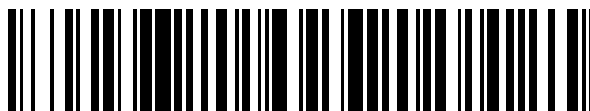


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 452**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2009** **PCT/US2009/065199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010** **WO10059859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009** **E 09759854 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2373673**

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

30 Prioridad:

19.11.2008 EP 08169460

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

30.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PELLICCIARI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 592 452 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moduladores de TGR5 y métodos de uso de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que modulan TGR5 y composiciones que contienen dichos compuestos útiles en métodos para el tratamiento y prevención de enfermedades. Específicamente, los compuestos de la invención son análogos del ácido quenodesoxicólico que tiene un sustituyente en la posición C-16.

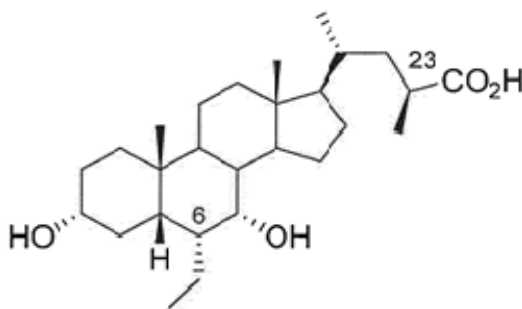
10

Antecedentes de la invención

El receptor TGR5 es un receptor acoplado a proteína-G que se ha identificado como un receptor de superficie celular que es sensible a ácidos biliares (BA). Se ha descubierto que la estructura primaria de TGR5 y su sensibilidad a ácidos biliares, está muy conservada en TGR5 entre seres humanos, bovinos, conejos, ratas y ratones, y por tanto sugiere que TGR5 tiene funciones fisiológicas importantes. Se ha descubierto que TGR5 está ampliamente distribuido y no solamente en tejidos linfoides sino también en otros tejidos. Se han detectado altos niveles de ARNm de TGR5 en placenta, bazo, y monocitos/macrófagos. Los ácidos biliares han demostrado inducir la internalización de la proteína de fusión de TGR5 desde la membrana celular al citoplasma. Kawamata *et al.* 2003, J. Bio. Chem., 278, 9435. Se ha descubierto que TGR5 es idéntico a hGPCR19 presentada por Takeda *et al.* 2002, FEBS Lett. 520, 97-101.

TGR5 está asociado con la acumulación intracelular de AMPc, que se expresa ampliamente en diversos tipos celulares. Aunque la activación de este receptor de membrana en macrófagos disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias ((Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M., A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. J. Biol. Chem. 2003, 278, 9435-9440), la estimulación de TGR5 por BA en adipocitos y miocitos potencia el gasto de energía (Watanabe, M.; Houten, S. M.; Matak, C.; Christoffolete, M. A.; Kim, B. W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J. W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A. C.; Auwerx, J., Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. Nature. 2006, 439, 484-489). Este último efecto implica la inducción dependiente de AMPc de yodotironina desyodinasas de tipo 2 (D2), que por conversión local de T4 en T3, da lugar a actividad de hormona tiroidea aumentada. Coherente con el papel de TGR5 en el control del metabolismo energético, ratones hembra TGR5 knock-out muestran una acumulación significativa de grasa con ganancia de peso corporal cuando se exponen a una dieta alta en grasas, lo que indica que la ausencia de TGR5 disminuye el gasto de energía y provoca obesidad (Maruyama, T.; Tanaka, K.; Suzuki, J.; Miyoshi, H.; Harada, N.; Nakamura, T.; Miyamoto, Y.; Kanatani, A.; Tamai, Y., Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/MBar) in mice. J. Endocrinol. 2006, 191, 197-205). Además, y en línea con la implicación de TGR5 en la homeostasis energética, se ha informado de que la activación por ácidos biliares del receptor de membrana promueve la producción de péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) en líneas celulares enteroendocrinas murinas (Katsuma, S.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G., Bile acids promote glucagonlike peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 329, 386-390). Sobre la base de todas las observaciones anteriores, TGR5 es una diana atractiva para el tratamiento de enfermedades metabólicas, por ejemplo, obesidad, diabetes (tipo I y tipo II), dislipidemia, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y síndrome metabólico.

Hasta ahora se han descrito en la bibliografía pocos ejemplos de agonistas de TGR5. Recientemente, se ha informado de derivados 23-alkil-sustituidos y 6,23-alkil-disustituidos de ácido quenodesoxicólico, tal como el ácido 6 α -etil-23(S)-metil-quenodesoxicólico mostrado a continuación, como agonistas potentes y selectivos de TGR5 (Pellicciari, R.; Sato, H.; Gioiello, A.; Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Sadeghpour, B. M.; Giorgi, G.; Schoonjans, K.; Auwerx, J., Nongenomic actions of bile acids. Synthesis and preliminary characterization of 23-and 6,23-alkyl-substituted bile acid derivatives as selective modulators for the g-protein coupled receptor TGR5. J. Med. Chem. 2007, 50, 4265-4268).



55

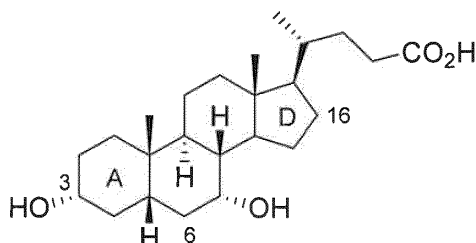
En particular, la metilación en la posición C₂₃-(S) de BA naturales confiere una selectividad marcada para la activación de TGR5 sobre FXR (receptor X farnesoide), mientras que la sustitución 6 α -alquilo aumenta la potencia en ambos receptores. Otros agonistas de TGR5 incluyen éster bencílico del ácido 6-metil-2-oxo-4-tiofen-2-il-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidina-5-carboxílico (documento WO004067008, Takeda Chemical Industries LTD, Japón, 2004) y ácido oleanólico (Sato, H.; Genet, C.; Strehle, A.; Thomas, C.; Lobstein, A.; Wagner, A.; Mioskowski, C.; Auwerx, J.; Saladin, R., Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 793-798; Ito, F.; Hinuma, K.; Kanzaki, N.; Miki, T.; Kawamata, Y.; Oi, S.; Tawaeaishi, T.; Ishichi, Y.; Hirohashi, M. Preparation of aromatic ring-fused cyclic compounds as TGR5 receptor agonists. PN: WO2004067008, 2004). Más recientemente, la primera síntesis de ácido quenodesoxicólico enantiomérico (CDCA) y ácido litocólico (LCA) ha permitido evaluar la especificidad de la interacción de BA naturales con TGR5 (Katona, B. W.; Cummins, C. L.; Ferguson, A. D.; Li, T.; Schmidt, D. R.; Mangelsdorf, D. J.; Covey, D. F., Synthesis, Characterization, and Receptor Interaction Profiles of Enantiomeric Bile Acids. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 6048-6058).

Aunque estas herramientas químicas han proporcionado por primera vez una diferenciación farmacológica de efectos genómicos frente a no genómicos de BA, algunos de ellos también permitieron obtener un primer estudio de relación estructural-actividad donde la presencia de un bolsillo de unión accesorio en TGR5 desempeña un papel central en la determinación de la selectividad de ligando (Pellicciari, R.; Sato, H.; Gioiello, A.; Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Sadeghpour, B. M.; Giorgi, G.; Schoonjans, K.; Auwerx, J., Nongenomic actions of bile acids. Synthesis and preliminary characterization of 23-and 6,23-alkyl-substituted bile acid derivatives as selective modulators for the g-protein coupled receptor TGR5. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 4265-4268). En este contexto, la disponibilidad de moduladores más potentes y selectivos de TGR5 es necesaria para identificar adicionalmente características adicionales que afecten a la activación del receptor y caracterice las acciones fisiológicas y farmacológicas de este receptor.

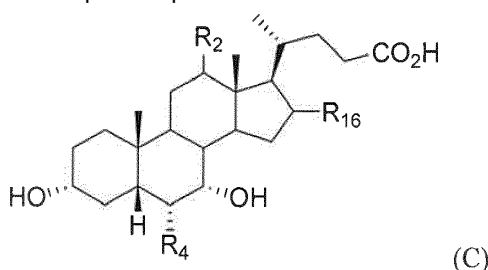
Existe una necesidad de desarrollo de moduladores de TGR5 para el tratamiento y prevención de enfermedades. La presente invención ha identificado compuestos que son análogos de ácido quenodesoxicólico que tienen un sustituyente en la posición C-16 así como métodos de uso de estos compuestos para tratar enfermedades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y su uso para tratar y prevenir enfermedades que implican la modulación del receptor TGR5, tal como una enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal. Específicamente, los compuestos de la invención son análogos de ácido quenodesoxicólico que están sustituidos en la posición C-16 del anillo D como se muestra a continuación.

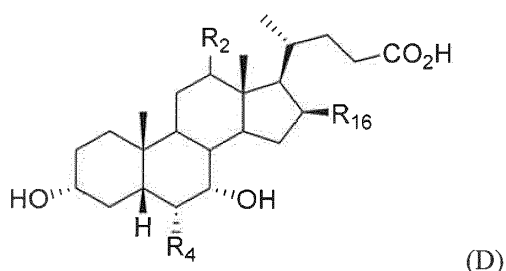


En un aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula C:



o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂ es hidrógeno o hidroxilo; R₄ es alquilo sin sustituir; y R₁₆ es hidroxilo, alcoxi o halógeno.

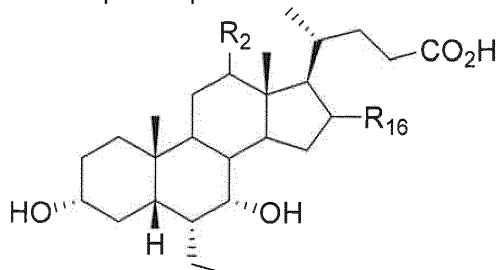
En otro aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula D:



(D)

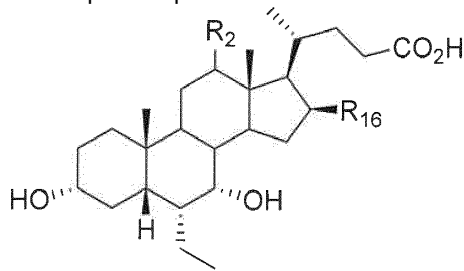
o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂, R₄, y R₁₆ son como se describen en el presente documento.

- 5 En otro aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula E:



(E) o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂ y R₁₆ son como se describen en el presente documento.

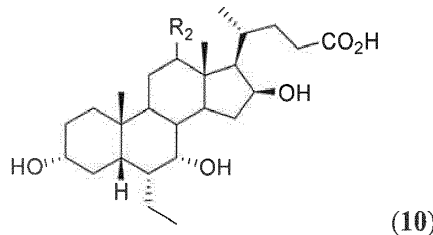
- 10 En otro aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula F:



(F) o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂ y R₁₆ son como se ha descrito anteriormente con respecto a un compuesto de fórmula C.

- 15 La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₂ es H. La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₂ es alfa-OH. La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₂ es beta-OH. La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₄ es etilo.
- 20 La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₁₆ es alfa hidroxilo. La invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R₁₆ es beta hidroxilo.

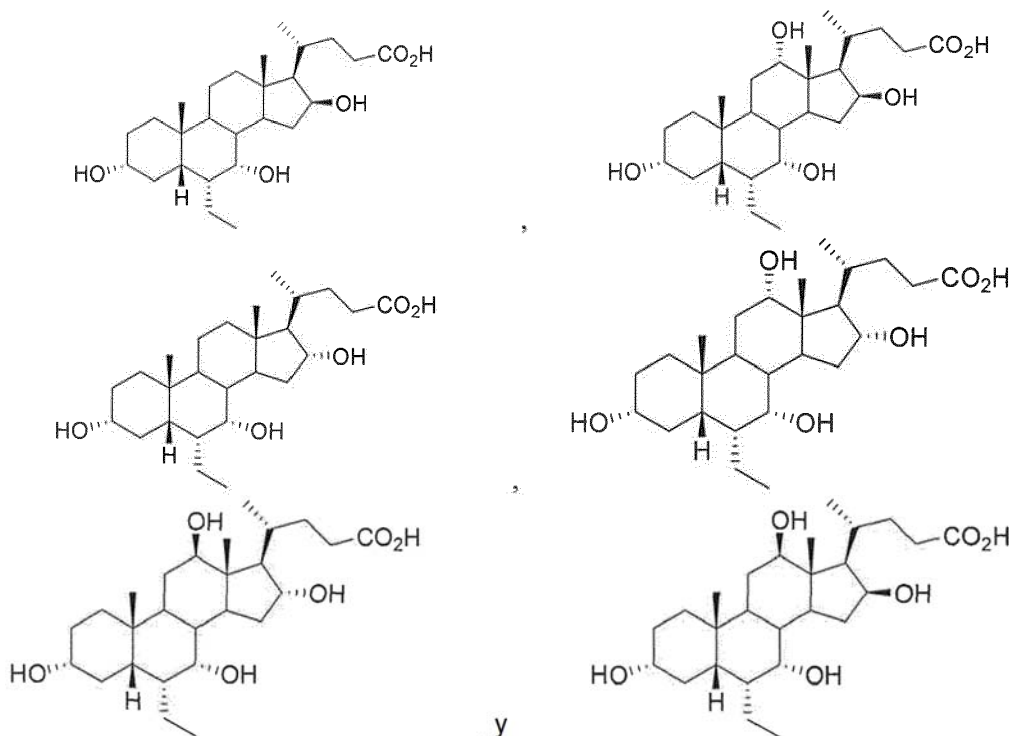
La invención incluye un compuesto, en el que el compuesto es el Compuesto 10:



(10)

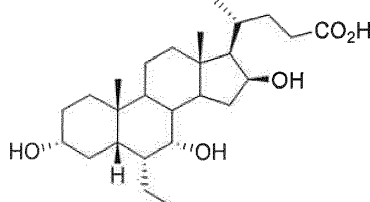
- 25 o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo. La invención incluye un compuesto, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.

La invención incluye un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en



, o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina de los mismos.

La invención incluye un compuesto, en el que el compuesto es



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

La invención incluye una composición que comprende un compuesto de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención incluye un compuesto o composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método administrar el compuesto de la invención. La invención incluye el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para un método de tratamiento o prevención de una enfermedad.

La invención incluye el uso, donde la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal. La invención incluye el uso, donde el compuesto o composición se administra al sujeto por vía oral, parenteral, intravenosa, o tópica. La invención incluye el uso donde el sujeto es un ser humano.

La descripción anterior expone de forma bastante amplia las características más importantes de la presente invención de modo que la descripción detallada de la misma a continuación pueda comprenderse, y de modo que puedan apreciarse mejor las presentes contribuciones a la técnica. Otros objetivos y características de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada junto con los ejemplos.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 es una serie de 2 gráficos (A-B) que muestra los resultados de ensayo FRET usando el compuesto 10 (Fig. 1A) y LCA (Fig. 1B) sobre células HEK293T transfectadas de forma transitoria con el vector solamente (V) o vector que expresa TGR5 (TGR5).

La Figura 2 es una serie de 2 gráficos (A-B) que muestra los resultados del ensayo de transactivación (indicador CRE-Luc) para el compuesto 10 y LCA (control positivo) usando células HEK293T que expresan TGR5.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los resultados del ensayo de expresión del gen diana TGR5 para el compuesto 10 usando células NC1-H716 intestinales y LCA como control positivo.

La Figura 4 es una serie de 3 gráficos (A-C) que muestra los resultados del compuesto 10 de ensayo de citotoxicidad *in vitro* que mide la liberación de ATP después de 4 horas de estimulación usando intestino humano (NCI-H716). LCA es un control positivo.

La Figura 5 es una serie de 3 gráficos (A-C) que muestra los resultados para el compuesto 10 de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* que mide la liberación de ATP después de 4 horas de estimulación usando líneas celulares hepáticas (HepG2). LCA es un control positivo.

