), 2,36-2,49 (m, 3H), 3,00-3,12 (m, 1H), 3,15-3,25 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 4,95 (s, 2H), 6,72-6,80 (m, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,90-7,00 (m, 1H), 7,42-7,60 (m, 4H), 7,89-7,93 (m, 1H), 7,98 (s, 1H). MS Calculado: 613; MS Encontrado: 612 [M-H] ⁻ .
13/4		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,20-1,30 (m, 4H), 2,27 (s, 3H), 2,30-2,55 (m, 3H), 2,98-3,10 (m, 1H), 3,25-3,40 (m, 2H, parcialmente bajo la señal del disolvente), 4,95 (s, 2H), 6,76-6,84 (m, 1H), 6,91 (s, 1H), 7,20-7,25 (m, 1H), 7,43-7,63 (m, 4H), 7,75-7,82 (m, 1H), 8,03 (s, 1H). MS Calculado: 597; MS Encontrado: 596 [M-H] ⁻ .

(continuación)

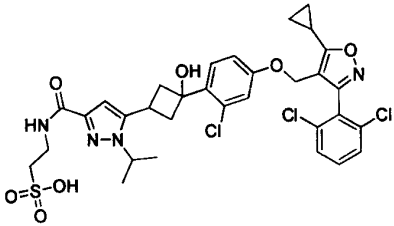
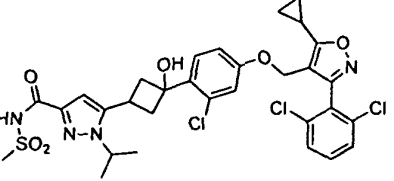
n.º	Estructura	Datos analíticos
13/5		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,20-1,25 (m, 4H), 2,33-2,43 (m, 4H), 2,46-2,56 (m, 2H), 2,88-2,97 (m, 1H) 3,22-3,30 (m, 2H), 4,94 (s, 2H), 6,78-6,82 (m, 1H), 6,90 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,43-7,60 (m, 4H), 7,69 (s, 1H), 7,78 (s, 1H). MS Calculado: 597; MS Encontrado: 596 [M-H] ⁻ .
13/6		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,17-1,23 (m, 4H), 2,31-2,40 (m, 4H), 2,42-2,50 (m, 2H), 2,83-2,92 (m, 1H) 3,19-3,26 (m, 2H), 4,92 (s, 2H), 6,74-6,80 (m, 1H), 6,88 (s, 1H), 7,19-7,22 (m, 1H), 7,43-7,57 (m, 4H), 7,83 (s, 1H). MS Calculado: 597; MS Encontrado: 598 [M+H] ⁺ .
13/7		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,09-1,11 (m, 4H), 2,19-2,26 (m, 1H), 4,08-4,10 (m, 2H), 4,19-4,21 (m, 2H), 4,80 (s, 2H), 6,64-6,67 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,28-7,39 (m, 6H); MS Calculado: 584; MS Encontrado: 585 (M+1).
13/8		RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) δ: 1,11 (m, 2H), 1,24 (m, 2H), 2,11 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 4,46 (m, 2H), 4,78 (s, 2H), 6,67 (dd, J = 1,2Hz, 8,4 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,28-7,35 (m, 3H), 7,55 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 8,56 (d, J = 3,6 Hz, 1H); MS Calculado: 585; MS Encontrado: 586 (M+1).
13/9		RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,13-1,23 (m, 4H), 2,50 (m, 1H), 4,23 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,51 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,96 (s, 2H), 6,24 (s, 1H), 6,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,97 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,58-7,66 (m, 3H), 8,25 (s, 1H); MS Calculado.: 585; MS Encontrado: 586 (M+1).

Ejemplo 14/1 y 14/2

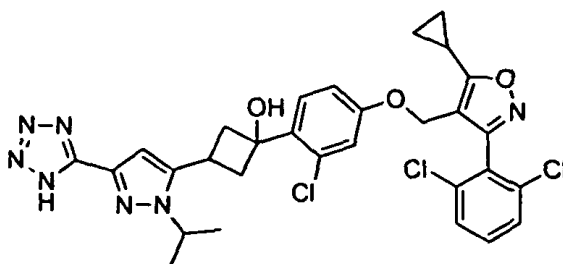
5 Utilizando un procedimiento similar al descrito en los Ejemplos 1 a 13 y en los Esquemas anteriores, se obtuvieron los siguientes compuestos utilizando los bloques de construcción apropiados.

n.º	Estructura	Datos analíticos
14/1		RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,13-1,23 (m, 4H), 1,33 (d, J = 6,4 Hz, 6H), 2,37-2,47 (m, 3H), 2,90-2,95 (m, 1H), 3,14-3,19 (t, J = 8,8 Hz, 2H), 3,57 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,92 (s, 2H), 5,51 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 6,76 (dd, J = 2,4 Hz, J = 8,4 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,51-7,58 (m, 2H), 7,62-7,65 (m, 2H), 7,69 (s, 1H); MS Calculado: 672; MS Encontrado: 673 [M+H] ⁺ .

(continuación)

n.º	Estructura	Datos analíticos
14/2		RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,13-1,20 (m, 4H), 1,31 (d, J = 6,0 Hz, 6H), 2,36-2,47 (m, 3H), 2,59-2,63 (m, 2H), 2,89-2,93 (m, 1H), 3,17-3,19 (m, 2H), 3,47-3,52 (m, 2H), 4,33-4,39 (m, 1H), 4,92 (s, 2H), 5,51 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 6,76 (dd, J = 2,4 Hz, J = 8,4 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,51-7,58 (m, 2H), 7,62-7,65 (m, 2H), 8,18-8,20 (m, 1H); MS Calculado: 744; MS Encontrado: 721 [M-Na] ⁺ .
14/3		RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,10~1,25 (m, 4H), 1,34 (d, J = 6,4 Hz, 6H), 3,03-2,95 (m, 1H), 2,50-2,30 (m, 3H), 3,20-3,10 (m, 2H), 4,50-4,35 (m, 1H), 4,92 (s, 2H), 5,5 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,78-6,70 (m, 2H), 7,70-7,49 (m, 4H), 11,44 (s, 1H); MS Calculado: 694; MS Encontrado: 695 [M+H] ⁺ .

