

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 948**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 13192394 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2698375**

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

30 Prioridad:

19.11.2008 EP 08169462

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

17.04.2018

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 2 663 948 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moduladores de TGR5 y método de uso de los mismos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos que modulan TGR5 y composiciones útiles en métodos para el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades.

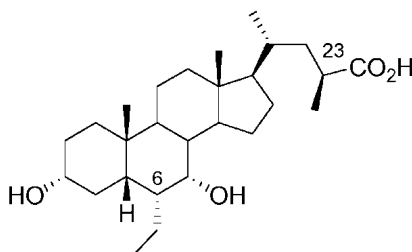
10 Antecedentes de la invención

El receptor TGR5 es un receptor acoplado a la proteína G que se ha identificado como un receptor de superficie celular que es sensible a los ácidos biliares (BA). Se ha encontrado que la estructura primaria del TGR5 y su capacidad de respuesta a los ácidos biliares están altamente conservadas en TGR5 entre ser humano, bovino, conejo, rata y ratón, y de ese modo sugiere que TGR5 tiene funciones fisiológicas importantes. Se ha encontrado que TGR5 está ampliamente distribuido no solamente en tejidos linfoides sino también en otros tejidos. Los niveles elevados de ARNm de TGR5 se han detectado en placenta, bazo, y monocitos/macrófagos. Se ha mostrado que los ácidos biliares inducen la internalización de la proteína de fusión de TGR5 desde la membrana celular al citoplasma. Kawamata et ál. 2003, *J. Bio. Chem.*, 278, 9435. Se ha encontrado que TGR5 es idéntico a hGPCR19 informado por Takeda et ál. 2002, *FEBS Lett.* 520, 97-101.

TGR5 está asociado con la acumulación intracelular de AMPc, que se expresa ampliamente en diversos tipos de células. Aunque la activación de este receptor de membrana en macrófagos disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias, (Kawamata, Y., et ál. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 9435-9440) la estimulación de TGR5 por los BA en adipocitos y miocitos aumenta el consumo de energía (Watanabe, M. et ál. *Nature.* 2006, 439, 484-489). Este último efecto implica la inducción dependiente de AMPc de la yodotironina desiodinasa de tipo 2 (D2), lo cual mediante, la conversión de forma local de T4 en T3, da lugar a un aumento de la actividad de la hormona tiroidea. De forma coherente con el papel de TGR5 en el control del metabolismo energético, los ratones hembra con supresión genética de TGR5 muestran una acumulación de grasa significativa con aumento de peso corporal cuando se estimulan con una dieta con alto contenido de grasas, lo que indica que la falta de TGR5 disminuye el consumo de energía y provoca obesidad (Maruyama, T., et ál. *J. Endocrinol.* 2006, 191, 197-205). Además y de acuerdo con la implicación de TGR5 en la homeostasis energética, también se ha informado que la activación de los ácidos biliares del receptor de membrana estimula la producción del péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) en líneas de células enteroendocrinas de murino (Katsuma, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, 386-390). Sobre la base de las observaciones mencionadas anteriormente, TGR5 es una diana atractiva para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

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

En la bibliografía se han descrito relativamente pocos ejemplos de agonistas de TGR5. Recientemente, se ha informado que los derivados 23-alquil-sustituidos y 6,23-alquil-disustituidos del ácido quenodesoxicólico (CDCA), tales como el compuesto ácido 6 α -etil-23(S)-metil-quenodesoxicólico que se muestra a continuación, son agonistas de TGR5 potentes y selectivos (Pellicciari, R.; et ál. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 4265-4268).

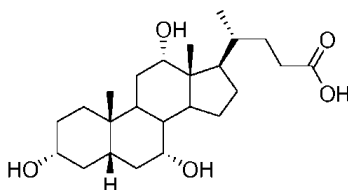


50 En particular, la metilación (configuración S) en la posición C₂₃ de los ácidos biliares naturales (BA) proporciona una selectividad notable para la activación de TGR5 con respecto a FXR (receptor X farnesoide), mientras que la sustitución de 6 α -alquilo aumenta la potencia en ambos receptores. Algunos ejemplos de otros agonistas de TGR5 incluyen éster de bencilo del ácido 6-Metil-2-oxo-4-tiofen-2-il-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidina-5-carboxílico (WO004067008, Takeda Chemical Industries LTD, Japón, 2004) y ácido oleanoico (Sato, H. et ál. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 793-798; Ito, F. et ál., documento WO2004067008, 2004). Más recientemente, la primera síntesis de ácido quenodesoxicólico enantiomérico (CDCA) y de ácido litocólico (LCA) ha permitido acceder al

estudio de la especificidad de la interacción de los BA naturales con TGR5 (Katona, B. W. et ál. J. Med. Chem. 2007, 50, 6048-6058).

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

Con este fin, eran de particular interés las propiedades biológicas y fisicoquímicas del compuesto ácido cólico (CA), que tiene la estructura que se muestra a continuación:

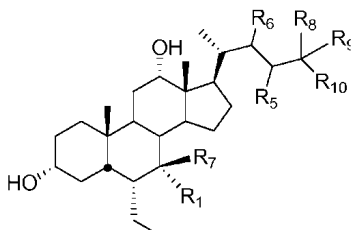


El ácido cólico es un ácido biliar primario en seres humanos y en muchas especies animales, también informado como uno de los componentes principales junto con la bilirrubina de *Calculus Bovis*, una medicina china tradicional altamente valorada (Chen, X., Biochem. Pharmacol. 2002, 63, 533-541). El ácido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

Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollo de moduladores de TGR5 para el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades. La presente invención ha identificado compuestos que modulan TGR5 así como métodos de uso de estos compuestos para tratar o prevenir enfermedades.

Sumario de la Invención

La presente divulgación se refiere a moduladores de TGR5 y su uso para tratar y/o prevenir diversas enfermedades. La invención se refiere a compuestos de acuerdo con la fórmula IIIA:



(A) o una sal, solvato o hidrato del mismo en la que:

R_1 es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno;

R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H;

R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo;

5 R₆ es hidrógeno; o

R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos;

10 R₇ es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido, o hidroxilo;

R₈ es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido;

15 R₉ es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido; o

R₈ y R₉ tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo;

R₁₀ es R₃ o SO₃H;

20 m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y

n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

25 en el que dicho alquilo incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo, grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo, y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo, y

en el que dicho arilo incluye grupos con aromaticidad, grupos arilo multicíclicos y heteroarilos.

30 En la fórmula A, las variables R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, y R₁₀ se pueden seleccionar entre los respectivos grupos de restos químicos que se definen posteriormente en la descripción detallada. La invención incluye una composición que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también incluye el uso de una composición o compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto. En un aspecto, la enfermedad se selecciona entre enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmune, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer, y enfermedad gastrointestinal.

40 La descripción mencionada anteriormente presenta de manera bastante amplia las características más importantes de la presente invención para que la descripción detallada de la misma que sigue a continuación se pueda comprender, y para que las presentes contribuciones a la técnica se puedan apreciar mejor. Otros objetos y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada en conjunto con los ejemplos.

45 Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra el impacto del compuesto lh3e en el aumento de peso en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa.

50 La Figura 2 es una serie de nueve gráficos (A-I) que muestran cambios en el perfil metabólico de ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e. Análisis de plasma en ratones obesos inducidos por la dieta tratados con el compuesto lh3e. A-D se refieren a enzimas hepáticas. F-I se refieren a lípidos en plasma.

55 La Figura 3 es una serie de gráficos (A-B) que muestran los resultados del análisis de insulina en plasma y el ensayo de tolerancia a glucosa oral en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e.

La Figura 4 es un gráfico que muestra cambios en los niveles de glucosa en ratones con dieta de pienso tratados con el compuesto lh3e.

La Figura 5 es una serie de gráficos (A-D) que muestran la liberación de insulina *in vivo* después de una comida de ensayo en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e.

60 La Figura 6 es una serie de gráficos (A-D) que muestran el consumo de oxígeno y la producción de CO₂ tal como se mide mediante calorimetría indirecta en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e

65 La Figura 7 son tres gráficos (A-C) que muestran el valor de la proporción de intercambio respiratorio (RER) tal como se calcula después de calorimetría indirecta en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e.

La Figura 8 es una serie de gráficos (A-B) que muestran actividad locomotora e ingesta de alimentos y agua para ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e.

La Figura 9 es una serie de gráficos (A-C) que muestran cambios en el peso de los órganos para ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e.

La Figura 10 es un gráfico que representa la tensión superficial representada frente al logaritmo de la concentración del compuesto lh3e (mM) en NaCl 0,15 M.

La Figura 11 es un diagrama de flujo biliar para un experimento de infusión duodenal realizado usando el compuesto lh3e.

La Figura 12 es un diagrama de flujo biliar para un experimento de infusión femoral realizado usando el compuesto lh3e.

La Figura 13 es un gráfico que representa tasas de secreción con respecto al tiempo en experimentos de infusión femoral e infusión duodenal realizados usando el compuesto lh3e.

La Figura 14 es una serie de gráficos (A-D) relacionados con el compuesto lh3e y sus metabolitos. La Figura 14A muestra el compuesto lh3e y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas en el experimento iv. Los datos se informaron como valores absolutos de área. La Figura 14b es una presentación de zoom de la Figura 14A. La Figura 14C muestra del compuesto lh3e y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas. La Figura 14D es una presentación de zoom de la Figura 14C.

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

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

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

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

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

La Figura 17D es un gráfico de barras que muestra la proporción de ATP/ADP en células STC-1 tratadas al igual que en la Figura B (n = 3).

La Figura 17E muestra representaciones de correlación para expresión de ARNm de hígado de TGR5 y Kir6.2 en la población de referencia genética BxD de ratón de acuerdo con una estrategia similar como se describe en la Figura A.

La Figura 17F es un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de ARNm de TGR5, CoxIV, and Kir6.2 en células STC-1 transfectadas durante 36 h con control o con ARNsh de mTGR5 tal como se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm diana se normalizaron con respecto a los niveles de ARNm de 36B4 (n = 3). Los datos se representan como media \pm ET; ensayo t de Student para muestras no relacionadas; *p < 0,05.

La Figura 18A muestra representaciones de correlación para expresión de ARNm de hígado de TGR5 y Cav2.2 en la población de referencia genética BxD de ratón (n = 41) como se encuentra en la página web de GeneNetwork University of Tennessee.

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

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

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

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

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

La Figura 18H es un gráfico de barras que muestra el impacto de 30 min del tratamiento con el compuesto lh3e en la liberación de GLP-1 en células STC-1 transfectadas con vector de expresión de mTGR5 en presencia de vehículo o inhibidor de adenilato ciclasa, MDL-1 2330-A (10 μ M). MDL o vehículo se añadió 15 min antes del tratamiento con el compuesto lh3e. Un inhibidor de DPP4 (Millipore) se añadió en medio de cultivo para un 0,1 % (n = 3). Los datos se representan como media \pm ET. Ensayo t de Student para muestras no relacionadas; #p < 0,05 de vehículo con respecto al tratamiento con el compuesto lh3e; #p < 0,05 vehículo con respecto a tratamiento con MDL-1 2330-A.

La Figura 19A es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT) en ratones TGR5-Tg macho alimentados durante 10 semanas con dieta HF y con compañeros de camada macho con

edades similares alimentados con CD o una dieta con HF para el mismo periodo de duración. Todos los ratones tenían 8 semanas de edad al inicio de la dieta HF. El peso corporal de los ratones TGR5-Tg y de los compañeros de camada de control era $37,9 \pm 1,7$ g y $37,0 \pm 1,8$ g, respectivamente (n = 8; no estadísticamente diferente). El gráfico de barras adyacente representa el área bajo la curva promedio (AUC) (n = 8).

5 La Figuras 19B y 19C muestran los niveles en plasma de insulina (panel superior) y GLP-1 (panel inferior) durante el OGTT (19B) o antes y después de una estimulación con comida de ensayo (19C) (n = 8).

La Figura 19D es un gráfico de barras que muestra la liberación de GLP-1 a partir de explantes ileales aislados a partir de ratones machos de control y TGR5-Tg alimentados durante 18 semanas con dieta HF y expuestos durante 1 h a las concentraciones indicadas de LCA (n = 4).

10 La Figura 19E es una serie de fotografías que son secciones pancreáticas teñidas con insulina inmunofluorescente representativas de ratones macho TGR5-Tg alimentados con una dieta HF durante 20 semanas o de compañeros de camada con edades similares macho alimentados con CD o una dieta HF durante el mismo periodo de duración.

La Figura 19F es un gráfico de barras que muestra un perfil de distribución de islotes pancreáticos de ratones TGR5-Tg macho y compañeros de camada de control alimentados con CD o una dieta HF como se describe en (la Figura 19E). Se hizo el recuento de los islotes y se midió su tamaño con el software de análisis ImageJ en cuatro secciones pancreáticas alternadas teñidas con H&E separadas cada una por $150 \mu\text{M}$ (n = 5).

15 La Figura 19G es un gráfico de barras que muestra el contenido de insulina en islotes pancreáticos aislados con colagenasa de ratones TGR5-Tg macho y compañeros de camada de control alimentados con CD o una dieta HF como se describe en (la Figura 19E).

20 La Figura 19H es un gráfico que muestra los resultados de un OGTT en ratones macho TGR5^{-/-} y TGR5^{+/+} alimentados con una dieta HF durante 8 semanas. La inserción representa la AUC promedio. El peso corporal de los ratones macho TGR5^{-/-} y TGR5^{+/+} en el momento del análisis era $46,3 \pm 3,9$ g y $51,9 \pm 2,0$ g, respectivamente (n = 8; no estadísticamente diferente).

25 La Figuras 19I y 19J son gráficos que muestran los niveles de GLP-1 en plasma en ratones TGR5^{+/+} (Figura 19I) y TGR5^{-/-} (Figura 19J) alimentados con CD después de una estimulación con glucosa oral, precedida 30 min antes de la administración oral de solución salina o el compuesto lh3e (30 mg/kg), solo o en combinación con un inhibidor de dipeptidil-peptidasa-4 (DPP4i, 3 mg/kg) (n = 6). Los datos se representan como media \pm ET. Ensayo t de Student para muestras no relacionadas; #p < 0,05, ratones tratados con el compuesto lh3e alimentados con HF en comparación con los alimentados con HF; y #p < 0,05, ratones alimentados con HF con respecto a los alimentados con CD excepto para (I) y (J), en los que * evaluaba los ratones tratados con solución salina o tratados con DPP4i con respecto al compuesto lh3e o lh3e + ratones tratados con DPP4i, y #ratones tratados con solución salina con respecto a los tratados con DPP4i.

30 La Figura 20A es un gráfico que muestra los resultados de la medición por HPLC de los niveles del compuesto lh3e en plasma en ratones C57BL6/J macho tratados con lh3e y alimentados con CD, HF, y HF.

35 La Figura 20B es un gráfico que muestra el resultado de la intervención dietética con el compuesto lh3e (30 mg/kg/d) que comenzó después de un periodo de 14 semanas de alimentación con HF en el momento indicado por la flecha. La evolución del peso corporal en todos los grupos se siguió durante todo el estudio (n = 8).

La Figura 20C es un gráfico de barras que muestra la composición corporal tal como se evalúa mediante RMNC después de 8 semanas de intervención dietética (n = 8).

40 La Figura 20D es un gráfico de barras que muestra la masa del órgano tal como se expresa mediante el porcentaje del peso de los ratones de control alimentados con CD.

La Figura 20E es un gráfico de barras que muestra la ingesta de alimentos (n = 8).

45 La Figura 20F es una serie de gráficos de barras que muestran la actividad horizontal espontánea y el consumo de energía, evaluado mediante la medición del consumo de oxígeno (VO₂) y la liberación de dióxido de carbono (VCO₂), que se controlaron durante un periodo de 18 h, 6 semanas después del inicio de la intervención dietética. El cociente respiratorio (RQ) se calculó como la proporción de VCO₂/VO₂. Los gráficos de barras representan el AUC promedio. Para el RQ, los gráficos de barras representan el promedio (n = 8).

La Figura 20G es un gráfico de barras que muestra la expresión genética en BAT mediante PCR cuantitativa en tiempo real después de 18 semanas de intervención dietética. Los niveles de ARNm diana se normalizaron a niveles de ARNm de 36B4 (n = 8).

50 La Figura 20H es un gráfico que muestra adipocitos de color marrón primarios aislados a partir de ratones macho C57BL/6J alimentados con CD que se cultivaron durante 12 h con vehículo o $3 \mu\text{M}$ del compuesto lh3e, y el consumo de O₂ se midió usando el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience) (n = 5). Las líneas de puntos ilustran la adición del agente de desacoplamiento FCCP a dosis sucesivas de 250 y 500 nM.

55 La Figura 20I es una serie de fotografías que son fotografías representativas de tinción con redO (ORO) de criosecciones (panel superior) y tinción con rojo Sirio de secciones en parafina (panel inferior) del hígado al final de la intervención dietética. La fibrosis se indica con la flecha.

La Figura 20J es una serie de gráficos de barras que muestran el contenido de ILipid en muestras de hígado extraídas de acuerdo con el método de Folch (n = 8).

60 La Figura 20K y 20L es una serie de gráficos de barras que muestran los niveles en plasma de enzimas hepáticas (Figura 20K) y lípidos (Figura 20L) al final de la intervención dietética (n = 8). Los datos se representan como la media \pm ET. Ensayo t de Student para muestras no relacionadas; *p < 0,05, ratones tratados con lh3e alimentados con HF en comparación con los alimentados con HF; y #p < 0,05, ratones alimentados con HF con respecto a los alimentados con CD.

65 La Figura 21A es un gráfico que muestra el resultado de un OGTT en ratones C57BL6/J macho alimentados con CD y con HF suplementado con 30 mg/kg/d del compuesto lh3e durante 8 semanas después del inicio de la

obesidad inducida por alimentación con una dieta HF durante 10 semanas. La inserción representa el AUC promedio. El peso corporal de los ratones tratados con vehículo y compuesto lh3e era $38,08 \pm 1,83$ g y $32,26 \pm 0,95$ g, respectivamente ($n = 8$; $p < 0,05$).

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

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

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

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

La Figura 21F es una serie de gráficos de barras que muestran la absorción de glucosa estimulada por insulina en los tejidos indicados que se midió usando elementos de traza de 14C-2-desoxiglucosa ($n = 5$).

La Figura 21G es una serie de gráficos de barras que muestran la formación de perfiles de expresión genética en hígado que se realizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm diana se normalizaron con respecto a los niveles de 36B4 ($n = 8$). Los datos se representan como media \pm ET. Ensayo t de Student para muestras no relacionadas; * $p < 0,05$, ratones tratados con el compuesto lh3e alimentados con HF en comparación con los alimentados con HF; y # $p < 0,05$, ratones alimentados con HF con respecto a los alimentados con CD.

La Figura 22A es una serie de gráficos que muestran los resultados de un estudio en el que los ratones macho $TGR5^{+/+}$ y $TGR5^{-/-}$ se alimentaron con una dieta HF durante 9 semanas, y a partir de ese momento se realizó un primer OGTT. A continuación la dieta HF se suplementó con el compuesto lh3e a 30 mg/kg/d. Un segundo OGTT se realizó 4 semanas después del inicio del tratamiento con el compuesto lh3e. Las curvas representan tolerancia a la glucosa antes y después del tratamiento durante 4 semanas con el compuesto lh3e en ratones $TGR5^{+/+}$ (panel izquierdo) y $TGR5^{-/-}$ (panel derecho). La inserción representa el AUC promedio. En ratones $TGR5^{+/+}$, el peso corporal antes y después del tratamiento con el compuesto lh3e era $46,86 \pm 3,54$ g y $43,50 \pm 3,47$ g, respectivamente ($n = 8$; no estadísticamente diferente). En los ratones $TGR5^{-/-}$, el peso corporal antes y después del tratamiento con el compuesto lh3e era $54,34 \pm 2,23$ g and $52,30 \pm 2,72$ g, respectivamente ($n = 8$; no estadísticamente diferente).

La Figura 22B es una serie de gráficos que muestran los niveles de insulina en plasma que se midieron de forma simultánea durante el OGTT en DIO en ratones $TGR5^{+/+}$ (panel izquierdo) y $TGR5^{-/-}$ (panel derecho) antes y después del tratamiento durante 4 semanas con el compuesto lh3e. La inserción representa el AUC promedio ($n = 8$). Los datos se representan como media \pm ET. Ensayo t de Student para muestras no relacionadas; * $p < 0,05$, vehículo en comparación con ratones tratados con el compuesto lh3e 7.

La Figura 23 es un gráfico que muestra las tasas de flujo biliar de los compuestos lh3e e li3e en un experimento de infusión femoral a 1 $\mu\text{mol/min/kg}$ durante 1 h y la tasa de flujo biliar en un experimento femoral como control con una infusión de solución fisiológica de BSA al 3 % durante 1 h.

La Figura 24 es un gráfico que muestra las tasas de secreción del compuesto lh3e y de tauro-lh3e con respecto al tiempo en un experimento femoral a 1 $\mu\text{mol/min/kg}$ durante 1 h.

La Figura 25 es un gráfico que muestra las tasas de secreción del compuesto li3e y tauro-li3e con respecto al tiempo en un experimento femoral a 1 $\mu\text{mol/min/kg}$ durante 1 h.

La Figura 26 es un gráfico que muestra el compuesto lh3e y sus metabolitos principales identificados en muestras de bilis recogidas durante el experimento de infusión femoral. Los datos se presentan como valores de área absolutos.

La Figura 27 es una presentación de zoom de la Figura 26.

Descripción de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se presentan en la descripción adjunta que sigue a continuación. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento se puede usar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales se describen a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas en singular también incluyen el plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva controlará.

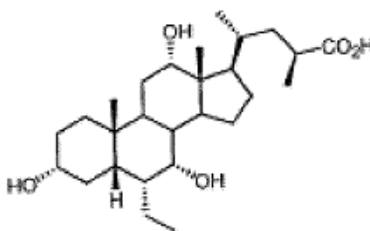
Definiciones

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

5 El término "trata", como se usa en el presente documento, se decide a aliviar, disminuir, reducir, eliminar, modular o mejorar, es decir producir la regresión de la patología o afección.

10 El término "prevenir", como se usa en el presente documento se refiere a, evitar completamente o casi completamente una patología o afección, que se produce en un paciente o sujeto, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto a la misma o se encuentra en riesgo de contraer una patología o afección. Editar también puede incluir inhibir, es decir detener el desarrollo, de una patología o afección, y aliviar o mejorar, es decir producir la regresión de la patología o afección, por ejemplo cuando la patología o afección ya puede estar presente.

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



20 Como alternativa, el compuesto lh3e también se puede denominar ácido 6α-etil-(23S)-metil-3α,7α,12α trihidroxi-5β-colan-24-oico.

25 Como se usa en el presente documento, "BA" se refiere a ácidos biliares y derivados de ácidos biliares. Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos esteroideos obtenidos a partir del colesterol. Los ácidos biliares primarios son ácidos cólicos y quenodesoxicólicos. En el organismo, estos ácidos se conjugan con glicina o taurina antes de que se secreten en la bilis.

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

40 El término "alquilo sustituido" se refiere a un resto de alquilo que tiene un sustituyente que reemplaza a uno o más átomos de hidrógeno en al menos uno o más átomos de carbono de la estructura principal de hidrocarburo. Los sustituyentes de este tipo pueden incluir, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino, y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureído), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

50 "Ariilo" incluye grupos con aromaticidad, que incluyen grupos "sin conjugar" de 5 y 6 miembros, o aromáticos de un solo anillo que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, así como "conjugados", o sistemas multicíclicos, con al menos un anillo aromático. Los ejemplos de grupos ariilo incluyen benceno, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina, y pirimidina, y similares. Además, el término "ariilo" incluye grupos ariilo multicíclicos, por ejemplo, tricíclicos, bicíclicos, por ejemplo, naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilenodioxifenilo, quinolina, isoquinolina, naphthridine, indol, benzofurano, purina, benzofurano, desazapurina, o indolicina. Esos grupos ariilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también se pueden denominar "aril heterociclos", "heterociclos," "heteroarilos" o "heteroaromáticos". Al menos una posición del anillo aromático se puede sustituir con sustituyentes tal como se ha descrito anteriormente, tales como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxycarbonilo,

aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino, y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureído), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también se pueden fusionar o unir por puente con anillos con alicíclicos o heterocíclicos, que no son aromáticos con el fin de formar un sistema multicíclico (por ejemplo, tetralina, metilendioxfenilo).

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

El término "alcoxi" o "alcoxilo" incluye grupos alquilo, alquenoilo, y alquinoilo unidos covalentemente a un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxi (o radicales alcoxil) incluyen grupos metoxi, etoxi, isopropiloxi, propoxi, butoxi, y pentoxi.