La Figura 6 es un gráfico que representa la tensión superficial representada contra el logaritmo de la concentración de compuesto 10 (mM) en NaCl 0,15 M.

La Figura 7 es un diagrama de flujo biliar para un experimento de infusión en el duodeno realizado usando el compuesto 10.

La Figura 8 es un diagrama del flujo biliar para un experimento de infusión femoral realizado usando el compuesto 10.

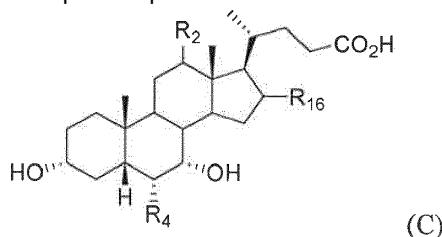
La Figura 9 es un gráfico que representa las tasas de secreción frente al tiempo en experimentos de infusión femoral y duodenal realizados usando el compuesto 10.

La Figura 10 es una serie de gráficos que muestra el compuesto 10 y su metabolito principal identificado en bilis usando espectrometría de masas en un experimento *in vivo*. Los datos se presentan como valores absolutos de área.

Descripción de la invención

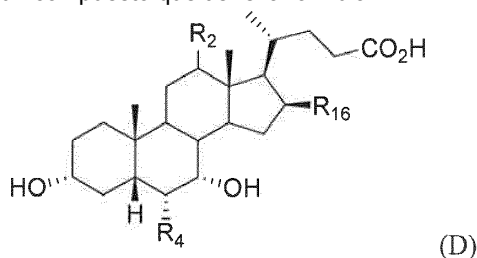
Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos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

En un aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula C:



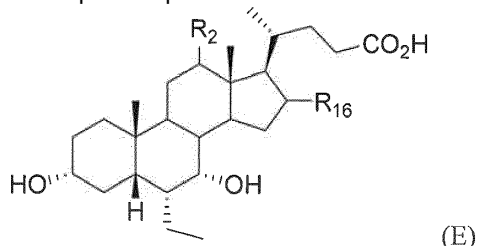
o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂ es hidrógeno o hidroxilo; R₄ es alquilo sin sustituir; y R₁₆ es hidroxilo, alcoxi o halógeno.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula D:



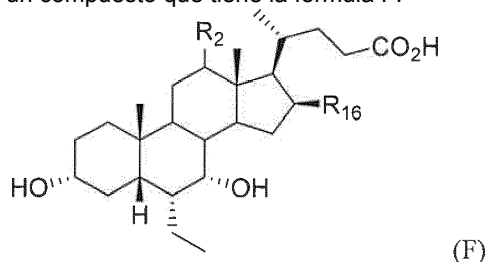
o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂, R₄, y R₁₆ son como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula E:



o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R₂ y R₁₆ son como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula F:

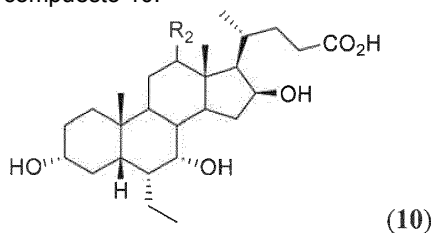


o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que R_2 y R_{16} son como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R_2 es H. En un aspecto, la invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R_2 es alfa-OH. En un aspecto, la invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R_2 es beta-OH.

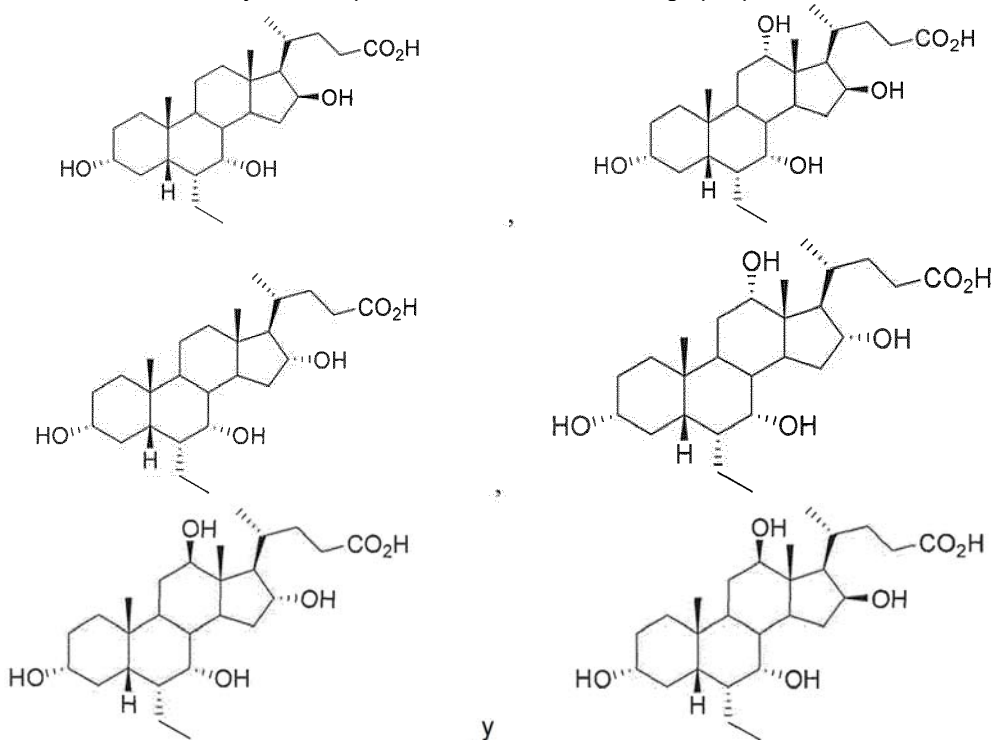
En un aspecto, la invención incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en el que R_4 es etilo.

En un aspecto, la invención incluye el compuesto 10:



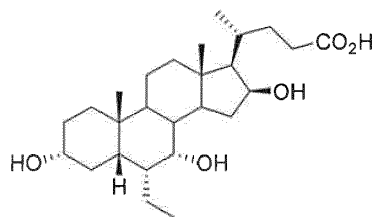
o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en



o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina de los mismos.

En un aspecto, la invención incluye el compuesto



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

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

En un aspecto, la invención incluye una composición que comprende un compuesto o una sal, solvato, hidrato conjugado con glicina o conjugado con taurina del mismo y al menos un excipiente. En un aspecto, la invención incluye una composición que comprende un compuesto o una sal, solvato, hidrato conjugado con glicina o conjugado con taurina del mismo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención incluye el compuesto o una composición de la invención, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto. En otro aspecto, la invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto administrando un compuesto o una composición de la invención. En un aspecto, la invención incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición de la invención que se administra al sujeto. En un aspecto, la invención incluye una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto o composición de la invención que se administra.

En un aspecto, la invención incluye el uso del compuesto o composición de la invención, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto que implica la modulación del receptor TGR5. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad que implica la inducción del receptor TGR5 en un sujeto mediante la administración de un compuesto o composición de la invención.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es una enfermedad metabólica seleccionada de obesidad, diabetes, síndrome metabólico, resistencia a insulina, hipertensión y dislipidemia. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica seleccionada de obesidad, diabetes, diabetes, síndrome metabólico, resistencia a insulina, resistencia prediabética a insulina, hipertensión y dislipidemia.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria seleccionada de alergia, osteoartritis, apendicitis, asma bronquial, pancreatitis, erupción alérgica y psoriasis. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada de alergia, osteoartritis, apendicitis, asma bronquial, pancreatitis, erupción alérgica y psoriasis.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo I. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo I.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es una enfermedad gastrointestinal seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, o colitis ulcerante), síndrome del intestino corto (colitis posradiación), colitis microscópica, síndrome del intestino irritable (absorción deficiente) y crecimiento bacteriano excesivo. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad gastrointestinal seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerante), síndrome del intestino corto (colitis posradiación), colitis microscópica, síndrome del intestino irritable (absorción deficiente) y crecimiento bacteriano excesivo.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es enfermedad renal seleccionada de nefropatía diabética, insuficiencia renal crónica, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de enfermedad renal seleccionada de nefropatía diabética, insuficiencia renal crónica, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es cáncer seleccionado de cáncer colorrectal, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata e insulanoma. La invención incluye un método de tratamiento o prevención del cáncer seleccionado de cáncer colorrectal, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata e insulanoma.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad es una enfermedad hepática seleccionada de esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica, hepatitis vírica crónica, enfermedad hepática alcohólica, hepatitis inducida por fármacos, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hipertensión portal, desaturación biliar, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Wilson, deficiencia de α 1-antitripsina, nutrición parenteral total (TPN), coleditiasis, colestasis asociada a TPN y sepsis. La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad hepática seleccionada de esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólica, hepatitis vírica crónica, enfermedad hepática alcohólica, hepatitis inducida por fármacos, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hipertensión portal, desaturación biliar, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Wilson, deficiencia de α 1-antitripsina, nutrición parenteral total (TPN), coleditiasis, colestasis asociada a TPN y sepsis.

En un aspecto, la invención incluye el uso, donde la enfermedad cardíaca se selecciona de insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, aterosclerosis, angina de pecho, arteriosclerosis y enfermedad cerebrovascular (hemorragia, apoplejía, infarto cerebrovascular). La invención incluye un método de tratamiento o prevención de una enfermedad cardíaca seleccionada de insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, aterosclerosis, angina de pecho, arteriosclerosis y enfermedad cerebrovascular (hemorragia, apoplejía, infarto cerebrovascular).

En un aspecto, la invención incluye una enfermedad que implica la modulación del receptor TGR5. En un aspecto, la invención incluye un compuesto que es un agonista de TGR5. En un aspecto, el compuesto es un agonista selectivo de TGR5 sobre el activador de FXR.

En un aspecto, el compuesto o composición de la invención se administra al sujeto por vía oral, parenteral, intravenosa o tópica. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

Definiciones

Por conveniencia, ciertos términos usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen aquí.

El término "tratar", como se usa en este documento, significa aliviar, disminuir, reducir, eliminar, modular o mejorar, es decir, causar la regresión de la patología o afección.

El término "prevenir", como se usa en este documento, significa impedir completa o casi completamente que una patología o afección aparezca en un paciente o sujeto, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto a dicha patología o afección o está en riesgo de contraerla. Prevenir también puede incluir inhibir, detener el desarrollo de una patología o afección y aliviar o mejorar, es decir, causar la regresión de la patología o afección, por ejemplo, cuando la patología o afección puede estar ya presente.

Como se usa en este documento, la expresión "conjugado de glicina o conjugado de taurina" se refiere a conjugados de los compuestos de las fórmulas de la invención con glicina o taurina. Dichos conjugados de los compuestos de las fórmulas de la invención tendrán la ventaja añadida de integridad potenciada en fluidos biliares o intestinales. Como se usa en este documento "BA" significa ácido biliar y derivados de ácido biliar. Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos esteroideos derivados de colesterol. Los ácidos biliares principales son ácido cólico y quenodesoxicólico. En el cuerpo, estos ácidos se conjugan con glicina o taurina antes de secretarse a la bilis.

"Alquilo" incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo) y grupos alquilo de cadena ramificada (por ejemplo, isopropilo, terc-butilo, isobutilo). En ciertas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono en su estructura (por ejemplo, C₁-C₆ para la cadena lineal, C₃-C₆ para la cadena ramificada). En algunos ejemplos, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene cuatro o menos átomos de carbono en su estructura.

A menos que el número de carbonos se especifique de otra manera, "alquilo inferior" incluye un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, pero que tiene de uno a diez, por ejemplo, de uno a seis, átomos de carbono en su estructura principal.

El término "éster" incluye compuestos y restos que contienen un carbono o un heteroátomo unido a un átomo de oxígeno que está unido al carbono de un grupo carbonilo. El término "éster" incluye grupos alcóxicarboxi tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, butoxicarbonilo, pentoxicarbonilo, etc. Los grupos alquilo, alquénilo o alquilinilo son como se han definido anteriormente.

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

5 El término "halógeno" incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc. El término "perhalogenado" generalmente se refiere a un resto en el que todos los hidrógenos se reemplazan por átomos de halógeno.

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

15 La expresión "funcionalidad inestable" se refiere a un patrón de sustitución que contiene una unión inestable, por ejemplo, una funcionalidad o enlace que es susceptible a la hidrólisis o escisión en condiciones fisiológicas (por ejemplo, soluciones acuosas en el intervalo de pH neutro). Los ejemplos de funcionalidades inestables incluyen acetales y cetales.

20 Además, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir en forma hidratada o no hidratada (la anhidra) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Los ejemplos no limitantes de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Los ejemplos no limitantes de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

25 "Solvatos" se refiere formas de adición de disolvente que contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen una tendencia a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando de esta manera un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman por la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en las que el agua conserva su estado molecular como H₂O, siendo tal combinación capaz de formar uno o más hidrato.

30 Se apreciará que la estructura de algunos de los compuestos de la invención incluye átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, se entenderá que los isómeros que surgen de tal asimetría (por ejemplo, todos los enantiómeros y diastereómeros) se incluyen dentro del alcance de la invención, a menos que se indique otra cosa. Dichos isómeros pueden obtenerse en una forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación convencionales y por síntesis controlada estereoquímicamente. Los enantiómeros (configuraciones R y S) se nombran de acuerdo con el sistema desarrollado por R.S. Cahn, C. Ingold y V. Prelog.

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

45 "Compuesto estable" y "estructura estable" pretenden indicar un compuesto que es lo suficientemente fuerte para sobrevivir al aislamiento a un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y la formulación en un agente terapéutico eficaz.

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

55 Como se define en el presente documento, el término "derivado", por ejemplo, en la expresión "derivados de ácido biliar", se refiere a compuestos que tienen una estructura anular de 4 miembros de núcleo común, y están sustituidos con diversos grupos como se describe en el presente documento.

60 El término "bioisómero" se refiere a un compuesto resultante del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos con otro átomo o grupo de átomos, ampliamente similares. El reemplazo bioisostérico puede tener base fisicoquímica o topológica. Los ejemplos de bioisómeros de ácido carboxílico incluyen sulfonimidas de acilo, tetrazoles, sulfonatos y fosfonatos. Véase, por ejemplo, Patani y LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176 (1996).

65 "Terapia de combinación" (o "coterapia") incluye la administración de un compuesto de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico pretendido para proporcionar el efecto

beneficioso de la coacción de estos agentes terapéuticos (es decir, el compuesto de la invención y al menos un segundo agente). El efecto beneficioso de la combinación incluye, aunque sin limitación, coacción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de los agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación típicamente se realiza sobre un período de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días, o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). "Terapia de combinación" puede pretender abarcar, pero generalmente no, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes diferentes de monoterapia que producen de forma accidental y arbitraria las combinaciones de la presente invención. "Terapia de combinación" pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de un modo secuencial, es decir, donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de un modo sustancialmente simultáneo. La administración sustancialmente simultánea puede conseguirse, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tenga una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede lograrse por cualquier vía apropiada incluyendo, aunque sin limitación, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse por inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Como alternativa, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección intravenosa. La secuencia en que se administran los agentes terapéuticos no es estrechamente crítica.

"Terapia de combinación" también abarca la administración de los agentes terapéuticos descritos anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos y terapias sin fármaco (por ejemplo, cirugía o tratamientos mecánicos). Cuando la terapia de combinación comprende adicionalmente un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármacos puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso a partir de la coacción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármacos. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso aún se consigue cuando el tratamiento sin fármacos se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizá por días o incluso semanas.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en este documento se refieren a modos de administración diferentes a administración enteral y tópica, habitualmente por inyección e incluye sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular e intraesternal.

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

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" significa una cantidad (cantidad o concentración) de un compuesto de la presente invención, o una combinación de compuestos, que se administra para prevenir o reducir el riesgo de una enfermedad - en otras palabras, una cantidad necesaria para proporcionar un efecto preventivo o profiláctico. La cantidad del presente compuesto a administrarse a un sujeto dependerá del trastorno particular, el modo de administración, los compuestos coadministrados, si los hay, y las características del sujeto, tales como salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a los fármacos.