El siguiente compuesto puede prepararse de la misma manera usando procedimientos similares a los descritos anteriormente:



5 Ensayos

Ensayo de actividad FRET

- La determinación de la interacción de péptido y cofactor mediada por ligando para cuantificar la unión del ligando al receptor nuclear FXR se realizó de la siguiente manera: Preparación de dominio de unión a ligando de FXR alfa humano: el LBD FXR alfa humano se expresó en la cepa *E. coli* BL21(DE3) como una proteína de fusión marcada con GST en el extremo N. El ADN que codifica el dominio de unión a ligando FXR se clonó dentro del vector pDEST15 (Invitrogen). La expresión estuvo bajo el control de un promotor T7 inducible por IPTG. Los límites de aminoácidos del dominio de unión a ligando fueron los aminoácidos 187–472 de la entrada de la base de datos NM_005123 (RefSeq). Expresión y Purificación del FXR-LBD: Un precultivo realizado durante la noche de una cepa *E. coli* transformada se diluyó 1:20 en medio LB-Ampicilina y se dejó crecer a 30 °C hasta una densidad óptica de DO₆₀₀=0,4–0,6. La expresión génica se indujo a continuación mediante la adición de IPTG 0,5 mM. Se incubaron las células durante otras 6 h a 30 °C, 180 rpm. Las células se recogieron por centrifugación (7000 x g, 7 min, temperatura ambiente). Por cada litro de cultivo celular original, las células se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (50 mM de glucosa, 50 mM de Tris pH 7,9, 1 mM de EDTA y 4 mg/ml lisozima) y se dejaron en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a ultrasonidos y se eliminaron los residuos celulares por centrifugación (22000 x g, 30 min, 4 °C). Por cada 10 ml de sobrenadante, se añadió 0,5 ml de suspensión prelavada de Glutathione 4B sefarosa (Qiagen) y se mantuvo la suspensión manteniendo una rotación lenta durante 1 h a 4 °C. Las cuentas de Glutathione 4B sefarosa se precipitaron por centrifugación (2000 x g, 15 s, 4 °C) y se lavaron dos veces en tampón de lavado (25 mM Tris, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ y 1M NaCl). El sedimento se resuspendió en 3 ml de tampón de elución por litro de cultivo original (tampón de elución: Tris 20 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM y glutatión 80 mM agregado como polvo inmediatamente antes de utilizarlo). Se dejó a la suspensión rotando durante 15 min a 4 °C, las cuentas se sedimentaron y se volvieron a eluir con la mitad del volumen de tampón de elución que la primera vez. Los eluatos se combinaron y se dializaron durante la noche en tampón Hepes 20 mM (pH 7,5) que contenía KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM, así como ditiotretitol 1 mM y 10 % (v/v) de glicerol. La proteína se analizó mediante SDS-PAGE.
- El procedimiento mide la capacidad de los posibles ligandos para modular la interacción entre el dominio de unión a ligando (LBD) del FXR purificado expresado en bacterias y un péptido biotinilado sintético basado en los restos 676–700 de SRC-1 (LCD2, 676–700). La secuencia del péptido utilizado fue B-CPSSHSLTERHKILHRLLEQEGSPS-COOH cuyo extremo N estaba era biotinilado (B). El dominio de unión a ligando (LBD) de FXR se expresó como una

proteína de fusión con GST en células BL-21 utilizando el vector pDEST15. Las células se lisaron por sonicación, y las proteínas de fusión se purificaron sobre Glutathione Sepharose (Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Para analizar la influencia de los compuestos sobre la interacción FXR-péptido, se aplicó la tecnología LANCE de PerkinElmer. Este procedimiento se basa en la transferencia de energía dependiente de la unión desde un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor unido al ligando de interés. Para facilidad de manejo y para la reducción de la fluorescencia de fondo del compuesto, la tecnología LANCE utiliza etiquetas genéricas de fluoróforo y detección con resolución en tiempo. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 25 µl en una placa de 384 pocillos, en un tampón de tipo Tris (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂; 35 ng/µl BSA), que contenía 20–60 ng/pocillo de FXR-LBD fusionado a GST expresado de manera recombinante, 200–600 nM de péptidos biotinilados en su extremo N, que representan los aminoácidos SRC1 676–700, 200 ng/pocillo de conjugado de Streptavidina-xLAPC (Prozyme) y 6–10 ng/pocillo de Eu W1024 – antiGST (Perkin Elmer). El contenido de DMSO de las muestras se mantuvo a 1 %. Tras la generación de la mezcla de ensayo y de diluir los ligandos potencialmente moduladores de FXR, el ensayo se equilibró durante una hora en la oscuridad a temperatura ambiente en placas para FIA negras de 384 pocillos (Greiner). La señal LANCE se detectó mediante equipo de recuento multietiqueta Perkin Elmer VICTOR2VTM. Se visualizaron los resultados representando gráficamente la relación entre la luz emitida a 665 y a 615 nm. Se observa un nivel basal de formación de FXR-péptido en ausencia de ligando añadido. Los ligandos que fomentan la formación del complejo inducen un incremento dependiente de la concentración en la señal fluorescente resuelta en el tiempo. Sería de esperar que no se obtuviera ningún cambio en la señal con los compuestos que se unen igualmente bien tanto al FXR monomérico como al complejo FXR-péptido, mientras que sería de esperar que los ligandos que se unen preferentemente al receptor monomérico indujeran una disminución dependiente de la concentración en la señal observada.

Para evaluar el potencial inhibitorio de los compuestos, se determinaron los valores CE₅₀ para los compuestos de ejemplo listados a continuación en la Tabla 1 (A = CE₅₀ < 25 nM; B = 25 ≤ CE₅₀ < 100 nM; C = CE₅₀ ≥ 100 nM).