El término "éter" incluye compuestos o restos que contienen un oxígeno unido a los átomos de carbono o heteroátomos diferentes. Por ejemplo, el término incluye "alcoxialquilo" que se refiere a un grupo alquilo, alquenoilo, o alquinoilo unido covalentemente a un átomo de oxígeno que está unido covalente mente a otro grupo alquilo.

El término "éster" incluye compuestos y restos que contienen un átomo de carbono o un heteroátomo unido a un átomo de oxígeno que está unido al carbono de un grupo carbonilo. El término "éster" incluye grupos alcoxycarboxi tales como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo, butoxycarbonilo, pentoxycarbonilo, etc. Los grupos alquilo, alquenoilo, o alquinoilo son como se han definido anteriormente.

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

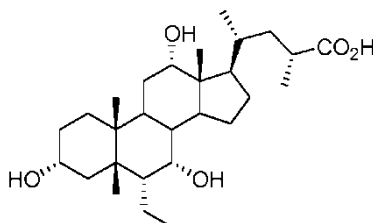
El término "halógeno" incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc. El término "perhalogenado" se refiere generalmente a un resto en el que todos los hidrógenos están sustituidos con átomos de halógeno.

Un "grupo aniónico", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que tiene carga negativa a pH fisiológico. Los grupos han iónicos incluyen carboxilato, sulfato, sulfonato, sulfinato, sulfamato, tetrazolilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, o fosfortioato o equivalentes funcionales de los mismos. Se pretende que los "equivalentes funcionales" de los grupos aniónicos incluyan bioisómeros, por ejemplo, bioisómeros de un grupo carboxilato. Los bioisómeros incluyen tanto equivalentes bioisostéricos clásicos como equivalentes bioisostéricos no clásicos. En la técnica se conocen 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, pp.19-23). Otro grupo aniónico es un carboxilato.

La expresión "grupo funcional inestable" se refiere a un patrón de sustitución que contiene un enlace lábil, por ejemplo, un grupo funcional o enlace que es susceptible de hidrólisis o escisión en condiciones fisiológicas (por ejemplo, soluciones acuosas en el intervalo de pH neutro). Los ejemplos de grupos funcionales inestables incluyen acetales y cetales.

Las expresiones "polimorfos cristalinos" o "polimorfos" se refieren a la existencia de más de una forma cristalina para un compuesto, sal o solvato del mismo. Los polimorfos cristalinos del compuesto de análogo de ácidos biliares se preparan por cristalización en diferentes condiciones.

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



Como alternativa se puede denominar ácido 6 α -etil-(23R) - metil-3 α ,7 α ,12 α trihidroxi-5 β -colan-24-oico.

Además, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir en forma hidratada o no hidratada (la forma anhidra) o en forma de 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.

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

Se observará que la estructura de algunos de los compuestos de la invención incluye átomos de carbono asimétricos. En consecuencia se debe entender que los isómeros que surgen a partir de una asimetría de ese tipo (por ejemplo, todos los enantiómeros y diastereómeros) están incluidos dentro del alcance de la invención, a menos que se indique de otro modo. Los isómeros de ese tipo se pueden obtener en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis estereoquímicamente controlada. Los enantiómeros (configuraciones R y S) se denominan de acuerdo con el sistema desarrollado por R.S. Cahn, C. Ingold, y V. Prelog.

Además, las estructuras y otros compuestos que se discuten en la presente solicitud incluyen todos los isómeros atropícos de los mismos. Los isómeros atropícos son un tipo de estereoisómero en el que los átomos de dos isómeros se colocan de forma diferente en el espacio. Los isómeros atropícos deben su existencia a una rotación limitada causada por impedimento de rotación de grupos grandes alrededor de un enlace central. Los isómeros atropícos de ese tipo por lo general existen en forma de una mezcla, sin embargo como resultado de recientes avances en técnicas de cromatografía, ha sido posible separar mezclas de dos isómeros atropícos en casos seleccionados.

"Compuesto estable" y "estructura estable" pretenden hacer referencia a un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y a la formulación en un agente terapéutico eficaz.

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

Como se define en el presente documento, el término "derivado", por ejemplo, en la expresión "derivados de ácidos biliares", se refiere a compuestos que tienen una estructura de anillo de 4 miembros con un núcleo común, Y están sustituidos con diversos grupos como se describe en el presente documento.

El término "bioisómero" se refiere a un compuesto que resulta del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos por otro, átomo un grupo de átomos, ampliamente similar. La sustitución bioisostérica puede tener base de fisicoquímica o antropológica. Los ejemplos de bioisómeros de ácido carboxílico incluyen acil sulfonimidias, tetrazoles, sulfonatos, y fosfonatos. Véase, por ejemplo, Patani y LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176 (1996).

La "terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de un compuesto de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la co-acción de estos agentes terapéuticos (es decir, el compuesto de la invención y al menos un segundo agente). El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación por lo general se realiza durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La "terapia de combinación" puede, pero generalmente no, pretende incluir la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes separados de monoterapia que de forma accidental y arbitraria da como resultado las combinaciones de la presente invención. La "terapia de combinación" pretende incluir la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea.

La administración sustancialmente simultánea se puede conseguir, por ejemplo, mediante la administración al sujeto de una sola cápsula que tiene una proporción fija DE cada agente terapéutico o en cápsulas múltiples, individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede realizar mediante cualquier vía apropiada que incluye, pero no se limita a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares, y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa. Los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante la misma vía o mediante diferentes vías. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar por vía oral. Como alternativa, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía oral o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección intravenosa. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos casi no es crítica.

La "terapia de combinación" también incluye la administración de los agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos y terapias no farmacológicas (por

ejemplo, cirugía o tratamientos mecánicos). Cuando la terapia de combinación comprende adicionalmente un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico se puede realizar en cualquier momento adecuado siempre y cuando tenga un efecto beneficioso a partir de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos Y se consigue el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso también se consigue cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizá en días o incluso semanas.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" cómo se usan en el presente documento se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, pero no se limita a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión.

El término "pulmonar", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier parte, tejido u órgano cuya función principal sea el intercambio de gases con el entorno externo, por ejemplo, intercambio de O_2/CO_2 . Dentro de un paciente. "Pulmonar" por lo general se refiere a los tejidos del tracto respiratorio. Por lo tanto, la expresión "administración pulmonar" se refiere a la administración de las formulaciones que se describen en el presente documento a cualquier parte, tejido u órgano cuya función principal sea el intercambio de gases con el entorno externo (por ejemplo, boca, nariz, faringe, orofaringe, laringofaringe, laringe, tráquea, carina, bronquios, bronquiolos, alvéolos). Para fines de la presente invención, "pulmonar" también incluye un tejido o cavidad que es contiguo al tracto respiratorio, en particular, los senos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención, o una combinación de compuestos es una cantidad (candidato concentración) del compuesto o compuestos. En una realización, cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto se administra a un sujeto con necesidad de tratamiento los síntomas que surgen a partir de la enfermedad mejoran inmediatamente o después de la administración del compuesto una o más veces. La cantidad del compuesto a administrar a un sujeto dependerá del trastorno en particular, el modo de administración, compuestos co-administrados, si los hubiera, y las características del sujeto, tales como salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad (candidato 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 administrar a un sujeto dependerá del trastorno en particular, el modo de administración, compuestos co-administrados, si los hubiera, y las características del sujeto, tales como salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

La expresión "reducir el riesgo de", como se usa en el presente documento, se refiere a reducir la posibilidad o la probabilidad de que una enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad inflamatoria y/o enfermedad metabólica se produzca en un paciente, especialmente cuando el paciente o sujeto está predispuesto a una aparición de este tipo.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" de un compuesto de la invención es un producto del compuesto que contiene un enlace iónico, y por lo general se produce por reacción del compuesto con cualquiera de un ácido o una base, adecuados para su administración a un sujeto.

Como se usa en el presente documento, las "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a derivados de los compuestos de la invención en los que el compuesto precursor se modifica preparando sales de ácidos o de bases de los mismos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido mineral orgánico de restos tales como aminas; sales de alcali u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales de este tipo incluyen, pero no se limitan a, las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos seleccionados entre ácido 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietano sulfónico, acético, ascórbico, benceno sulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etano disulfónico, etano sulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicoliarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhidrato, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, lauril sulfónico, maleico, málico, mandélico, metano sulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico, y tolueno sulfónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales de este tipo se pueden preparar por reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los

dos; generalmente, son preferentes los medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Los listados de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, p. 1445 (1990).

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la expresión incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional con una proporción de beneficio/riesgo razonable.

10 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida la técnica, e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicados en el desplazamiento o transporte de cualquier composición objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de una composición objeto y no dañinos para el paciente. En ciertas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable es no pirógeno. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de taponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas.

Una "composición" o "composición farmacéuticamente aceptable" es una formulación que contiene un compuesto de la invención o sal, solvato o hidrato del mismo. En una realización, la composición farmacéutica se encuentra a granel o en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria es cualquiera de una diversidad de formas, que incluyen, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una bomba individual en un inhalador de aerosol, o un vial. La cantidad de principio activo (por ejemplo, una formulación de un compuesto de la invención o sales del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y varía de acuerdo con el tratamiento en particular implicado. Un experto en la materia observará que en ocasiones es necesario hacer variaciones de rutina a la dosificación dependiendo de la edad y condición del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una diversidad de vías, incluyendo las vías oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, y similares. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmicas de un compuesto de la presente invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches y agentes de inhalación. En otra realización, el compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o agente de propulsión que sea necesario.

El término "dosis instantánea" se refiere a formulaciones de un compuesto que son formas de dosificación que se dispersan rápidamente.

45 La expresión "liberación inmediata" se define como una liberación del compuesto a partir de una forma de dosificación en un periodo de tiempo relativamente breve, generalmente hasta aproximadamente 60 minutos. La expresión "liberación modificada" se define para que incluya liberación retardada, liberación prolongada, y liberación pulsada. La expresión "liberación pulsada" se define como una serie de liberaciones de fármaco a partir de una forma de dosificación. La expresión "liberación sostenida" o "liberación prolongada" se define como una liberación continua de un compuesto a partir de una forma de dosificación durante un periodo de tiempo 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). Por lo general con el sujeto es un ser humano.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "conjugados de aminoácidos" se refiere a conjugados de los compuestos de la invención con cualquier aminoácido adecuado. La taurina ($\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$) y la glicina ($\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$) son ejemplos de conjugados de aminoácidos. Los conjugados de aminoácidos adecuados de los compuestos tienen la ventaja añadida de aumento de la integridad en fluidos biliares o intestinales. Los aminoácidos adecuados no se limitan a taurina y glicina. La invención incluye conjugados de aminoácidos de los compuestos de la invención.

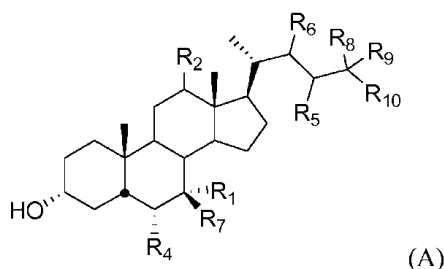
65 La expresión "compuestos de la invención" se refiere a compuestos que tienen las fórmulas que se describen en el presente documento.

La expresión "modulador de TGR5" se refiere a cualquier compuesto que interactúa con el receptor TGR5. La interacción no se limita a un compuesto que actúa como un 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 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 o sintético, se caracteriza por su eficacia intrínseca 'e' descrita originalmente por Furchgott en 1966. Se usa para expresar el grado en el que los diferentes ligandos producen respuestas biológicas variables a la vez que ocupan el mismo número de receptores. Generalmente, el término "agonista" se refiere a un compuesto que aumenta la actividad de otra molécula o sitio receptor. Un agonista, por definición clásica, ya sea un agonista ortoestérico, aloestérico, inverso o un co-agonista tiene una propiedad para unirse al receptor, alterar su estado de receptor y dar como resultado una acción biológica. En consecuencia, El agonismo se define como una propiedad de un antagonista o un ligando para producir una acción biológica. A diferencia de esto, un "antagonista" es esencialmente un agonista con alta afinidad hacia la misma macromolécula receptora, pero con eficacia intrínseca muy baja o casi imperceptible, y por lo tanto evita por vía estérica las acciones biológicas de un agonista. Como una propiedad, el antagonismo puede ser funcional o fisiológico, en el que un agonista tiene una competición directa por el sitio receptor en efectos anteriores y opuestos a través de un sistema de receptor-mensajero diferente en el último. De forma más específica, un agonista de TGR5 es un ligando receptor o compuesto que se une a TGR5 y aumenta la concentración del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) en al menos un 20 % en células que expresan el receptor. " Por el contrario, un antagonista de TGR5 podría ser un compuesto que antagoniza o bloquea la actividad de un agonista, efectuando de ese modo una reducción de la concentración de AMPc.

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

Compuestos y Composiciones

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



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

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

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

En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo sin sustituir. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo sin sustituir. R₄ es alquilo sin sustituir. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo. R₃ y R₄ son los mismos. R₃ y R₄ son diferentes. R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno. R₃ es hidroxilo y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H, R₄

es hidrógeno, y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ es hidrógeno, y n es 1. R₃ es H y R₄ es alquilo sin sustituir. R₃ es OH y R₄ es metilo. R₃ es OH y R₄ es etilo. R₃ es OH y R₄ es metilo.

5 En otro aspecto, R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ es alquilo sustituido alquilo con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. R₅ es arilo. R₅ es fenilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, en el que R₅ está en la configuración S y R₄ está en la configuración alfa. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, R₁ es hidroxilo, y R₂ es hidrógeno.

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

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

20 En otro aspecto, al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es etilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es propilo. R₁ es metilo. R₁ es etilo. R₁ es propilo. R₇ es metilo. R₇ es etilo. R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo sin sustituir. Tanto R₁ como R₇ son metilo. Tanto R₁ como R₇ are etilo. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₁ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el otro R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el otro R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo y R₅ es metilo. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo sin sustituir. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo sin sustituir. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración R.

30 En otro aspecto, R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo. R₆ es alquilo sin sustituir. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₆ es propilo.

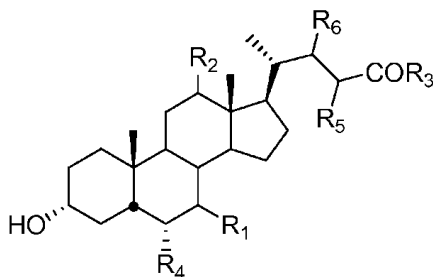
35 En otro aspecto, R₈ es hidrógeno. R₈ es alquilo sin sustituir. R₈ es metilo. R₈ es etilo. R₈ es propilo. R₂ es α-hidroxilo y R₈ es alquilo sin sustituir. En otro aspecto, R₈ y R₉ forman un carbonilo.

En un aspecto, R₁₀ es R₃. R₃ es hidroxilo. Al menos uno de R₈ o R₉ es hidrógeno. R₈ y R₉ son los dos hidrógeno. Al menos uno de R₈ o R₉ es alquilo sin sustituir. Al menos uno de R₈ o R₉ es metilo. Al menos uno de R₈ o R₉ es etilo. En otro aspecto, R₁₀ es SO₃H.

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

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

En el presente documento también se describe un compuesto de fórmula I:



(I)

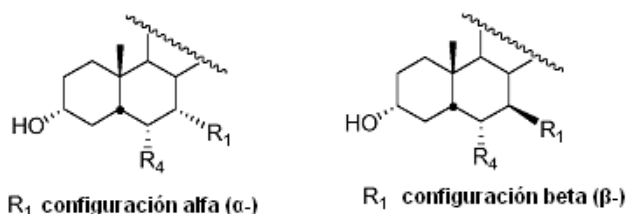
50 o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno; R₂ es hidrógeno o α-hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido, o halógeno; R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R₆ es hidrógeno o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y n es

55

un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, cuando R_5 es metilo, R_1 es hidroxilo, y R_3 es hidroxilo o $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, entonces R_4 no es hidrógeno.

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

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



10 En otro aspecto se presentan compuestos en los que R_2 es α -hidroxilo. R_2 es hidrógeno. R_1 es β -hidroxilo y R_2 es α -hidroxilo. R_1 es β -hidroxilo y R_2 es H. R_1 es α -hidroxilo y R_2 es H.

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

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

25 En otro aspecto, R_4 es hidrógeno o alquilo. R_4 es hidrógeno. R_4 es alquilo inferior. R_4 es alquilo inferior y el grupo al que el inferior está en la configuración alfa. R_4 en la configuración alfa se refiere a que R_4 tiene la estereoquímica que se muestra en la estructura que sigue a continuación.



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

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

35 En otro aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 es hidrógeno y n es 1.

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

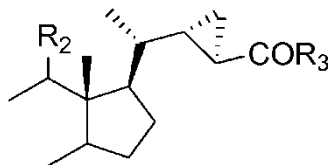
40 En otro aspecto, R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido. R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido inferior. R_5 está en la configuración S. R_5 está en la configuración R. R_5 es metilo o etilo. R_5 es S-metilo. R-metilo. R_5 es S-etilo. R-etilo. R_5 es alquilo sustituido con fenilo. R_5 es alquilo inferior sustituido con fenilo. R_5 es bencilo. R_5 es S-bencilo. R_5 es R-bencilo.

En otro aspecto, R_5 es arilo. R_5 es fenilo.

45 En otro aspecto, R_4 y R_5 son cada uno alquilo sin sustituir. R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir. R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir y R_5 está en la configuración S. R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir y R_4 está en la configuración alfa. En otro aspecto, R_4 y R_5 no son hidrógeno.

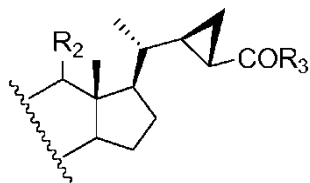
50 En otro aspecto, R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir y R_1 es α -hidroxilo. R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir y R_2 es hidrógeno. R_4 y R_5 son cada uno alquilo inferior sin sustituir, R_1 es α -hidroxilo, y R_2 es hidrógeno.

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



5

El anillo de 3 miembros tiene la siguiente estereoquímica:



10

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

15

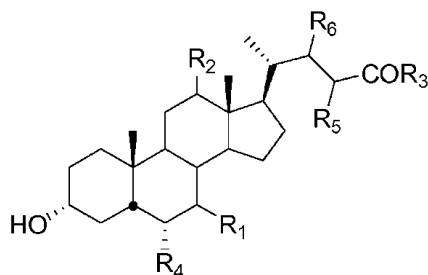
En otro aspecto, al menos uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es hidrógeno. En otro aspecto, al menos dos de R₁, R₂, R₃, o R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, al menos tres de R₁, R₂, R₃, o R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, R₁, R₂, R₃, y R₄ son hidrógeno. En otro aspecto, al menos uno de R₁, R₂, o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. En otro aspecto, al menos dos de R₁, R₂, o R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. En otro aspecto, R₁, R₂, y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH.

20

Los compuestos que se desvelan en el presente documento incluyen compuestos seleccionados entre los Compuestos la, lb, lc, lg, lh, li, lo, lp, lq, la 1, lb1, lc1, lg 1, lh1, lilo, ll, lm1, ln1, lo1, lp1, lq1, la2, lb2, lc2, ld2, le2, lf2, lg2, lh2, li2, ll2, lm2, ln2, lo2, lp2, lq2, la3, lb3, lc3, ld3, le3, lf3, lg3, lh3, li3, ll3, lm3, ln3, la4, lb4, lc4, ld4, le4, lf4, lg4, lh4, li4, ll4, lm4, ln4, la5, lb5, lc5, ld5, le5, lf5, lg5, lh5, li5, ll5, lm5, ln5, lb3e, lc3e, ld3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, ll3e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, li5e, ll5e, lm5e, lo5, lp5, lq5, e lr5.

25

En el presente documento también se describe una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula I:



(I),

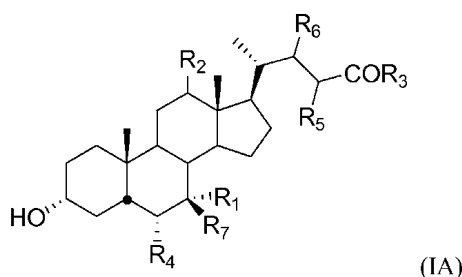
30

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

35

40

En el presente documento también se describen compuestos de Fórmula IA:



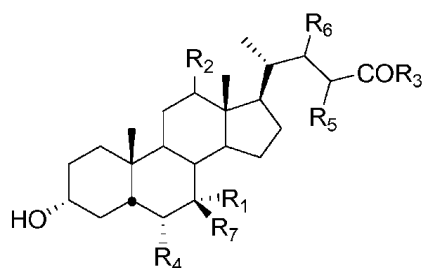
- o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo, o halógeno; R₂ es hidrógeno o α-hidroxilo; R₃ es hidroxilo, hidrógeno, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo, o halógeno; R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R₆ es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido, o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo, o hidroxilo; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo, y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.
- En un aspecto, R₁ es hidrógeno o hidroxilo. R₁ es hidroxilo. R₁ es hidrógeno. R₁ es hidroxilo y R₂ es α-hidroxilo. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. R₁ es hidroxilo y R₂ es H. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₂ es hidrógeno. R₁ y R₂ son los mismos. R₁ es hidroxilo y R₂ es α-hidroxilo. R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno.
- En un aspecto, R₃ es hidrógeno, hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es hidroxilo. R₃ no es hidroxilo. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y n es 1.
- En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo sin sustituir. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo sin sustituir. R₄ es alquilo sin sustituir. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo. R₃ y R₄ son los mismos. R₃ y R₄ son diferentes. R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno. R₃ es OH y R₄ es hidrógeno.
- En otro aspecto, R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_mSO₃H, R₄ es hidrógeno, y m es 2. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H y R₄ es hidrógeno. R₃ es NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ es hidrógeno, y n es 1. R₃ es OH y R₄ es alquilo sin sustituir. R₃ es OH y R₄ es alquilo sin sustituir. R₃ es OH y R₄ es metilo. R₃ es OH y R₄ es etilo. R₃ es OH y R₄ es metilo.
- En un aspecto, R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ está sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. En otro aspecto, R₅ es arilo. Por ejemplo, R₅ es fenilo.
- R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, R₁ es hidroxilo, y R₂ es hidrógeno.
- En un aspecto, R₁, R₂, R₃, y R₄ son hidrógeno. R₂, R₃, y R₄ son hidrógeno. R₂ y R₃ son hidrógeno. Al menos uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es hidrógeno. Al menos dos de R₁, R₂, R₃, o R₄ es hidrógeno. Al menos tres de R₁, R₂, R₃, o R₄ es hidrógeno. R₁, R₂, R₃, y R₄ es hidrógeno.
- En un aspecto, R₁, R₂, y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH. R₂ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos uno de R₁, R₂, o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. Al menos dos de R₁, R₂, o R₄ es hidrógeno y R₃ es OH. Todos de R₁, R₂, y R₄ son hidrógeno y R₃ es OH.
- En otro aspecto, al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es etilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo sin sustituir. Tanto R₁ como R₇ son metilo. Tanto R₁ como R₇ son etilo. R₁ y R₇ son los mismos. R₁ y R₇ son diferentes. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el restante R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el resto de R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es metilo y R₅ es metilo.
- Tanto R₁ como R₅ son alquilo sin sustituir y R₇ es hidroxilo. Tanto R₇ como R₅ son alquilo sin sustituir y R₁ es hidroxilo. R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración R.
- En otro aspecto, R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo. R₆ es alquilo sin sustituir. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₂, y R₆ son cada uno hidrógeno. R₂ y R₆ son hidrógeno y R₅ es alquilo sin sustituir. R₂ y R₆ son hidrógeno, R₅ es alquilo sin sustituir, and al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir.

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

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

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

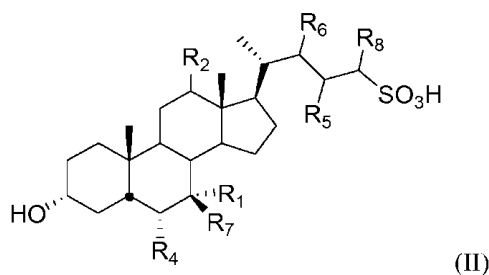
En el presente documento también se describe una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula IA:



o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en la que: R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo o halógeno; R₂ es hidrógeno o α-hidroxilo; R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H; R₄ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo, o halógeno; R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R₆ es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido, o R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; R₇ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir alquilo, o hidroxilo; y m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, cuando R₅ es metilo, R₁ es hidroxilo, y R₃ es hidroxilo o NHCH₂CH₂SO₃H, entonces R₄ no es hidrógeno.

En el presente documento también se describe un compuesto de Fórmula II:



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

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

En otro aspecto, R₄ es hidrógeno o alquilo sin sustituir. R₄ es hidrógeno. R₄ es alquilo sin sustituir. R₄ es un alquilo sustituido. R₄ es metilo o etilo. R₄ es metilo. R₄ es etilo.