La expresión "reducir el riesgo de", como se usa en este documento, significa disminuir la posibilidad o probabilidad de que aparezca una enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad inflamatoria y/o enfermedad metabólica en un paciente, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto a dicho acontecimiento.

Una "sal" de un compuesto de la invención es un producto del compuesto que contiene un enlace iónico y se produce típicamente por reacción del compuesto con un ácido o una base.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal adecuada para administrar a un sujeto.

Una "composición" es una formulación que contiene un compuesto de la invención en una forma adecuada para su administración a un sujeto. En otra realización, la composición farmacéutica está a granel o en forma unitaria de dosificación. La forma unitaria de dosificación es cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una bomba individual en un inhalador de aerosol, o un vial. La cantidad de ingrediente activo (por ejemplo, una formulación de un compuesto de la invención o sales del mismo) en una

monodosis de composición es una cantidad eficaz y se varía de acuerdo con el tratamiento particular implicado. Un experto en la materia apreciará que a veces es necesario hacer variaciones rutinarias a la dosificación dependiendo de la edad y estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una diversidad de vías, incluyendo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal y similares. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la invención incluye polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. En otra realización, el compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que sea necesario.

La expresión "dosis rápida" se refiere a formulaciones de compuestos que son formas de dosificación de rápida dispersión.

La expresión "liberación inmediata" se define como una liberación de compuesto a partir de una forma de dosificación en un período de tiempo relativamente breve, generalmente hasta aproximadamente 60 minutos. La expresión "liberación modificada" se define para incluir liberación retardada, liberación prolongada y liberación pulsada. La expresión "liberación pulsada" se define como una serie de liberaciones de fármaco desde una forma de dosificación. La expresión "liberación sostenida" o "liberación prolongada" se define como liberación continua de un compuesto desde una forma de dosificación durante un período prolongado.

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

La expresión "modulador de TGR5" significa cualquier compuesto que interacciona con el receptor TGR5. La interacción no está limitada a un compuesto que actúa como antagonista, agonista, agonista parcial o agonista inverso del receptor TGR5. En un aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como un antagonista del receptor TGR5. En otro aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como un agonista parcial del receptor TGR5. En otro aspecto, los compuestos de la presente invención actúan como un agonista inverso del receptor TGR5. El perfil de un ligando, tradicionalmente, endógeno sintético, se caracteriza por su eficacia intrínseca "e" descrita originalmente por Furchgott en 1966. Se usa para expresar el grado al cual los diferentes ligandos producen respuestas biológicas variables ocupando al mismo tiempo la misma cantidad de receptores. En líneas generales, el término "agonista" significa un compuesto que potencia la actividad de otra molécula o sitio receptor. Un agonista, por definición clásica, sea ortostérico, alostérico, inverso o coagonista tiene una propiedad de unirse al receptor, alterar su estado del receptor y provocar una acción biológica. Por consiguiente, el agonismo se define como una propiedad de un agonista o un ligando de producir una acción biológica. En contraste con esto, un "antagonista" es esencialmente un agonista con alta afinidad para la misma macromolécula de receptor, pero con eficacia intrínseca muy baja o insignificante, y por tanto evita estéricamente las acciones biológicas de un agonista. Como una propiedad, el antagonismo puede ser funcional o fisiológico, donde un agonista tiene una competición directa por el sitio del receptor en el primero y efectos opuestos mediante un sistema diferente de receptor-mensajero en el segundo. Más específicamente, una agonista de TGR5 es un ligando de receptor o compuesto que se une a TGR5 y aumenta la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en al menos un 20 % en células que expresan el receptor. A la inversa, un antagonista de TGR5 sería un compuesto que antagoniza o bloquea la actividad de un agonista, logrando de ese modo una reducción en la concentración de AMPC.

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad moduladora del receptor TGR5 y su uso para tratar y prevenir enfermedades metabólicas tales como obesidad y sensibilidad a insulina.

A continuación se muestra un compuesto de la invención.

Compuesto n.º	Estructura
10	

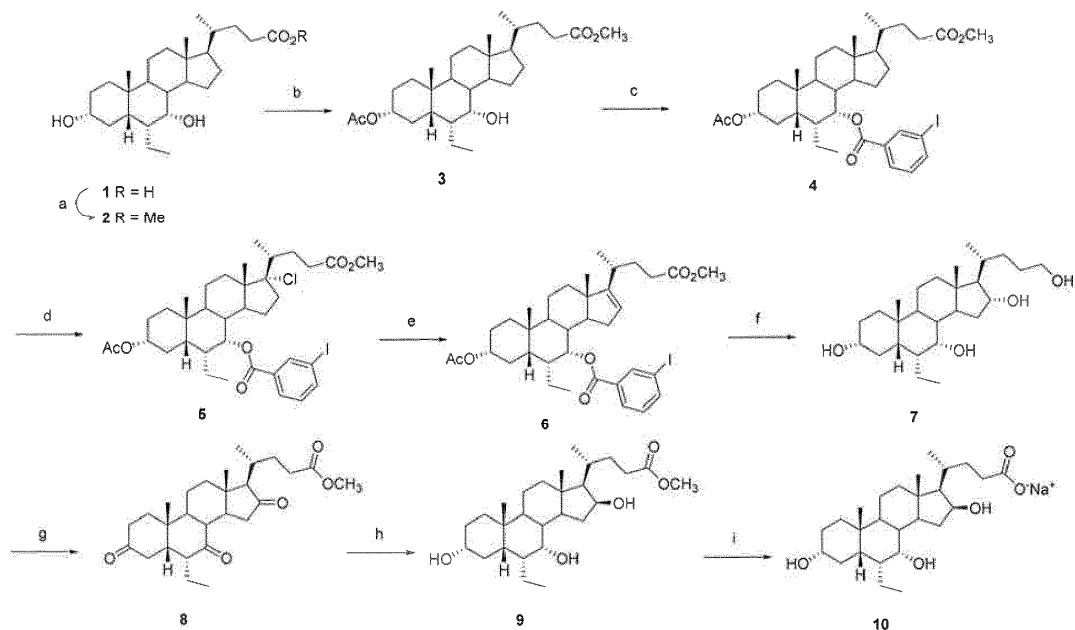
Compuesto n.º	Estructura
11	
12	
13	
14	
15	

La mención de publicaciones y documentos de patente no significa el reconocimiento de que todo pertenece a la técnica anterior, ni supone reconocimiento alguno en cuanto al contenido o fecha del mismo. Habiendo descrito ahora la invención por medio de una descripción escrita, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede llevar a la práctica en una diversidad de realizaciones, y que la descripción anterior y los ejemplos siguientes sirven de ilustración y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

EJEMPLO 1: Síntesis de moduladores TGRS

Los compuestos de la invención, y derivados relacionados, pueden sintetizarse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

Síntesis de sal sódica del ácido 3 α ,7 α ,16 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (10)



Reactivo y condiciones: a) MeOH, *p*TSA, ultrasonidos, 30 °C, 2 h, 93 %. b) Ac₂O, NaHCO₃, THF, reflujo, 12 h, 99 %. c) 1. Ácido 3-*i*-benzoico, (COCl)₂, CH₂Cl₂, ta, 1 h. 2. CaH₂, BnEt₃N⁺Cl⁻, tolueno, reflujo, 48 h, 80 %. d) PhICl₂, ^tBuOH, CH₂Cl₂, av, 0 °C, 1 h, 91 %. e) Piridina, reflujo, 12 h, 64 %. f) 1. BH₃THF, ta, 2 h. 2. H₂O₂, NaOH_{ac.}, de 0 °C a ta, 3 h. 3. KOH, MeOH, tolueno, reflujo, 12 h. 47 %. g) 1. Reactivo de Jones, acetona, de 0 °C a ta, 2 h. 2. *p*TSA, MeOH, ultrasonidos, 30 °C, 2 h. 55 %. h) ^tBuNH₂BH₃, CH₂Cl₂, ta, 24 h, 40 %. i) NaOH, MeOH, ta, 3 h, 82 %. Rendimiento total: 3,6 %.

10 3α, 7α-Dihidroxi-6α-etil-5β-colan-24-oato de metilo (2)

A una solución de 1 (4,1 g, 9,76 mmol) en metanol (120 ml) se le añadió *p*TSA (0,41 g, 2,15 mmol) y la mezcla se sometió a ultrasonidos a 30 °C durante 2 h. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en CHCl₃ (150 ml), se lavó con una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico (2 x 100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad para proporcionar el éster metílico 2 (3,95 g, 9,1 mmol, 93 %) en forma de un sólido de color blanco que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 3α-Acetoxi-7α-hidroxi-6α-etil-5β-colan-24-oato de metilo (3)

A una solución de 2 (3,9 g, 8,98 mmol) en THF recién destilado (100 ml) se le añadieron anhídrido acético (15,29 ml, 161,75 mmol) y NaHCO₃ (15,09 g, 179,72 mmol) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (120 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 80 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron a sequedad a presión reducida para obtener el compuesto acetilado deseado 3 (4,25 g, 8,92 mmol, 99 %) en forma de un sólido de color blanco que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,65 (3H, s, 18-CH₃), 0,84-0,93 (9H, m, 19-CH₃ + 21-CH₃-21, 26-CH₃), 1,11-1,91 (26H, m), 2,00 (3H, s, 3-CHOC(O)CH₃), 2,28-2,36 (2H, m), 3,65 (3H, s, COOCH₃), 3,70 (1H, s a, 7-CH), 4,48-4,59 (1H, m, 3-CH).

30 3α-Acetoxi-6α-etil-7α-(3'-yodobenzoil)oxi-5β-colan-24-oato de metilo (4)

Se suspendió ácido 3-yodobenzoico (3,93 g, 15 mmol) en CH₂Cl₂ (30 ml) y se trató con cloruro de oxalilo (3,21 ml, 36,1 mmol) en presencia de 2 gotas de DMF a temperatura ambiente hasta que la mezcla se disolvió (aproximadamente 1 h). Los volátiles se retiraron a presión reducida y el cloruro de acilo obtenido de esta manera se disolvió en 150 ml de tolueno y se añadió a una solución agitada de 3 (4,2 g, 8,82 mmol) en tolueno (150 ml). A la solución anterior se le añadieron CaH₂ (2,66 g, 63,5 mmol) y BnEt₃N⁺Cl⁻ (0,5 g, 2,2 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 48 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se suspendió en CHCl₃ (200 ml) y se filtró. El filtrado orgánico se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando del 5 al 10 % de EtOAc en éter de petróleo para producir 3,54 g (5,01 mmol, 57 %) de 4 y 1,23 g (2,58 mmol) de material de partida sin reaccionar (rendimiento de conversión al 80 %).

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,67 (3H, s, 18-CH₃), 0,88-0,92 (6H, m, 21-CH₃, 26-CH₃), 1,13-1,32 (15H, m), 1,7-1,74 (5H, m), 1,89-1,91 (5H, m), 2,05 (3H, s, 3-CHOC(O)CH₃), 2,18-2,30 (2H, m), 3,63 (3H, s, COOCH₃), 4,60-4,62 (1H, m, 3-CH),

5,41 (1H, s a, 7-CH), 7,23 (1H, dd, J1 = 6,5 Hz, J2 = 6,7 Hz, 5'-H), 7,94 (1H, d, J = 6,7 Hz, 4'-H), 8,04 (1H, d, J = 6,5 Hz, 6'-H); 8,37 (1H, s, 2'-H).

¹³C RMN (CDCl₃) δ: 11,6, 11,7, 18,2, 20,7, 21,7, 22,2, 23,1, 23,9, 26,8, 27,9, 29,6, 30,8 (x 2), 34,4, 35,1 (2 x), 35,5, 39,2, 39,3, 41,3, 42,9, 44,6, 50,6, 51,4, 55,3, 74,2, 74,5, 93,9, 128,9, 130,1, 132,4, 138,6, 141,6, 164,5, 170,3, 174,6.

3a-Acetoxi-6a-etil-7α-(3'-yodobenzoil)oxi-17a-cloro-5β-colan-24-oato de metilo (5)

A una solución de 4 (3,5 g, 4,95 mmol) en CH₂Cl₂ (280 ml) que contenía ^tBuOH 0,3 M (8,2 ml) se le añadió dicloroyodobenceno (3,38 g, 12,4 mmol). La mezcla se desoxigenó durante 3 min burbujeando N₂ seco. Después, la mezcla se sometió a fotólisis a 0 °C usando una lámpara de tungsteno (200 W) durante 1 h. Después, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó rápidamente por cromatografía ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo/EtOAc (8:2, v/v) para producir 3,35 g (4,52 mmol, 92 %) del derivado de 17-cloro 5 en forma de un sólido de color blanco.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,81 (3H, s, 18-CH₃), 0,91 (3H, d, J = 7,3 Hz, 21-CH₃), 1,0 (6H, m, 19-CH₃ + 26-CH₃), 1,12-1,93 (24H, m), 2,03 (3H, s, 3-CHOC(O)CH₃), 2,18-2,25 (2H, m), 3,65 (3H, s, COOCH₃), 4,57-4,62 (1H, m, 3-CH), 5,40 (1H, s a, 7-CH), 7,22 (1H, t, J = 7,79 Hz, 5'-H), 7,91 (1H, d, J = 7,76 Hz, 4'-H), 8,02 (1H, d, J = 7,7 Hz, 6'-H), 8,38 (1H, s, 2'-H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 11,6, 14,4, 14,5, 20,7, 21,6, 22,2, 23,1 (x 2), 26,7, 28,6, 29,4, 31,7, 34,2 (x 2), 35,1, 35,4, 39,6, 40,4, 41,1, 41,3, 44,6, 45,2, 49,9, 51,5, 74,1, 74,4, 92,9, 93,9, 128,8, 130,1, 132,3, 138,6, 141,7, 164,9, 170,7, 174,1.

A¹⁶ 3a-Acetoxi-6a-etil-7α-(3'-yodobenzoil)oxi-5β-colan-24-oato de metilo (6)

El derivado de 17-cloro 5 (3,3 g, 4,46 mmol) se disolvió en piridina seca (130 ml) y se calentó a reflujo durante una noche. Después, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 8:2 de éter de petróleo/EtOAc para producir 2,24 g (3,18 mmol, 72 %) de la olefina deseada en forma de un sólido de color blanco.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,75 (3H, s, 18-CH₃), 0,89 (3H, t, J = 7,4 Hz, 21-CH₃), 0,98 (3H, t, J = 6,5 Hz, 26-CH₃), 1,03 (H, s, 19-CH₃), 1,11-2,02 (22H, m), 2,05 (3H, s, 3-CHOC(O)CH₃), 2,22- 2,30 (2H, m), 3,65 (3H, s, COOCH₃), 4,58-4,62 (1H, m, 3-CH), 5,20 (1H, s a, 7-CH), 5,51 (1H, s, 16-CH), 7,21 (1H, t, J = 7,9 Hz, 5'-H), 7,90 (1H, dt, J1 = 7,9 Hz, J2 = 1,1 Hz, 4'-H), 8,02 (1H, dt, J1 = 7,9 Hz, J2 = 1,1 Hz, 6'-H), 8,37 (1H, t, J = 1,3 Hz, 2'-H).

¹³C RMN (CDCl₃) δ: 11,6, 15,9, 20,6, 21,7, 21,8, 22,1, 23,1, 26,7, 29,6, 30,9, 31,1, 31,7, 32,2, 34,5, 34,9, 35,0, 35,7, 37,9, 41,3, 44,8, 47,5, 51,4, 51,7, 74,1, 74,7, 93,9, 121,4, 128,9, 130,1, 132,3, 138,6, 141,7, 158,5, 164,6, 170,7, 174,4.