Tabla 1

Grupo	Ejemplo n.º
A	4, 8, 10, 13/8, 13/9, 14/1, 14/2
B	1, 2, 5, 6, 8A, 13/1, 13/3, 13/4, 13/5, 13/7
C	13/2, 13/6

25

Ensayo híbrido 1 mamífero (M1H)

La determinación de una transactivación dirigida por un promotor Gal4 mediada por ligando a fin de cuantificar la activación del FXR mediada por unión a ligando se llevó a cabo de la siguiente forma: La parte del ADNc que codifica el dominio de unión a ligando de FXR se clonó en el vector pCMV-BD (Stratagene) como una fusión al dominio de unión del ADN Gal4 de levadura bajo el control del promotor CMV. Los límites de aminoácidos del dominio de unión a ligando fueron los aminoácidos 187–472 de la entrada de la base de datos NM_005123 (RefSeq). El plásmido pFR-Luc (Stratagene) se utilizó como plásmido indicador, que contenía un promotor sintético con cinco repeticiones en *tándem* de los sitios de unión Gal4 de levadura, que estimulan la expresión del gen luciferasa de la *Photinus pyralis* (luciérnaga de América del Norte) como gen indicador. A fin de mejorar la precisión experimental, el plásmido pRL-CMV (Promega) se transfectó simultáneamente. pRL-CMV contiene el promotor CMV constitutivo, que controla la expresión de luciferasa de *Renilla reniformis*. Todos los ensayos de gen indicador de Gal4 se realizaron en células HEK293 (obtenidas de DSMZ, Braunschweig, Alemania) cultivadas en MEM con L-glutamina y BSS de Earle suplementadas con 10 % de suero fetal bovino, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, y 100 unidades de penicilina/estreptavidina por ml a 37 °C en 5 % CO₂. Se obtuvieron medios y suplementos de Invitrogen. Para el ensayo, se sembraron 5 x 10⁵ células por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 µl por pocillo de MEM sin Rojo de Fenol y L-Glutamina y con BSS de Earle suplementado con 10 % de FBS tratado con carbón activo/dextrano (HyClone, South Logan, Utah), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, y 100 unidades de penicilina/estreptavidina por ml, y se incubaron a 37 °C en CO₂ 5 %. Al día siguiente, las células tenían >90 % de confluencia. Se eliminó el medio y las células se transfectaron transitoriamente utilizando 20 µl por pocillo de un agente de transfección basado en OptiMEM-polietilenimina (OptiMEM, Invitrogen; Polyetileneimine, Aldrich n.º Cat 40,827-7) incluyendo los tres plásmidos descritos anteriormente. Se añadió MEM con la misma composición que la utilizada para sembrar las células de 2 a 4 horas después de añadir la mezcla de transfección. A continuación se añadieron las disoluciones madre de compuestos prediluidos en MEM (la concentración del vehículo final no debe exceder 0,1 %). Se incubaron las células durante 16 horas más antes de medir las actividades de la luciferasa de luciérnaga y renilla secuencialmente en el mismo extracto celular utilizando un sistema de ensayo de doble intensidad de luciferasa (Dyer y col., Anal. Biochem. 2000, 282, 158–161). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

A fin de evaluar la potencia agonística del FXR de los compuestos de ejemplo, se determinaron los intervalos de potencia en el ensayo M1H como se listan a continuación en la Tabla 2 (A = CE₅₀ < 25 nM; B = 25 ≤ CE₅₀ < 100 nM; C = CE₅₀ ≥ 100 nM).

55

Tabla 2

Grupo	Ejemplo n.º
A	13/4, 13/5, 13/6
B	2, 8, 8A, 10, 13/1, 13/3, 13/7
C	1, 4, 5, 6, 13/2, 13/8, 13/9

Ensayo de solubilidad en medio acuoso

5 La solubilidad en medio acuoso en PBS, pH 7,4 se determinó de la siguiente forma. Se añadió una solución madre de 10 mM del compuesto en DMSO a PBS (pH 7,4) para alcanzar una concentración teórica final de 200 µM. Se agitó la solución/suspensión resultante a 1250 rpm durante 1 h y a continuación se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 23 h. En este momento se separó de la solución cualquier precipitado mediante centrifugación a 3900 rpm durante 30 min. La solubilidad en medio acuoso se determinó comparando el área del pico del pico principal en un patrón de calibración (200 µM) en un disolvente orgánico (metanol/agua 60:40, v/v) con el área del pico correspondiente en la muestra tampón. Se utilizó HPLC-UV/VIS a 230 nm como procedimiento de detección.

Ensayo paralelo de permeación de membrana artificial (PAMPA)

15 Para el PAMPA, se prepararon soluciones madre de 5 mM en DMSO de los elementos de ensayo. Se prepararon soluciones madre de 5 mM de los elementos de referencia en EtOH (carbamazepina, guanabenz) o en EtOH:H₂O 1:1 (v/v) (ceftriaxona), respectivamente. Se diluyeron los compuestos en PBS (pH 7,4) para obtener las soluciones de partida conteniendo 5 % del respectivo disolvente orgánico y 250 µM de los compuestos de referencia o 10 µM de los elementos de ensayo, respectivamente. Para el ensayo se utilizó un procedimiento modificado del PAMPA descrito por Kansy y col. (J. Med. Chem. 1998, 41, 1007). Los compuestos de referencia para permeación baja (ceftriaxona), media (guanabenz) y alta (carbamazepina) se incluyeron como controles internos.

20 Se llevaron a cabo los experimentos de permeación en una placa Multiscreen de 96 pocillos (donante) recubierta con una placa Multiscreen Immobilon de 96 pocillos (aceptor). El material de filtro hidrófobo de la placa Immobilon se prehumedeció con etanol al 70 % y se trató con una solución de lípidos (lecitina disuelta en dodecano). Se llenó la placa donante con los compuestos de ensayo y de referencia, y ambas placas se insertaron una dentro de otra y se colocaron sobre un agitador orbital durante 15 min a 100 rpm. Se comenzó el estudio de transporte aplicando 150 µl de PBS-tampón que contiene los compuestos de ensayo y de referencia, a la placa donante. Después de 15 – 16 h de difusión a temperatura ambiente, se recogieron los contenidos de la placa aceptora y dadora, que se cuantificaron utilizando detección por CL/EM (elementos de ensayo) o mediante espectroscopia UV utilizando un Spectramax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices) (elementos de referencia). La absorción máxima para los elementos de referencia ceftriaxona, guanabenz y carbamazepina fueron 240 nm, 270 nm y 286 nm, respectivamente. Las muestras de recuperación se prepararon como se describe para las muestras de ensayo de permeación y se incubaron en viales representativos durante el período de permeación bajo las mismas condiciones.