ES 2 663 948 T3

En un aspecto, R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. R₅ está en la configuración S. R₅ está en la configuración R. R₅ es metilo o etilo. R₅ es S-metilo. R₅ es R-metilo. R₅ es S-etilo. R₅ es R-etilo. R₅ está sustituido con fenilo. R₅ es bencilo. R₅ es S-bencilo. R₅ es R-bencilo. R₅ es arilo. R₅ es fenilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₁ es hidroxilo. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir y R₂ es hidrógeno. R₄ y R₅ son cada uno alquilo sin sustituir, R₁ es hidroxilo y R₂ es hidrógeno.

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

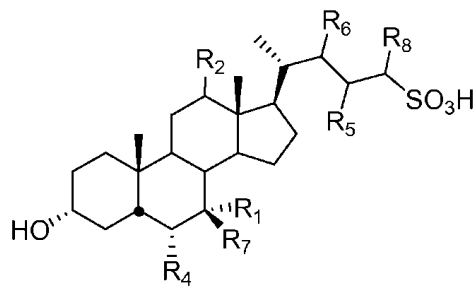
En un aspecto, R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir. R₁ o R₇ es metilo. R₁ o R₇ es etilo. R₁ o R₇ es propilo. Tanto R₁ como R₇ son alquilo sin sustituir. R₇ es hidrógeno. R₇ es hidroxilo. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el resto de R₁ o R₇ es hidrógeno. Uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y el resto de R₁ o R₇ es hidroxilo. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y tanto R₁ como R₅ son alquilo sin sustituir. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo sin sustituir. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. Al menos uno de R₁ o R₇ es alquilo sin sustituir y R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración R. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. R₇ es hidroxilo y tanto R₁ como R₅ son alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración R. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración S. R₁ es hidroxilo y tanto R₇ como R₅ son alquilo sin sustituir, en el que adicionalmente R₅ está en la configuración R. R₁ es hidroxilo y R₇ es metilo. R₁ es metilo y R₇ es hidroxilo.

En otro aspecto, R₆ es alquilo sin sustituir. R₆ es metilo. R₆ es etilo. R₈ es hidrógeno.

R₈ es alquilo sin sustituir. R₈ es metilo. R₈ es etilo. R₂ es α-hidroxilo y R₈ es alquilo sin sustituir.

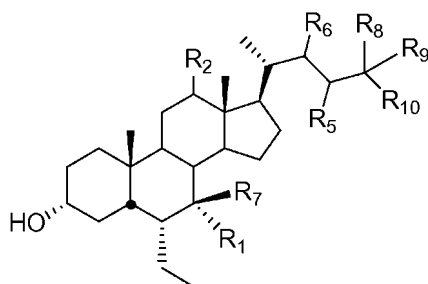
En otro aspecto, el compuesto se selecciona entre los Compuestos la12, lb12, lc12, lg12, lh12, li12, lo12, lp12, lq12, la13, lb13, lc13, lg13, lh13, li13, ll13, lm13, ln13, lo13, lp13, lq13, la14, lb14, lc14, ld14, le14, lf14, lg14, lh14, li14, ll14, lm14, ln14, lo14, lp14, lq14, la15, lb15, lc15, ld15, le15, lf15, lg15, lh15, li15, ll15, lm15, ln15, la16, lb16, lc16, ld16, le16, lf16, lg16, lh16, li16, ll16, lm16, ln16, la17, lb17, lc17, ld17, le17, lf17, lg17, lh17, li17, ll17, lm17, ln17, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e, ln17e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e, ln17e.

En el presente documento también se describe una composición o medicamento que comprende un compuesto de fórmula II:



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

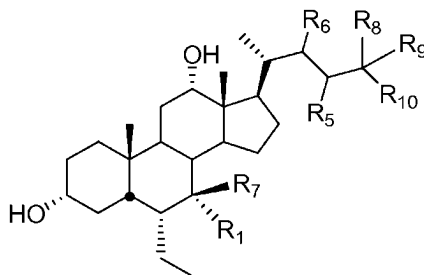
En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la fórmula III:



(III)

o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en la que R_1 es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno; R_2 es hidrógeno o α -hidroxilo; R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; R_7 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido o hidroxilo; R_8 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido; R_9 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido o R_8 y R_9 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo; R_{10} es R_3 o SO_3H ; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

La invención incluye un compuesto de acuerdo con la fórmula IIIA:



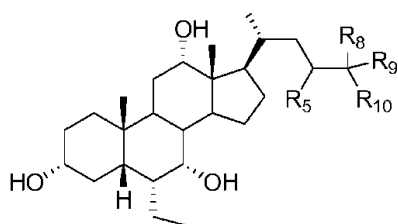
(IIIA)

o una sal, solvato, o hidrato del mismo, en la que R_1 es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno; R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; R_7 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido o hidroxilo; R_8 es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido; R_9 es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido o R_8 y R_9 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo; R_{10} es R_3 o SO_3H ; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_1 es hidroxilo. Otro aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo, en el que R_8 y R_9 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo y R_{10} es R_3 . En un aspecto, R_3 se selecciona entre hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$, y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_6 es hidrógeno. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato, del mismo, en el que R_5 es alquilo sin sustituir. En un aspecto, R_5 es metilo. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo. Un aspecto de la invención incluye un compuesto o una sal, solvato o hidrato del mismo, en el que R_7 es hidrógeno.

Un aspecto de la invención incluye un compuesto seleccionado entre los Compuestos Ig3e, li3e, Ig4e, lh4e, li4e, Ig5e, lh5e, e li5e.

En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la fórmula IIIB:

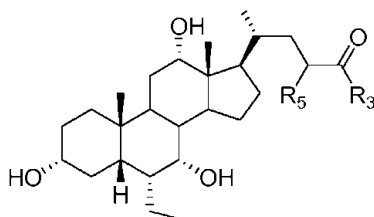


(IIIB)

o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en la que R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R_8 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido; R_9 es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido o R_8 y R_9 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo; R_{10} es R_3 o SO_3H ; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_5 es alquilo sin sustituir. En un aspecto, R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o sal, solvato, o hidrato del mismo en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto incluye un compuesto o sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_8 y R_9 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo, en el que R_{10} es R_3 . En un aspecto, R_3 se selecciona entre hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$, y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$.

15

En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la fórmula IIIC:



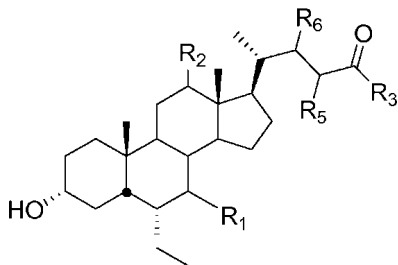
(IIIC)

o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_3 se selecciona entre hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$, y $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En un aspecto, R_3 es hidroxilo. En un aspecto, R_3 es $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. En un aspecto, R_3 es $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo, en el que R_5 es alquilo sin sustituir. En un aspecto, R_5 es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_5 está en la configuración S. Un aspecto incluye un compuesto o sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_5 está en la configuración S y R_5 es metilo.

25

En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la fórmula IV:

30



(IV)

o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en la que: R_1 es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno; R_2 es hidrógeno o α -hidroxilo; R_3 es hidroxilo, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, o $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$; R_5 es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo; R_6 es hidrógeno o R_5 y R_6 tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

35

Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_1 es hidroxilo. Otro aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R_1 es alfa hidroxilo. Un

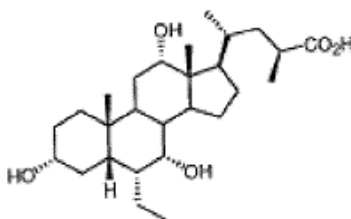
aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₁ es beta hidroxilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo en el que R₁ es metilo.

5 Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₅ es alquilo sin sustituir. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₅ es metilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₅ está en la configuración R. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₅ está en la configuración S.

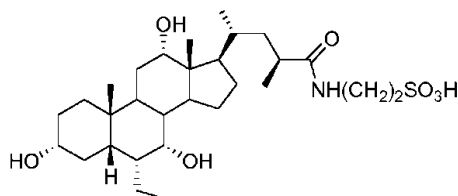
10 Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₆ es hidrógeno. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo en el que R₂ es hidrógeno. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo, en el que R₂ es alfa hidroxilo. Un aspecto incluye un compuesto o una sal, solvato, o hidrato del mismo en el que R₃ es hidroxilo.

15 Un aspecto incluye un compuesto seleccionado entre los Compuestos Ib3e, Ic3e, Id3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, ll3e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, li5e, ll5e, lm5e, ln5e, la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, ll9e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e, le11e, lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e, ln11e, la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e, ld16e, le16e, lf16e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e, e ln17e.

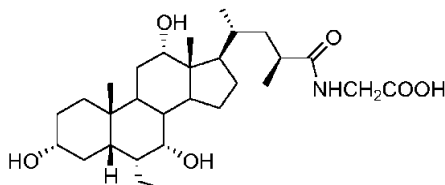
La divulgación incluye el Compuesto lh3e:



25 o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo. Un aspecto incluye el conjugado de taurina del Compuesto lh3e:



30 o una sal, solvato, hidrato, o profármaco del mismo. Un aspecto incluye el conjugado de glicina del Compuesto lh3e:



35 o una sal, solvato, o hidrato del mismo.

Un aspecto de la invención incluye los Compuestos lg3e, li3e, lg4e, lh4e, li4e, lg5e, lh5e, e li5e.

40 Un aspecto de la invención incluye los Compuestos lg9e, lh9e, li9e, lg10e, lh10e, li10e, lg11e, lh11e, e li11e.

Un aspecto de la invención incluye los Compuestos lg15e, lh15e, li15e, lg16e, lh16e, li16e, lg17e, lh17e e li17e.

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

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

5 La presente divulgación también incluye compuestos radioetiquetados de la invención. Los compuestos radioetiquetados se pueden preparar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los compuestos radioetiquetados se pueden preparar haciendo reaccionar el compuesto de la invención con gas tritio en presencia de un catalizador apropiado para producir compuestos radioetiquetados que tienen las fórmulas que se describen en el presente documento. En una realización, los compuestos están trititados.

10 Uso y Métodos

La invención incluye un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto. La divulgación también incluye un método para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto mediante la administración de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, o profármaco del mismo.

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

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

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

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

En un aspecto, la invención incluye una enfermedad gastrointestinal seleccionada entre enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome del intestino corto (colitis post-radiación), colitis microscópica, síndrome del intestino irritable (malabsorción), y hiperproliferación bacteriana.

40 En un aspecto, la invención incluye enfermedad renal seleccionada entre nefropatía diabética, insuficiencia renal crónica, nefritis glomerular, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía de trasplante crónica, nefritis intersticial crónica, y enfermedad renal poliquística.

45 En un aspecto, la invención incluye cáncer seleccionado entre cáncer colorrectal, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, colangio carcinoma, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, e insulinoma.

50 En un aspecto, la invención incluye enfermedad hepática seleccionada entre esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólico, 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, eficiencia de α 1-antitripsina, nutrición parenteral total (TPN), colestasis asociada a la TPN y sepsis.

55 En un aspecto, la invención incluye la enfermedad autoinmune eritematosa.

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

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

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

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

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

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

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

25 Para preparar composiciones farmacéuticas en forma de supositorios, una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao se mezcla en primer lugar y el principio activo se dispersa en la misma mediante, por ejemplo, agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte a continuación en moldes de tamaño conveniente y se permite que se enfríe y solidifique.

30 Los polvos y comprimidos contienen preferentemente entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 70 % en peso del principio activo del compuesto de la invención. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir la formulación del compuesto activo con material en cápsula acción como un vehículo proporcionando una cápsula en la que el compuesto de la invención (con o sin otros vehículos) está rodeado por el vehículo, de modo que el vehículo se encuentra de ese modo en asociación con el compuesto. De una manera similar, también se pueden incluir obleas. Los comprimidos, polvos, obleas, y cápsulas se pueden usar como formas de dosificación sólida adecuadas para administración oral.

40 Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones adecuadas para administración oral o parenteral, suspensiones y emulsiones adecuadas para administración oral. Las soluciones acuosas estériles del componente activo o soluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua tamponada, solución salina, PBS, etanol, o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si fuera necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para ajuste del pH y agentes de tamponamiento, agentes para ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes, y similares.

45 Las soluciones estériles se pueden preparar por disolución del componente activo (por ejemplo, un compuesto de la invención) en el sistema de disolventes deseado, y a continuación pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarla o, como alternativa, por disolución del compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar, o liofilizar, para su uso tal como lo es la preparación liofilizada que se combina con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones por lo general estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9, y lo más preferentemente entre 7 y 8.

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

65

Las cantidades eficaces para uso terapéutico dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y del peso y el estado general del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg del compuesto al día para un paciente de 70 kg, con dosificaciones de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg el compuesto al día para un paciente de 70 kg siendo las más comúnmente usadas.

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

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se pueden realizar con niveles y patrones de dosis que son seleccionados por el médico que prescribe. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para tratar o prevenir de manera eficaz la enfermedad en el paciente.

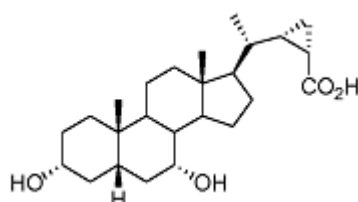
La invención también proporciona kits para prevenir o tratar una enfermedad, en la que el kit comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o hidrato del mismo. Los kits generalmente incluyen una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, así como material de información que contiene instrucciones sobre cómo distribuir la composición farmacéutica, incluyendo la descripción del tipo de pacientes que se pueden tratar, la programación (por ejemplo, dosis y frecuencia) y la vía de administración, y similares. A continuación se muestran algunos compuestos representativos de la divulgación.

Los siguientes compuestos que se muestran a continuación la-Ir5 pertenecen al menos a la fórmula I:

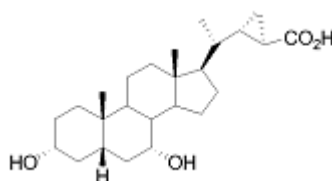
- la: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lb: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lc: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ld: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 le: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lf: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lg: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lh: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 li: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ll: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lm: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ln: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lo: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lp: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lq: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 la1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lb1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lc1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ld1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 le1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lf1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lg1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lh1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 li1: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ll1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lm1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ln1: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lo1: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lp1: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lq1: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 la2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lb2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lc2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ld2: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 le2: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lf2: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lg2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lh2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 li2: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$

- lb5e: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lc5e: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ld5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 le5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lf5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lg5e: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lh5e: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 li5e: $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ll5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 lm5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$
 ln5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$

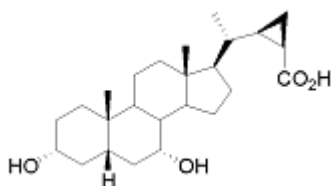
lo5:



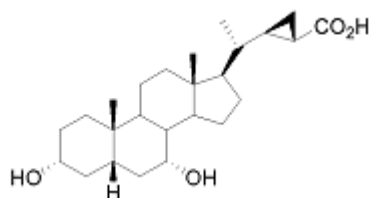
lp5:



lq5:



lr5:



Los siguientes compuestos ln6-In11e pertenecen al menos a la fórmula IA:

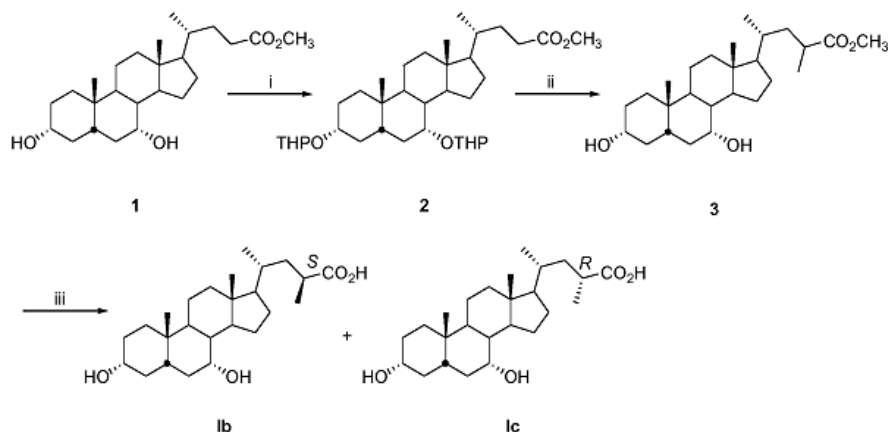
- ln6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 lb6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 lc6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 ld6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
 le6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
 lf6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
 lg6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 lh6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 li6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
 ll6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S,R)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
 lm6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S)\text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

- li15e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 ll15e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 lm15e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 ln15e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 5 la16e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lb16e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lc16e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 ld16e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 le16e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 10 lf16e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 lg16e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lh16e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 li16e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 ll16e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 15 lm16e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 ln16e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 la17e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lb17e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lc17e: R₁ = OH, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 20 ld17e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 le17e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 lf17e: R₁ = Me, R₂ = H, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 lg17e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 lh17e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 25 li17e: R₁ = OH, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = Me, R₈ = H
 ll17e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S,R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 lm17e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (S)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H
 ln17e: R₁ = Me, R₂ = α-OH, R₄ = α-Et, R₅ = (R)Me, R₆ = H, R₇ = OH, R₈ = H

30 EJEMPLO 1: Síntesis de Moduladores de TGR5

Los compuestos de la invención, y derivados relacionados, se pueden sintetizar con métodos conocidos por alguien con experiencia en la materia. Los métodos detallados para sintetizar estos compuestos y los compuestos que se describen en el presente documento se describen a continuación. Véanse también, los documentos WO 02/072598, WO 2004/0007521, EP 1568706 y EP 135782. en el caso del compuesto en el que R₁ es hidrógeno, R₂ y R₃ son hidroxilo y R₄ es un grupo alquilo inferior, el compuesto de fórmula (I) se puede obtener de acuerdo con el siguiente esquema:

Esquema 1



40 Esquema 1.

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

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

23(S)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ib) y el ácido 23(R)-metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ic) deseados.

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

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

Se añadieron ácido p-toluenosulfónico (78 mg, 0,41 mmol) y 3,4-dihidro-2H-pirano (20,1 ml, 0,098 mol) a una solución de 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (1) (2,0 g, 4,9 mmol) en dioxano (6 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se añadió H₂O (50 ml) y la mezcla se concentró parcialmente al vacío y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con solución salina saturada (1 x 50 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. La elución con petróleo ligero/acetato de etilo a 80/20 proporcionó 2,5 g del compuesto puro 2 (rendimiento de un 90 %).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,64 (s, 3H, CH₃-18), 0,89 (s, 3H, CH₃-19), 0,92 (d, 3H, CH₃-21), 3,31-3,67 (m, 4H, -CH₂OCH-), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,67 (m, 1H, CH-3), 3,88 (s a, 1H, CH-7), 4,67 (s a, 1H, -O-CH-O-), 4,73 (s a, 1H, -O-CH-O-).

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

Se añadió n-butil litio (4,3 ml, solución 2,2 M en hexano) gota a gota a -78 °C a una solución de diisopropilamina (1,4 ml, 10,1 mmol) en THF seco (50 ml). El sistema se mantuvo a -78 °C durante un periodo adicional de 30 min la continuación, se añadió 3 α ,7 α ,12 α - tetrahidropiranioloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (2) (1,8 g, 3,2 mmol) disuelto en THF seco (14 ml) gota a gota a la mezcla. Después de 20 min se añadió lentamente yoduro de metilo (1,4 ml, 22,0 mmol) disuelto en THF seco (7 ml) se y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche.

Los disolventes se retiraron al vacío y se acidificaron con HCl al 10 % y se extrajo con EtOAc (5 x 50 ml), se lavaron con solución de Na₂S₂O₃ al 5 % (2 x 50 ml), se secaron (sobre Na₂SO₄ anhidro), se filtraron, y se evaporaron al vacío. El residuo en bruto a continuación se trató con una solución de HCl 2 N en MeOH (50 ml) durante 12 h. El residuo se evaporó al vacío y se recogió con EtOAc (100 ml), se lavó con una solución de NaHCO₃ saturado (2 x 50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice. La elución con petróleo ligero/acetato de etilo a 70/30 proporcionó 1,1 g (2,7 mmol) del compuesto puro 3 (rendimiento de un 84 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,62 (s, 3H, CH₃-18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,92 (d, 3H, CH₃-21), 2,38 (m, 1H, CH-23), 3,27-3,40 (m, 1H, CH-3), 3,55 (s a, 1H, CH-7), 3,63 (s, 3H, CO₂CH₃).

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

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

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

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

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

Los siguientes compuestos se prepararon por alquilación de ácido 6 α -metil-3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1.

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

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

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

Los siguientes compuestos se prepararon por alquilación de ácido 3 α ,7 α D,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1.

5 Ácido 23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih): pf: 237-239 °C. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,63 (s, 3H, CH₃- 18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 0,96-0,98 (m, 3H, CH₃-21), 1,07-1,11 (d, 3H, -CH₃), 2,44-2,73 (m, 1H, CH-23), 3,35-3,50 (m, 1H, CH-3), 3,82 (s a, 1H, CH-7) 3,95 (s a, 1H, CH-12). RMN ¹³C (DMSO) δ : 12,72, 17,60, 19,24, 19,24, 23,00, 23,19, 26,59, 27,78, 28,88, 30,72, 34,77, 35,22, 35,66, 37,19, 41,84, 46,19, 47,27, 49,01, 66,69, 70,88, 71,45, 178,25.

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

EJEMPLO 4: Preparación de ácido 23(R)- y 23(S)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α D,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ih3, Ii3)

15 Los siguientes compuestos se prepararon por alquilación de ácido 6 α -metil-3 α ,7 α D,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1.

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

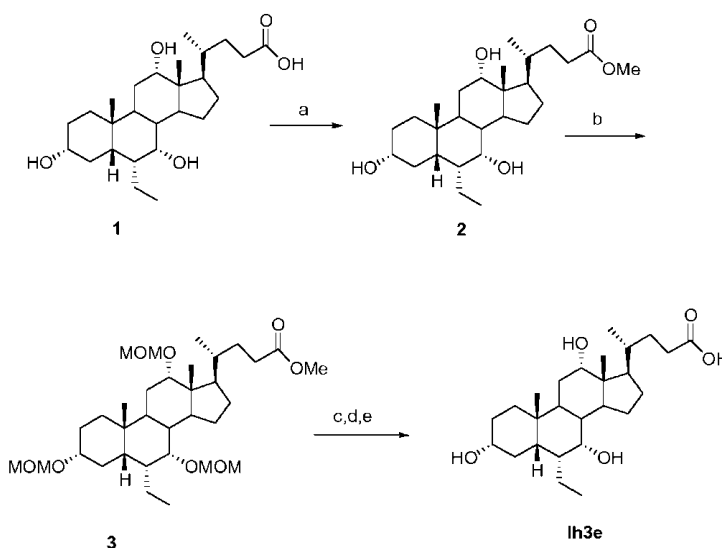
25 Ácido 23(R)-metil-6 α -metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico (Ii3): pf: 109-110 °C. RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0,72 (s, 3H, CH₃-18), 0,91 (s, 3H, CH₃-19), 1,07-1,11 (m, 6H, - CH₃ y CH₃-21), 2,37-2,53 (m, 1H, CH-23), 3,15-3,42 (m, 1H, CH-3), 3,53 (s a, 1H, CH-7) 3,97 (s a, 1H, CH-12). RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 11,61, 15,04, 15,32, 16,15, 22,04, 22,75, 26,27, 27,62, 28,18, 29,61, 32,91, 33,74, 34,31, 35,06, 35,18, 36,56, 39,70, 40,25, 41,68, 46,19, 46,31, 71,76, 71,77, 72,62, 180,11.

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

30 Los siguientes compuestos se prepararon por alquilación de ácido 3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oico de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1.

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

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

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

45 **Reactivos y condiciones:** a) pTSA, MeOH, ultrasonidos, cuant. b) CH₂(OCH₃)₂, P₂O₅, CHCl₃, 97 %. c) LDA, MeI, -78 °C. d) MeOH, HCl, 45 °C. e) MeOH, NaOH, 45 °C, 41 %. Rendimiento global: 39,7 %.

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

A una solución de 1 (2,78 g, 6,37 mmol) en MeOH (120 ml), se añadió pTSA (0,12 g, 0,63 mmol), y la mezcla se trató con ultrasonidos durante 90'. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se diluyó con AcOEt (120 ml), se lavó con H₂O (3 x 100 ml) y solución salina saturada (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentró a presión reducida para dar 2 (rendimiento cuantitativo) que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,63 (3H, s, 18-CH₃), 0,84-0,88 (6H, s, 19-CH₃ + CH₃CH₂), 0,97 (3H, d, *J* = 6,62 Hz, 21-CH₃), 3,30 (1H, m, 3-CH), 3,48 (3H, s, COOCH₃), 3,62 (1H, m, 7-CH), 3,97 (1H, m, 12-CH).