3α,7α,16α,24-tetrahidroxi-6α-etil-5β-colano (7)

La olefina 6 (0,3 g, 0,42 mmol) se disolvió en BH₃-THF (10,6 ml 1 M en THF) a 0 °C y después se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de este tiempo la reacción se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota una mezcla de NaOH acuoso 4 M (20 ml) y H₂O₂ (20 ml) y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 3 h. La reacción se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 60 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo oleoso se disolvió en tolueno (52 ml), se añadió KOH al 5 % en MeOH (7 ml) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante una noche. El disolvente se retiró a presión reducida, el residuo se disolvió en agua (25 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc/EtOH (95:5, v/v) para producir 0,085 g (0,2 mmol, 47 %) del tetrol deseado en forma de un sólido de color blanco.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,64 (3H, s, 18-CH₃), 0,85-0,91 (6H, m, 19-CH₃ + 26-CH₃), 0,92 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-CH₃), 1,21-1,91 (21H, m), 3,33-3,35 (1H, m, 3-CH), 3,54-3,61 (3H, m, 7-CH + 24-CH₂), 3,94 (1H, s a, 16-CH).

¹³C RMN(CDCl₃) δ: 11,7, 13,1, 14,1, 18,8, 20,4, 21,9, 22,4, 23,1, 28,7, 30,4, 31,8, 33,1, 33,5, 34,0, 35,4 (x 2), 35,5, 35,8, 39,5, 39,9, 41,3, 43,9, 45,3, 47,4, 62,6, 66,1, 70,6, 72,0.

3,7,16-Trioxo-6α-etil-5β-colan-24-oato de metilo (8)

Se añadió gota a gota reactivo de Jones (2 ml) a una solución agitada del tetrol 7 (0,19 g, 0,45 mmol) en acetona (25 ml) a 0 °C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después, se añadió metanol (8 ml) y el producto oxidado se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en MeOH (80 ml), se añadió pTSA y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en CHCl₃ (50 ml), se lavó con una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico (2 x 50 ml), agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando EtOAc del 20 al 30 % en éter de petróleo para proporcionar el éster metílico 8 (0,115 g, 0,26 mmol, 58 %) en forma de un sólido de color blanquecino.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 0,82 (3H, s, 18-CH₃); 0,85 (3H, m, 26-CH₃); 1,0 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-CH₃); 1,37 (3H, s, 19-CH₃); 1,55-2,35 (23H,m); 2,63-2,87 (2H, m).

3 α ,7 α ,16 β -Trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oato de metilo (9)

A una solución del triceto éster 8 (0,1 g, 0,22 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) se le añadió un complejo de terc-butilamina-borano (0,1 g, 1,12 mmol) y la reacción se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió HCl 3 N y la mezcla resultante se agitó durante 30 min. La capa orgánica se separó, se lavó con una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico (10 ml), agua (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo, en el que la 7-cetona no se redujo, se disolvió en una mezcla 1:4 v/v de H₂O/THF (5 ml) y se añadió NaBH₄ a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, después se añadieron agua (5 ml) y HCl 3 N (5 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (4 x 30 ml), las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo, que consiste en al menos 2 componentes, se purificó por cromatografía ultrarrápida, usando MeOH del 1 a 4 % en CHCl₃ para producir 0,036 g (0,08 mmol, 36 %) del compuesto deseado 9.

¹H RMN (Acetona-d₆) δ : 0,87-0,90 (6H, m, 18-CH₃ + 26-CH₃), 0,92 (3H, s, 19-CH₃), 0,98 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-CH₃), 1,19-1,58 (10H, m), 1,75-2,05 (7H, m), 2,34-2,41 (2H, m), 3,28-3,30 (1H, m, 3-CH), 3,62 (3H, s, COOCH₃), 3,64 (1H, s a, 7-CH), 4,37 (1H, s a, 16-CH). ¹³C RMN (Acetona-d₆) δ : 11,1, 12,5, 17,4, 20,4, 22,3, 22,8, 30,1, 30,4, 30,5, 30,6, 33,1, 33,7, 35,4, 35,6 (x 2), 39,7, 40,0, 41,6, 42,2, 45,7, 48,3, 50,8, 61,7, 69,5, 71,3, 71,4, 174,8.

Sal sódica del ácido 3 α ,7 α ,16 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (10)

El éster 9 (35 mg, 0,08 mmol) se disolvió en 8 ml de NaOH al 5 % en MeOH y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó a presión reducida, el sólido resultante era en una mezcla de H₂O/CH₃OH (1:1) y se purificó por cromatografía de fase inversa (columna RP-18 lobar A) usando una mezcla de CH₃OH/H₂O (de 5:5 a 7:3) como fase móvil, para proporcionar la sal sódica deseada 10 (15 mg, 0,03 mmol, 43 %).

¹H RMN (CD₃OD) δ : 0,86 (3H, s, 18-CH₃), 0,88-0,93 (6H, m, 19-CH₃ + 26-CH₃), 0,99 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-CH₃), 1,06-1,41 (9H, m), 1,46-1,9 (11H, m), 1,97-2,04 (2H, m), 2,23-2,25 (2H, m), 2,30-2,35 (1H, m), 3,28-3,35 (1H, m, 3-CH), 3,67 (1H, s a, 7-CH), 4,49-4,52 (1H, m, 16-CH). ¹³C RMN (CD₃OD) δ : 12,0, 13,3, 18,7, 21,6, 23,5, 23,7, 29,5, 31,2, 31,3, 33,4, 34,4, 34,5, 35,3, 35,5, 36,6, 36,7, 41,2, 43,1, 43,4, 46,7, 63,8, 71,1, 73,2, 73,4.

Ejemplo 2: Actividad de TGR5 y FXR *in vitro*

Ejemplo 2A: Unión al receptor TGR5 y FXR

La potencia y eficacia de los compuestos de la invención sobre el receptor TGR5 se evalúan usando ensayos *in vitro*. La Tabla 1 resume la potencia y eficacia de un compuesto de la invención sobre receptores FXR y TGR5.

Tabla1.

Compuesto (Patrón de Referencia)	Ensayo Alphascreen hFXR (CDCA = 10-20 μ M) CE ₅₀ (μ M)	FRET (AMPc) NCI-H716 hTGR5 (LCA = 4-8 μ M) CE ₅₀ (μ M)	Ensayo de Transactivación hTGR5 (LCA = 1-6 μ M) CE ₅₀ (μ M)	FRET-AMPc sobre células Hek293 que sobrexpresan TGR5 hTGR5 (LCA = 0,3-5 μ M) CE ₅₀ (μ M)
Compuesto 10	12	0,65	0,04	0,2

Ensayo FRET (Detección de niveles intracelulares de AMPc)

El ensayo de unión a receptor se realizó midiendo el nivel de AMP cíclico (AMPc) usando ensayo FRET. Se sembraron líneas celulares de intestino humano (NCI-H716) en placas de 96 pocillos recubiertas con 0,75 mg/ml de Matrigel (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante justo antes de su uso, a una densidad de 12 x 10³ células/pocillo en DMEN suplementado con FBS al 10 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina, y se cultivaron durante 24 h, lo que permitió la adhesión de las células al fondo de la placa. Las células se lavaron dos veces con PBS y se intercambió el medio por medio de ensayo de AMPc [OPTIMEM que contenía BSA al 0,1 % (p/v) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 1 mM]. Después de incubación durante 60 minutos a 37 °C, las células se trataron con concentraciones crecientes de compuesto **10** en tampón de estimulación (HEPES 5 mM, o, BSA al 1 % en HBSS pH 7,4) que contenía el quelato con europio - Estreptavidina y el anticuerpo conjugado con ALEXA Fluor 647 anti-AMPc (PerkinElmer) durante 1 hora a temperatura ambiente. El nivel de AMPc intracelular se determinó con el kit Lance (PerkinElmer). Se usó ácido litocólico como ligando de control. Se usó factor Z' para validar los ensayos. Se realizaron curvas de regresión no lineal, sin restricciones, usando ecuación de cuatro parámetros y el software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE₅₀.

Ensayo Alphascreen

La actividad sobre FXR se ensayó usando la tecnología Alphascreen en un ensayo de reclutamiento de coactivador. Alphascreen es un ensayo de química basada en perlas usado para estudiar las interacciones biomoleculares. La unión de moléculas capturadas en las perlas conduce a una transferencia de energía desde una perla a otra, produciendo finalmente una señal luminiscente. Cuando los compañeros interactúan, se transfiere energía química desde las perlas donantes hasta las perlasceptoras y se produce una señal. Tras la estimulación con ácidos biliares, el GST-FXR-LBD interacciona con el péptido Src1. Se usaron perlasceptoras recubiertas con anti-GST para capturar la fusión con GST de FXR-LBD mientras que se capturó el péptido SRC-1 biotinilado por las perlas donantes de estreptavidina. Tras iluminación a 680 nm, se transfiere energía química desde las perlas donantes hasta las perlasceptoras a través del complejo estreptavidina-donante/Src-1-biotina/GSTFXR-LBD/anti-GST-aceptor y se produce una señal. El ensayo se realizó en Optiplates de 384 pocillos de bajo volumen blancas (PerkinElmer) usando un volumen final de 25 µl que contenía concentraciones finales de 10 nM de proteína FXR-LBD marcada con GST purificada, péptido Src-1 biotinilado 30 nM, 20 µg/ml de perlasceptoras anti-GST y 10 µg/ml de perlas donantes de estreptavidina (PerkinElmer). El tampón de ensayo contenía Tris 50 mM (pH 7,4), KCl 50 mM, BSA al 0,1 % y DTT 1mM. Los tiempos de estimulación con 1 µl de ligandos (solubilizados en DMSO al 100 %) se fijaron a 30 min a temperatura ambiente. La concentración de DMSO en cada pocillo se mantuvo a una concentración final del 4 %. Después de la adición de la mezcla de detección (perlasceptoras y donantes), las placas se incubaron en la oscuridad durante 4 h a temperatura ambiente y después se leyeron con un analizador de microplaca Envision (PerkinElmer). Se realizaron curvas de respuesta a dosis por triplicado y se usó el factor Z' para validar los ensayos. Se realizaron curvas de regresión no lineal, sin restricciones, usando ecuación de cuatro parámetros y el software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE50.

Cultivo celular, transfección y ensayo de luciferasa

Se cultivaron células HEPG2 y HEK293T en E-MEM y DMEM respectivamente, suplementado con penicilina/estreptomycin al 1 %, L-glutamina al 1 % y suero bovino fetal al 1 % (alto contenido en glucosa) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Todas las transfecciones se hicieron usando reactivo de transfección Fugene HD (µl) a ADN (µg) 5:2 respectivamente (Roche). Veinticuatro horas antes de la transfección las células HEK293T o HepG2 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 o 15.000 células por pocillo respectivamente. Se realizaron transfecciones transitorias usando 100 ng de vector indicador pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega), 40 ng de pGL4.74 (Renilla), como control interno para la eficacia de transfección y 10 ng de plásmido de expresión pCMV-SPORT6-hTGR5, clon MGC:40597 de la NIH Mammalian Gene Collection (Invitrogen). Se añadió el vector pGEM para normalizar las cantidades de ADN transfectadas en cada ensayo (2 µg). Veinticuatro horas después de la transfección las células se estimularon con concentraciones crecientes de compuesto 10 durante 18 h. Los cultivos de control recibieron vehículo (DMSO al 0,1 %) en solitario. Las células después se lisaron añadiendo 75 µl de reactivo de luciferasa Dual-Glo (Promega) a 75 µl de medio que contenía células/pocillo. Se midió la actividad luciferasa de Renilla añadiendo volumen:volumen de reactivo Dual-Glo Stop y Glo y medio de cultivo original. Las actividades luciferasa se expresaron como la relación entre la unidad de luciferasa y la unidad de luciferasa de Renilla. Cada dato puntual es el promedio de ensayos triplicados. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

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

La eficacia se determinó calculando los porcentajes del valor LCA 10 µM para el estudio de agonista de TGR5 y el valor CDCA 10 µM para el estudio de agonista de FXR, respectivamente. Después de restar el valor promedio del estado basal (tratado con vehículo), los valores se aplicaron a las determinaciones de CE₅₀ y/o eficacia. El cálculo de la CE₅₀ promedio y la comparación de la CE₅₀ entre diferentes compuestos, se hizo después de la transformación en logaritmos.

Ejemplo 2B: Ensayo de expresión del gen diana de TGR5 del compuesto 10

Se midió el nivel de expresión génica de ACC y AMPK en células intestinales NCI-H716 usando el compuesto **10** y LCA como control positivo. El nivel de expresión de ARNm de genes diana de TGR5 se midió por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Q-RT-PCR). Se aisló el ARN total (Aurum Total RNA Mini Kit BioRad) de NCI-H716 estimuladas con compuesto **10** 5 µM durante 18 horas. El ARN se transcribió de forma inversa de forma aleatoria con ISCRIP cDNA SYNTHESIS KIT (BioRad) en 20 µl de volumen de reacción. Se usaron diez ng de molde en 20 µl de volumen final de reacción de PCR a tiempo real que contenía 0,3 µM de cada cebador y 10 µl de mezcla maestra de PCR de verde SYBR 2X (Bio-Rad). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y las condiciones de termociclado fueron: 3 minutos a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 30 segundos en el instrumento iCycler iQ5 (Biorad, Hercules, CA). El valor medio de las réplicas para cada muestra se calculó y expresó como el umbral de ciclo (CT: número de ciclo en que cada reacción de PCR alcanza un umbral de fluorescencia predeterminado, establecido dentro del intervalo lineal de todas las reacciones). La cantidad de expresión génica se calculó entonces como la diferencia (ΔCT) entre el valor CT de la muestra para el gen diana y el valor CT medio de esa muestra para el control endógeno (β2-microglobulina). La expresión relativa se calculó como la diferencia (ΔΔCT) entre los valores ΔCT de la muestra de ensayo y la muestra de control (WT) para

cada gen diana. El valor de cuantificación relativa se expresó y se muestra como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Todos los cebadores de PCR abarcaban intrones diseñados usando el software Beacon Designer sobre los datos de secuencia publicados de la base de datos NCBI. Los resultados se muestran en la Figura 3.

5 Ejemplo 2C: Citotoxicidad *in vitro* del compuesto 10 en líneas celulares intestinales y hepáticas humanas

Se midió la viabilidad celular usando PerkinElmer ATP-Lite 1 STEP. El ATP es un marcador para la viabilidad celular porque está presente en todas las células metabólicamente activas y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células experimentan necrosis o apoptosis. Se sembraron células humanas NCI-H716 o HepG2 (1×10^4) en placas de 96 pocillos y se estimularon con diluciones de factor 10 de 1 nM a 300 μ M del compuesto **10** durante 4 h a 37 °C. Las placas se equilibraron a TA durante 10 minutos y se añadieron 100 μ l de reactivo ATP-Lite 1 STEP a 100 μ l de medio de cultivo que contenía células. Se leyó la luminiscencia con Victor Light (PerkinElmer). La señal experimental se restó del fondo. Se usó tamoxifeno como control positivo de citotoxicidad celular, mientras que las células no tratadas sirvieron como control negativo. Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5.

15 Ejemplo 3: Actividades metabólicas de compuestos de la invención en un modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta

El objetivo del estudio es definir si agonistas de TGR5 (ácido oleanólico (OA) o compuesto de la invención (por ejemplo, un "compuesto de ensayo")) corrigen el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina asociada *in vivo*. Para ensayar esta posibilidad, se administró OA/compuesto de ensayo mediante administración en la comida durante 16 semanas a ratones C57BL6J macho que previamente se sometieron durante 10 semanas a una dieta alta en grasas.

25 II-Protocolo

En un estudio previo, se observó OA como agonista selectivo de TGR5 que no causaba aversión a la comida. Los animales tratados con una dosis de 100 mg/kg/día de OA mostraron, sin embargo, algunos signos de toxicidad, mientras que una dosis inferior era bien tolerada. Por lo tanto, se administra OA a la dosis de 50 mg/kg/día en este estudio.

Estudios *in vitro* han identificado compuestos de la invención como ligandos potentes y selectivos de TGR5. No se esperan problemas con la toxicidad con compuestos de la invención, que se administran a una concentración ~50 veces inferior.