35 Para el análisis CL/EM de los elementos de ensayo, se retiraron 100 µl de incubado del compartimento aceptor y donante, que se procesaron mediante precipitación con acetonitrilo (ACN) como se describe a continuación. Adicionalmente, se extrajeron las muestras de los elementos de ensayo de la capa lipídica enjuagando dos veces con 150 µl de EA. Se recogieron las soluciones en tubos de reacción de 1,5 ml y el disolvente se evaporó. Los residuos se volvieron a suspender en una mezcla de PBS/DMSO/ACN reflejando la composición de las muestrasceptoras y donantes (es decir 100 µl de tampón suplementado con DMSO 5 %, 200 µl de ACN+ISTD). El contenido final de disolvente de cada muestra fue 66 % de ACN.

40 Las muestras de los compartimentos aceptor y donante, y de los patrones de calibración se precipitaron mediante la adición de 200 µl de ACN/ISTD o 400 µl de ACN/ISTD, respectivamente. Después de agitación vigorosa (10 segundos) y centrifugación (5 min a 4800 x g, temperatura ambiente), los sobrenadantes libres de partículas se sometieron a CL-EM/EM. Los compartimentos de membrana se extrajeron como se ha descrito como se describió anteriormente. Después de la reconstitución, las muestras se agitaron vigorosamente (10 segundos) y se pusieron boca abajo (5 min a 4800 x g, temperatura ambiente). Los sobrenadantes libres de partículas se sometieron a CL-EM/EM.

45 Para el análisis de los compuestos de la presente invención, el sistema HPLC consistió en una bomba Accela U-HPLC y un automuestreador Accela (Thermo Fisher Scientific, USA). La espectrometría de masa se llevó a cabo en un espectrómetro de masa Exactive (tecnología orbitrap con masa exacta) equipado con un electropulverizador calentado (H-ESI2) conectado con interfaz (Thermo Fisher Scientific, USA) a una PC que ejecuta el programa estándar Xcalibur 2.1.

50 La CL se realizó en el modo gradiente (Tabla 3) utilizando ACN/0,1 % de ácido fórmico como la fase orgánica (A) y formiato de amonio 10 mM /0,1 % de ácido fórmico como la fase acuosa (B); y el caudal de la bomba se ajustó a 500

µl/min. La separación se llevó a cabo en una columna analítica Gemini C6-Fenil, 3 µm, 50x2,0 mm (Phenomenex, Alemania) con una pre-columna (Gemini C6-Fenil, 3 µm, 4x2,0 mm).

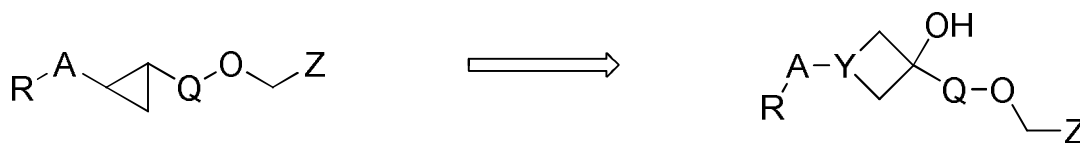
Tabla 3: gradientes de HPLC

Fase móvil	0 min	0,1 min	1,2 min	2,6 min	2,7 min	3,5 min
A (%)	5	5	97	97	5	5
B (%)	95	95	3	3	95	95

5 Como archivo de sintonización de EM se utilizó un archivo de sintonización genérico para todos los analitos aplicando el modo de ion positivo o negativo. Como masa de referencia para calibración interna de masa, se utilizó el ion $[M+H]^+$ de ftalato de diisooctilo (m/z 391,28429), el cual está ubicuamente presente en el sistema disolvente.

10 El analito se adquirió mediante barrido Thomson ± 1 alrededor de la masa esperada del ion monoisotópico $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$. La resolución de masa del Orbitrap se estableció en 50.000. La masa exacta de cada analito se utilizó para integración de picos. Las configuraciones adicionales de los instrumentos fueron como sigue: HCD-Gas "NO" (off), rango dinámico alto AGC, tiempo máximo de inyección en trampa 100 ms, gas cubierta 30, gas aux. 8, gas de barrido 2, tensión rociado 4 kV, temperatura capilar 250 °C, temperatura del calentador IEN 2, 250 °C.

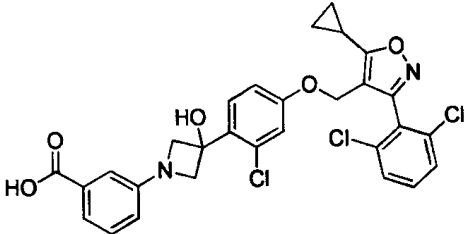
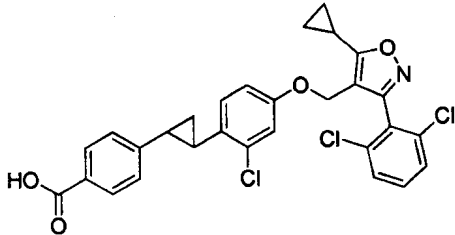
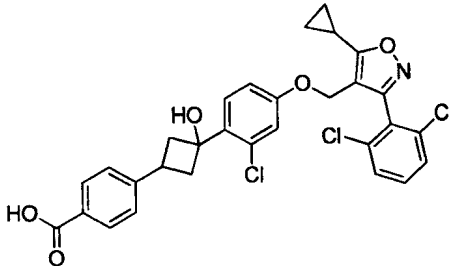
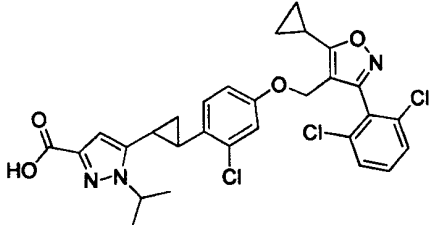
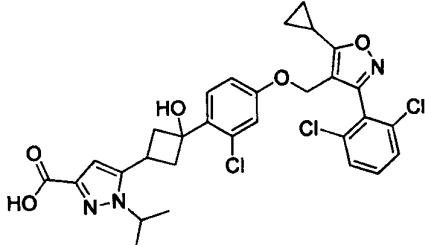
15 El objeto de la presente invención era generar agonistas de FXR con propiedades físico-químicas mejoradas en comparación con los compuestos reivindicados en el documento WO 2011/020615. Esto se logró mediante la introducción de un grupo hidroxilo polar en un grupo 1,3-ciclobutilideno o 1,3-azetidilideno reemplazando el anillo 1,2-ciclopropilideno anterior.