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

A una solución de 2 (2,50 g, 5,55 mmol) en CHCl₃ (60 ml) y dimetoximetano (34,10 ml, 166,66 mmol), se añadió P₂O₅ (14,18 g, 99,90 mmol) en porciones, y la suspensión resultante se agitó por vía mecánica durante 45'. A continuación, la mezcla se decantó, y la fase orgánica se trató con NaHCO₃ al 10 % (50 ml) durante 10'. A continuación la fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 ml). Las fases orgánicas recogidas se lavaron con solución salina saturada (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron a presión reducida para dar 3 (3,14 g, 97 %), que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

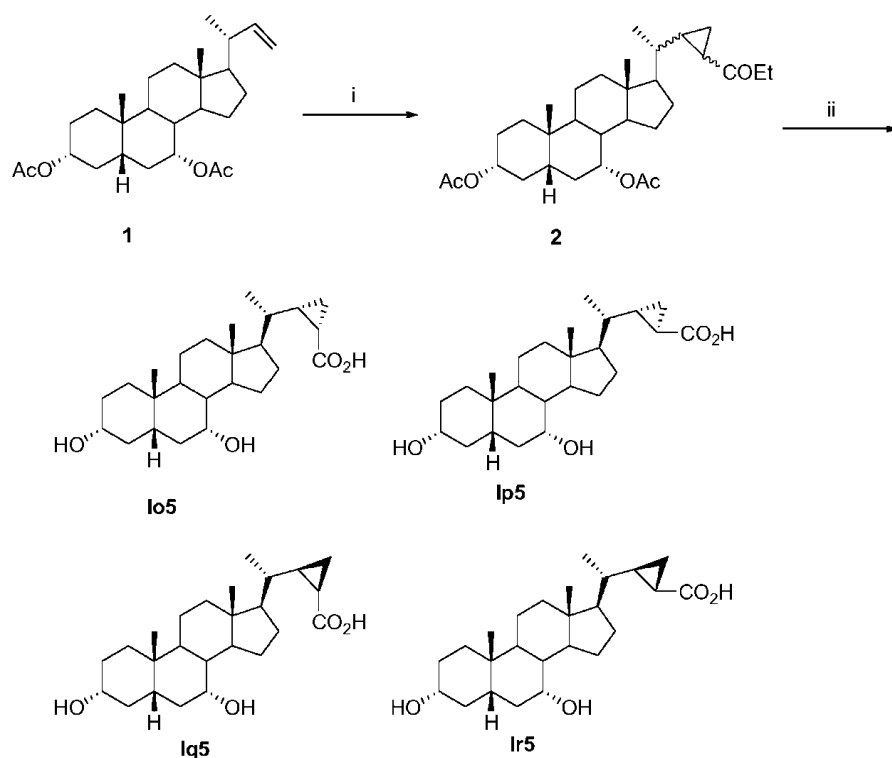
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,67 (3H, s, 18-CH₃), 0,88-1,04 (9H, m, 19-CH₃ + CH₃CH₂ + 21-CH₃), 3,30 (1H, m, 3-CH), 3,30-3,40 (7H, m, 3-CH + 2 x CH₃OCH₂O), 3,45 (3H, s, CH₃OCH₂O), 3,50 (1H, m, 7-CH), 3,66 (3H, s, COOCH₃), 3,79 (1H, m, 12-CH), 4,57 - 4,75 (6H, m, 3 x CH₃OCH₂O).

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

A una solución de diisopropilamina (0,56 ml, 4,026 mmol) en THF recién destilado (15 ml) enfriado a -78 °C y en atmósfera de N₂, se añadió ¹¹BuLi 2,5 N en hexano (1,53 ml, 3,840 mmol) gota a gota. La reacción se agitó a -78 °C durante 30' y a continuación se añadió una solución de 3 (350 mg, 0,601 mmol) disuelto en THF recién destilado (7 ml) gota a gota. La solución resultante se agitó a -78 °C durante 90'. Se añadió yodometano (0,56 ml, 9,015 mmol), la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 60', y a continuación se calentó lentamente a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se diluyó con H₂O (30 ml) y se extrajo con AcOEt (3 x 30 ml). Las fases orgánicas recogidas se lavaron con solución salina saturada (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron a presión reducida. A continuación el residuo se trató con una solución de MeOH/HCl al 37 % (20 ml, 20:1 en vol/vol) a 45° durante 8 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se diluyó con H₂O (30 ml) y se extrajo con AcOEt (3 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución salina saturada (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se trató con una solución de NaOH al 10 % en MeOH (15 ml) a 45 °C durante 24 h. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se diluyó con H₂O (20 ml), se lavó con ¹Pr₂O (3 x 15 ml), se acidificó con HCl 3 N, y por último se extrajo con CHCl₃ (3 x 20 ml). Las fases orgánicas se lavaron con solución salina saturada (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía de presión media (columna: "RP-1 8 Lobar B", MeOH/H₂O de 5:5 a 6:4, 345 kPa) para dar 4 (47 mg, 41 %). Pf: 195-197 °C

RMN ¹H (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,63 (3H, s, 18-CH₃), 0,84-0,88 (6H, m, 19-CH₃ + CH₃CH₂), 0,98 (3H, d, *J* = 6,60 Hz, 21-CH₃), 1,10 (3H, d, *J* = 6,80 Hz, CH(CH₃)COOH), 2,61 (m, 1H, CH(CH₃)COOH), 3,35 (1H, m, 3-CH), 3,65 (1H, m, 7-CH), 3,92 (1H, m, 12-CH). RMN ¹³C (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 11,51, 12,34, 17,52, 19,19, 22,09, 22,67, 23,11, 26,65, 27,40, 28,05, 29,83, 33,31, 34,56, 35,06, 35,40, 38,67, 39,90, 41,11, 41,39, 41,69, 45,10, 46,39, 47,32, 70,65, 71,79, 72,90, 182,07.

EJEMPLO 7: Síntesis de los compuestos lo5, lp5, lq5, e lr5



(i) EDA, Rh₂(OAc)₄, CH₂Cl₂, temp ambiente; (ii) (a) NaOH, EtOH, reflujo, (b) MPLC

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

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

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

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

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

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

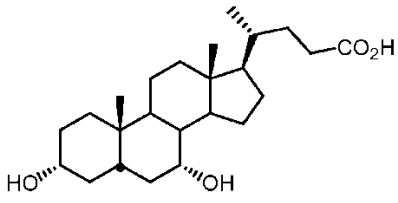
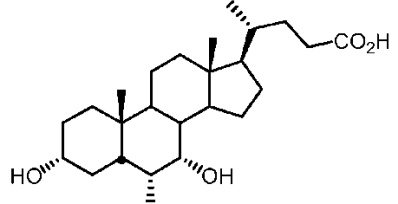
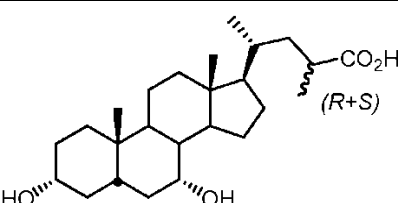
EJEMPLO 8: Actividad de TGR5 y FXR *in vitro*

La potencia y eficacia de los compuestos de la invención y divulgación en el receptor TGR5 se evaluó usando ensayos *in vitro*.

5 La Tabla 1 muestra que los compuestos de la invención y divulgación son moduladores de TGR5 potentes y selectivos. La introducción de un grupo alquilo en la posición C-23 del ácido biliar proporciona selectividad para el receptor TGR5 con respecto a FXR. Esto es evidente mediante la observación de los resultados biológicos obtenidos para CDCA, es evidente que 6-MeCDCA y 6,23-diMe-CDCA (mezcla de isómeros 23- *R,S*) en FXR y TGR5 como se muestra en la

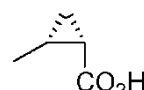
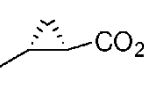
10 Tabla 1. 6,23-diMe-CDCA es 100 veces más potente sobre TGR5 con respecto al receptor FXR. Para una descripción de la unión al receptor TGR5 usando un ensayo *in vitro*, véase, por ejemplo, Kawamata, J. Biol. Chem 2003, Vol. 278 No. 11, p. 9435-9440). La actividad sobre FXR se evaluó mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para reclutamiento del péptido SRC-1 con respecto al FXR humano usando un ELISA sin células. Véase, Blanchard et ál., documento WO 00/37077.

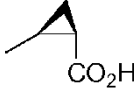
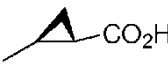
Tabla 1: CE₅₀ (μM) de los Compuestos a modo de Ejemplo sobre el Receptor FXR y TGR5

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

20 Las Tablas 2 y 3 muestran compuestos adicionales evaluados para actividad de TGR5. La actividad de luciferasa se determinó en células expresaban de forma estable hTGR5 o cotransfectadas de forma transitoria con un vector de expresión de hTGR5 y un gen indicador de luciferasa dirigido por elemento sensible a AMPc (CRE). Algunos de los compuestos se sometieron adicionalmente a un ensayo de indicador de luciferasa para puntuar su capacidad para activar el receptor de ácidos biliares nuclear FXR.

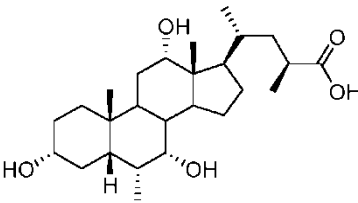
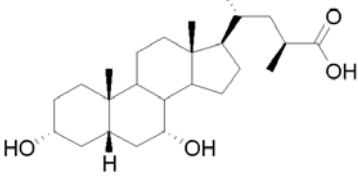
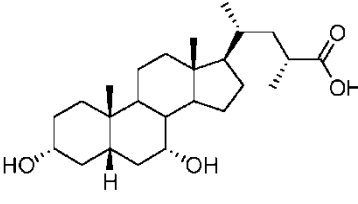
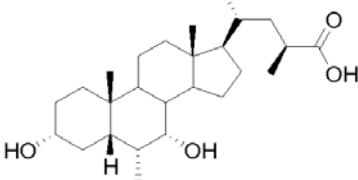
Tabla 2.

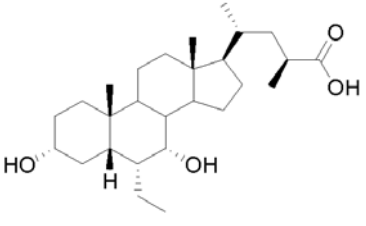
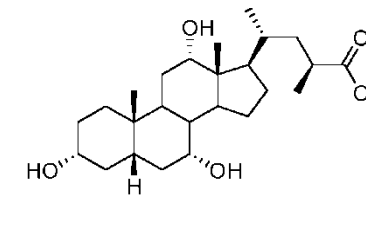
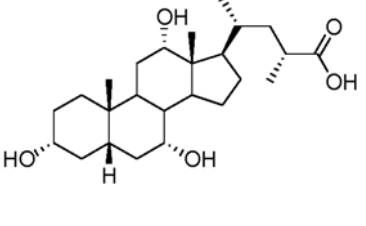
Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	CE ₅₀ de TGR5	Eficacia de TGR5
22S,23S-CCDCA* (I05)	α-OH	-H		1,33	110
22S,23R-CCDCA* (I05)	α-OH	-H		2,91	102

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	CE ₅₀ de TGR5	Eficacia de TGR5
22 <i>R</i> ,23 <i>R</i> -CCDCA* (Iq5)	α-OH	-H		75,7	5
22 <i>R</i> ,23 <i>S</i> -CCDCA* (Ir5)	α-OH	-H		> 100	4

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

Tabla 3. Actividades de TGR5 y FXR^a

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

Nombre	CE ₅₀ de FXR μ M	Eficacia de FXR	CE ₅₀ de TGR5 μ M	Eficacia de TGR5	Proporción de CE ₅₀ (TGR5/ FXR)
 <p>Ib3e</p>	3,97	64,4	0,51	165	0,128
 <p>Ib</p>			4,39	105	
 <p>Ii</p>			> 51,9	75 ^b	

^a Los datos representan valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Los valores para eficacia se expresan como % de actividad con respecto a LCA 10 μ M (TGR5) o 6ECDCA 10 μ M (FXR).
^b Nivel de activación de meseta lo alcanzado; la concentración máxima sometida al ensayo fue 125 μ M para Ib y 100 mM para Ii.

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

5 Plásmidos

El clon MGC:40597 de la Colección Genética de Mamífero del NIH (también denominado pCMVSPORT6/hTGR5 o pTGR5) y pcDNA3.1(+) se obtuvieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). pCRE-Luc y pCMV β se obtuvieron en Clontech (Palo Alto, CA). pCMX-hFXR y pCMX-mRXR α fueron detalles amables del Dr. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center). pEcREx7-Luc fue un presente generoso del Dr. Richard A. Heyman (X-ceptor Therapeutics, CA).

Cultivo celular

15 Las células de ovario de hámster chino (CHO), células NCI-H716, células Hep3B y células COS1 se obtuvieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). El medio de cultivo celular, suelo y suplementos eran de Invitrogen o Sigma-Aldrich. Todas las células CHO se mantuvieron en medio esencial mínimo α (α -MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) (FBS) y aminoácidos no esenciales 100 μ M (NEAA). Las células NCI-H716 Se mantuvieron en suspensión en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10 % (v/v), HEPES 10 mM y piruvato sódico 1 mM. Las células Hep3B se mantuvieron en medio de Eagle suplementado con FBS al 10 % (v/v) y NEAA 100 μ M. Las células COS1 se mantuvieron en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) suplementado con FBS al 10 % (v/v). Todo el medio de cultivo celular se suplementó con 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml

de sulfato de estreptomycin. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, se pasaron cada 2-6 días y se sembraron recién preparadas para cada experimento.

Transfecciones transitorias

Las células CHO se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo, se cultivaron durante 24 h, y a continuación se transfectaron con 150 ng de plásmido de expresión (pCMVSPORT6/hTGR5) de TGR5 humano (h) y 100 ng de plásmido indicador de luciferasa dirigido por elemento sensible a AMPc (CRE) (pCRE-Luc) en cada pocillo usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 6 h de incubación, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) el medio se intercambió por DMEM que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % (p/v). Después de incubación durante otras 18 h, las células se trataron durante 5 h con diferentes concentraciones de cada compuesto en DMEM recién preparado que contenía al BSA 0,1 % (p/v). Después del tratamiento, las células se lisaron con 50 µl de tampón de lisis (Tris-Cl 25 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, ditiotreitól 1 mM (DTT), glicerol al 10 % (v/v) y Triton X-100 al 1 % (v/v)) mediante un ciclo de congelación-descongelación y se sometieron a ensayos de luciferasa como se describe a continuación.

Las células COS1 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en DMEM suplementado con FBS extraído con carbón vegetal al 10 % (v/v), cultivaron durante 24 h, y a continuación se transfectaron con 25 ng de plásmido de expresión de hFXR (pCMX-hFXR), 25 ng de plásmido (pCMX-mRXRa) de expresión del receptor α de X retinoide (RXR α) de ratón (m), 50 ng de plásmido indicador (pEcREX7-Luc) y 50 ng de pCMV β como control interno en cada pocillo, usando el reactivo Lipofectamina 2000. Después de 24 h, las células se lavaron dos veces con PBS y se trataron con diferentes concentraciones de cada compuesto en medio DMEM recién preparado suplementado con FBS extraído con carbón vegetal al 10 % (v/v) durante 24 h. Después del tratamiento, las células se lisaron con 50 µl de tampón de lisis mediante un ciclo de congelación-descongelación y se sometieron a ensayos tanto de luciferasa como de β -galactosidasa como se describe a continuación. Los valores de luciferasa normalizados se determinaron dividiendo la actividad de la luciferasa entre la actividad de la β -galactosidasa.

Ensayos de luciferasa y β -galactosidasa

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

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

Las células CHO se transfectaron con 3,8 µg de plásmido de expresión hTGR5 (pCMVSPORT6/hTGR5), 3,8 µg de plásmido indicador luciferasa dirigido por CRE (pCRE-Luc) y 0,4 µg de plásmido de expresión genética resistente a neomicina [pcDNA3.1(+)] usando Lipofectamina 2000. Los transfectantes se seleccionaron con 400 µg/ml de sulfato de G418 y los clones individuales se cultivaron en placas de 96 pocillos, independientemente. Las líneas de células CHO que expresan TGR5 se identificaron sistemáticamente mediante tratamientos con LCA, seguido por ensayos de luciferasa.

Análisis de producción de AMPc

Las células NCI-H716 Se sembraron en placas de 96 pocillos revestidas 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 6×10^4 células/pocillo en DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml sulfato de estreptomycin, y se cultivaron durante 24 h, lo que permitió la adhesión celular al fondo de la placa. Las células CHO-TGR5 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo en α -MEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), NEAA 100 µM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg de sulfato de estreptomycin, y se cultivaron durante 24 h. Las células se lavaron dos veces con PBS y el medio se intercambió por el medio de ensayo de AMPc [DMEM que contenía BSA al 0,1 % (p/v) y 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)]. Después de incubación durante 30 minutos a 37 °C, las células se trataron con cada compuesto en medio de ensayo de AMPc recién preparado durante 30 minutos. Después del tratamiento con el medio se descartó hoy las cantidades de AMPc se determinaron usando el kit de identificación sistemática de AMPc (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

Los ensayos eran por triplicado o por cuadruplicado para cada condición. Los valores de CE₅₀ se determinaron mediante análisis por el método de próbit. La eficacia se determinó calculando los porcentajes del valor de LCA 10 µM

para el estudio de agonista de TGR5 y 6 α -Et-CDCA 10 μ M para el estudio de agonista de FXR, respectivamente. Después de restar el valor promedio de la condición basal (tratado con vehículo), los valores se aplicaron a determinaciones de CE₅₀ y/o determinaciones de eficacia. El cálculo de la CE₅₀ promedio y la comparación de la CE₅₀ entre diferentes compuestos se realizaron después de transformación logarítmica.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ensayo de t de Student y un valor de p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 3A.

		Ensayo de Alphascreen	FRET (AMPc) NCI-H716	Transactivación en el Ensayo	FRET-AMPc en células Hek293 que sobreexpresan TGR5
Compuesto (Patrón de Referencia)		hFXR (CDCA = 1020 μ M) CE ₅₀ (μ M)	hTGR5 (LCA = 48 μ M) CE ₅₀ (μ M)	hTGR5 (LCA = 16 μ M) CE ₅₀ (μ M)	hTGR5 (LCA = 0,35 μ M) CE ₅₀ (μ M)
1h3e		175	0,9	1,7	0,001

Los datos en la Tabla 3A se generaron usando los métodos que se describen a continuación.

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

El ensayo de unión a receptor se realizó midiendo el nivel de AMP cíclico (AMPc) usando el ensayo de FRET. Las líneas de células intestinales humanas (NCI-H716) se sembraron en placas de 96 pocillos revestidas 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 x10³ células/pocillo en DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomocina, y se cultivaron durante 24 h, lo que permitió la adhesión celular al fondo de la placa. Las células se lavaron dos veces con PBS y el medio se intercambió por medio de ensayo de AMPc [OPTIMEM que contenía BSA al 0,1 % (p/v) e 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX)]. Después de incubación durante 60 minutos a 37 °C, las células se trataron con concentraciones crecientes del compuesto 1h3 en tampón de estimulación (HEPES 5 mM, BSA al 0,1 % en HBSS a pH 7,4) que contenía el quelato de europio - Estreptavidina Y el anticuerpo anti-AMPc conjugado con ALEXA Fluor 647 (PerkinElmer) durante 1 hora a temperatura ambiente. El nivel de AMPc intracelular se determinó con el kit Lance (PerkinElmer). Como ligando de control se usó ácido litocólico. El factor Z' se usó para validar los ensayos. Las curvas de regresión no lineal, sin limitaciones, se realizaron usando una ecuación de cuatro parámetros y el Software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE₅₀.

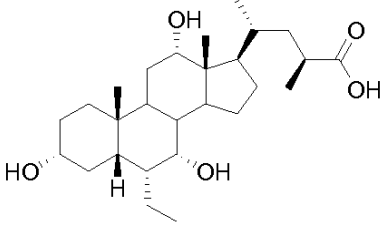
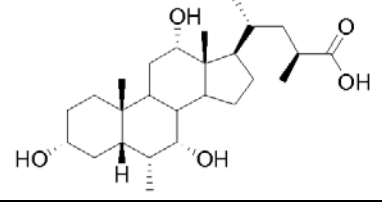
Ensayo de Alphascreen

La actividad sobre FXR se evaluó usando la tecnología Alphascreen technology en un ensayo coactivador de reclutamiento. AlphaScreen es un ensayo químico basado en perlas usado para estudiar interacciones biomoleculares. La unión de moléculas capturadas sobre las perlas conduce a una transferencia de energía de una perla a la otra, produciendo por último una señal luminiscente. Cuando los asociados interactúan, la energía química se transfiere de perlas Dadoras a Aceptoras y se produce una señal. Después de la estimulación de los ácidos biliares, el GST-FXR-LBD interactúa con el péptido Src-1. Las perlas Aceptoras revestidas con anti-GST se usaron para capturar el FXR-LBD de fusión de the GST mientras que el péptido SRC-1 biotinilado se capturó con las perlas Dadoras de estreptavidina. Después de iluminación a 680 nm la energía química se transfiere de las perlas Dadoras a Aceptoras a través del complejo de estreptavidina-Dador/Src-1-Biotina/GSTFXR-LBD/Anti-GST-Aceptor y se produce una señal. El ensayo se realizó en Optiplates (PerkinElmer) de 384 pocillos, de bajo volumen, de color blanco usando un volumen final de 25 μ l que contenía concentraciones finales de 10 nM de proteína FXR-LBD etiquetada con GST purificada, péptido Src-1 biotinilado 30 nM, 20 μ g/ml de perlas aceptoras anti-GST y 10 μ g/ml de perla dadora de estreptavidina (PerkinElmer). El campo de ensayo contenía Tris 50 mM (pH 7,4), KCl 50 mM, BSA al 0,1 %, y DTT 1 mM. Los tiempos de estimulación con 1 μ l de ligandos (son utilizados en DMSO al 100 %) se fijaron durante 30' a temperatura ambiente. La concentración de DMSO en cada pocillo se mantuvo a una concentración final de un 4 %. Después de la adición de la mezcla de detección (perlas aceptoras y dadoras) las placas se incubaron en la oscuridad durante 4 h a temperatura ambiente y a continuación se leyeron en un lector de microplacas Envision (PerkinElmer). Las curvas de respuesta a la dosis se realizaron por triplicado y el factor Z' se usó para validar los ensayos. Las curvas de regresión no lineal, sin limitaciones, se realizaron usando una ecuación de cuatro parámetros y el Software GraphPad Prism (GraphPad Inc.), para obtener los valores de CE₅₀.

Cultivo Celular, Transfección y ensayo de Luciferasa

Las células HEPG2 y HEK293T se cultivaron en E-MEM y DMEM respectivamente, ya fuera suplementado con penicilina al 1 %/estreptomicina, L-glutamina al 1 % y suero bovino fetal al 10 %. (alto contenido de glucosa) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Todas las tranfecciones se prepararon usando el reactivo de Transfección Fugene HD (μl) con respecto a ADN (μg) a 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/pocillo, respectivamente. Las tranfecciones transitorias se realizaron usando 100 ng de vector indicador pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega), 40 ng de pGL4.74 (Renilla), como control interno para eficacia de tranfección, y 10 ng de plásmido de expresión pCMV-SPORT6-hTGR5. Clon MGC:40597 de la Colección Genética de Mamífero del NIH (Invitrogen). El vector pGEM se añadió para normalizar las cantidades de ADN transfectado en cada ensayo (2 μg). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se estimularon con concentraciones crecientes del compuesto lh3e durante 18 h. Los cultivos de control recibieron solamente vehículo (DMSO al 0,1 %). A continuación las células se lisaron mediante adición de 75 μl de Reactivo de Luciferasa Dual-Glo (Promega) a 75 μl de medio que contenía células/pocillo. La actividad de luciferasa de renilla se midió mediante la adición de un volumen de reactivo Dual-Glo Stop & Glo y medio de cultivo original. Las actividades de luciferasa se expresaron como proporción entre unidad de luciferasa y unidad de luciferasa de renilla. Cada punto de datos es el promedio de ensayos por triplicado. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

Tabla 3A. Comparación directa del ácido 23-metil cólico sustituido con 6-etilo con respecto a 6-metilo

Cmp N.º	Patrón de Referencia LCA (4,5 ±2,4 μM) CA (69 ±24 μM)	Exp de TGR5 I (CE ₅₀ = μM)	Exp de TGR5 II (CE ₅₀ = μM)	Exp de FXRI (CE ₅₀ = μM)	Exp de FXR II (CE ₅₀ = μM)
lh3e		0,8	1,1	53	23
lh3		1,7	3	10	7,8
* Los resultados que se muestran en la Tabla 3A se generaron usando los procedimientos que se han descrito anteriormente de forma directa.					