Para este estudio, 48 ratones C57BL6J macho (5 semanas de edad) se dividen en dos grupos: un grupo de 24 (grupo 1, 2 y 3) animales recibe dieta de pienso mientras que el otro grupo de 24 recibe una dieta alta en grasas durante un período de 10 semanas (grupo 4, 5 y 6). Los animales después se analizan durante un período de 16 semanas. Cinco grupos de 10 animales se asignaron del siguiente modo:

- 1: dieta de pienso
- 2: dieta de pienso + OA 50 mg/kg/día
- 3: dieta de pienso + compuesto de ensayo, por ejemplo, 30 mg/kg/día
- 4: dieta alta en grasas
- 5: dieta alta en grasas + OA 50 mg/kg/día
- 6: dieta alta en grasas + compuesto de ensayo, por ejemplo. 30 mg/kg/día

Durante el estudio completo, se controló el peso corporal y la ingesta de comida dos veces a la semana.

Semana -2: Se analiza la composición corporal, para todos los grupos, por absorciometría de rayos-X de energía dual (dexascan).

Semana -1: se miden los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos después de un período de ayunas de 12 h y los ratones después se asignan a las dietas indicadas (día 0).

Semana 2: Se miden los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos después de un período de ayunas de 12 h (día 14).

Semana 4: Se determina la tolerancia de glucosa sometiendo a todos los animales a un ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT). Los animales se dejan en ayunas durante 12 h antes de este ensayo. Se mide el gasto de energía nocturna de los grupos 1, 4, y 6 (dieta de pienso, dieta alta en grasas y dieta alta en grasas OA/compuesto de ensayo por calorimetría indirecta).

Semana 8: Se analiza de nuevo la composición de peso corporal por dexascan para todos los grupos. Se miden los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina en todos los grupos después de un período de ayunas de 12 h (día 56).

- 5 Semana 9: Se estudia la actividad circadiana de los grupos 4, 5 y 6 (animales alimentados con dieta alta en grasas) durante un período de 30 h.

Semana 10: Se realiza la medición de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco en los grupos 4, 5 y 6.

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

Semana 12: Se analiza la tolerancia de glucosa realizando un ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los grupos 4, 5 y 6. Durante el IPGTT, también se recoge sangre para analizar los niveles de insulina. Los animales se dejan en ayunas 12 h antes de estos ensayos.

- 15 Se recogen heces en todos los grupos durante un período de tiempo de 24 h y se mide el contenido de lípidos fecales.

Semana 16: Se realiza ensayo frío en todos los animales midiendo la temperatura corporal de animales expuestos a 4 °C.

- 20 Tres días después, los animales se sacrificaron. En el sacrificio, se recoge sangre y se analiza para: lípidos en plasma (TC, TG, HDL-C, FFA); funciones hepáticas (ALAT, ASAT, Pasa alcalina, γ -GT); glucosa e insulina; perfiles de lipoproteínas de grupos seleccionados de plasma (cromatografía por exclusión de tamaño).

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

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

III-Procedimientos detallados

- 35 A-Procedimiento en animales y dietas

Alojamiento y manipulación de animales

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

- 45 *Agua para beber*

La composición química del agua corriente se analiza de forma regular para verificar la ausencia de sustancias tóxicas potenciales en el Institut d'Hydrologie, ULP, Estrasburgo. El agua para beber se trata con HCl y HClO₄ para mantener el pH entre 5 y 5,5 y la concentración de cloro entre 5 y 6 ppm.

- 50 *Dieta*

La dieta de pienso de roedores convencional se obtiene de UAR y la dieta alta en grasa se obtiene de Research Diet. Los ratones se alimentan, con dieta de pienso (proteínas al 16 %, grasas al 3 %, fibras al 5 %, cenizas al 5%) o con dieta alta en grasas (proteínas al 20 %, carbohidratos al 20 %, grasas al 60 %). Se mezclan ácido oleanólico y compuesto de ensayo con la dieta de pienso pulverizada o la dieta alta en grasas pulverizada en las siguientes proporciones: 0,5 g de OA/kg de alimento para el tratamiento de 50 mg/kg/día y 0,08 g de compuesto de ensayo/kg de alimento para el tratamiento de 10 mg/kg/día. Los gránulos después se reconstituyen. Los grupos de control reciben gránulos de alimento sin compuesto de ensayo u OA. Debido a la consistencia de la dieta alta en grasas, no se añade agua en la mezcla con OA. En el caso de la dieta de pienso, que es más difícil de reconstituir, se añade una cantidad mínima de agua al polvo para reconstituir los gránulos, que después se secan al aire. Se preparan semanalmente lotes nuevos de alimento.

- 60 *Recogida de sangre*

La sangre se recoge del seno retroorbital con anestesia o de la vena de la cola.

- 65

Anestesia

Para el experimento dexascan, los animales se anestesian con una mezcla de ketamina (200 mg/kg) / xilazina (10 mg/kg) administrada por inyección intraperitoneal.

5 Para la venipunción, se anestesia a los animales por inhalación de una mezcla de isoflurano-O₂.

B-Bioquímica

10 Los ensayos se realizan con una estación de trabajo de laboratorio automatizada Olympus AU-400 usando reactivos comerciales (Olympus).

Análisis de lípidos y lipoproteínas

15 Se determinan los triglicéridos, colesterol total y HDL en suero por ensayos enzimáticos. El contenido de colesterol HDL en suero se determina después de la precipitación de lipoproteínas que contienen apo B con ácido fosfotúngstico/Mg (por ejemplo, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El nivel de ácidos grasos libres se determina con un kit de Wako (por ejemplo, Neuss, Alemania) como se especifica por el proveedor.

Exploración metabólica y endocrina

20 La concentración de glucosa en sangre se mide por un analizador Precision Q.I.D (por ejemplo, sistema Medisense), usando electrodos Medisense Precis (por ejemplo, Abbot Laboratories, productos Medisense, Bedford, EE.UU.). Este método se valida, por comparación de los valores del analizador Precision Q.I.D con mediciones clásicas de glucosa. El método Precision Q.I.D se eligió ya que requiere una cantidad mínima de sangre y, por tanto, puede
25 emplearse para múltiples mediciones tales como durante un IPGTT. La insulina en plasma (por ejemplo, Mercodia, Uppsala, Suecia) se determina por ELISA de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

C-Ensayo metabólico

30 Perfiles de lipoproteínas

Los perfiles de lipoproteínas se obtienen por cromatografía líquida rápida de proteínas, que permite la separación de las tres clases principales de lipoproteínas VLDL, LDL, y HDL.

35 Ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal (IPGTT) - Ensayo de tolerancia a glucosa oral

Se realiza IPGTT en ratones que se han dejado en ayunas durante una noche (12 h). A los ratones se les inyecta por vía intraperitoneal (IPGTT) una solución de glucosa al 20 % en solución salina estéril (NaCl al 0,9 %) a una dosis de 2 g de glucosa/kg de peso corporal. Se recoge sangre de la vena de la cola, para el control de la glucosa y la
40 insulina, antes y 15, 30, 45, 75, 90, 120, 150, 180 min después de la administración de la solución de glucosa- el área de incremento de la curva de glucosa se calcula como una medida de la sensibilidad a insulina, mientras que los niveles correspondientes de insulina indican reservas de secreción de insulina.

Gasto de energía

45 El gasto de energía se evalúa a través de calorimetría indirecta midiendo el consumo de oxígeno con el aparato Oxyman (por ejemplo, Columbus Instruments, Columbus, OH) durante 12 h. este sistema consiste en un circuito abierto con aire que entra y sale de las jaulas de plástico (un ratón por jaula). Se permite a los animales acceso libre al alimento y al agua. Un detector muy preciso de CO₂ y O₂ mide la diferencia en las concentraciones de O₂ y CO₂
50 en ambos volúmenes de aire, lo que da la cantidad de oxígeno consumida en un período de tiempo dado que el flujo de aire del aire proveniente de la jaula es constante. Los datos provenientes del aparato se procesan en un ordenador conectado, se analizan y se muestran en un archivo Excel exportable. Los valores se expresan como ml.kg⁻¹.h⁻¹, que se conoce habitualmente como el VO₂.

55 Determinación del contenido de grasa corporal por Dexascan

Los análisis DEXA se realizan por el densitómetro de resolución ultra alta de la serie PIXIMUS (píxeles de 0,18 x 0,18 mm, GE Medical Systems, Madison, WI, EE.UU.). La densidad de minerales en hueso (BMD en g/cm²) y la composición corporal se determinan usando el software PIXIMUS (versión 1.4x, GE Medical Systems).

60 D-Medición no invasiva de la presión sanguínea y el pulso

El sistema de análisis de presión sanguínea Visitech BP-2000 es un sistema de manguito en la cola automatizado por ordenador que se usa para recoger múltiples mediciones en 4 ratones despiertos simultáneamente sin
65 intervención del operario. Los ratones están contenidos en cámaras oscuras individuales en una plataforma calentada con sus colas enroscadas a través de un manguito en la cola. El sistema mide la presión sanguínea

determinando la presión del manguito en que se elimina el flujo de sangre a la cola. Un detector fotoeléctrico detecta el pulso del ejemplar. El sistema genera resultados que han demostrado corresponder cercanamente con la presión intraarterial media, medidas simultáneamente en la arteria carótida. Esto permite obtener valores reproducibles de presión sanguínea sistólica y ritmo cardíaco. Esto requiere entrenar a los animales durante una semana en el sistema.

E-Actividad circadiana

Se mide la actividad locomotora espontánea usando cajas individuales, cada una compuesta por un suelo deslizante, una jaula desprendible y equipadas con receptores infrarrojos que permiten la medición de la actividad locomotora ambulatoria y de erguirse. Las cajas se vinculan a un ordenador usando una interface electrónica (por ejemplo, Imetronic, Pessac, Francia). Los ratones se ensayan durante 32 horas para medir la habituación al aparato, así como las actividades nocturnas y diurnas. La cantidad de agua consumida se mide durante el período de ensayo usando un medidor de lametones automatizado.

Ejemplo 4: Propiedades fisico-químicas

Solubilidad en agua

Se suspendieron BA sólidos en 5 ml de HCl 0,1 M. Las soluciones saturadas, después de incubación y mezcla suave durante 1 semana, se filtraron en un filtro Millipore (0,22 µm) y se midió la concentración de BA por HPLC-ESI-MS/MS usando columna C18 (150 mm x 2 mm d.i., 4 µm) y fases móviles de agua que contenían ácido acético 15 mM pH 5 y acetonitrilo. El caudal fue de 150 µl/min. La adquisición de espectrometría de masas se realizó en el modo de control de reacción múltiple usando la fuente ESI en ionización negativa. La solubilidad en agua se expresó como µmol/litro.

La solubilidad en agua se midió para las especies protonadas insolubles de ácidos biliares carboxilados a un pH 1. La solubilidad en agua del compuesto 10 fue de 120 µM (véase la Tabla 2).

La diferente posición de un hidroxilo (posición 16) en el compuesto 10 reducía ligeramente la solubilidad respecto al ácido 3,7,12 trihidroxibiliar convencional ácido cólico. La solubilidad en agua aumentó aumentando el pH y a pH 7 el compuesto 10 era muy soluble en agua. Los datos en la Tabla 2 muestran que el análogo carboxilado compuesto 10 cuando se administra en su forma ácida permanece insoluble en el contenido gástrico a un pH bajo y llega a solución para formar la sal (anión) una vez excretado en el duodeno debido al mayor pH de los fluidos pancreático y duodenal. En la bilis, el compuesto permanece en solución formando finalmente micelas a altas concentraciones.

Tabla 2

Ácido biliar	Ws ^(a) (µM)	CMC ^(b) Na ⁺ 0,15 M (mM)	ST _{CMC} ^(c) dina/cm	LogP _A ^(d)	Unión a albúmina ^(e) (%)
CDCA	32	3,2	45,5	2,2	93
UDCA	7,5	6,0	50,5	2,2	94
CA	273*	11*	-	1,1*	50*
TCDCA	hs	3,0*	-	0,9*	70*
TUDCA	hs	2,2*	-	1,1*	67*
6MUDCA	28*	4,2*	-	1,3*	80*
10	120	5,9	52,4	1,6	83

^a Ws: solubilidad en agua se refiere a BA como especie protonada y por lo tanto no se evaluó para TCDCA y TUDCA que son muy solubles (hs).

^b CMC: concentración micelar crítica determinada en solución acuosa de NaCl 0,15 M.

^c ST_{CMC}: tensión superficial en CMC en solución acuosa de NaCl 0,15 M.

^d LogP_A: coeficiente de reparto en 1-octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas.

*: valores de la bibliografía.

Concentración micelar crítica (CMC)

La detergencia, es decir, la tendencia a formar micelas se evaluó para todas las moléculas cargadas que son solubles en agua como sal sódica (2 unidades por encima del pKa). La concentración micelar crítica (CMC) se determinó por mediciones de tensión superficial (ST) usando un método de presión máxima de burbuja que da valores de tensión superficial ligeramente afectados por impurezas potenciales similares a métodos estáticos. El tensiómetro era un Sensadyne 6000 (Chem-Dyne Research Corp., Milwaukee, WI) equipado con dos sondas de vidrio de 0,5 y 4,0 mm de diámetro conectadas a una fuente de nitrógeno. La frecuencia de burbuja era 1 burbuja/segundo en agua destilada a 26 °C (P=273,5 kPa (2,7 atm)) y la calibración se hizo con agua bidestilada y metanol. La tensión superficial de soluciones de sales sódicas de BA en NaCl 0,15 M se midió a diversas concentraciones que variaban de 0,10-50 nM de intervalo. Los valores de tensión superficial se representaron frente al logaritmo de la concentración de sal biliar; las líneas de regresión correspondientes a las dos partes de la curva (fases monomérica y micelar) se calcularon usando el método de mínimos cuadrados, y la intersección de las líneas

se adoptó como el valor de CMC. A partir de las curvas de ST frente a la concentración también se calculó el valor de la tensión superficial en la CMC (equilibrio entre especies de monómeros y multímeros) que da información acerca de la potencia de detergencia que está relacionada con el tamaño de las micelas con capacidad asociada de disminución de la tensión superficial.

La CMC se evaluó por mediciones de tensión superficial en condiciones no de equilibrio, es decir, en condiciones en que las impurezas afectan ligeramente a los resultados de tensión superficial (Fig. 6). La Tabla 2 muestra los resultados. El compuesto **10** presentó una alta CMC con una baja capacidad de disminución de la tensión superficial que indicaba que este compuesto es un detergente moderado y las micelas tienen un número de agregación muy bajo. La presencia de un grupo hidroxilo en la posición beta C-16 reduce el área hidrófoba responsable de la interacción entre las partes posteriores, que es para formar micelas y, por lo tanto, las micelas son pequeñas y poco detergentes. Esta propiedad confiere a la molécula una baja toxicidad cuando se acumula en un fluido biológico u órgano dado.

Coefficiente de reparto en octanol/agua

El coeficiente de reparto en octanol/agua se midió para moléculas en su forma ionizada y, por lo tanto, se estudiaron análogos carboxi a un pH relativamente alto (8 o 9) para asegurar la ionización completa del grupo carboxilo. El coeficiente de reparto en 1-octanol/agua ($\log P$) se evaluó usando un procedimiento de matraz en agitación convencional. Los experimentos se realizaron en una solución de sal biliar 0,1 mM tamponada a pH 8 con tampón fosfato 0,1 M para asegurar la ionización completa del BA; los valores de $\log P$ se refieren al BA en la forma ionizada, no a las especies protonadas, y la concentración inicial de cada BA estaba por debajo de su propio valor de CMC. El tampón acuoso se presaturó previamente con 1-octanol, después se añadieron 5 ml de 1-octanol presaturado con agua y las muestras se dejaron equilibrar durante 2 semanas en agitación continua a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, las dos fases se separaron cuidadosamente. La concentración de BA en la fase acuosa se midió con HPLC-ESI-MS/MS usando una columna C18 (150 mm x 2 mm d.i., 4 μ m) y con agua que contenía ácido acético 15mM pH 5 y acetonitrilo para las fases móviles. El caudal fue de 150 μ l/min y la columna se mantuvo a 45 °C. La adquisición de espectrometría de masas se realizó en el modo de control de reacción múltiple usando la fuente ESI en ionización negativa.