20 Sorprendentemente, los compuestos resultantes mantuvieron su actividad sobre el receptor de FXR, pero demostraron mejores propiedades físico-químicas, tales como mayor solubilidad y/o permeabilidad de membrana. Se proporciona en la Tabla 4 una comparación directa de los compuestos correspondientes de las dos series.

Tabla 4

Estructura	Solubilidad en medio acuoso (PBS, pH 7,4)	PAMPA, Permeabilidad de membrana en % de Flujo *	clogD (software ChemAxon)
	20 µM	13,6	5,1
	192 µM	24,0	4,4

(continuación)			
Estructura	Solubilidad en medio acuoso (PBS, pH 7,4)	PAMPA, Permeabilidad de membrana en % de Flujo *	clogD (software ChemAxon)
	195 μM	n.d.**	4,4
	72 μM	20,7	5,2
	192 μM	21,1	4,5
	158 μM	28,9	4,2
	171 μM	46,1	3,5

* Flujo (%) = $(c \text{ pocillo acepto}) / \text{sum}(c \text{ pocillo dador} + c \text{ pocillo acepto}) \times 100 \times 2$

** n.d. = no determinado

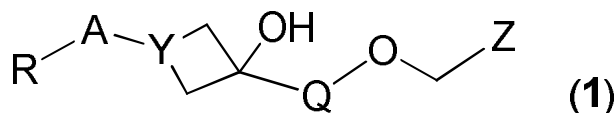
En cada caso, la solubilidad en medio acuoso o la permeabilidad de membrana PAMPA o ambas, están significativamente mejoradas mediante la introducción del resto hidroxí-ciclobutilo o hidroxí-azetidilo. Como la mayoría de las moléculas activas como receptores nucleares, los agonistas de FXR son generalmente muy lipófilos

(M. L. Crawley, *Expert Opin. Ther. Patents* 2010, 20, 1047). En consecuencia, se supone que una mejor solubilidad en medio acuoso y permeabilidad de membrana darán por resultado una mejor biodisponibilidad oral y en general una mayor adecuación de estos compuestos como fármacos, para el desarrollo clínico. (L. Huang, J. Dong, S. Karki in *Evaluation of drug candidates for preclinical development* (Eds. C. Han, C. B. Davis, B. Wang), Wiley & Sons, Hoboken 2010, 187-217).

5

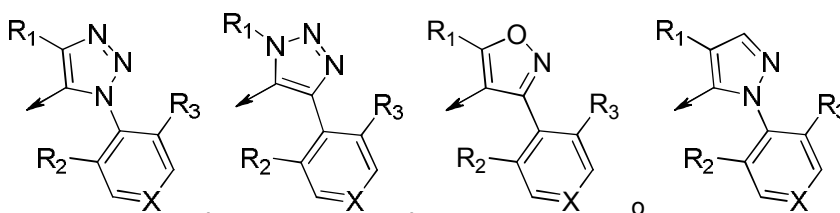
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula (1), un enantiómero, diastereómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo



5 en la que

R se selecciona del grupo que consiste de COOR₆, CONR₇R₈, tetrazolilo, SO₂NR₇R₈, alquilo C₁₋₆, SO₂-alquilo C₁₋₆ y H, en el que R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste de H o alquilo C₁₋₆, y R₇ y R₈ seleccionados independientemente entre sí del grupo que consiste de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilen C₁₋₆-R₉, SO₂-alquilo C₁₋₆, en el que R₉ está seleccionado del grupo que consiste en COOH, OH y SO₃H;
 A se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indolilo, tienilo, benzotienilo, indazolilo, bencisoxazolilo, benzofuranilo, benzotriazolilo, furanilo, benzotiazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en OH, O-alquilo C₁₋₆, O-haloalquilo C₁₋₆, alquilo, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y halógeno;
 Q se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, tiazolilo, tiofenilo, pirimidilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, halógeno y CF₃;
 Y se selecciona de N o CH;
 Z se selecciona de



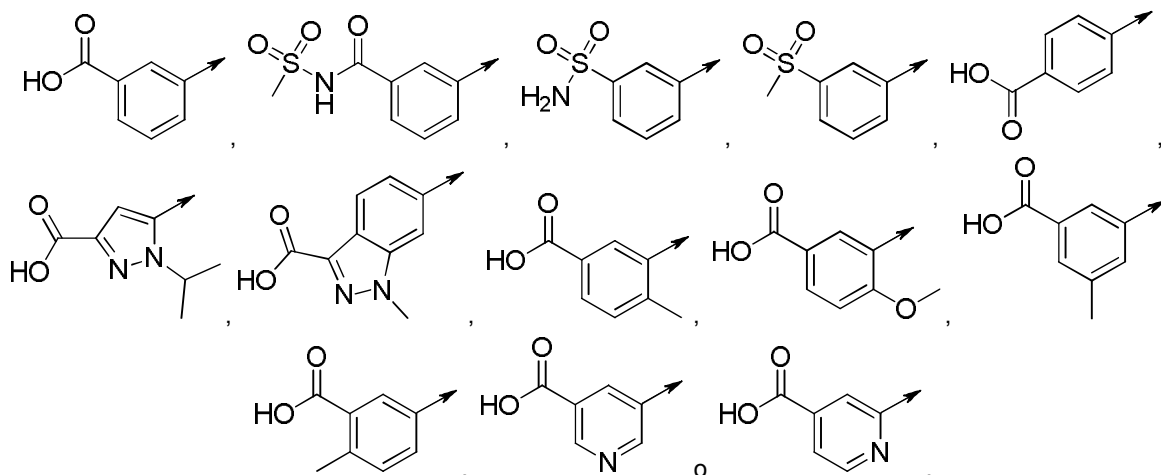
20 en las que

X = CH, N, NO;