Los compuestos que tienen un grupo alfa-etilo en la posición C-6 en el anillo del ácido biliar son referentes. De forma más específica, los compuestos que tienen un grupo alfa etilo en la posición C-6 del ácido 23-metil cólico son los más preferentes. Como se muestra en la Tabla 3A mencionada anteriormente, los compuestos que tienen un grupo alfa-etilo en la posición C-6 son de forma sorprendente e inesperada más potentes que el correspondiente derivado de alfa-metilo en C-6.

EJEMPLO 9: Actividades metabólicas del ácido oleanólico y del ácido 6-Etil, 23-Metil-cólico (lh3e) en un modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta

El objetivo del estudio es definir si los agonistas de TGR5 (ácido oleanólico (OA) o ácido 6 etil, 23-metil cólico (lh3e) corrigen el desarrollo de la obesidad y la resistencia a insulina asociada *in vivo*. Para someter ensayo esta posibilidad, se administraron OA/ lh3e a través de la administración mediante alimento durante 16 semanas a ratones C57BL6J macho que previamente se habían sometido durante 10 semanas a una dieta con alto contenido de grasa.

II- Protocolo

En un estudio previo, se observó que OA era un agonista de TGR5 selectivo que no producía adhesión al alimento. Sin embargo, los animales tratados con una dosis de 100 mg/kg/día de OA presentaban algunos signos de toxicidad, mientras que una dosis más baja se toleraba bien. Por lo tanto, en este estudio el OA se administró a la dosis de 50 mg/kg/día.

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

5 Para este estudio, 48 ratones C57BL6J macho (5 semanas de edad) se dividieron en dos grupos: un grupo de 24 (grupos 1, 2 y 3) animales recibieron dieta con pienso mientras que el otro 24 recibió una dieta con alto contenido de grasa durante un periodo de 10 semanas (grupos 4, 5 y 6). A continuación los animales se analizaron durante un periodo de 16 semanas. Como sigue a continuación se asignaron cinco grupos de 10 animales:

- 10 1: dieta con pienso
 2: dieta con pienso + OA 50 mg/kg/día
 3: dieta con pienso + 6Et23MeCA (lh3e) 30 mg/kg/día
 4: dieta con alto contenido de grasa
 5: dieta con alto contenido de grasa + OA 50 mg/kg/día
 15 6: dieta con alto contenido de grasa + 6Et23MeCA (lh3e) 30 mg/kg/día

Durante todo el estudio, el peso corporal y la ingesta de alimentos controló dos veces semanalmente.

20 Semana 2: La composición corporal se analizó, para todos los grupos, mediante absorciometría de rayos X de energía dual (dexascan).

Semana 1: Los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina se midieron en todos los grupos después de un periodo en ayunas de 12 h y los ratones se pusieron a continuación con las dietas como se ha indicado (Día 0).

25 Semana 2: Los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina se midieron en todos los grupos después de un periodo en ayunas de 12 h (Día 14).

Semana 4: La tolerancia a la glucosa se determinó sometiendo todos los animales a un ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT). Los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 h para este ensayo. El consumo de energía nocturna de los grupos 1, 4, 5 y 6 (dieta con pienso, dieta con alto contenido de grasa y dieta con alto contenido de grasa OA / 6Et23MeCDCA (lh3e) se midió mediante calorimetría indirecta.

30 Semana 8: La composición del peso corporal se analizó de nuevo mediante dexascan para todos los grupos. Los niveles en suero de transaminasas, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C e insulina se midieron en todos los grupos después de un periodo de ayunas de 12 h (Día 56).

Semana 9: La actividad circadiana de los grupos 4, 5 y 6 (ratones alimentados con dieta con alto contenido de grasa) se estudió durante un periodo de 30 h.

35 Semana 10: En los grupos 4, 5 y 6 se realizó la medición de presión sanguínea y ritmo cardiaco s.

Semana 11: La temperatura rectal de todos los animales se inició a temperatura ambiente a las 10:00 am.

La medición de la actividad circadiana se realizó en los grupos 1, 2, 3 y 4.

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

40 En todos los grupos se recogieron heces durante un periodo de tiempo de 24 h y el contenido de líquidos fecales se midió.

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

45 Tres días más tarde, los animales se sacrificaron. El momento del sacrificio, la sangre se extrajo y se analizó para: lípidos en plasma (TC, TG, HDL-C, FFAs); funciones hepáticas (ALAT, ASAT, Pasa alcalina, γ-GT); glucosa e insulina; perfiles de lipoproteína de grupos seleccionados de plasma (cromatografía por exclusión de tamaño).

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

III - Procedimientos detallados

60 A - Procedimiento en animal y dietas

Alojamiento y manipulación de animales

65 Los ratones se alojaron en grupo (5 animales / jaula) en condiciones sin patógenos específicas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h (encendido a las 7:00), en un vivario con temperatura (20-22 °C) y humedad controladas, de acuerdo con las especificaciones de la Comunidad Europea. Los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento.

Agua potable

5 La composición química del agua potable se analizó regularmente para verificar la ausencia de sustancias tóxicas potenciales en el Instituto de Hidrología, ULP, Estrasburgo. El agua potable se trató con HCl y HClO₄ para mantener el pH entre 5 y 5,5 y la concentración de cloro entre 5 y 6 ppm.

Dieta

10 La dieta con pienso para proveedores convencional se obtuvo en UAR y la dieta con alto contenido de grasa se obtuvo en Research Diet. Los ratones se alimentaron, con dieta con pienso (proteína al 16 %, grasa al 3 %, fibra al 5 %, ceniza al 5 %) o con dieta con alto contenido de grasa (proteína al 20 %, carbohidratos al 20 %, grasa al 60 %). El ácido oleanólico y 6Et23MeCDCA (1h3e) se mezclaron con dieta con pienso en polvo o dieta con alto contenido de grasa en polvo en las siguientes proporciones: 0,5 g de OA/kg de alimento para el tratamiento con 50 mg/kg/día y 0,08 g de 6Et23MeCA (1h3e) /kg de alimento para el tratamiento con 10 mg/kg/día. A continuación los gránulos se reconstituyeron. Los grupos de control recibieron gránulos de alimento tal como los proporciona la compañía. Debido a la consistencia de la dieta con alto contenido de grasa, no se añadió agua en la mezcla con OA. En el caso de la dieta con pienso, que es más difícil de reconstituir, se añadió una cantidad mínima de agua al polvo para reconstituir los gránulos, que a continuación se secaron al aire. Semanalmente se preparaban nuevos lotes de alimento.

Extracción de sangre

La sangre se extrajo del seno retro-orbital con anestesia o de la vena de la cola.

Anestesia

25 Para el experimento de barrido dexa, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (200 mg/kg) / Xilasina (10 mg/kg) administrada mediante inyección intraperitoneal.

30 Para la punción en la vena, los animales se anestesiaron mediante inhalación de una mezcla de isoflurano-O₂.

B - Bioquímica

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

Análisis de lípidos y lipoproteínas

40 Los triglicéridos en suero, colesterol total y HDL se determinaron mediante ensayos enzimáticos. El contenido de colesterol HDL en suero se determinó después de precipitación de lipoproteínas que contenían apo B con ácido fosfotúngstico/Mg (por ejemplo, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El nivel de ácido graso libre se determinó con un kit de Wako (por ejemplo, Neuss, Alemania) tal como lo especifica el proveedor.

Exploración metabólica y endocrina

45 La concentración de glucosa en sangre se midió con un analizador Precision Q.I.D (por ejemplo, sistema Medisense), usando electrodos Medisense Precis (por ejemplo, Abbot Laboratories, Medisense products, Bedford, USA). Este método se validó, por comparación de los valores del analizador Precision Q.I.D con mediciones de glucosa clásicas. El método de Precision Q.I.D se eligió ya que requiere una cantidad mínima de sangre y por lo tanto se puede usar para múltiples mediciones tal como durante un IPGTT. La insulina en plasma (por ejemplo, Mercodia, Uppsala, Suecia) se determinó mediante ELISA de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

*C - Ensayo metabólico**Perfiles de lipoproteína*

55 Los perfiles de lipoproteína se obtuvieron mediante cromatografía líquida de proteína rápida, que permite la separación de las clases principales de lipoproteínas, VLDL, LDL, y HDL.

Ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) – Ensayo de tolerancia a glucosa oral

60 El IPGTT se realizó en ratones que se mantuvieron en ayunas durante una noche (12 h). A los ratones se les inyectó 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. La sangre se extrajo de la arena de la cola para el control de la glucosa y la 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 calculó como una medida de la sensibilidad a la insulina, mientras que los correspondientes niveles de insulina indican reservas secretoras de insulina.

Consumo de energía

El consumo de energía se evaluó a través de calorimetría indirecta mediante la medición del consumo de oxígeno con el aparato Oxymax (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 clase (un ratón por jaula). Se permitió que los animales tuvieran libre acceso a agua y alimento. Un sensor de CO₂ y O₂ muy preciso midió la diferencia de las concentraciones de O₂ y CO₂ en ambos volúmenes de aire, lo que proporciona la cantidad de oxígeno consumido en un periodo de tiempo dado que el flujo de aire del aire que entra en la jaula era constante. Los datos que provienen Del aparato se procesaron en un ordenador conectado, se analizaron, y se mostraron en un archivo de Excel exportable. Los valores se expresaron como ml.kg⁻¹.h⁻¹, que normalmente se conoce como VO₂.

Determinación del contenido de grasa corporal mediante barrido Dexa

Los análisis Dexa se realizaron con el Densitómetro de resolución de ultra elevada de la Serie PIXIMUS (píxeles de 0,18 x 0,18 mm, GE Medical Systems, Madison, WI, USA). La densidad de mineral ósea (BMD en g/cm²) Las la composición corporal se determinaron usando el software PIXIMUS (versión 1.4x, GE Medical Systems).

D - Medición no invasiva de la presión sanguínea y pulso

El sistema de análisis de presión sanguínea Visitech BP-2000 es un sistema de banda en la cola automatizado por ordenador que se usa para tomar múltiples mediciones en 4 ratones despiertos de forma simultánea sin intervención de operador. Los ratones estaban contenidos en cámaras oscuras individuales en una plataforma caliente con sus colas enroscadas a través de una banda en la cola. El sistema mide la presión sanguínea determinando la presión de la banda a la que se eliminaba el flujo de sangre a la cola. Un sensor fotoeléctrico detecta el pulso de la muestra de ensayo. El sistema genera resultados que se ha mostrado que se corresponden muy de cerca con la presión intra-arterial media medida de forma simultánea en la arteria carótida. Esto permite valores reproducibles de la presión sanguínea sistólica y del ritmo del latido cardiaco a obtener. Esto necesitaba el entrenamiento de los animales durante una semana en el sistema.

E - Actividad circadiana

La actividad locomotora espontánea se midió usando cajas individuales, cada una formada por un suelo deslizante, una jaula desmontable, y equipado con captadores de infrarrojos que permiten la medición de la actividad locomotora ambulatoria y las patas traseras. Las cajas estaban unidas a un ordenador con una interfaz electrónica (por ejemplo, Imetronic, Pessac, Francia). Los ratones se sometieron a ensayo durante 32 horas para medir la habituación al aparato así como las actividades diurnas y nocturnas. La cantidad de agua consumida se midió durante el periodo de ensayo usando un licómetro automatizado

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 1-9. La Figura 1 muestra el impacto del compuesto lh3e en el aumento de peso en ratones alimentados con pienso y con alto contenido de grasa. El aumento de peso corporal se midió durante 16 semanas. Los ratones alimentados con la dieta de alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e presentaban menos aumento de peso que los ratones alimentados con la dieta con un alto contenido de grasa tratados con vehículo. La Figura 2 muestra que el compuesto lh3e mejora el perfil metabólico de los ratones alimentados con alto contenido de grasa. Los resultados del análisis de plasma en sangre y de ritmo cardiaco en ratones obesos inducidos por la dieta tratados con el compuesto lh3e se muestra en la Figura 2, incluyendo niveles de glucosa en sangre, enzimas hepáticas (LDH, ASAT, y ALAT) y lípidos en plasma (colesterol total, HDL-col, LDL-col, y triglicéridos). Los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e presentaban glucosa en sangre, enzimas hepáticas, y lípidos en plasma más bajos que los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con vehículo. El ritmo cardiaco de los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e también era un ritmo cardiaco más bajo en comparación con Los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con vehículo. La Figura 3 muestra que el compuesto lh3e aumenta la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con alto contenido de grasa. Después de 10 semanas, los niveles de insulina en plasma aumentaron en los ratones tanto alimentados con pienso como en los alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e en comparación con los ratones tratados con vehículo como se muestra en la Figura 3A. Después de 12 semanas, se mostró que los niveles de glucosa eran menores en los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e como se muestra en la Figura 3B. La Figura 4 muestra los resultados del ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT) como niveles de glucosa durante un periodo de 200 min en ratones alimentados con dieta con pienso tratados con el compuesto lh3e. La Figura 5 (graphs A-D) muestra la liberación de insulina *in vivo* después de una comida de ensayo. La Figura 5A muestra la liberación de insulina durante 30 min. La Figura 5B muestra el número de veces de aumento de liberación de insulina en comparación con el nivel de insulina basal. Los niveles de insulina tenían máximos a niveles más elevados a ~12 minutos en los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e en comparación con ratones tratados con vehículo. Las Figuras 5C y 5D muestran el número de veces de aumento de liberación de insulina en comparación con los niveles de insulina basal. El número de veces de aumento en los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e era mayor tanto a los 15, los 30 min de puntos temporales como se muestra en la Figura 5D. Las Figuras 6 (gráficos A-D) y 7 (gráficos A-C) muestran que los ratones tratados con el compuesto lh3e

5 tienen un aumento de la proporción de intercambio respiratorio (RER) después de HFD (dieta con alto contenido de grasa) que se puede explicar como relacionado con su aumento de la sensibilidad a la insulina que mantiene su capacidad para oxidar glucosa. La Figura 8 (gráficos A Y B) muestra la actividad locomotora y la ingesta de alimento/agua de ratones alimentados con alto contenido de grasa y alimentados con pienso en comparación con los tratados con vehículo. La ingesta de alimento/agua para ratones alimentados con una dieta con alto contenido de grasa y tratados con el compuesto lh3e presentaba un ligero aumento en la ingesta con respecto a los ratones tratados con vehículo. La Figura 9 (gráficos A-C) muestra cambios en el peso de los órganos. Las Figuras 9B y 9C muestran el porcentaje de cambio del peso corporal, hígado, riñón, corazón, , peri WAT, epi WAT, Sc WAT, y BAT en comparación con el peso en ratones alimentados con una dieta con pienso. En todos los órganos, los ratones alimentados con alto contenido de grasa tratados con el compuesto lh3e presentaban una reducción del porcentaje de cambio.

EJEMPLO 10: Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad en agua

15 Los BA sólidos (en forma protonada para el compuesto lh3e) se suspendieron en 5 ml de 0,1 M HCl. Las soluciones saturadas, después de incubación durante 1 semana, se filtraron en un filtro Millipore (0,22 μm) y la concentración de BA se midió mediante HPLC-ESI-MS/MS usando una columna C18 (150 mm x 2 mm de d.i., 4 μm) y frases móviles de agua que contenían ácido acético 15 mM a pH 5 y acetonitrilo. El caudal era de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. 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 $\mu\text{mol}/\text{litr}$.

20 La solubilidad en agua del compuesto lh3e es 99 μM un valor más elevado que el correspondiente al dihidroxi BA y comparable con el del CA (véase la Tabla 4).

25

Tabla 4.

Ácido Biliar	Sa ^(a) (μM)	CMC ^(b) Na ⁺ 0,15 M (mM)	TS _{CMC} ^(c) $\mu\text{N}/\text{cm}$	LogP _A ^(d)	Unión a albúmina ^(e) (%)
CDCA	32	3,2	455	2,2	93
UDCA	7,5	6,0	505	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*
lh3e	99	1,4	501	1,4	62

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

^b CMC: Concentración Micelar Crítica determinada en solución acuosa de NaCl 0,15 M.

^c TS_{CMC}: Tensión Superficial en CMC en solución acuosa de NaCl 0,15 M.

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

*: valores de la bibliografía.

30 La presencia de un grupo 23-metilo en el compuesto lh3e no compromete la solubilidad en agua. El Compuesto lh3e presenta un valor de solubilidad en el intervalo del que tiene el BA de origen natural y análogos sintéticos estudiados previamente. Además, dada la unión a albúmina relativamente buena del compuesto lh3e, la circulación del compuesto lh3e en la sangre se puede facilitar, favoreciendo de ese modo la diana sistémica de TGR5 en tejidos periféricos tales como músculo y tejido adiposo marrón. Los Ejemplos 9, 16 y 17 apoyan adicionalmente esta hipótesis.

Concentración Micelar Crítica (CMC)

35

La capacidad detergente, 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 con mediciones de tensión superficial (ST) usando un método de burbujeo-presión máximos que proporciona los valores de tensión superficial ligeramente influidos por las impurezas potenciales ya que son métodos estáticos. El tensiómetro era un Sensadyne 6000 (Chem-Dyne Research Corp., Milwaukee, WI) equipado con dos sondas de vidrio de diámetros de 0,5 y 4,0 mm conectadas a una fuente de nitrógeno. La frecuencia del burbujeo era

40

de 1 burbuja/segundo en agua destilada a 26 °C ($P = 273,6$ kPa) y la calibración se realizó con agua bidestilada y metanol. La tensión superficial de las soluciones de sales sódicas de BA en NaCl 0,15 M se midió a diversas concentraciones dentro del intervalo de 0,13-50 mM. Los valores de la tensión superficial se representaron con respecto al logaritmo de la concentración de sales biliares; las líneas de regresión que corresponden 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 tomó como el valor de CMC. A partir de las curvas de ST con respecto a la concentración, el valor de la tensión superficial en la CMC (equilibrio entre especies de monómeros y multímeros) también se calculó proporcionan información sobre el poder detergente que se relaciona con el tamaño de las micelas con capacidad de reducción de la tensión superficial asociada.

La CMC se evaluó mediante mediciones de tensión superficial en condiciones del equilibrio, es decir, en condiciones en las que las impurezas influyen ligeramente en los resultados de la tensión superficial (Fig. 10). El compuesto lh3e presenta una CMC baja pero una capacidad detergente y capacidad de reducción de la tensión superficial moderadas como se muestra mediante los valores de tensión superficial en la CMC (capacidad detergente baja significa baja toxicidad para membranas o células).

Coefficiente de reparto de octanol/agua

Dado que el sulfato y los análogos sulfonados siempre están ionizados a todos los valores de pH, el coeficiente de reparto de octanol/agua se midió para todas las moléculas en forma ionizada y por lo tanto los análogos de carboxi se estudiaron a pH elevado. El coeficiente de reparto de 1-octanol/agua ($\log P$) se evaluó usando un procedimiento de matraz de agitación convencional. Los experimentos se realizaron en solución de sales biliares 0,1 mM tamponada a pH 8 con tampón fosfato 0,1 M para asegurar una completa ionización del BA; los valores del $\log P$ 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 pre-saturó previamente con 1-octanol, y a continuación se añadieron 5 ml de 1-octanol pre-saturado con agua y se dejó que las muestras se liberarán durante 2 semanas en agitación continua a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, las dos fases se separaron con cuidado. La concentración del BA en la fase acuosa se midió con HPLC-ESI-MS/MS usando una columna C18 (150 mm x 2 mm de d.i., 4 μ m) y, como fases móviles, agua que contenía ácido acético 15 mM a pH 5 y acetonitrilo. El caudal era 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 de ESI en ionización negativa.

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

Unión a albúmina

El alcance de la unión a albúmina se evaluó mediante diálisis en equilibrio a una proporción fija de BA-albúmina. El BA se disolvió a una concentración de 100 μ M en albúmina de suero bovino al 5 %-solución salina (pH 7,2) y se dejó reposar durante 24 h a 25 °C. Dos ml de esta solución se dializaron en bolsas de celulosa que tenían un límite de separación de peso molecular de 12-14.000 con respecto a 25 ml de solución salina. El sistema se equilibró mediante agitación mecánica suave durante 72 h a 25 °C. Las concentraciones de BA de la solución dializada (que corresponde a la fracción sin unir 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 informan en la Tabla 4.

El porcentaje de unión a albúmina del compuesto lh3e es ligeramente más elevado que el CA y esto se obtiene a partir de la presencia de los grupos 23 metilo y 6 etilo.

EJEMPLO 11: Estabilidad metabólica *in vitro* en cultivo de heces humanas

Estabilidad con respecto a Bacterias Intestinales.

Ejemplo 11a: 7 α -deshidroxilación

Las heces humanas recién obtenidas homogeneizadas (500 mg) se transfirieron a viales estériles a los que se añadieron 5 ml de medio esterilizado de glucosa con carne troceada (Scott Lab., Fiskville, RI). A continuación se añadió el BA a una concentración final de 0,05 mM. Los viales se incubaron a 37 °C; a continuación, a 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 rpm durante 10 min; a partir del sobrenadante, los BA se aislaron mediante extracción en fase sólida en columna C-18 y se analizaron mediante TLC y HPLC-ES-MS/MS.

Como primer ensayo de identificación sistemática se usó cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas con un grosor de 0,25 mm de gel de sílice (Merck, Darmstat, Alemania). El sistema de disolventes usados para la separación del BA conjugado estaba formado por ácido propiónico/acetato de isoamilo/agua/N-propanol (3:4:1:2, v/v/v/v; disolvente I), y el del BA no conjugado era ácido acético/tetracloruro de carbono/éter isopropílico/acetato de isoamilo/agua/N-propanol/benceno (1:4:6:8:2:2, v/v/v/v/v/v; disolvente II). Los BA separados se revelaron con una solución de etanol y ácido fosfomolibdico al 5 %.

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

Después de un largo periodo de incubación para lh3e, la 7-deshidroxilación y la formación del compuesto intermedio de un derivado 7-oxo estaban prácticamente anuladas.

Ejemplo 11b

Se sabe que las bacterias intestinales hidrolizan el enlace amida en C24 de los BA conjugados con taurina y glicina y eliminan el grupo 7 α -hidroxilo de CA, lo que conduce a la formación de los BA secundarios lipófilos tóxicos tales como ácido desoxicólico (DCA) (Ridlon, J.M., et ál., J. Lipid Res. 2006, 47, 241-259). Para determinar la sensibilidad del compuesto lh3e a la 7-deshidroxilación mediada por la flora intestinal, su estabilidad metabólica se evaluó en caldo de cultivo de heces humanas como se describe en Roda, A., et ál., J. Lipid Res. 1994, 35, 2268-2279. Parece que el compuesto lh3e no es sensible a este proceso se mostró que era altamente estable con más de un 95 % del compuesto no modificado después de 12 h de incubación. Mediante comparación, más de un 50 % de CA (ácido cólico) se metabolizaba después de 1 h y hasta un 90 % en 8 h (Figura 15). Es probable que la estabilidad prolongada del compuesto lh3e esté relacionada con la alquilación de la posición C6 que proporciona impedimento estérico al proceso de 7 α -deshidroxilación bacteriana.

Estabilidad de la cadena lateral

De acuerdo con estos resultados, la cadena lateral del compuesto lh3e no era modificada por las actividades enzimática es de las bacterias intestinales.

Estos datos sugieren que la presencia del grupo etilo en la posición C-6 protege al grupo 7-hidroxilo con respecto a la oxidación o retirada mediante impedimento estérico. Además el compuesto lh3e también es muy estable para metabolismo de la cadena lateral. No se encontraron metabolitos secundarios mediante HPLC-ES-MS/MS. Estos datos sugieren que en el contenido del intestino delgado en presencia de bacterias anaerobias estos análogos son estables.

EJEMPLO 12: Secreción y metabolismo biliar del compuesto lh3e en rata con fístula biliar después de administración duodenal (id) y femoral (iv)

Ejemplo 12A: Objeto y Justificación

Las modificaciones estructurales de los ácidos biliares podrían influir en su absorción hepática, transportes hepáticos y secreción y absorción intestinal. Por lo tanto, el conocimiento de la secreción biliar después de administración tanto iv como id junto con su metabolismo es un punto fundamental en la selección del compuesto para estudios adicionales.

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

Las diferencias en el área bajo la curva de la secreción biliar con respecto al tiempo entre la administración iv e id representan su absorción intestinal y proporcione información sobre su biodisponibilidad. Además, el metabolismo hepático e intestinal también podría ser bastante diferente y por lo tanto, se determinó la secreción biliar del compuesto lh3e y sus metabolitos hepáticos principales.

Efecto Colerético

- Infusión duodenal

El modelo de rata con fístula biliar se desarrolló en las instalaciones del Lab de la Universidad de Bolonia. El compuesto lh3e se administró una dosis de 1 μ mol/kg/min (1 hora de infusión) a un grupo de ratas a través de infusión duodenal (id). Las ratas presentaban una fístula biliar para recoger muestras de bilis en diferentes momentos antes, durante, y después de la infusión. Para el experimento de infusión duodenal se trataron 6 ratas (250 \pm 10 g). Las

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

5 La infusión duodenal del compuesto lh3e aumentaba de forma significativa el flujo biliar que alcanzaba el valor máximo de aproximadamente 120 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$. Este fenómeno comenzó durante el periodo de infusión y continuó durante al menos 3 horas.