La Tabla 2 muestra los resultados. El compuesto carboxilado **10** con tres grupos hidroxilo en las posiciones 3 α , 7 α y 16 β presentó una lipofilicidad ligeramente mayor respecto al análogo CA natural debido a la presencia del etilo en la posición C-6. La diferencia probablemente se debe a la posición infrecuente del grupo hidroxilo 16-beta, considerando que la posición 12-alfa no parece desempeñar un papel principal en las propiedades de detergencia.

Unión a albúmina

Se evaluó el grado de unión a albúmina por diálisis en equilibrio a una relación fija de BA-albúmina. Cada BA se disolvió a una concentración de 100 μ M en solución salina con albúmina sérica bovina al 5% (pH 7,2) y se dejó reposar durante 24 h a 25 °C. Se dializaron dos mililitros de esta solución en sacos de celulosa que tenían un punto de corte de peso molecular de 12.000-14.000 Dalton frente a 25 ml de solución salina. El sistema se equilibró por agitación suave durante 72 h a 25 °C. Las concentraciones BA de la solución dializada (correspondiente a la fracción no unida libre) y de la solución de partida se determinaron con HPLC-ESI-MS/MS en las mismas condiciones del análisis previo.

El porcentaje de unión a albúmina se calculó a partir de la concentración inicial de BA y a partir de la concentración no unida en la fracción dializada. Los datos se presentan en la Tabla 2.

El porcentaje de unión del compuesto **10** es mayor que CA como resultado del grupo metilo en la cadena lateral. El compuesto **10** presenta una unión a albúmina compatible con una captación hepática relativamente rápida, similar a BA de origen natural.

Ejemplo 5: Estabilidad metabólica *in vitro* en cultivo de deposiciones humanas

Estabilidad a bacterias intestinales

7 α -deshidroxilación

Se transfirieron deposiciones humanas recién homogeneizadas (500 mg) en viales estériles a los que se añadió 5 ml de medio de glucosa de carne troceada esterilizada (Scott Lab., Fiskville, RI). Después se añadieron los BA a una concentración final de 0,05 mM. Los viales se incubaron a 37 °C; después, a las 0, 1, 2, 4, 8 y 24 h después de la adición del BA, la reacción se detuvo con 150 μ L de KOH al 30 %. Las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 10 min; a partir del sobrenadante se aisló el BA por extracción en fase sólida en C-18 y se analizaron por TLC y HPLC-ES-MS/MS.

Se empleó cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas de gel de sílice de 0,25 mm de grosor (Merck, Darmstadt, Alemania), como el primer ensayo de exploración. El sistema disolvente usado para la separación de BA conjugado estaba compuesto de ácido propiónico/acetato isoamílico/agua/N-propanol (3:4:1:2, v/v/v/v; disolvente I), y el del BA no conjugado era ácido acético/tetracloruro de carbono/éter isopropílico/acetato isoamílico/agua/N-propanol/benceno (1:4:6:8:2:2, v/v/v/v/v/v; disolvente II). El BA separado se reveló con solución en etanol de ácido fosfomolibdico al 5 %.

El compuesto 10 era muy estable cuando se incubaba en cultivos de deposiciones humanas y, incluso después de 24 horas, más del 85 % del compuesto se recuperaba sin modificar. Por el contrario, el análogo natural de referencia quenodesoxicólico (CDCA) presentaba un tiempo de semivida de casi 1 hora y después de 8 horas de incubación se había metabolizado casi completamente (7-deshidroxilado) para formar ácido litocólico. Además, después de un largo tiempo de incubación, la 7 deshidroxilación y la formación de intermedio de un derivado 7 oxo estaba prácticamente anulada.

Estabilidad de cadena lateral

De acuerdo con los primeros resultados, la cadena lateral no se modificaba por las actividades enzimáticas de las bacterias intestinales.

Estos datos sugieren que la presencia del grupo etilo en la posición C-6 protege el grupo 7-hidroxilo hacia la oxidación o retirada por impedancia estérica. Además, el compuesto 10 también es muy estable para el metabolismo de cadena lateral.

Ejemplo 6: Secreción biliar y metabolismo del compuesto 10 en rata con fístula biliar después de administración duodenal (id) y femoral (iv)

Objetivo y fundamento

La modificación estructural de los nuevos análogos de BA podría afectar a su captación hepática, los transportadores hepáticos y la secreción y absorción intestinal. Por lo tanto, el conocimiento de la secreción biliar después de administración iv e id junto con su metabolismo es un punto clave en la selección de candidatos para estudios adicionales.

Para evaluar el modo y eficacia de la absorción intestinal, el compuesto 10 se administró de forma intravenosa (infusión femoral) y por vía oral (infusión duodenal) a la misma dosis y se evaluó su tasa de secreción biliar en el modelo de rata con fístula biliar. También se evaluó el efecto colerético sobre la producción de bilis. Las diferencias en el área bajo la curva (AUC) de la secreción biliar frente al tiempo entre la administración iv e id justifica su absorción intestinal y da información acerca de su biodisponibilidad. Además, el metabolismo hepático e intestinal también podría ser bastante diferente y, por lo tanto, la secreción biliar de compuesto 10 y se determinaron sus metabolitos principales (intestinales) y hepáticos.

Efecto colerético

-Infusión duodenal

El modelo de rata con fístula biliar se desarrolló en las instalaciones del University of Bologna Lab. Los compuestos se administraron a una dosis de 1 $\mu\text{mol/kg/min}$ (infusión de 1 hora) a un grupo de ratas mediante infusión duodenal (id). Las ratas tenían una fístula biliar para recoger muestras de bilis en diferentes momentos antes y durante la infusión. Para el experimento de infusión duodenal, se trataron 6 ratas (250 ± 10 g). Las muestras de bilis se recogieron cada 15 minutos durante 4 horas. Además, 3 ratas de control se trataron con solución salina en las mismas condiciones para los tiempos y el muestro (ratas de control duodenal).

La Figura 7 muestra el flujo de bilis durante la recogida de muestras (un animal). La infusión duodenal empieza después de 30 minutos de la recogida de bilis inicial y continúa durante 1 hora. El compuesto 10 no es colerético y el flujo de bilis es similar al grupo de control.

-Infusión intravenosa

Para el experimento de infusión femoral, se trataron 6 ratas (peso corporal, 250 ± 10 g) con compuesto 10 a 1 $\mu\text{mol/min/kg}$. La Figura 8 muestra el flujo de bilis durante el estudio. La infusión femoral empieza después de 75 minutos de régimen permanente y continúa durante 60 minutos. Las muestras de bilis se recogieron cada 15 minutos cada 4 horas. Además, 3 ratas se trataron con solución salina en las mismas condiciones para los tiempos y el muestreo (ratas de control femoral).

El flujo de bilis durante la infusión iv de vehículo de solución salina BSA al 3 % (control, $n = 1$) mantuvo un valor que variaba de 40 a 80 $\mu\text{l/min/kg}$ durante el periodo completo del experimento. La Figura 8 presenta el flujo de bilis

después de la infusión iv de CDCA como compuesto de referencia. No se observaron diferencias significativas con respecto al experimento de control y el caudal máximo era solo ligeramente mayor que el caso de control (80 frente a 70 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$).

Secreción biliar de los análogos administrados

Las muestras de bilis recogidas durante los experimentos iv e id se analizaron para determinar la secreción biliar de los análogos administrados y sus metabolitos. Análisis HPLC-ES-MS/MS. Se obtuvo polvo cristalino puro de cada compuesto del laboratorio R. Pellicciari de Perugia. Se prepararon soluciones madre en metanol a 1 mmol/l (con la excepción del compuesto 10 a 350 $\mu\text{mol}/\text{l}$) y se prepararon soluciones de trabajo diluyendo volúmenes apropiados de la solución principal. El metanol y el acetonitrilo eran de pureza de calidad HPLC. El amoníaco era al 30 % y el ácido acético era al 99,8 %. Todos los reactivos se obtuvieron de Carlo Erba Reagents. Se preparó agua de calidad HPLC por un sistema Milli-Q.

Preparación de muestras

Las muestras de bilis de rata se llevaron a temperatura ambiente, se agitaron brevemente y se diluyeron 1:100 v/v (muestras de bilis de infusión duodenal) y 1:100 o 1:200 v/v (muestras biliares de infusión femoral) con tampón acetato amónico 15 mM (pH 5,0): acetonitrilo = 70:30 (v/v). La solución final se transfirió a viales de tomamuestras automático, y se inyectaron 10 μl a la columna cromatográfica.

Método de HPLC-ESI-MS/MS

Las muestras de bilis de rata se analizaron por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem (HPLC-MS/MS) usando fuente de electronebulización (ESI) en modo de ionización negativa.

Para la cromatografía líquida, se usó un módulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado con un tomamuestras automático. El tomamuestras automático se mantuvo a 7 °C. La separación se realizó en una columna Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 x 2,0 mm d.i., 4 μm de tamaño de partícula), protegida por una precolumna SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm d.i., ambas suministradas por Phenomenex. El analito se eluyó usando tampón acetato amónico 15 mM (pH = 5,00) como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. La fase móvil B se aumentó desde el 30 % al 64 % en 10 min, después hasta el 100 % en 10 min, y se mantuvo constante durante 10 min. El caudal fue de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la columna se mantuvo a 45 °C. El efluente de la columna se introdujo en la fuente ESI conectada a un espectrómetro de masas de triple cuádruplo (Quattro-LC, Micromass) que funciona en modo de adquisición de Control de Reacciones Múltiples (MRM). Se usó nitrógeno como gas nebulizador a 90 l/h de caudal y como gas de desolvatación s 930 l/h. El bloque de fuente de iones y las temperaturas de desolvatación se ajustaron respectivamente a 80 °C y 180 °C. El voltaje del capilar fue de 3,0 kV.

Se usó el software MassLynx versión 4.0 para la adquisición y procesamiento de datos. Además, usando espectrometría de masas tanto en configuración MS única o MS/MS en tandem se realizaron experimentos para identificar los metabolitos.

Cuantificación

Se preparó diariamente una curva de calibración de 5 puntos y se inyectó por duplicado. Las muestras de calibración se obtuvieron en el intervalo de concentración de 0,1 a 25 $\mu\text{mol}/\text{l}$ preparadas en fase móvil. Los parámetros de la curva de calibración lineal se obtuvieron del diagrama del área de pico de analito frente a la concentración de analito usando un análisis de regresión de mínimos cuadrados (peso = $1/x^2$). Los coeficientes de correlación fueron $\geq 0,989$.

Farmacocinética (secreción biliar) de los análogos administrados: comparación de iv frente a id

Los datos se refieren a la tasa de secreción de los análogos recuperados en la bilis tal cual después de infusión duodenal y femoral a una dosis 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$. Los metabolitos principales y minoritarios se presentan posteriormente. La Tabla 3 muestra los valores de concentración y secreción para el compuesto **10** obtenidos de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 h que varía de 75 a 135 min).

Tabla 3.

Tiempo (min)	Conc. (mmol/l)	Secreción ($\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$)
90	0,01	0,0004
120	0,07	0,003
150	0,39	0,019
180	0,14	0,003
210	0,09	0,004
240	0,03	0,001
270	0,02	0,001
300	0,02	0,001

La Tabla 4 muestra los valores de concentración y secreción para el compuesto **10** obtenidos de muestras de bilis de rata recogidas durante la infusión femoral (1 h que varía de 75 a 135 min).

Tabla 4.

Tiempo (min)	Conc. (mmol/l)	Secreción (μmol/kg/min)
75	0,04	0,002
90	2,3	0,127
120	0,90	0,065
150	0,06	0,004
180	0,04	0,003
210	0,02	0,001
240	n.d. ^b	^a -

^a -: no calculado n.d.^b: no detectado

La secreción biliar de compuesto **10** después de infusión iv no es eficaz y la tasa de secreción máxima es baja (Fig. 9). El compuesto se metaboliza para formar el conjugado con taurina y esto contribuye a mejorar ligeramente su recuperación. La secreción biliar después de administración id es mucho menor que los experimentos iv, lo que sugiere una mala absorción intestinal de la molécula.

Metabolismo hepático

El compuesto **10** experimenta un metabolismo hepático como el BA de origen natural. Después de administración iv se secreta en la bilis tal cual y se conjuga principalmente con taurina. También se han encontrado metabolitos minoritarios tales como los metabolitos lactona y monoglucurónido. Después de administración id, la molécula se recupera tal cual y se metaboliza principalmente para formar los conjugados con taurina. Figura 10a: Compuesto **10** y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas en el experimento iv. Los datos se presentan como valores absolutos de área.

Figura 10b: Presentación ampliada de la Figura 10a.

Figura 10c: Compuesto **10** y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas en el experimento id. Los datos se presentan como valores absolutos de área.

El compuesto **10** es moderadamente hidrófilo con una baja detergencia. La captación hepática es eficaz y también la absorción intestinal. El compuesto se secreta en bilis tal cual y principalmente como conjugado con taurina y la recuperación en la bilis es casi completa.

Ejemplo 7: Toxicidad *in vitro* sobre células HepG2

Los compuestos de la invención se evaluaron para toxicidad *in vitro* usando un ensayo de células HepG2. Se determinó la citotoxicidad en células HepG2 controlando la disminución de ATP y se determinó la apoptosis de células HepG2 controlando la activación de caspasa-3. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Citotoxicidad

Se midió la viabilidad celular usando PerkinElmer ATP-Lite 1 STEP. El ATP es un marcador para la viabilidad celular porque está presente en todas las células metabólicamente activas y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células experimentan necrosis o apoptosis. Se sembraron células humanas NCI-H716 o HepG2 (1×10^4) en placas de 96 pocillos y se estimularon con diluciones de factor 10 de 1 nM a 300 μM del compuesto **10** durante 4 horas a 37 °C. Las placas se equilibraron a TA durante 10 minutos y se añadieron 100 μl de reactivo ATP-Lite 1 STEP a 100 ATP-Lite 1 STEP de medio de cultivo que contenía células. Se leyó la luminiscencia con Victor Light (PerkinElmer). La señal experimental se restó del fondo. Se usó tamoxifeno como control positivo de citotoxicidad celular, mientras que el control negativo eran las células no tratadas.

Apoptosis

Las caspasas participan en el control molecular de la apoptosis y el sustrato de Caspasa-3 TruPoint posibilita un ensayo de fluorescencia resuelto en el tiempo sensible, robusto y homogéneo para la actividad caspasa-3.

Se sembraron células de hepatocitos humanos (HepG2) (1×10^4) en placa de 96 pocillos con medio de HepG2 sin piruvato sódico. Las células se estimularon 4 horas a 37 °C con diluciones en serie de compuesto de ensayo de 1 nM a 300 μM por triplicado. Se usó estaurosporina como control positivo de células apoptóticas. Los controles negativos fueron: 1. Células no estimuladas; 2. Medio solo sin células; 3. Células incubadas sin el sustrato de caspasa. Se añadieron tampón de lisis y sustrato de caspasa-3 a las células y 1 hora y 24 horas después se midió la fluorescencia con EnVision.

Necrosis

La necrosis celular se analizó midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células necróticas usando el ensayo de integridad de membrana homogénea CytoTox ONE de Promega. Se sembraron células de hepatocitos humanos (1×10^4) en una placa de 96 pocillos. Después de 18 horas de incubación, se reemplazó el medio fresco de incubación sin piruvato sódico y sin suero y se añadió el compuesto **10** en respuesta a la dosis de 0,1 μM a 500 μM . Se usó Triton al 1 % como control de liberación máxima de LDH. Se usó tamoxifeno como inductor de necrosis. Las células sembradas se sembraron de nuevo en la incubadora durante 4 horas adicionales. El sobrenadante se transfirió a una nueva placa y se añadió el mismo volumen de reactivo CytoTox-ONE a la placa. Después de 1 hora de incubación, se leyó la fluorescencia con el lector de placa de múltiples marcadores EnVision con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una emisión de 590 nm.