R₁ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₆, alquilocicloalquilo C₄₋₅, en el que alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo o alcoxi C₁₋₆;

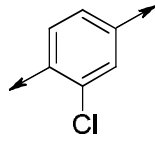
R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y halógeno.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde R-A se selecciona de

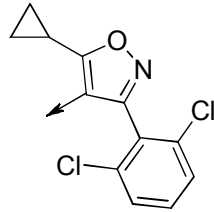


30

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que Q es

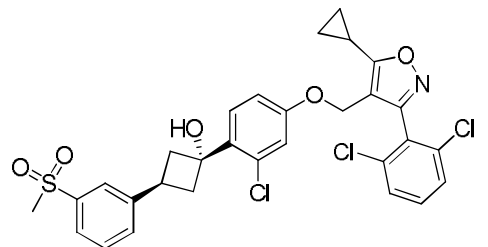
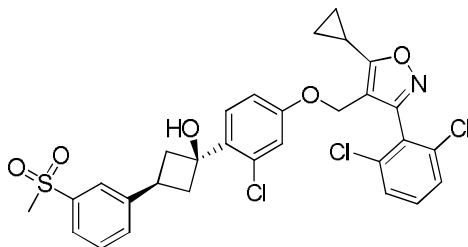
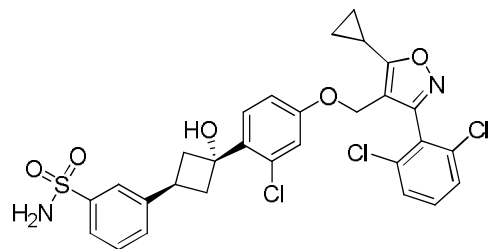
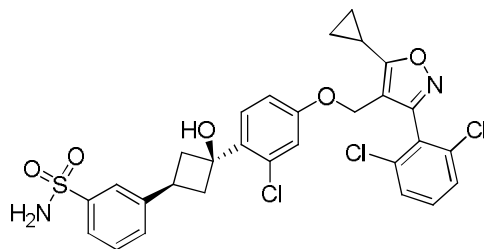
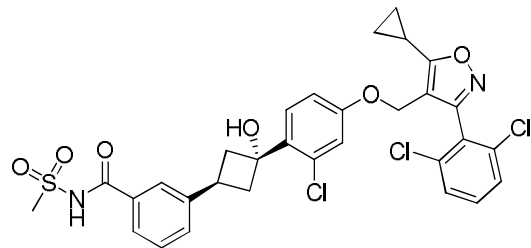
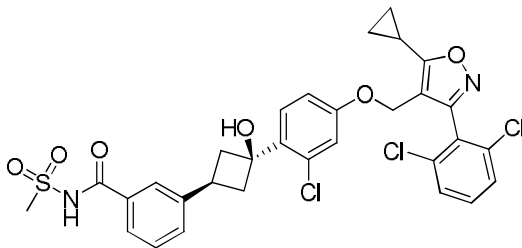
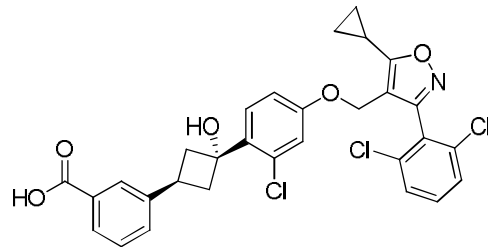
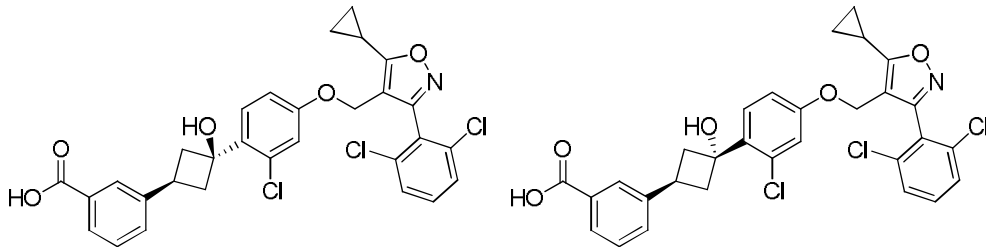