10 El Compuesto lh3e presentaba un efecto colerético potente y se cree que esto está relacionado con su estructura; un grupo metilo en la posición C-23 evita parcialmente la conjugación y esta molécula puede experimentar una ruta de desviación colehepática. Para comparación, la infusión duodenal de CDCA aumentaba de forma significativa el flujo biliar, que no superaba 80 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$.

- Infusión intravenosa

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

20 La infusión iv del compuesto lh3e aumentaba de forma significativa el flujo biliar y el fenómeno comenzó 15 minutos después de comenzar el periodo de infusión y continuó durante al menos dos horas. El efecto colerético era bastante similar al conseguido en el experimento de infusión id.

25 *Secreción biliar*

Las muestras de bilis recogidas durante los experimentos iv e id se analizan para determinar la secreción biliar del compuesto lh3e y sus metabolitos.

30 *Análisis de HPLC-ES-MS/MS*

35 El polvo cristalino puro del compuesto lh3e se obtuvo a partir del laboratorio de R. Pellicciari de Perugia. Se prepararon soluciones de reserva en metanol a 1 mmol/l y las soluciones de trabajo se prepararon por dilución de volúmenes apropiados de la solución primaria. El metanol y el acetonitrilo tenían una pureza de calidad para HPLC. El amoníaco era al 30 % y el ácido acético era al 99,8 %. Todos los reactivos se obtuvieron en Carlo Erba Reagents. El agua de calidad para HPLC se preparó con un sistema Milli-Q.

40 *Preparación de la muestra*

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

45 *Método de HPLC-ESI-MS/MS*

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

50 Para la cromatografía líquida, se usó un módulo de separación Alliance 2695 acoplado con automuestreador. El automuestreador se mantuvo a 7 °C. La separación se realizó en una columna Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 x 2,0 mm de d.i., 4 μm de tamaño de partícula), protegida con una columna previa de SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm de d.i., ambas suministradas por Phenomenex. El analito se eluyó usando tampón de acetato amónico 15 mM (pH = 5,00) como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. La fase móvil B aumentó de un 30 % a un 64 % en 10 min, a continuación hasta un 100 % en 10 min, y se mantuvo constante durante 10 min. El caudal era de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la columna se mantuvo a 45 °C. El afluente de la columna se introdujo en la fuente de ESI conectada a un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple (Quattro-LC, Micromass) funcionando en modo de adquisición para Control de Reacción Múltiple (MRM). Como gas nebulizador se usó nitrógeno a un caudal de 100 l/h y como gas de desolvatación a 930 l/h. Las temperaturas de la fuente de bloqueo iónico y de desolvatación se establecieron respectivamente en 80 °C y 180 °C. El voltaje del capilar era 3,0 kV. Para adquisición y procesamiento de datos se usó la versión 4.0 del software MassLynx. Además, usando espectrometría de masas en configuraciones tanto de MS individual como en MS/MS en tándem se realizaron experimentos de configuración para identificar metabolitos.

Cuantificación

5 Una curva de calibración de 5 puntos se preparó diariamente y se inyectó por duplicado. Las muestras de calibración se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 20 µmol/l preparadas en la fase móvil. Los parámetros de la curva de calibración lineal se obtuvieron a partir de la representación del área máxima del analito con respecto a la concentración de analito usando un análisis de regresión de mínimos cuadrados (peso = 1/x²). Los coeficientes de correlación fueron ≥ 0,981.

10 También se calcularon los metabolitos del compuesto lh3e conjugados con taurina. Los factores de corrección, para tener en cuenta las diferentes respuestas en ES-MS/MS entre especies libres y conjugados con taurina, se calcularon y se aplicaron a los valores del área obtenidos a partir de los cromatogramas de conjuntos de datos de HPLC-MRM. Por último, las curvas de calibración obtenidas para los ácidos biliares libres se usaron para calcular los metabolitos conjugados con taurina.

15 **Farmacocinética (secreción biliar) de los análogos administrados: comparación de iv con respecto a id**

Los datos hacen referencia a la tasa de secreción del compuesto recuperado en bilis como tal después de fusión duodenal y femoral a una dosis de 1 µmol/Kg/min.

20 La Tabla 5 muestra valores de concentración y secreción para el compuesto lh3e obtenidos a partir de las muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 h que varía de 75 a 135 min).

Tabla 5. Valores de concentración y secreción del compuesto lh3e obtenidos a partir de las muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 hora que varía de 75 a 135 minutos)

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

25 La Tabla 6 muestra valores de concentración y secreción obtenidos a partir de muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión femoral (1 h que varía de 75 a 135 min).

30 Tabla 6. Valores de concentración y secreción del compuesto lh3e obtenidos a partir de muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión femoral (1 hora que varía de 75 a 135 minutos)

Tiempo (min)	lh3e (n = 5)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción (µmol/kg/min)
75	n.d.	- ^a
90	1,9	0,1
120	3,1	0,23
150	3,4	0,31
180	2,3	0,2
210	1,06	0,105
240	0,55	0,049
270	0,27	0,018
^a :- no calculado		

Tabla 6A. Valores de concentración y secreción de tauro-lh3e calculados a partir de muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión duodenal (1 hora que varía de 75 a 135 minutos)

Tiempo (min)	lh3e (n = 4)	
	Conc. (mmol/l)	Secreción (µmol/kg/min)
90	0,017	0,001
120	0,63	0,051
150	0,68	0,053
180	0,75	0,091
210	0,68	0,063
240	0,60	0,054
270	0,64	0,074
300	0,74	0,053

Tabla 6B. Valores de concentración y secreción de tauro-lh3e calculados a partir de muestras de ácido biliar de rata recogidas durante la infusión femoral (1 hora que varía de 75 a 135 minutos)

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

La secreción biliar del compuesto lh3e después de administración iv energética y el compuesto se recuperó en bilis un por con un porcentaje relativamente elevado. El perfil cinético indicaba que el compuesto se absorbía de forma eficaz por el hígado y secretado en bilis parcialmente como tal y también, en menor medida, metabolizado para compuestos más polares (Fig. 13, 14a y 14b). Sin desea quedar ligado por ninguna teoría en particular, se cree que la presencia del grupo metilo en la posición C-23 impide el proceso de conjugación con taurina y glicina que es en parte relevante para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados de origen natural; esto es fundamental para el dihidroxi BA y en menor medida para el trihidroxi BA. El alcance de esta recuperación en bilis también se relaciona con la dosis administrada. Después de la administración id, la recuperación en bilis era ligeramente menor que la recuperación después de la administración iv lo que sugiere que el compuesto no se absorbe de forma eficaz por el intestino (Fig. 13, 14c y 14d). Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas, los investigadores esperaban que este compuesto se pudiera absorber por un mecanismo de difusión pasiva ($\log P = 1,44$) y no parecía que estuviera implicado un mecanismo activo. La presencia de tres grupos hidroxilo permite que la molécula en un lado sea absorbida de forma eficaz por el hígado y secretada parcialmente en la bilis. También evita que la molécula sea absorbida por el intestino.

Ejemplo 12B

Los resultados en la Tabla que se muestra a continuación desvelan que el compuesto lh3e tiene un efecto colerético potente, con la tasa de secreción de bilis máxima (SV₀) siendo significativamente mayor que la del CDCA y CA.

Tabla. Parámetros de Secreción de Lípido Biliar después de Infusión iv e id a una Dosis de 1 (µmol/min)/kg bw durante 1 h de los BA^a

Comp	SV ₀ id(iv)	SBA id(iv)	% de id(iv) libre	% de id(iv) conjug
CDCA	57 ± 7 (51 ± 9)	0,7 ± 0,2 (0,8 ± 0,1)	3 ± 1 (4 ± 1)	96 ± 8 (98 ± 5)
CA	64 ± 6 (78 ± 8)	1,0 ± 0,4 (1,3 ± 0,2)	12 ± 2 (8 ± 3)	90 ± 4 (92 ± 6)

Comp	SV ₀ id(iv)	SBA id(iv)	% de id(iv) libre	% de id(iv) conjug
lh3e	112 ± 12 (131 ± 11)	0,5 ± 0,2 (0,7 ± 0,3)	94 ± 6 (93 ± 5)	10 ± 5 (7 ± 3)
R-EMCA	81 ± 8 (90 ± 5)	0,4 ± 0,2 (0,5 ± 0,1)	68 ± 8 (65 ± 4)	32 ± 7 (26 ± 6)
Solución Salina	46 ± 4 (48 ± 4)	0,4 ± 0,1 (0,4 ± 0,1)		

^a Los datos representan valores promedios y desviaciones estándar de seis experimentos independientes. El vehículo usado para la administración id era solución salina. El vehículo usado para la administración iv era solución salina y BSA al 3 %, pH 7,2. SV₀: tasa de secreción de bilis máxima ((μ l/ min)/kg bw). S_{BA}: tasa de secreción de BA máxima ((μ mol/min)/kg bw). % libre: porcentaje de la dosis administrada recuperada en bilis de las moléculas como tal. % de conjugado: porcentaje de la dosis administrada recuperada como BA conjugado.

5 Por consiguiente, los resultados en la tabla mencionada anteriormente muestran que el compuesto lh3e es resistente a la conjugación, con más de un 90 % del compuesto siendo secretado en la bilis en su forma conjugada después de infusión intravenosa o intraduodenal. A diferencia de CDCA y CA no se puede secretar en la bilis como tal, requiriendo la etapa de conjugación. Por lo tanto, se prevé que el grupo metilo en C23(S) del compuesto lh3e evita la activación de la carboxil CoA y su posterior conjugación, favoreciendo de ese modo ruta de desviación colehepática con una absorción ductal y un efecto colerético potente.

10 Para estudiar adicionalmente la influencia de la configuración del grupo metilo en C23 en la amidación de la cadena lateral y el efecto colerético el compuesto, también se realizaron análisis similares el otro epímero, en particular, ácido 6 α -etil- 23(R)-metilcólico (R-EMCA en la tabla mencionada anteriormente). La inspección de la tasa de secreción de bilis máxima (SV₀) muestra que el efecto colerético de R-EMCA aún es más elevado que CA, Aunque menor que el del compuesto lh3e. Como resultado, estos datos sugieren que la orientación del grupo metilo en C-23 es importante para la conjugación del grupo carboxilo, con el resto metilo ajustándose en bajo grado en el bolsillo catalítico de la enzima de conjugación en el caso del epímero C23(S). en conjunto con estos resultados muestran que el compuesto lh3e se absorbe de forma eficaz y experimentar un ciclado enterohepático aunque con una conjugación hepática relativamente baja. La tasa de conjugación baja también puede permitir que el compuesto lh3e escape de la del primer paso de eliminación hepática y alcance la circulación sanguínea sistémica.

20 *Metabolismo hepático*

Para una identificación sistemática preliminar, la búsqueda de los posibles metabolitos se realizó sobre la base de los compuestos esperados de acuerdo con experimentos y datos previos y la estructura y propiedades fisicoquímicas del compuesto lh3e.

25 El Compuesto lh3e se secreta principalmente como compuesto precursor (sin modificar) y era metabolizado solo ligeramente por el hígado. El metabolito principal era el conjugado de taurina y el mono glucurónido estaba presente en una baja cantidad. El metabolismo es similar para administración tanto iv como id. Teniendo en cuenta la recuperación en bilis, los investigadores esperaban identificar otros metabolitos. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 impide el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere en parte para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados de origen natural; esto es fundamental para el dihidroxi BA y en menor medida para el trihidroxi BA dado que son bastante polares. La formación de glucurónidos podría llegar a ser relevante si se administrara a dosis más elevadas.

35 La Figura 14a muestra el compuesto lh3e y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas en el experimento iv. Los datos se informan como valores de área absoluta (n = 5). La Figura 14b es una presentación con zoom de la Figura 14a. La Figura 14c muestra el compuesto lh3e y sus metabolitos principales identificados en bilis usando espectrometría de masas en el experimento di. Los datos se informan como valores de área absoluta. La Figura 14d es una presentación con zoom de la Figura 14c.

40 En resumen, el compuesto lh3e es moderadamente hidrófilo y tienen la capacidad detergente suave. Su absorción hepática parece eficaz. La secreción biliar también es eficaz teniendo en cuenta que el compuesto se secreta principalmente sin modificar y, hasta un alcance limitado, conjugados con taurina. La absorción intestinal también es eficaz, aunque no es completa, y la molécula no necesita un amplio metabolismo hepático a la dosis administrada para su secreción en bilis. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 evita una amplia conjugación con taurina para secreción biliar. Por lo tanto, hay un aumento en el tiempo de resonancia hepática de la molécula que experimenta una ruta de desviación colehepática, es responsable de su efecto colerético potente.

50 EJEMPLO 13: Toxicidad *in vitro* en células HepG2

Los compuestos de la invención y divulgación se evaluaron para toxicidad *in vitro* usando un ensayo de células HepG2. La citotoxicidad de las células HepG2 se determinó controlando la disminución de ATP y la apoptosis de las células HepG2 se determinó controlando la activación de caspasa-3. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Citotoxicidad

La viabilidad celular se midió usando Perkin Elmer ATP-Lite 1 STEP. El ATP es un marcador de viabilidad celular porque está presente en todas las células metabólicamente activas y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células experimentan necrosis o apoptosis. Las células HepG2 (1×10^4) se sembraron en una placa de 96 pocillos y se estimularon con diluciones de 10 veces de 1 nM a 300 μ M del compuesto lh3e 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. La lectura de la luminiscencia se realizó con Victor Light (PerkinElmer). La señal experimental se restó del fondo. Como control positivo de citotoxicidad celular se usó tamoxifeno, mientras que el control negativo era las células no tratadas.

Apoptosis

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

Necrosis

La necrosis celular se analizó por medición de la liberación de Lactato DesHidrogenasa (LDH) de las células necróticas usando el ensayo de integridad de membrana homogénea CytoTox ONE de Promega. Las células HepG2 cells (1×10^4) se sembraron en una placa de 96 pocillos. Después de 18 horas de incubación, el medio recién preparado sin Piruvato Sódico y sin Suero se sustituyó y el compuesto lh3e se añadió como respuesta a la dosis de 0,1 μ M a 500 μ M. Como control de liberación de LDH máxima se usó Triton al 1 %. Como inductor de necrosis se usó tamoxifeno. Las células sembradas se volvieron a colocar en la incubadora durante un periodo adicional de 4 horas. El sobrenadante se transfirió en una placa nueva y el mismo volumen de maíz inicial reactivo CytoTox-ONE se añadió a la placa. Después de 1 h de incubación, se hizo la lectura de la fluorescencia con el lector de placas de múltiples etiquetas de EnVision con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una emisión de 590 nm.

Tabla 7.

Toxicidad <i>In Vitro</i> en células HepG2			
Compuesto	CITOTOXICIDAD ATP CE ₅₀ de disminución (μ M)	APOPTOSIS Caspasa-3 CE ₅₀ de activación (μ M)	NECROSIS liberación de LDH CE ₅₀ (μ M)
Estaurosporina (apoptosis)	15	3	<i>n.d.</i>
Tamoxifeno (Necrosis)	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 lh3e	> 1000	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

EJEMPLO 14: Ensayos de Selectividad de NR

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

- FXR y LXR: Reclutamiento de Coactivador (alfascreen);
- TGR5: Nivel de AMPc en línea de células intestinales humanas (NCI-H716);
- PXR: Ensayo de Competición de Ligandos (Ensayo de Unión)
- CAR: Reclutamiento de Coactivador (Lanthascreen)

La Tabla 8 muestran los resultados de estos ensayos.

Ensayo de Coactivador por TR-FRET

- 5 El ensayo Lanthascreen (Invitrogen) se usó para ensayo de selectividad de receptor nuclear. El kit usa un anticuerpo anti-GST etiquetado con terbio, un péptido coactivador etiquetado con fluoresceína, y un dominio de unión a ligando de NR que se etiqueta con glutatión-S-transferasa (GST) en formato de ensayo homogéneo de mezcla y lectura. Los ensayos se realizaron en placas de 384 micropocillos (PerkinElmer). Una reacción de ensayo total de 20 μ l fluía los NR etiquetados con GST 5 nM, 125 nM de péptido corregulador, 5 nM de anticuerpo etiquetado con TB-anti-GST (etiquetado con terbio-anti-glutatión S transferasa), DTT 5 mM y una concentración variable del compuesto lh3e en el tampón de ensayo suministrado por Invitrogen. El control negativo estaba desprovisto del compuesto lh3e pero contenía algo más contenido en el pocillo agonista. Después de un periodo de incubación de 1 hora en la oscuridad, las mediciones de TR-FRET se realizaron en el aparato de Envision. La proporción de emisión de 520/495 se representó con respecto a las concentraciones variables de ligando. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism usando la ecuación de curva sigmoidea contendiente variable para obtener valores de CE_{50} .
- 10
- 15

Tabla 8
Ensayos de Selectividad de NR

Compuesto	Activación de FXR	Activación de TGR5	Activación de LXR α	Unión a PXR	Activación de CAR	Activación de PPAR δ	Activación de VDR
(Patrón de Referencia)	(CDCA = 10-20 μ M) CE ₅₀ (μ M)	(LCA = 4-8 μ M) CE ₅₀ (μ M)	(T0901317 = 0,08 μ M) CE ₅₀ (μ M)	(SR-12183 = 0,013 μ M) C ₁₅₀ (μ M)	(CITCO = 0,005 μ M) CE ₅₀ (μ M)	(GW0742 = 0,004 μ M) CE ₅₀ (μ M)	(Di-FiliroxivitD3 = 0,005 μ M) CE ₅₀ (μ M)
CDCA	20	30	Sin actividad	> 250	> 250	Sin actividad	Sin actividad
LCA	Sin actividad	4-8	Sin actividad	23	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
CA	Sin actividad	30	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
UDCA	150	Sin actividad	Sin actividad	> 250	> 250	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto lh3e	175	0,9	Sin actividad	110	> 250	Sin actividad	Sin actividad

FXR, LXR, CAR, PPAR α , VDR: Ensayo de Reclutamiento de Coactivador; TGR-5: Nivel de cAMP en la línea de células intestinales humanas, NCI-H716; PXR: Ensayo de Competición de Ligandos;

EJEMPLO 15: Estabilidad del Compuesto

La estabilidad del compuesto lh3e se determinó usando métodos conocidos en la técnica. La concentración de la fracción celular era de 1 mg/ml durante un periodo de tiempo de 0-15-30-60-120-240-360-1440 minutos. Los controles positivos fueron testosterona (1000 ng/ml); 7-hidroxi cumarina (1296 ng/ml); ácido benzoico (2440 ng/ml) durante un periodo de tiempo de 0-10-20-40-60-120. El método analítico usado fue separación por LC/MS en una columna C18 mediante gradiente de polaridad; la adquisición se realizó en Control de Ion Individual. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

	Controles Positivos			
	lh3e	Testosterona	7-Hidroxi Cumarina	Ácido Benzoico
	T _{1/2} (expresado en minutos)			
Fracción S9 de hígado humano	725	39	8,5	236
Microsomas de hígado humano	1942	8-20	-----	-----

Ejemplo 16 Liberación de GLP-1 *ex vivo*

La Figura 16 muestra que el compuesto lh3e induce de forma radical y dependiente de la dosis la liberación de GLP-1 *ex vivo*. La Figura 16 muestra el impacto de una exposición de 1 h a la concentración indicada del compuesto lh3e en la liberación de GLP-1 *ex vivo* en explantes ileales aislados de ratones macho TGR5-Tg de 18 semanas alimentados con dieta HF (n = 4). Los datos se representan como media ± ET: ensayo t de Student para muestras no relacionadas, (*) P < 0,05, explantes ileales tratados con el compuesto lh3e con respecto a los tratados con vehículo.

Los siguientes Procedimientos Experimentales si utilizan en los Ejemplos 17-21.

Productos Químicos y Reactivos

Todos los reactivos bioquímicos se adquirieron en Sigma-Aldrich a menos que se indique de otro modo. El inhibidor DPP4 (DPP4i) sitagliptina fue un detalle amable del Dr. C. Ullmer (Hoffmann-La Roche). El compuesto lh3e se sintetizó como se ha descrito anteriormente (Macchiarulo et ál., 2008; Pellicciari et ál., 2007).

Cultivo Celular

Los experimentos *in vitro* se realizaron en células STC-1 o NCI-H716 tratadas con vehículo (DMSO) o con el compuesto lh3e. El Compuesto lh3e se evaluó por su actividad agonista sobre TGR5 como se ha descrito anteriormente (Macchiarulo et ál., 2008, J. Chem. Inf. Model. 48, 1792; Pellicciari et ál., 2007, J. Med. Chem. 50, 4265-4268). La producción de AMPc se realizó como se ha descrito (Sato et ál., 2008, J. Med. Chem. 51, 1831; Watanabe et ál., 2006, Nature 439, 484). La actividad de Cox se evaluó siguiendo la oxidación del citocromo c (Sigma) totalmente reducido a 550 nm (Feige et ál., 2008b, Cell Metab. 8, 347). La proporción de ATP/ADP y la liberación de GLP-1 se midieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biovision y Millipore, respectivamente). Los adipocitos marrones primarios se prepararon como se ha descrito anteriormente (Watanabe et ál., 2006, Nature 439, 484), y los explantes ileales se prepararon de acuerdo con un método establecido (Cima et ál., 2004, J. Exp. Med. 200, 1635-1646).

Cuantificación de Calcio Intracelular

El NCI-H716 (40.000 células) se pipeteó en placas de color negro de 96 pocillos revestidas con Matrigel (BD Biosciences). Setenta y dos horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces en tampón de ensayo (HBSS1x, HEPES 20 mM [pH 7,4]) y se evaluaron para calcio intracelular con Fluo-4 AM de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen).

Bioquímica e Histoquímica

Los parámetros de plasma y contenido de lípidos hepáticos y fecales se midieron tal como se ha descrito (Mataki et ál., 2007, Mol. Cell. Biol. 27, 8330-8339). La tinción con hematoxilina y eosina (H&E), rojo Sirio, y aceite rojo O se realizaron como se ha descrito (Mark al., 2007, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29B, 24), y se tomaron microfotografías en microscopios de campo amplio (Leica) con una cámara CCD. Para secciones pancreáticas, el tamaño de los islotes se ajustó y se hizo su recuento a partir de cuatro secciones alternadas teñidas con HE

espaciadas de 150 μM usando el software ImageJ (cinco animales por grupo). La tinción inmunofluorescente de insulina se realizó como se ha descrito (Fajas et ál., 2004, J. Clin. Invest. 113, 1288). Además, los islotes pancreáticos se aislaron mediante digestión de páncreas con colagenasa de ratones TGR5-Tg alimentados con dieta HF de acuerdo con procedimientos disponibles en línea (por ejemplo, véase JOVE (página web de Journal of Visualized Experiments)). La insulina se extrajo después de incubación O/N a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en etanol ácido y se midió con ELISA en muestras diluidas con PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mercodia). La liberación de GLP- 1 se midió *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Medición del Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno celular se midió usando un analizador Seahorse Bioscience XF24 con diez replicados biológicos por condición (Feige et ál., 2008b, Cell Metab. 8, 347).

Experimentos con Animales

Los animales se alojaron y se reprodujeron de acuerdo con procedimientos estandarizados (Argmann y Auwerx, 2006b). Para todos los experimentos se usaron ratones macho emparejados por edades. Se generaron modelos de ratón modificado por ingeniería genética (GEMM), es decir, ratones TGR5-Tg y TGR5^{-/-}, como se ha descrito en los Datos Complementarios. DIO en los GEMM o ratones C57BL/6J (Charles River) se indujo mediante alimentación de ratones de 8 semanas de edad con una dieta HF (60 % de cal/grasa, D12492; Research Diets) durante al menos 8 semanas, como se menciona en el texto y en las leyendas de las figuras. En los experimentos de intervención dietética, el Compuesto lh3e se mezcló con la dieta (Feige et ál., 2008a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29B, 25) a la dosis suficiente para alcanzar una dosis *in vivo* de 30 mg/kg/d. Los experimentos de formación de fenotipos de ratón se realizaron de acuerdo con los protocolos de EMPRESS (véase, por ejemplo, la página web de Empress (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screening)) y tenían como objeto evaluar la ingesta de alimento y agua, composición corporal (Argmann et ál., 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29A, 23), consumo de energía (Argmann et ál., 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29A, 23), homeostasis de glucosa y lípidos (Argmann et ál., 2006b, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29A, 22); Heikkinen et ál., 2007, Curr. Protoc. Mol. Capítulo 29, Unidad 29B, 23; Matakí et ál., 2007, Mol. Cell Biol. 27, 8330), y bioquímica de plasma (Argmann y Auwerx, 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Capítulo 29, Unidad 29A, 22). Los tejidos y la sangre se recogieron y se procesaron para histopatología, química sanguínea, y expresión genética de acuerdo con procedimientos estandarizados (Argmann y Auwerx, 2006a; Feige et ál., 2008b; Mark et ál., 2007; Watanabe et ál., 2006). Los estudios de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico se realizaron como se ha descrito (Feige et ál., 2008b), con modificaciones menores incluyendo un cambio en el bolo de insulina inicial (30 mU/kg) y tasa de infusión de insulina (10 mU/min/kg). Los niveles de GLP-1 en plasma se midieron con ELISA (Millipore) en sangre recogida mediante punción retro-orbital. Los experimentos con ratones db/db (Charles River) se realizaron en animales de 14 semanas de edad alimentados con una dieta CD sin o con el compuesto lh3e (30 mg/kg/d) durante las seis semanas (Feige et ál., 2008a).