Tabla 5.

Toxicidad <i>in vitro</i> sobre células HepG2			
Compuesto	CITOTOXICIDAD disminución de ATP CE_{50} (μM)	APOPTOSIS activación de Caspasa-3 CE_{50} (μM)	NECROSIS liberación de LDH CE_{50} (μM)
Estaurosporina (<i>apoptosis</i>)	15	3	<i>n.d.</i>
Tamoxifeno (<i>Necrosis</i>)	47	4	35
LCA	84	65	105
CDCA	650	890	>1000
UDCA	>1000	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
CA	>1000	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Compuesto 10	>1000	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>n.d., No detectado</i>			

Ejemplo 8: Ensayos de selectividad de NR

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

FXR y LXR: Reclutamiento de coactivadores (alphascreen);

TGR5: Nivel de AMPc sobre la línea celular de intestino humano (NCI-H716);

PXR: Ensayo de competición de ligandos (Ensayo de unión);

CAR: Reclutamiento de coactivadores (Lanthascreen);

La Tabla 6 muestra los resultados de estos ensayos.

Ensayo de coactivadores TR-FRET

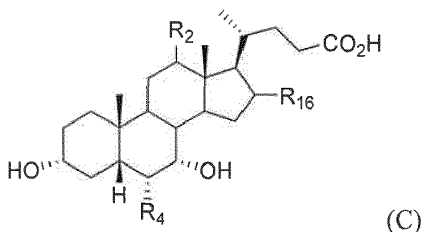
Se usó el ensayo Lanthascreen (Invitrogen) para el ensayo de selectividad de receptores nucleares. El kit usa un anticuerpo anti-GST marcado con terbio, un péptido coactivador marcado con fluoresceína y un dominio de unión a ligando NR que está marcado con glutatión-S-transferasa (GST) en un formato de ensayo de mezcla homogénea y lectura. Los ensayos se realizaron en microplaca de 384 pocillos (PerkinElmer). Una reacción de ensayo total de 20 μl incluía NR marcados con GST 5 nM, 125 nM de péptido co-regulador, 5 nM de anticuerpo anti-GST marcado con TB (anti-glutatión-S-transferasa marcado con terbio), DTT 5 mM y concentración variable de compuesto 10 en el tampón de ensayo suministrado por Invitrogen. El control negativo estaba desprovisto del compuesto 10 pero contenía todo lo demás contenido en el pocillo de agonista. Después de 1 hora de incubación en la oscuridad, se hicieron mediciones TR-FRET en el EnVision. La relación de emisión 520/495 se representó frente a las concentraciones variables de ligando. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism usando la ecuación de curva sigmoidea con pendiente variable para obtener los valores de CE_{50} .

Tabla 6.
Ensayos de selectividad de NR

Compuesto (Patrón de referencia)	FXR Activación (CDCA CE ₅₀ (μM))	TGR5 Activación (LCA CE ₅₀ (μM))	LXRα Activación (TO901317 = 0,08 μM) CE ₅₀ (μM)	PXR Unión (SR-12183 = 0,013 μM) Cl ₅₀ (μM)	CAR Activación (CITCO = 0,005 μM) CE ₅₀ (μM)	PPARδ Activación (GW0742 = 0,004 μM) CE ₅₀ (μM)	VDR Activación (Di- HidroxiVitD3 = 0,005 μM) CE ₅₀ (μM)
CDCA	20	30	Sin actividad	> 250	> 250*	Sin actividad	Sin actividad
LCA	Sin actividad	4-8	Sin actividad	23	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
CA	Sin actividad	30	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
UDCA	> 150	Sin actividad	Sin actividad	> 250	> 250*	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto 10	12	0,6	Sin actividad	64	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
Métodos de ensayo FXR y LXR: Reclutamiento de coactivadores (Alphascreen); TGR-5: Nivel de AMPc sobre la línea celular de intestino humano (NCI-H716); PXR: Ensayo de competición de ligandos (ensayo de unión); *: datos que representan agonismo inverso							

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, que tiene la fórmula C:

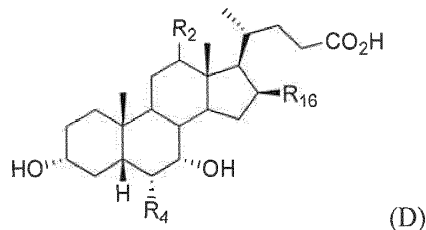


5

o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo, en la que:

10 R₂ es hidrógeno o hidroxilo;
R₄ es alquilo sin sustituir; y
R₁₆ es hidroxilo, alcoxi o halógeno.

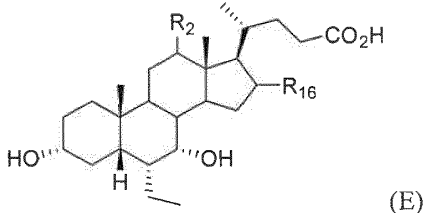
2. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula D:



15

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

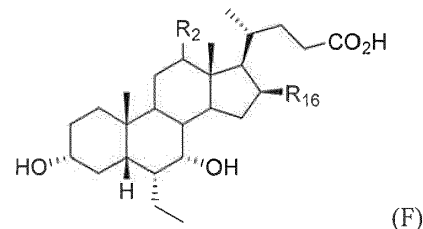
3. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula E:



20

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

4. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula F:

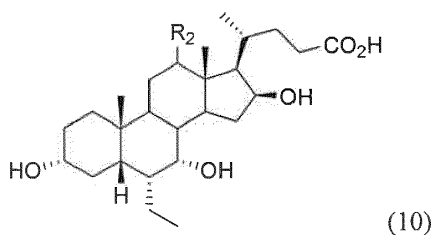


25

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

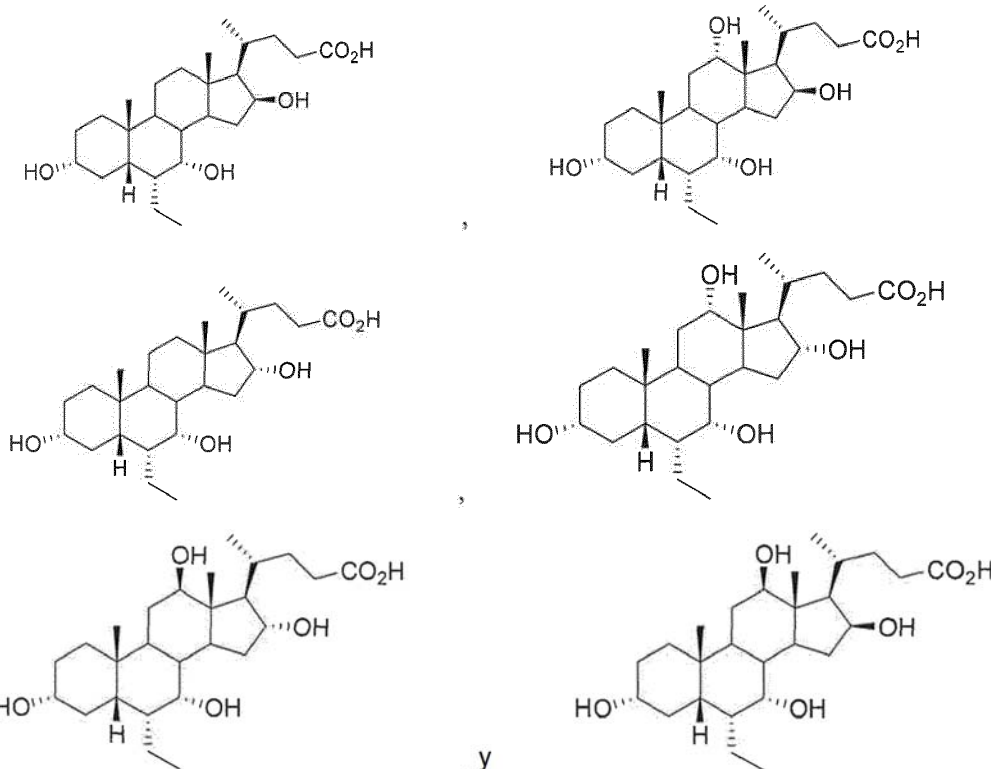
5. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es el Compuesto 10:

30



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

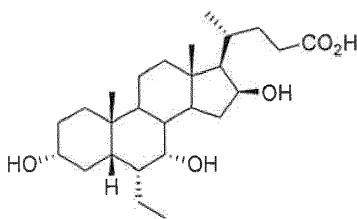
- 5 6. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:



o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina de los mismos.

10

7. Un compuesto de la reivindicación 6, en el que el compuesto es:



- 15 o una sal, solvato, hidrato, conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.

- 20 9. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto o composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método administrar el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

25

11. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad se selecciona de enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer y enfermedad gastrointestinal.

5 12. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que el compuesto o composición se administra al sujeto por vía oral, parenteral, intravenosa o tópica.

13. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que el sujeto es un ser humano.