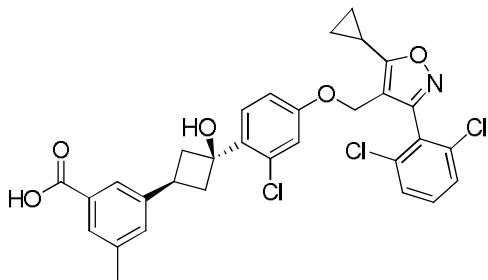
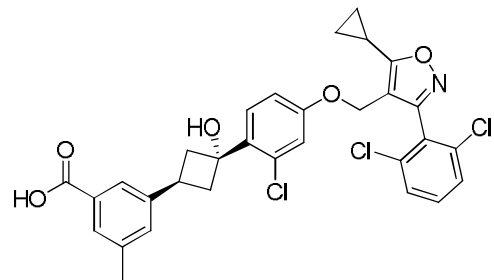
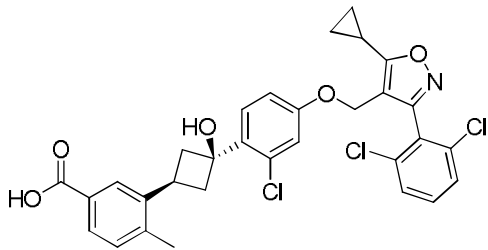
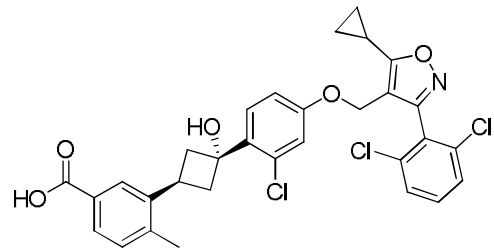
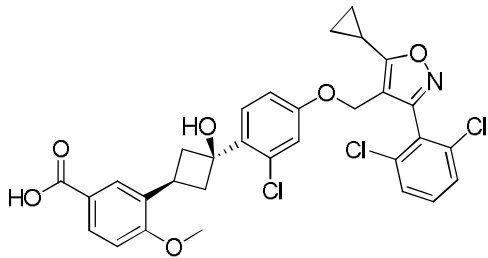
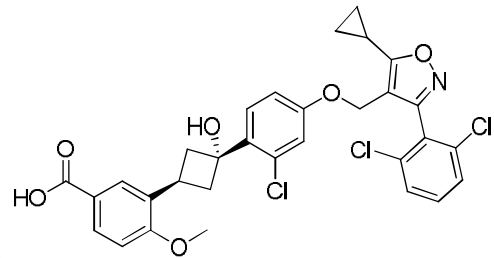
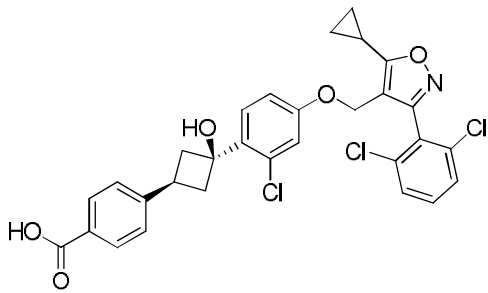
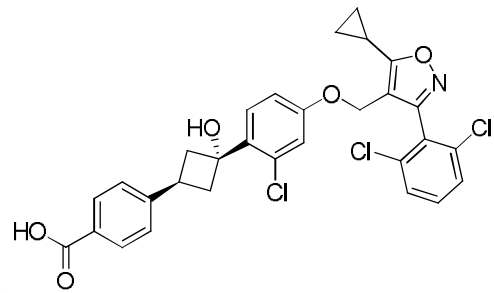
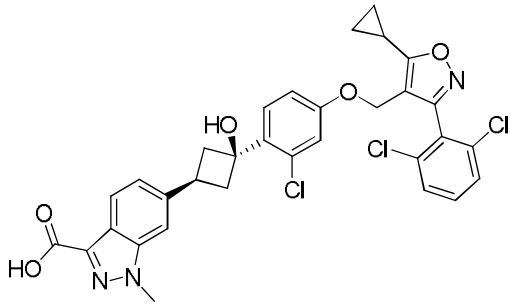
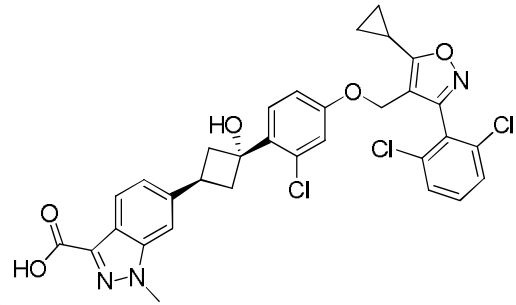
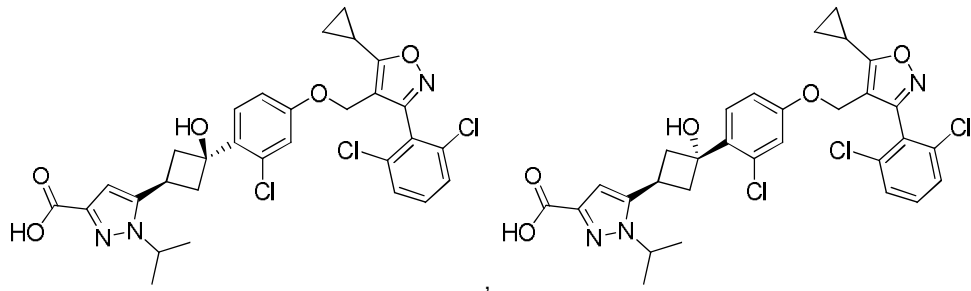
4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Z es