Formación de Perfiles de Expresión Genética

La formación de perfiles de expresión genética se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Feige et ál., 2008b; Watanabe et ál., 2006). Previamente se han publicado secuencias de cebador usadas, excepto las usadas para el gen Kir6.2: R-5' AGATGCTAACTTGGGCTTG (SEQ ID NO. 1), F-5' TAAAGTGCCACACCACTC (SEQ ID NO. 2).

Estadísticas

Los análisis estadísticos se realizaron usando el ensayo t de Student para muestras no relacionadas. Los datos se expresan como media \pm ETM, y los valores de P menores que 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 17 Expresión de ARNm de TGR5

Previamente se ha establecido una relación entre los BA y el consumo de energía *in vivo* (Watanabe et ál., 2006, Nature, 439, 484-489), de modo que se especuló que la activación de la señalización de TGR5 podría influir en la actividad mitocondrial de una forma más general. Para encontrar un soporte inicial para esta hipótesis, la expresión del ARNm de TGR5 se analizó a través de la base de datos de ARNm de hígado GeneNetwork en la población de referencia genética de BxD tal como se encuentra en la página web de GeneNetwork University of Tennessee. Una amplia gama de variación en la expresión del ARNm de TGR5 era evidente entre las diferentes cepas de ratón BxD. De forma interesante, la expresión del ARNm de TGR5 estaba correlacionada de forma altamente significativa con la expresión de varios genes que codifican subunidades de complejos implicados en la fosforilación oxidativa, tales como citocromo c oxidasa (Cox) (por ejemplo, CoxV11a; Figura 17A) y ATP sintasa (Atp6v0b, subunidad B de V0 de transporte de ATPasa H⁺; Atpaf2, factor 2 de ensamblaje del complejo de ATP sintasa mitocondrial F1; Atp1 a3, polipéptido alfa 3 de transporte de ATPasa Na⁺/K⁺; Atp6v1 b2, isoforma 2 de la subunidad B de V1 de transporte de ATPasa H⁺). De forma coherente con esta observación, el tratamiento de células STC-1 con el compuesto lh3e dio como resultado un aumento de la actividad de Cox dependiente de AMPc (Figura 17B), que estaba asociado con un

aumento del consumo de oxígeno celular (Figura 17C) y un aumento en la proporción de ATP/ADP (Figura 17D). este resultado se confirmó en la línea de células enteroendocrinas humanas NCI-H716, en las que el tratamiento con el compuesto lh3e aumentaba la producción de ATP de una manera dependiente de AMPc. De forma interesante, la expresión de TGR5 también estaba fuertemente correlacionada con la de Kir6.2, un componente del canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}) (Figura 17E). Estas correlaciones se corroboraron adicionalmente mediante interferencia de ARN de TGR5 en células STC-1, que dio como resultado una caída simultánea en la expresión de los ARNm de CoxIV y Kir6.2 (Figura 17F).

Ejemplo 18. La Activación de la Ruta de Señalización de TGR5 Aumenta los Niveles de Calcio Intracelular y estimula la Liberación de GLP-1 en Células L Enteroendocrinas

En células β pancreáticas, está bien establecido que un aumento en la proporción de ATP/ADP obtenido a partir del metabolismo de la glucosa cierra los canales de K_{ATP} , dando como resultado la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización de la membrana a su vez abre los canales de calcio abiertos por voltaje (Ca_v), produciendo un influxo de calcio. El aumento del calcio intracelular resultante a continuación desencadena la interacción directa entre proteínas exocitóticas situadas en la membrana granular que contiene insulina y las situadas en la membrana plasmática (Yang y Berggren, 2006, *Endocr. Rev.* 27, 621-676), conduciendo a la posterior liberación de insulina (Nichols, 2006, *Nature*, 440, 470-476). Los hallazgos recientes apoyan la hipótesis de que los canales de K_{ATP} y Ca_v también desempeñan un papel fundamental en la liberación de GLP-1 a partir de las células L enteroendocrinas (Reimann y Gribble, 2002, *Diabetes* 51, 2757-2763; Reimann et ál., 2008, *Cell Metab.* 8, 532-539). De forma que atrae la atención, en la población de referencia de BxD, los investigadores también encontraron que la expresión de TGR5 se correlacionaba con la expresión de Cav2.2 (Figura 18A), cuya expresión se describió previamente en células enteroendocrinas (Reimann et ál., 2005, *J. Physiol.* 563, 161-175) y que participa en la liberación de insulina estimulada por calcio en las células β pancreáticas (Yang y Berggren, 2006, *Endocr. Rev.* 27, 621-676). Junto con esto, el compuesto lh3e aumentaba de forma sólida el influxo de calcio en la línea de células enteroendocrinas humanas NCI-H716, un efecto que potenciaba la sobreexpresión de TGR5 y, por el contrario, se truncaba por la interferencia del ARN de TGR5 (Figuras 18B y 18C) o mediante la adición del inhibidor MDL-1 2330^a (MDL) de la adenilato ciclasa (Figura 18D). Además, la presencia de glucosa aumentaba el aumento del calcio intracelular dependiente de TGR5 (Figura 18E). Este efecto estaba correlacionado con un aumento de la liberación de GLP-1 de las células NCI-H716 (Figura 18F), que se inhibía con MDL-12-330A.

La liberación mediada de GLP-1 por TGR5 desencadenada por el compuesto lh3e se confirmó adicionalmente en las células enteroendocrinas de ratón, STC-1, en las que el impacto del compuesto lh3e en la liberación de GLP-1 aumentaba con la sobreexpresión de TGR5, a la vez que se evitaba con el ARN interferencia (Figura 18G) o con MDL-12-330A, enfatizando adicionalmente la dependencia de AMPc de la liberación de GLP-1 mediada por TGR5 (Figura 18H). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que TGR5 regula una ruta fundamental que gobierna la liberación de GLP-1 de las células L enteroendocrinas.

Ejemplo 19. La Sobreexpresión de TGR5 Modula la Secreción de GLP-1 *In Vivo*

Para evaluar adicionalmente el papel metabólico del aumento de la señalización de TGR5, los investigadores evaluaron el impacto de la sobreexpresión transgénica de TGR5 *in vivo* en el contexto de DIO en ratones. Los ratones transgénicos TGR5 (TGR5-Tg) se generaron mediante inyección de oocitos del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-278N1. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se mostró que los ratones TGR5-Tg habían integrado seis copias del clon RP23-278N1 1 BAC, conduciendo a una fuerte expresión del ARNm de TGR5, limitada a la mayoría de los tejidos que expresan TGR5 normalmente. La tolerancia a la glucosa aumentó de forma notable en los ratones TGR5-Tg estimulados durante 10 semanas con una dieta con alto contenido de grasa (HF) en comparación con los compañeros de camada alimentados con una dieta HF de control (Figura 19A), mientras que no se observó diferencia en los ratones con una dieta con pienso (CD) (los datos no se muestran). A diferencia de nuestras expectativas, no se observaron diferencias en el aumento de peso corporal entre los ratones de tipo silvestre y los TGR5-Tg con una dieta CD o HF, lo que demuestra que el aumento de la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5-Tg no se podía atribuir a los efectos de confusión de la pérdida de peso. La ausencia de aumento de peso en los ratones TGR5-Tg, siguiendo los pasos de un aumento de consumo de energía, se explicaban mediante una reducción de la actividad locomotora. Dado que los ratones con supresión genética de receptor GLP-1 presentan una notable hiperactividad (Hansotia et ál., 2007, *J. Clin. Invest.* 117, 143-152), los investigadores administraron el agonista Ex-4 del receptor GLP-1 a los ratones de tipo silvestre para evaluar si la disminución de la actividad locomotora en los ratones TGR5-Tg podría estar relacionada con la secreción de GLP-1. Ex-4 reducía de forma eficaz y de forma dependiente de la dosis la actividad locomotora en ratones. De forma interesante, a 1 nmol/Kg, los investigadores observaron una disminución significativa de la actividad locomotora aunque los ratones todavía se alimentaban de forma adecuada.

De forma interesante, y de acuerdo con las expectativas de los investigadores, la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5-Tg estaba asociada con una fuerte secreción de GLP-1 y liberación de insulina como respuesta a la carga de glucosa oral (Figura 19B). La significancia del aumento de la secreción de GLP-1 se enfatizaba con el hecho de que las mediciones de los niveles de GLP-1 en plasma se realizaban sin administración oral preliminar de un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) a los ratones. Este aumento de la liberación de GLP-1 en ratones TGR5-Tg ayuda a explicar la disminución de la actividad locomotora en estos ratones. Por investigar adicionalmente el impacto de la

sobreexpresión de TGR5 en la secreción de GLP-1, los ratones alimentados con HF se estimularon posteriormente con una comida de ensayo para estimular la liberación de BA de la vesícula biliar. De forma interesante, el impacto de la sobreexpresión de TGR5 en la secreción de insulina y GLP-1 era más pronunciada después de la comida que después de una simple estimulación con glucosa (Figura 19C). Se especula que estos efectos se deben al aumento del flujo de BA desencadenado por la comida de ensayo en comparación con la estimulación con glucosa. En línea con esta hipótesis, el tratamiento de explantes ileales de ratones TGR5-Tg y de control con ácido litocólico (LCA) confirmaba que los BA proporcionan una señal excelente para inducir liberación de GLP-1 en el contexto de expresión de TGR5 elevada (Figura 19D). Además estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos en las células STC-1 transfectadas con mTGR5 en las que la liberación de GLP-1 también se reforzaba con un aumento de la expresión de TGR5 (Figura 19G). Los investigadores especulan que en el contexto de explantes ileales de tipo silvestre, la rápida degradación de GLP-1 por la enzima DPP4 podría enmascarar el aumento moderado de la liberación de GLP-1 desencadenada por LCA.

El impacto de GLP-1 en la función pancreática se ha documentado ampliamente durante la última década y varía desde los efectos secretagogos de insulina al ascenso de la supervivencia y proliferación del islote pancreático (Drucker, 2006, Cell Metab. 3, 153-165). En este contexto, la tinción con inmunofluorescencia de insulina en secciones pancreáticas desveló que, a diferencia de los islotes hipertróficos con bajo contenido de insulina, como se observa en los ratones de control alimentados con HF, los islotes de los ratones HF TGR5-Tg alimentados con no eran hipertróficos y se tiñeron de forma más amplia para insulina (Figura 19E). De acuerdo con estos datos, el recuento y el ajuste del tamaño de los islotes pancreáticos confirmaba que los resultados de la expresión de TGR5 en el mantenimiento de un perfil de distribución de islotes normal (Figura 19F), probablemente debido al aumento de los niveles de GLP-1 en plasma. Además, el contenido de insulina de los islotes pancreático era significativamente superior en ratones TGR5-Tg alimentados con HF que en los controles (Figura 19G).

Para establecer adicionalmente un papel de la señalización de TGR5 en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa, los investigadores evaluaron la tolerancia a la glucosa de los ratones deficientes en TGR5 de la línea germinal (TGR5^{-/-}), generados cruzando ratones en los que el alelo TGR5 estaba flanqueado por sitios LoxP con ratones transgénicos CMV-Cre. En contraste directo con lo que se observó en ratones TGR5-Tg, la tolerancia a la glucosa estaba alterada en los ratones TGR5^{-/-} estimulados con una dieta HF durante 8 semanas (Figura 19H), mientras que no se observa diferencia en los ratones alimentados con CD (los datos no se muestran). A continuación, la secreción de GLP-1 se sometió a ensayo estimulando ratones TGR5^{+/+} y TGR5^{-/-} con una carga de glucosa oral 30 min después de la administración de solución salina o compuesto lh3e solo, o en combinación con el inhibidor DPP4 (DPP4i), sitagliptina. La administración previa del compuesto lh3e aumentaba de forma moderada la liberación de GLP-1 después de la estimulación con glucosa en ratones TGR5^{+/+} (Figura 19I). Sin embargo, este efecto era notablemente más pronunciado cuando DPP4i se coadministrada como una consecuencia de su capacidad para prolongar la semivida de GLP-1 en plasma (Drucker y Nauck, 2006 Lancet, 368, 1696-1705) (Figura 19I). Por el contrario, los efectos del compuesto lh3e en los niveles de GLP-1 en plasma se truncaron en los ratones TGR5^{-/-} (Figura 19J). En conjunto con estos datos destacan el papel fundamental de la señalización de TGR5 en el control de la liberación de GLP-1 y demuestran adicionalmente la especificidad del compuesto lh3e agonista semisintético *in vivo*.

Ejemplo 20. El Compuesto lh3e Agonista de TGR5 Aumenta el Consumo de Energía y Reduce la Esteatosis Hepática y la Obesidad con Alimentación con Alto Contenido de Grasa

En vista del aumento del perfil de glucosa e insulina en ratones TGR5-Tg, los investigadores evaluaron a continuación el potencial terapéutico del compuesto lh3e mezclado a una dosis de 30 mg/kg/día (mkd) con la dieta en un estudio de intervención en ratones C57BL/6J en los que la diabetes se indujo con alimentación con HF durante 14 semanas. Como se esperaba, el perfil de HPLC de los BA en plasma confirmada la presencia del compuesto lh3e solamente en los ratones tratados (Figura 20A). Los niveles del compuesto lh3e en plasma estaban dentro del intervalo de los de CA y ácido 3-muricólico. Es digno de atención que el tratamiento con el compuesto lh3e no influirán ni en la composición del BA en plasma ni el perfil de expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de BA, cuya expresión está principalmente bajo el control de receptores nucleares. La ausencia completa de cambios en el nivel de expresión de los genes diana clásicos de FXR en el hígado, tales colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) y bomba de exportación de sales biliares (BSEP) (Thomas et ál., 2008, Nat. Rev. Drug Discovery 7, 678-693), confirmaba adicionalmente la especificidad del compuesto lh3e hacia TGR5.

Después de 10 semanas de tratamiento con el compuesto lh3e, se observó una atenuación significativa de aumento peso corporal de aproximadamente un 15 %, en asociación con una clara reducción de la masa de grasa, en ratones tratados con el compuesto lh3e alimentados con una dieta HF con respecto a los controles alimentados con una dieta HF (Figuras 20B y 20C). EL aumento en la masa en el hígado y en la almohadilla de la pata también se atenuó en ratones tratados con el compuesto lh3e alimentados con una dieta HF (Figura 20D). Como se observó en el estudio previo de los investigadores con CA (Watanabe et ál., 2006, Nature, 439, 484-489), la disminución de la masa de BAT estaba relacionada con una disminución del tejido adiposo blanco (WAT) en la región inter escapular (Figura 20D y los datos no se muestran). Los cambios metabólicos entre los ratones alimentados con una dieta HF de control y los ratones alimentados con una dieta HF tratados con el compuesto lh3 no fueron causados por una reducción de la ingesta de calorías (Figura 20E) o pérdida de energía fecal, sino que en su lugar fue la consecuencia de un aumento del consumo de energía, como se indica mediante la medición del consumo de O₂ y la producción de CO₂ durante la

calorimetría indirecta (Figura 20F). Durante el periodo de oscuridad, el cociente respiratorio de los ratones tratados con lh3e se redujo de forma significativa, lo que es coherente con un aumento de la quema de grasas (Figura 20F). La formación de perfiles de expresión genética de BAT confirmaba que la activación de la ruta de señalización de TGR5 desencadena el aumento de varios genes mitocondriales implicados en el consumo de energía junto con una inducción de la expresión genética de la desiodinasa de tipo 2 (Figura 20G). La activación de la cadena respiratoria mitocondrial por el compuesto lh3e se puso en evidencia adicionalmente midiendo el consumo de O₂ en adipocitos marrones primarios aislados de ratones C57BL/6J tratados durante 12 h con el compuesto lh3e. La adición del agente sin acoplar, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), reforzó el consumo de O₂ basal en todas las condiciones pero estaba significativamente más pronunciado en los tratados con el compuesto lh3e (Figura 20H). Además del aumento del consumo de energía, también mejoró la de función hepática, como se pone en evidencia mediante la reducción de la esteatosis hepática, que se evaluó mediante tinción con aceite rojo O (Figura 20I) y cuantificación bioquímica del contenido de lípidos hepáticos (Figura 20J). Además, los niveles de enzimas hepáticas en plasma estaba notablemente reducidos en comparación con los controles alimentados con la dieta HF, que se correlaciona con la ausencia de fibrosis hepática en secciones de hígado de ratones tratados con lh3e teñidas con rojo Sirio (Figuras 20I y 20K). La mejora de la función hepática también se reflejaba por la caída significativa de triglicéridos en plasma y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en ratones alimentados con una dieta HF tratados con el compuesto lh3e (Figura 20L).

Ejemplo 21. El Compuesto lh3e Agonista de TGR5 Mejora la Sensibilidad a Insulina en Ratones Obesos

La capacidad del compuesto lh3e para mejorar la homeostasis de la glucosa se determinó. En ratones tanto DIO como db/db, un modelo de diabetes ambiental y genético, respectivamente, el tratamiento con el compuesto lh3e (30 mkd) mezclado con la dieta mejoraba en gran medida la tolerancia a la glucosa después de una estimulación oral con glucosa (Figuras 21A y 21C), junto con un aumento del perfil de secreción de insulina estimulada por glucosa (Figuras 21B y 21D, panel inferior). Esta característica es coherente con una mejora de la función pancreática mediada por GLP-1. Además, los niveles de glucosa e insulina en ayunas disminuyeron en ratones tanto DIO como db/db que se trataron con el compuesto lh3e (Figuras 21B y 21D, panel superior). Para caracterizar adicionalmente el impacto del compuesto lh3e en la homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina, un pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico se realizó en estos ratones DIO. De forma coherente con el aumento de la tolerancia a la glucosa, la tasa de infusión de glucosa necesaria para mantener la euglucemia en ratones DIO tratados con el compuesto lh3e era prácticamente idéntica a la observada en ratones de control alimentados con CD (Figura 21E). Aunque los ratones alimentados con la dieta HF resistentes a la insulina mostraban un aumento de la producción endógena de glucosa hepática, junto con una reducción tanto de la tasa de retirada de glucosa como la supresión de la producción de glucosa por la insulina, el tratamiento con el compuesto lh3e de los ratones alimentados con una dieta HF normalizaba estos parámetros con respecto a los valores observados en ratones alimentados con CD (Figura 21E). La medición de la absorción de la ¹⁴C-desoxiglucosa estimulada por insulina durante el pinzamiento de glucosa euglucémico hiperinsulinémico indicaba que la mejora de la homeostasis de la glucosa por el compuesto lh3e se podría atribuir principalmente a la reducción de la resistencia a la insulina en hígado y músculo (Figura 21F). Estos efectos se correlacionan con la normalización de la expresión de los genes fundamentales implicados en la homeostasis de la glucosa hepática (Figura 21G).

Para abordar la especificidad del compuesto lh3e con respecto a TGR5 *in vivo*, el impacto del tratamiento durante 4 semanas con el compuesto lh3e a 30 mkd en la tolerancia a la glucosa se comparó en ratones TGR5^{-/-} y TGR5^{+/+}, preparados mediante alimentación con una dieta HF durante 9 semanas. Incluso durante este breve periodo de tiempo, el compuesto lh3e mejorará de forma significativa la tolerancia a la glucosa en ratones TGR5^{+/+} alimentados con una dieta HF (Figura 6A), junto con una normalización de la secreción de insulina durante la estimulación con glucosa oral (Figura 6B). Estos efectos se truncaron en ratones TGR5^{-/-}, proporcionando de ese modo argumentos adicionales para apoyar la especificidad del compuesto lh3e para TGR5 (Figuras 22A y 22B).

Ejemplo 22. Farmacocinética y Metabolismo en Rata con Fístula Biliar Después de Administración IV para los compuestos lh3e e li3e

La diferencia entre los dos diastereoisómeros puros, lh3e e li3e, es que el grupo metilo en C-23 está orientado de forma diferente, generando de ese modo las formas 23S y 23R. esta modificación de la estructura podría modificar en parte las propiedades fisicoquímicas, metabolismo y farmacocinética de los dos compuestos. La introducción de un grupo metilo en C-23 en la cadena lateral orientada de forma diferente produjo dos isómeros. En los que también el grupo carboxi está orientado de forma diferente y su reactividad en el proceso de amidación o en la desconjugación de la forma amidada puede ser diferente entre los dos diastereoisómeros. La orientación del grupo carboxi diferente también es responsable de un equilibrio hidrófobo/hidrófilo de las dos moléculas que podría dar como resultado propiedades biológicas y metabolismo diferentes. Para aclarar este punto los dos isómeros puros se administraron mediante infusión femoral (i.v.) a un modelo de rata con fístula biliar a una sola dosis de 1 µmol/min/kg de bw durante 1 hora y las muestras de bilis se recogieron durante 3 horas. También se evaluó el efecto en el flujo de bilis, en la secreción biliar del compuesto precursor y del metabolitos principales.

*Flujo Biliar. Efecto Colerético*Métodos

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

10

Resultados

15 El flujo de bilis durante la infusión iv del vehículo de solución salina y BSA al 3 % de control mantuvo un valor que variaba de 40 a 60 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$ para todo el periodo de los experimentos. La infusión iv del compuesto lh3e aumentó de forma significativa el caudal biliar y este fenómeno comenzó 15 minutos después del comienzo del periodo de infusión y continuó durante al menos 2 horas después del final del periodo de infusión (Figura 23). La infusión iv del compuesto li3e también aumentaba el caudal biliar pero su efecto es significativamente menor que el observado para el compuesto lh3e isomérico (Figura 23).

20 Farmacocinética (Secreción Biliar) de los Isómeros Administrados después de Infusión iv

Las muestras de bilis recogidas en diferentes momentos durante los experimentos iv se analizaron para determinar las secreciones biliares de los isómeros administrados y sus metabolitos principales recuperados en la bilis.

Materiales

El polvo cristalino puro de cada compuesto se obtuvo en el laboratorio de R. Pellicciari en la Universidad de Perugia. Las soluciones de reserva se prepararon en metanol a 1 mmol/l y las soluciones de trabajo se prepararon Diluyendo volúmenes apropiados de la solución primaria. El metanol y el acetonitrilo eran de pureza con calidad para HPLC. El amoniaco era puro al 30 % y el ácido acético era puro al 99,8 %. Todos los reactivos se obtuvieron en Carlo Erba Reagents. El agua de calidad para HPLC se preparó con un sistema Milli-Q.

30

Preparación de Muestras

35 Las muestras de bilis de ratas se llevaron a temperatura ambiente, se agitaron brevemente, y se diluyeron a 1:100 o 1:200 v/v con tampón de acetato amónico 15 mM (pH = 5,0): acetonitrilo (70:30, v/v). La solución final se transfirió en un vial de automuestreador y se inyectaron 10 μl se en la columna de cromatografía. Cuando se encontró que las mesas estaban en el intervalo de linealidad, éstas se diluyeron y se volvieron a analizar.

Método de HPLC-ESI-MS/MS

40 Las muestras de bilis de rata se analizaron por HPLC-ESI-MS/MS usando la fuente de ESI en modo de ionización negativa. Para la cromatografía líquida, se usó un módulo de separación Alliance 2695 acoplado con automuestreador. El automuestreador se mantuvo a 7 °C. La separación se realizó en una columna Synergi Hydro-RP C18 (150 x 2,0 mm de d.i., 4 μm de tamaño de partícula), protegida con una columna previa de SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm de d.i., ambas suministradas por Phenomenex. El analito se eluyó usando tampón de acetato amónico 15 mM (pH = 5,00) como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. La fase móvil B aumentó de un 30 % a un 64 % en 10 minutos, a continuación hasta un 100 % en 10 minutos, y se mantuvo constante durante 10 minutos. El caudal era de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la columna se mantuvo a 45 °C. El afluente de la columna se introdujo en la fuente de ESI conectada a un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple (Quattro-LC, Micromass) funcionando en modo de adquisición para Control de Reacción Múltiple (MRM). Como gas nebulizador se usó nitrógeno a un caudal de 100 l/h y como gas de desolvatación a 930 l/h. Las temperaturas de la fuente de bloqueo iónico y de desolvatación se establecieron respectivamente en 80 °C y 180 °C. El voltaje del capilar era 3,0 kV. Para adquisición y procesamiento de datos se usó la versión 4.0 del software MassLynx. Además, usando espectrometría de masas en configuraciones tanto de MS individual como en MS/MS en tándem se realizaron experimentos de configuración para identificar metabolitos.