10

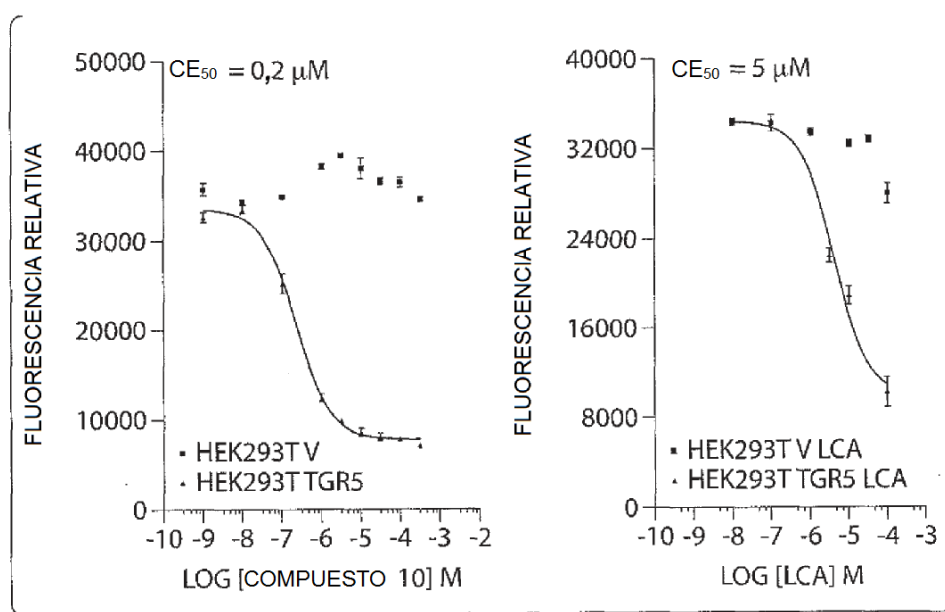


Fig. 1

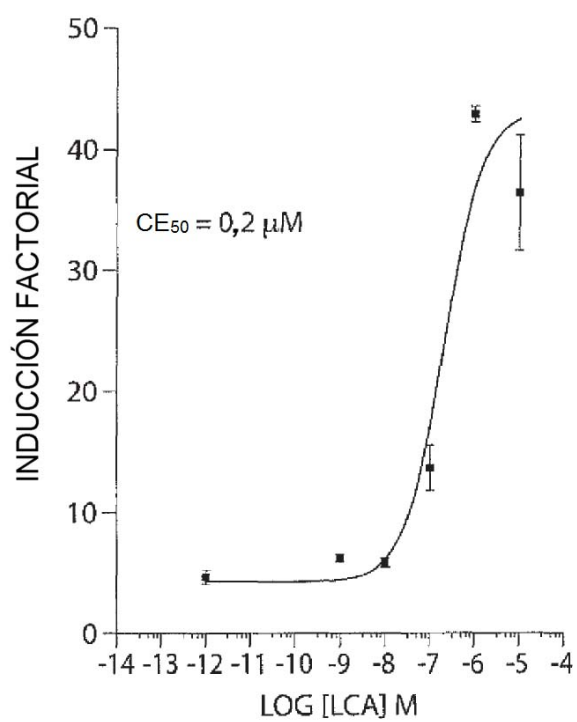


Fig. 2A

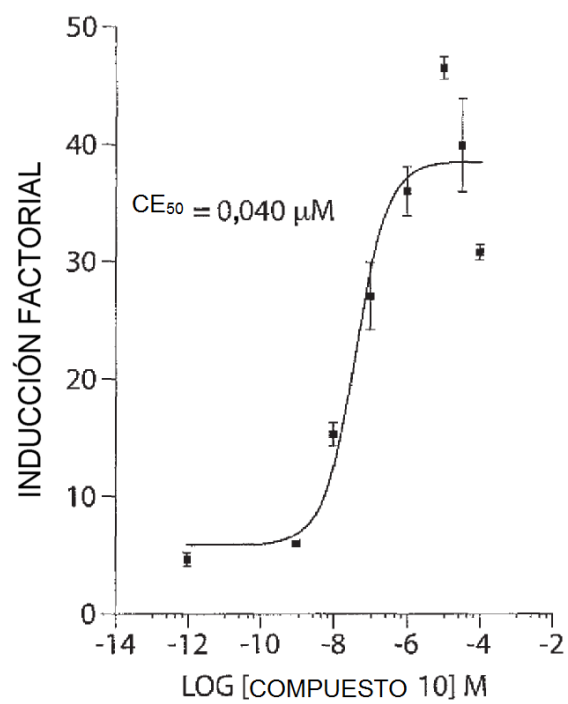


Fig. 2B

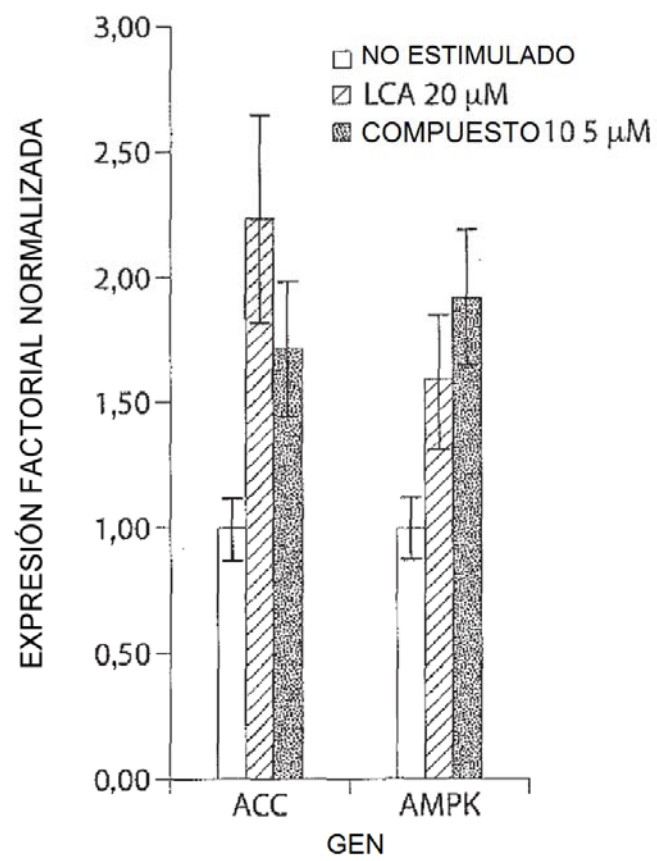


Fig. 3

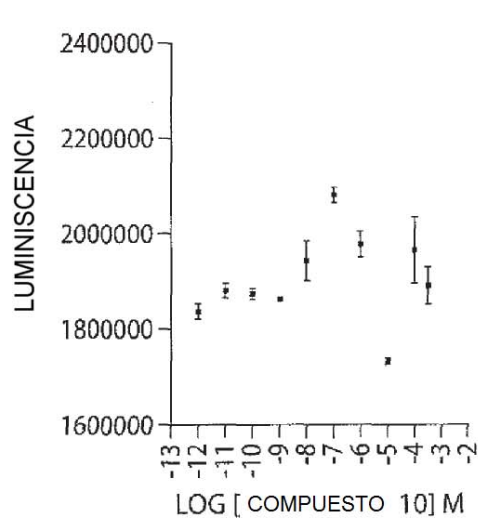


Fig. 4A

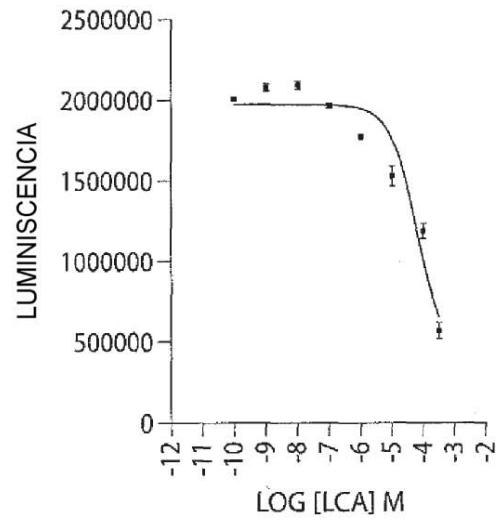


Fig. 4B

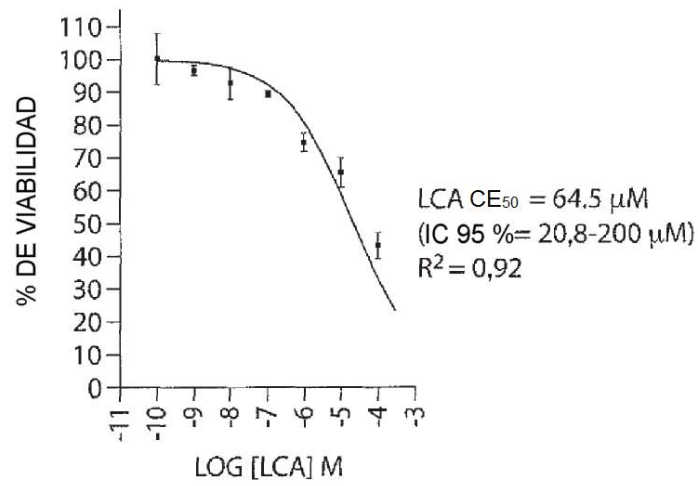


Fig. 4C

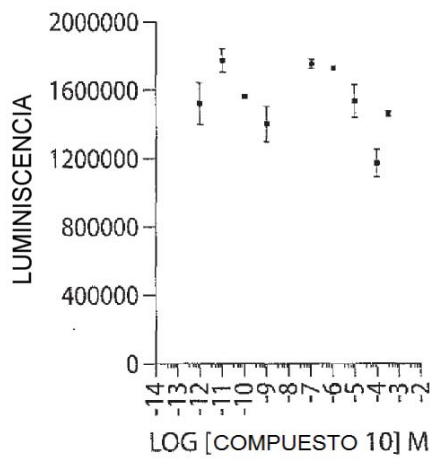


Fig. 5A

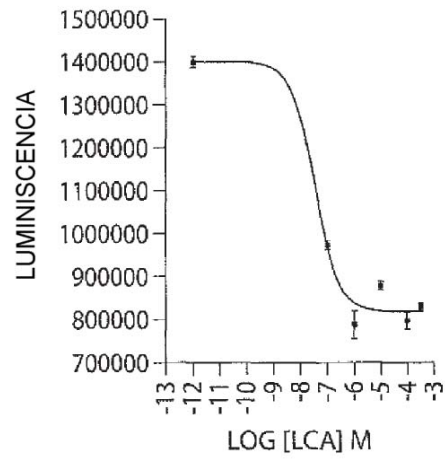


Fig. 5B

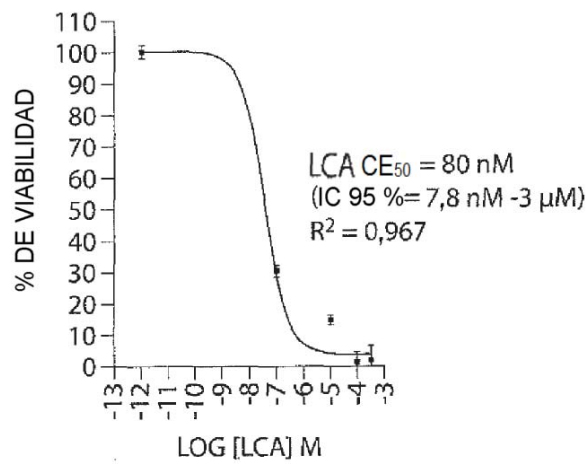


Fig. 5C

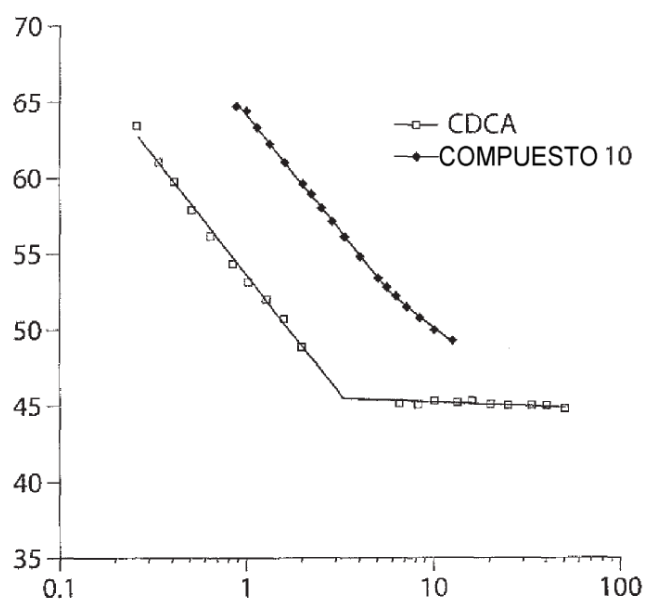


Fig. 6

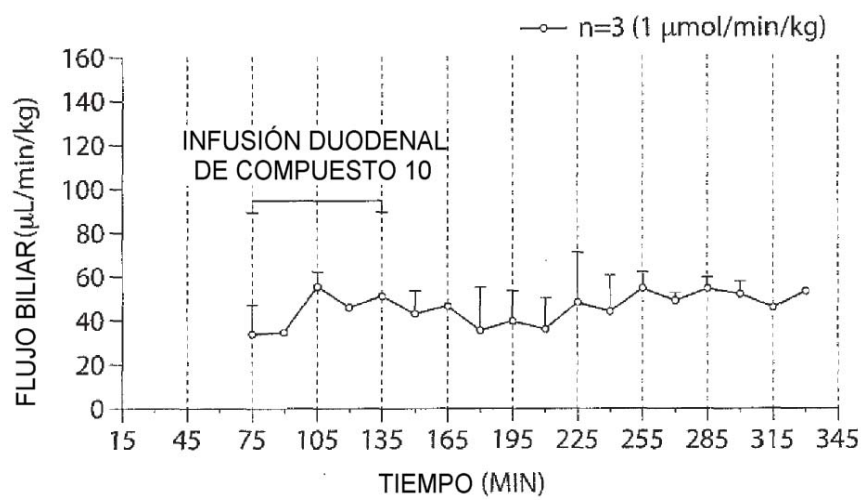


Fig. 7

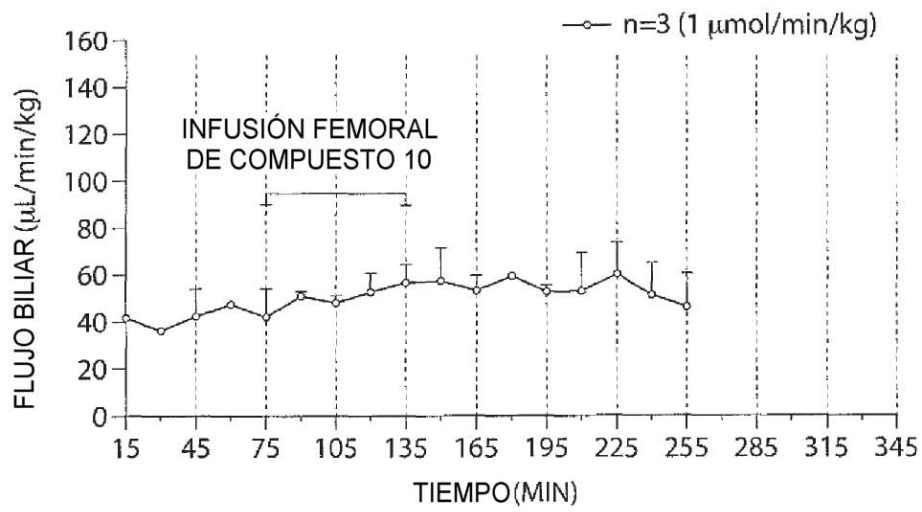


Fig. 8

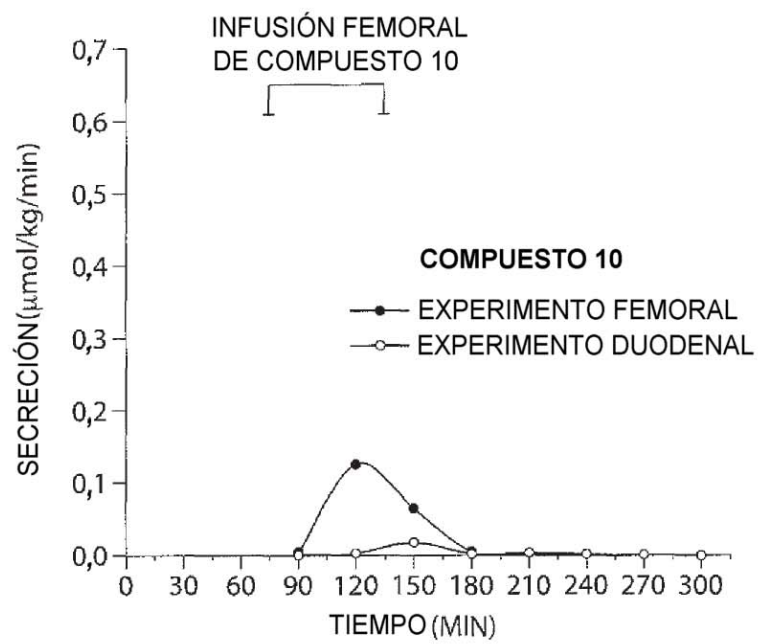


Fig. 9

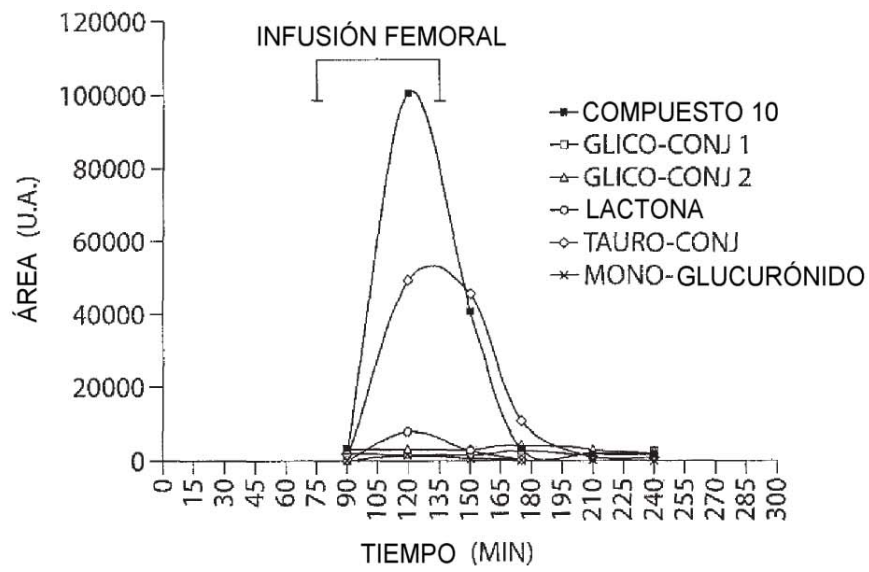


Fig. 10A

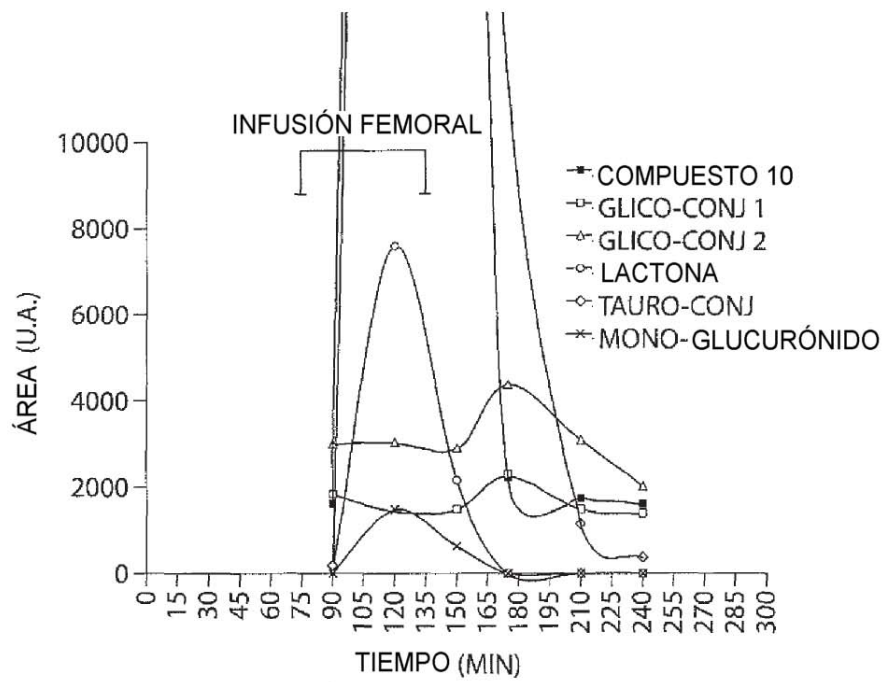


Fig. 10B

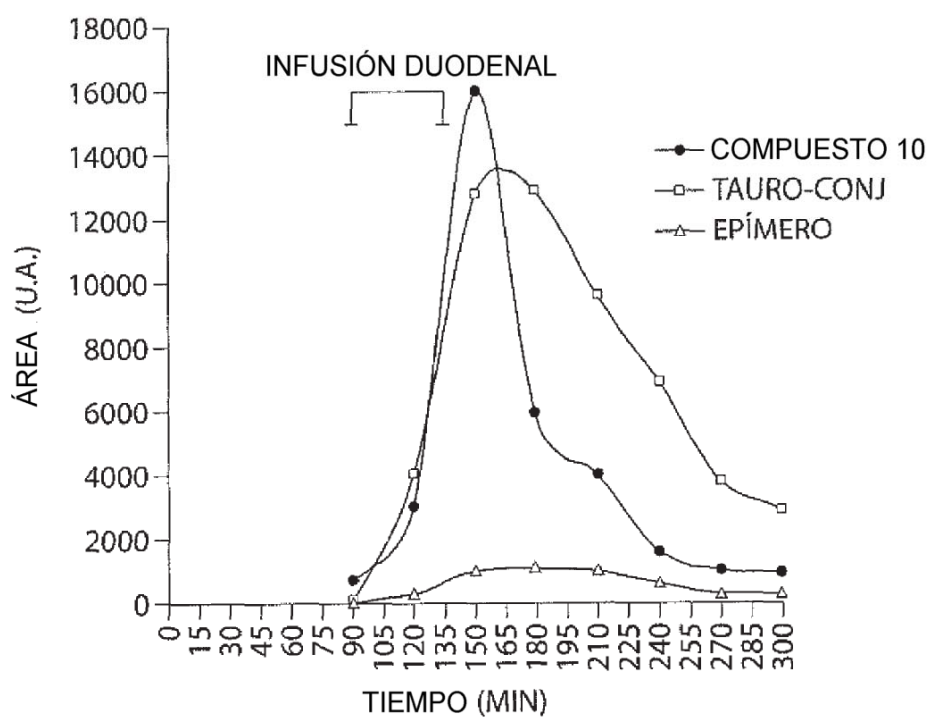


Fig. 10C