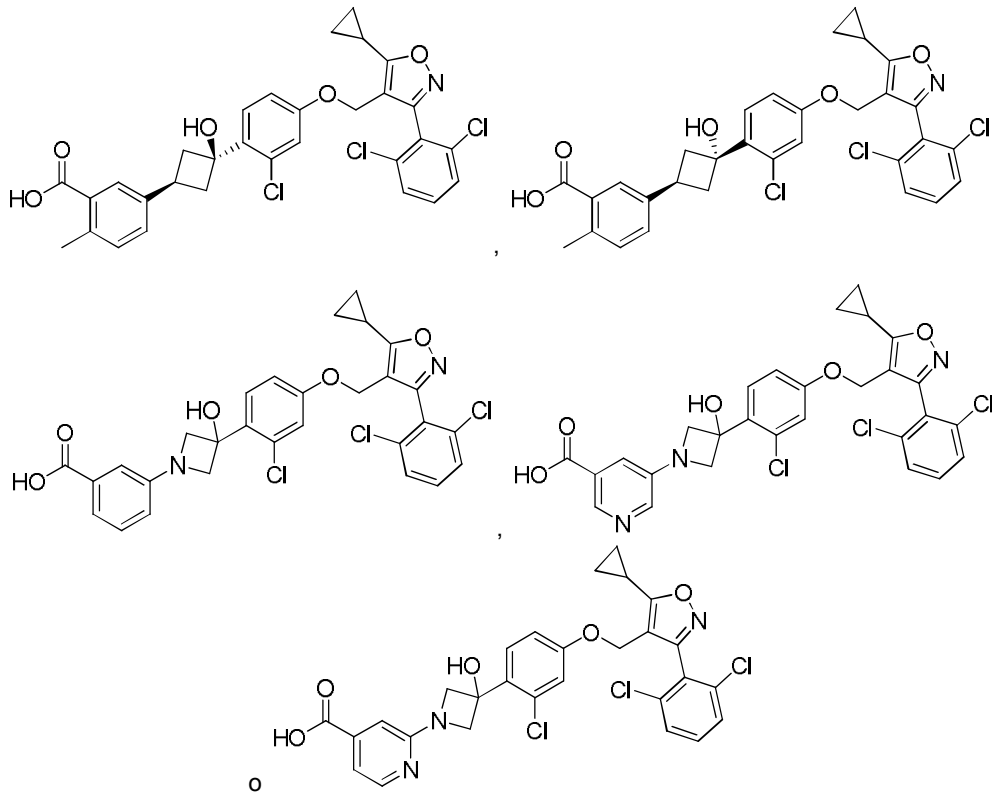


5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 seleccionado de

5

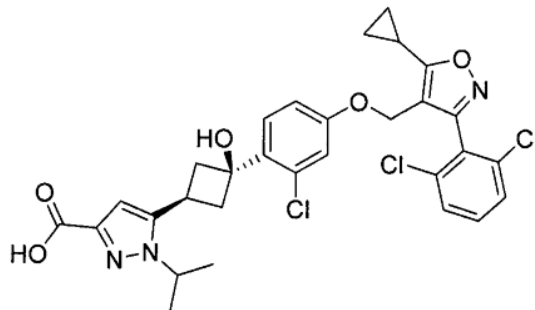






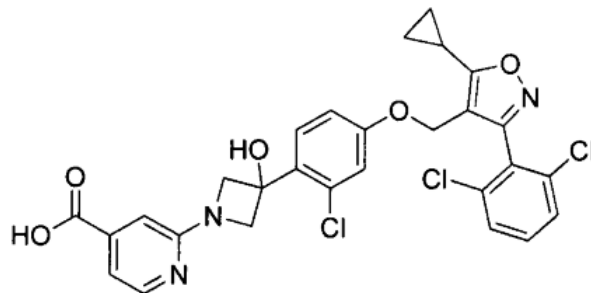
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que tiene la siguiente estructura



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que tiene la siguiente estructura



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente activo.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso como medicamento.

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

5 11. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la enfermedad se selecciona de:
 trastornos colestáticos crónicos intrahepáticos o algunas formas extrahepáticas;
 fibrosis hepática;
 trastornos inflamatorios obstructivos o crónicos del hígado;
 cirrosis hepática;
 esteatosis hepática y síndromes asociados, efectos fibróticos o colestáticos que están asociados con cirrosis
 10 inducida por alcohol o con formas virales de la hepatitis;
 fallo hepático o isquemia hepática posterior a hepatectomía mayor;
 esteatohepatitis asociada a quimioterapia (CASH);
 insuficiencia hepática agudo; y/o
 enfermedades inflamatorias del intestino.

15 12. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la enfermedad se selecciona de trastornos de lípidos y lipoproteínas;
 diabetes Tipo II y complicaciones clínicas de la diabetes Tipo I y Tipo II, incluyendo nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y otros efectos observados de la diabetes manifestada clínicamente durante mucho
 20 tiempo;
 dolencias y enfermedades que resultan de degeneración crónica grasa y fibrótica de órganos debido a la acumulación forzosa de lípidos y específicamente triglicéridos y la posterior activación de rutas profibróticas, tales como enfermedad de hígado graso no-alcohólica (NAFLD), o esteatosis no alcohólica (NASH);
 obesidad o síndrome metabólico (dolencias combinadas de dislipidemia, diabetes e índices de masa corporal
 25 anormalmente elevados);
 y/o
 infarto agudo de miocardio, ictus agudo o trombosis que sucede como culminación de arteriosclerosis obstructiva crónica.

30 13. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la enfermedad se selecciona de trastornos hiperproliferativos no malignos y trastornos hiperproliferativos malignos, específicamente de carcinoma hepatocelular, adenoma de colon y poliposis, adenocarcinoma de colon, cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas, esófago de Barret u otras formas de enfermedades neoplásicas del tracto gastrointestinal y del hígado.

35 14. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones a 7 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

40 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la enfermedad se selecciona de trastornos colestáticos crónicos intrahepáticos o algunas formas extrahepáticas;
 fibrosis hepática;
 trastornos inflamatorios obstructivos o crónicos del hígado;
 cirrosis hepática;
 esteatosis hepática y síndromes asociados, efectos fibróticos o colestáticos que están asociados con cirrosis
 inducida por alcohol o con formas virales de la hepatitis;
 fallo hepático o isquemia hepática posterior a hepatectomía mayor;
 esteatohepatitis asociada a quimioterapia (CASH);
 45 insuficiencia hepática agudo; y/o
 enfermedades inflamatorias del intestino.

50 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la enfermedad se selecciona de Trastornos de lípidos y lipoproteínas;
 diabetes Tipo II y complicaciones clínicas de la diabetes Tipo I y Tipo II, incluyendo nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y otros efectos observados de la diabetes manifestada clínicamente durante mucho
 tiempo;
 dolencias y enfermedades que resultan de degeneración crónica grasa y fibrótica de órganos debido a la
 55 acumulación forzosa de lípidos y específicamente triglicéridos y la posterior activación de rutas profibróticas, tales como enfermedad de hígado graso no-alcohólica (NAFLD), o esteatosis no alcohólica (NASH);
 obesidad o síndrome metabólico (dolencias combinadas de dislipidemia, diabetes e índices de masa corporal anormalmente elevados);
 y/o
 infarto agudo de miocardio, ictus agudo o trombosis que sucede como culminación de arteriosclerosis obstructiva
 60 crónica.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la enfermedad se selecciona de trastornos hiperproliferativos no malignos y trastornos hiperproliferativos malignos, específicamente de carcinoma hepatocelular, adenoma de colon y poliposis, adenocarcinoma de colon, cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas, esófago de Barret u otras formas de enfermedades neoplásicas del tracto gastrointestinal y del hígado.