55

Cuantificación

60 Una curva de calibración de 5 puntos se preparó diariamente y se inyectó por duplicado. Las muestras de calibración se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de 0,1-20 $\mu\text{mol}/\text{l}$ preparadas en la fase móvil. Los parámetros de la curva de calibración lineal se obtuvieron a partir de la representación del área máxima del analito con respecto a la concentración de analito usando un análisis de regresión de mínimos cuadrados (peso = $1/x^2$). Los coeficientes de correlación fueron $\geq 0,994$. También se calcularon los metabolitos de los compuestos lh3e e li3e conjugados con taurina incluso si los patrones no estaban disponibles para los investigadores. Un factor de corrección para tener en cuenta las diferentes respuestas en ES-MS/MS entre especies libres y conjugados con taurina, calculado previamente y se aplicó a los valores del área obtenidos a partir de los cromatogramas de conjuntos de datos de HPLC-MRM. Por

65

último, las curvas de calibración obtenidas para los BA libres se usaron para calcular los metabolitos conjugados con taurina.

Resultados de Secreción Biliar del Compuesto lh3e

La secreción biliar del compuesto lh3e después de la administración iv era eficaz y el compuesto se recuperó en la bilis en un porcentaje relativamente elevado de la dosis administrada. El perfil cinético indica que el compuesto lh3e era absorbido de forma eficaz por el hígado y secretado en la bilis principalmente sin modificar y también, en menor medida conjugados con taurina (Fig. 24); otros metabolitos secundarios incluyendo glucurónidos se han identificado en la bilis en cantidades traza (Figuras 26 y 27).

La presencia del grupo metilo en la posición C-23 dificulta el proceso de conjugación fisiológica con taurina y glicina que es relevante para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados de origen natural; esto es fundamental para dihidroxi-BA y en menor medida para trihidroxi-BA. El alcance de esta recuperación en bilis también se refiere a la dosis administrada como se ha observado para el ácido cólico (Roda A. et ál. Hepatology. 8,1571-6,1988).

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del compuesto lh3e, los investigadores esperaban que este compuesto se podría absorber mediante un mecanismo de difusión pasiva ($\log P = 1,44$) y no parecía que estuviera implicado un mecanismo activo. La presencia de tres grupos hidroxilo permite que la molécula sea absorbida de forma eficaz por el hígado y secretada parcialmente en la bilis. El grupo 6-etilo también evita la 7-deshidroxilación de bacterias intestinales como se ha mostrado en el que informe previo.

Resultados de Secreción Biliar del Compuesto li3e

La secreción biliar del compuesto li3e después de la infusión iv se informa en la Figura 25. El perfil cinético indica que el compuesto se metaboliza en el hígado más ampliamente que el compuesto lh3e. El compuesto precursor se secreta en la bilis como tal y en menor medida como conjugado de taurina. Con respecto a su compuesto diastereoisómero lh3e, el porcentaje de conjugación es más elevado y la tasa secreción máxima de la forma no conjugada es menor. Esto sugiere que el isómero C-23(R) presenta una geometría de cadena lateral y orientación más adecuada para el proceso de amidación con respecto al isómero (S) que es secretado como forma no conjugada en un porcentaje más elevado. La conjugación con taurina contribuye a mejorar la recuperación del compuesto li3e en la bilis que es de aproximadamente un 70-80 % de la dosis administrada. Otros metabolitos secundarios incluyendo glucurónidos se han identificado en la bilis en cantidades traza (Fig 28-29).

Metabolismo Hepático

Métodos

Usando los datos obtenidos a partir de experimentos previos así como propiedades estructurales y fisicoquímicas de los análogos estudiados, se realizó una identificación sistemática preliminar para buscar los posibles metabolitos.

Compuesto lh3e

Esta molécula se secretaba principalmente como compuesto precursor (sin modificar) y era metabolizada solo ligeramente por el hígado. El metabolito principal era la especie de conjugado de taurina y, a niveles muy bajos, se detectó la especie de mono glucurónido (Fig. 26-27).

La presencia del grupo metilo en la posición C-23 impide el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados de origen natural; esto es fundamental para el dihidroxi BA y en menor medida para el trihidroxi BA dado que son bastante polares. La formación de glucurónidos podría llegar a ser relevante si se administrara a dosis más elevadas.

Compuesto li3e

Esta molécula se secretaba principalmente como compuesto precursor (sin modificar) y también era metabolizada por el hígado para formar la especie de conjugado de taurina y, a niveles muy bajos, la especie de mono glucurónido. (Fig. 27-29).

La presencia del grupo metilo en la posición C-23 impide el proceso de conjugación con taurina y glicina que se requiere para una secreción eficaz de casi todos los BA carboxilados de origen natural; esto es fundamental para el dihidroxi BA y en menor medida para el trihidroxi BA, dado que son bastante polares. La formación de glucurónidos podría llegar a ser relevante si se administrara a dosis más elevadas.

El Compuesto li3e se secreta en la bilis con un porcentaje más elevado que el compuesto diastereoisómero lh3e en forma de conjugado de taurina, un 20-30 % con respecto a un 5-10 % esto se refiere a la geometría de la cadena lateral diferente y a una lipofilia ligeramente más elevada del compuesto li3e.

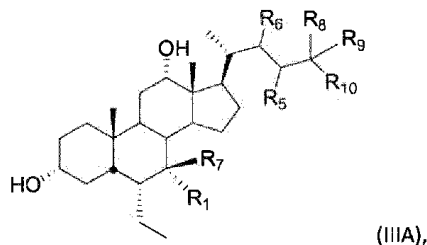
5 El Compuesto lh3e es moderadamente hidrófilo y tiene una capacidad detergente suave. Su absorción hepática parece eficaz. La secreción biliar también es eficaz teniendo en cuenta que el compuesto se secreta principalmente sin modificar y, en menor medida, conjugados con taurina. La absorción intestinal se produce a través del mecanismo pasivo como el BA sin conjugar de origen natural y la cinética es similar a la del ácido cólico ligeramente menor que la de los ácidos biliares dihidroxi (Aldini R. et ál. Steroids 61, 590-7, 1996).

10 El Compuesto lh3e no requiere un amplio metabolismo hepático a la dosis administrada para ser secretario en la bilis. La presencia del grupo metilo en la posición C-23 (S) edita una amplia conjugación con la taurina y la molécula se puede secretar sin modificar de forma eficaz. Un aumento del tiempo de permanencia hepático de la molécula resulta de la absorción ductal ya que esta molécula experimenta una ruta de desviación colehepática, que Es responsable de su potente efecto colerético.

15 El Compuesto li3e es el diastereoisómero del compuesto lh3e. El Compuesto li3e se caracteriza por una hidrofilia ligeramente menor como resultado de la geometría diferente de la cadena lateral. Por lo tanto, el grupo carboxi en C-23 está orientado de forma diferente y esto representa el equilibrio hidrófilo-hidrófobo diferente de la molécula. Como consecuencia de su lipofilia más elevada, la molécula requiere una conjugación más amplia con la taurina con respecto al compuesto lh3e. La geometría de la cadena lateral del último compuesto produce probablemente un BA con una especificidad de sustrato menor hacia la enzima responsable de la conjugación mediada por el proceso de activación de CoA. El resultado final es que el compuesto li3e se secreta en la bilis en un porcentaje conjugado más elevado que
20 el compuesto lh3e.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula IIIA:



5

o una sal, solvato, o hidrato del mismo, en la que:

- 10 R₁ es hidrógeno, hidroxilo, o halógeno;
 R₃ es hidroxilo, NH(CH₂)_mSO₃H, o NH(CH₂)_nCO₂H;
 R₅ es alquilo sin sustituir o sustituido, o arilo;
 R₆ es hidrógeno; o
 R₅ y R₆ tomados junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo con un tamaño de 3, 4, 5 o 6 átomos;
 15 R₇ es hidrógeno, alquilo sin sustituir o sustituido, o hidroxilo;
 R₈ es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido;
 R₉ es hidrógeno, o alquilo sin sustituir o sustituido; o
 R₈ y R₉ tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo;
 R₁₀ es R₃ o SO₃H;
 20 m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y
 n es un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5,
 en el que dicho alquilo incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo, grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo, y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo, y
 25 en el que dicho arilo incluye grupos con aromaticidad, grupos arilo multicíclicos y heteroarilos.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₈ y R₉ tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo.
- 30 3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que R₁₀ es R₃.
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R₃ se selecciona entre hidroxilo, NH(CH₂)₂SO₃H, y NHCH₂CO₂H.
- 35 5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R₆ es hidrógeno.
6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R₅ está en la configuración S.
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R₅ es alquilo sin sustituir.
- 40 8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que R₅ es metilo.
9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos Ig3e, li3e, Ig4e, lh4e, li4e, Ig5e, lh5e, e li5e.
- 45 10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos Ig3e, li3e, Ig4e, lh4e, li4e, Ig5e, lh5e, li5e, Ig9e, lh9e, li9e, Ig10e, lh10e, li10e, Ig11e, lh11e, li11e, Ig15e, lh15e, li15e, Ig16e, lh16e, li16e, Ig17e, lh17e, e li17e.
- 50 11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en las que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55

13. Un compuesto para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto, método que comprende administrar un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que adicionalmente la enfermedad se selecciona entre enfermedad metabólica, enfermedad inflamatoria, enfermedad hepática, enfermedad autoinmune, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, cáncer, y enfermedad gastrointestinal.

5

14. Un kit para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto, en el que el kit comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o una sal, solvato, o hidrato del mismo.

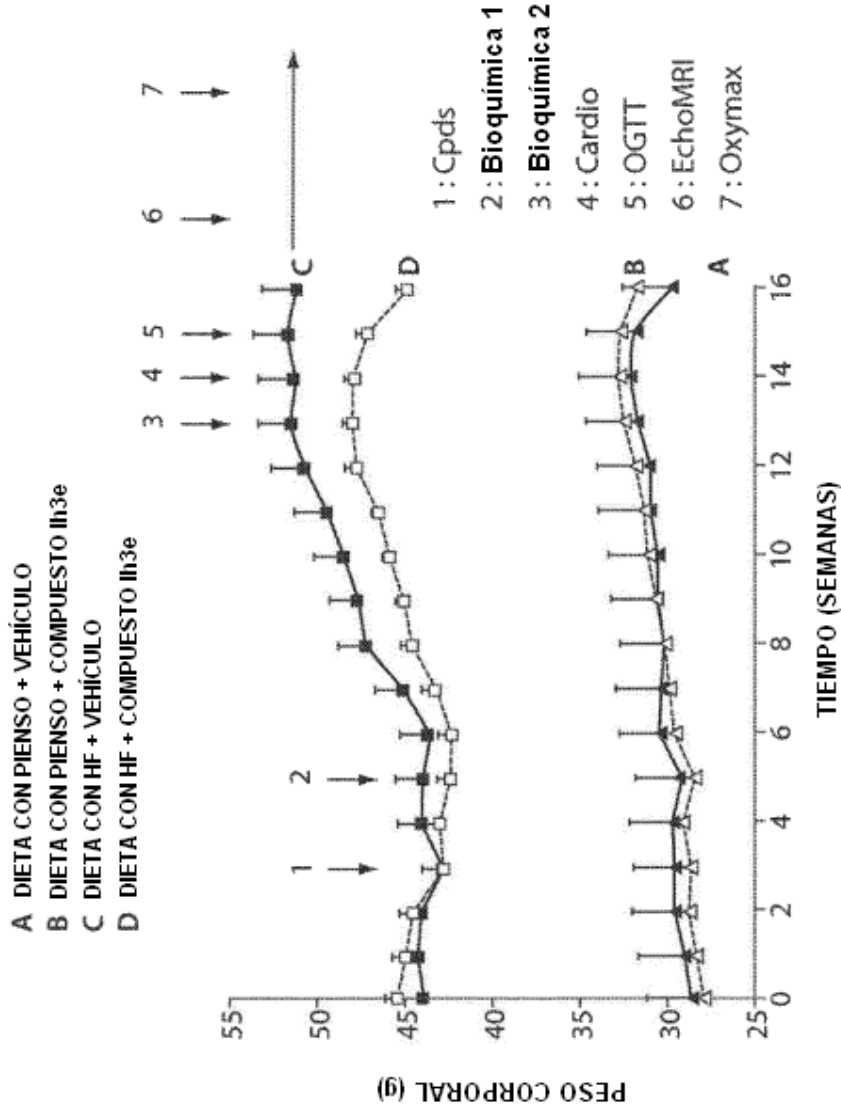


Fig. 1





- A  DIETA CON PIENSO + VEHICULO C  DIETA CON HF + VEHICULO
B  DIETA CON PIENSO + 6-Et,23(S)-Me CA D  DIETA CON HF + 6-Et,23(S)-Me CA

Fig. 2

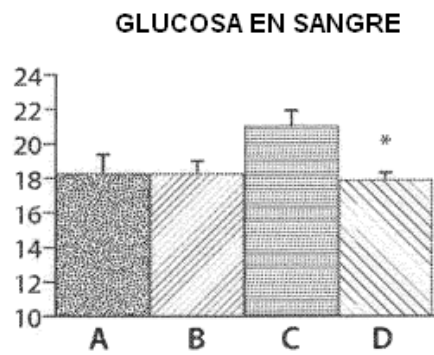


Fig. 2A

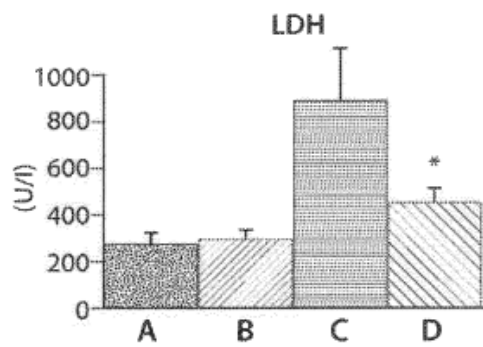


Fig. 2B

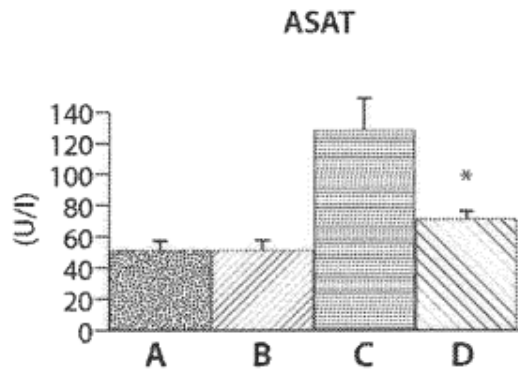


Fig. 2C

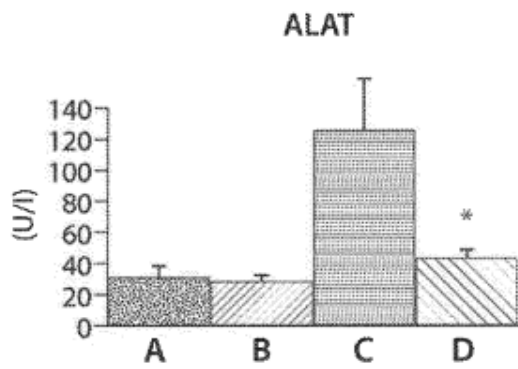


Fig. 2D

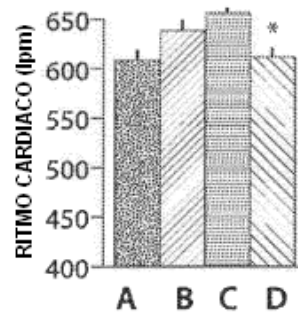


Fig. 2E

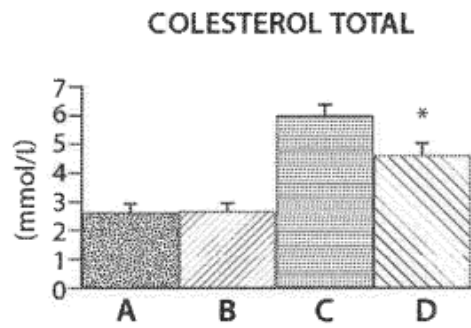


Fig. 2F

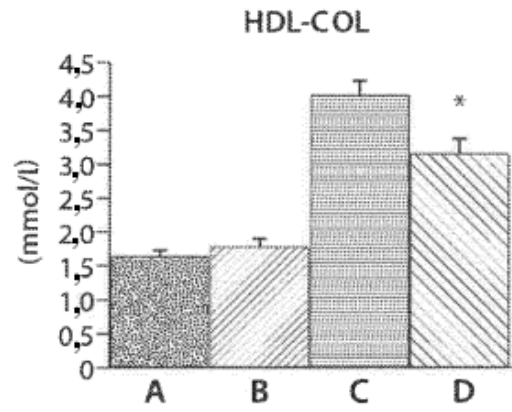


Fig. 2G

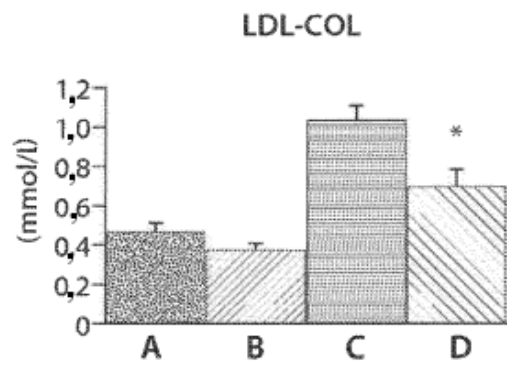


Fig. 2H

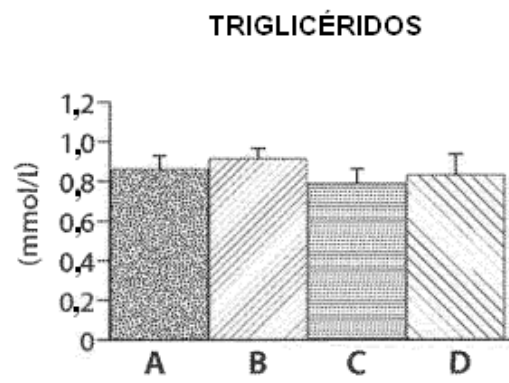


Fig. 2I

SEGUIMIENTO DE INSULINA EN PLASMA

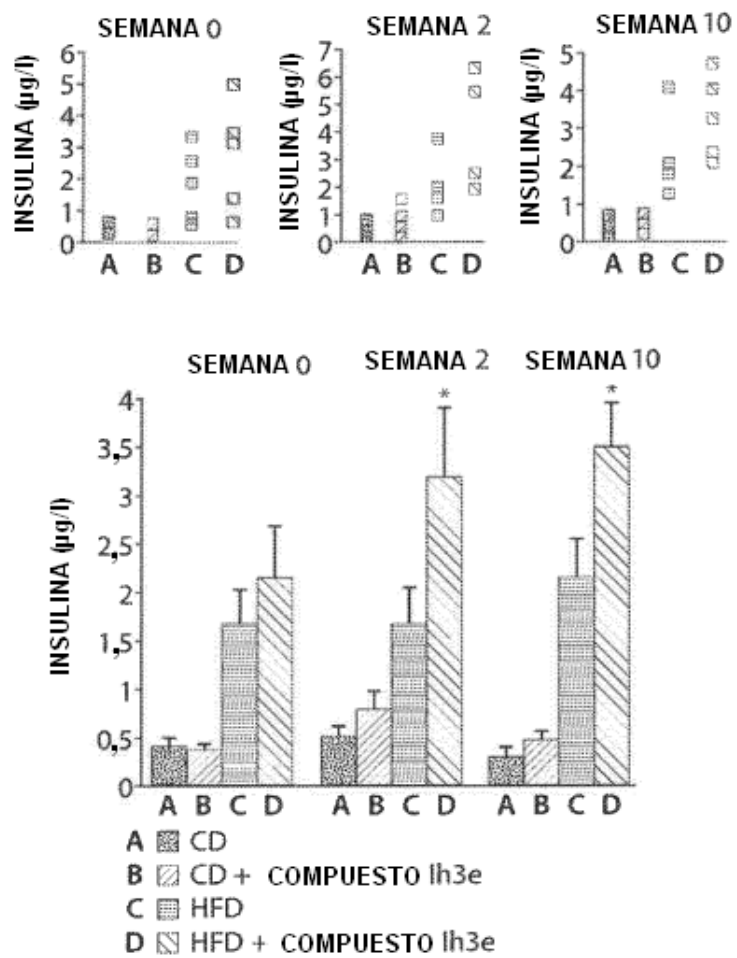


Fig. 3A

ENSAYO DE TOLERANCIA A GLUCOSA ORAL

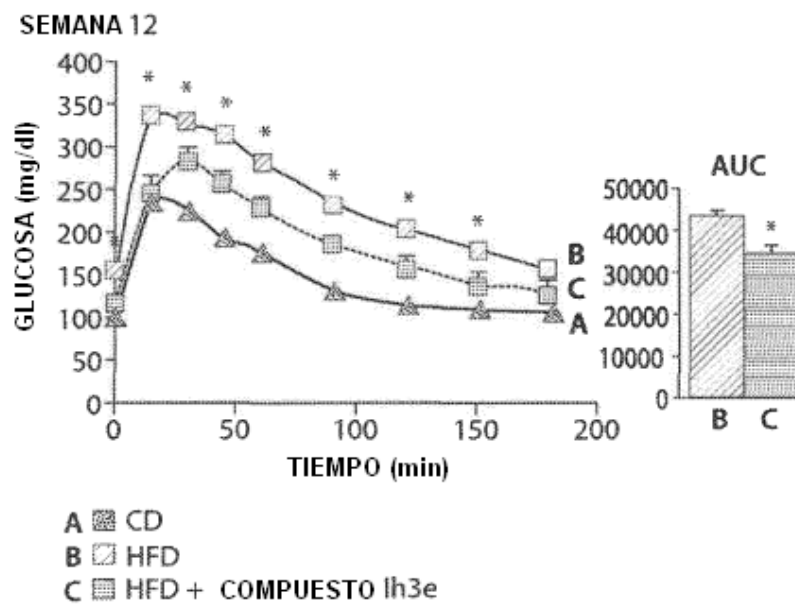


Fig. 3B

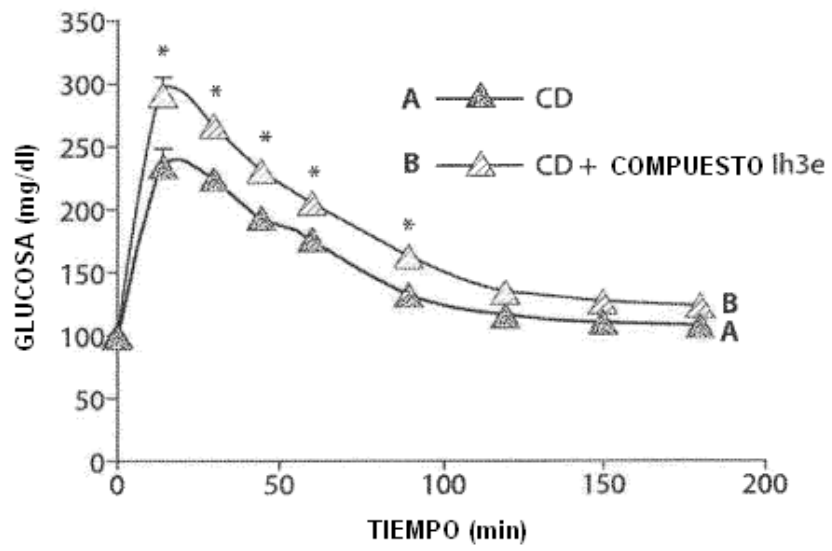


Fig. 4

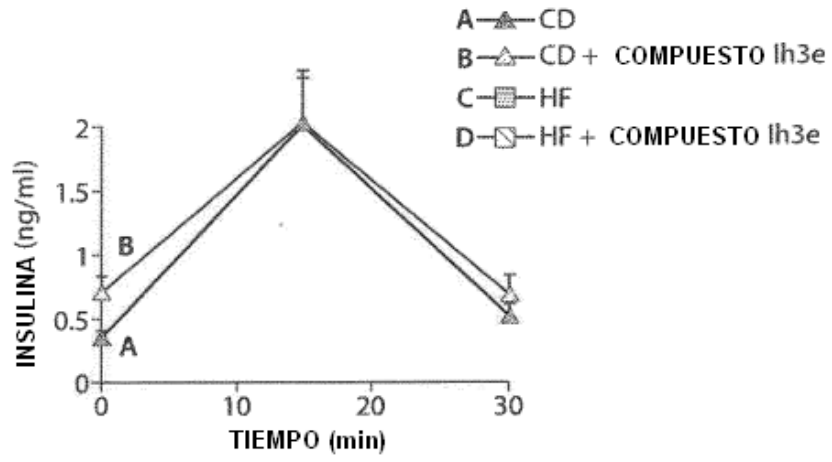


Fig. 5A

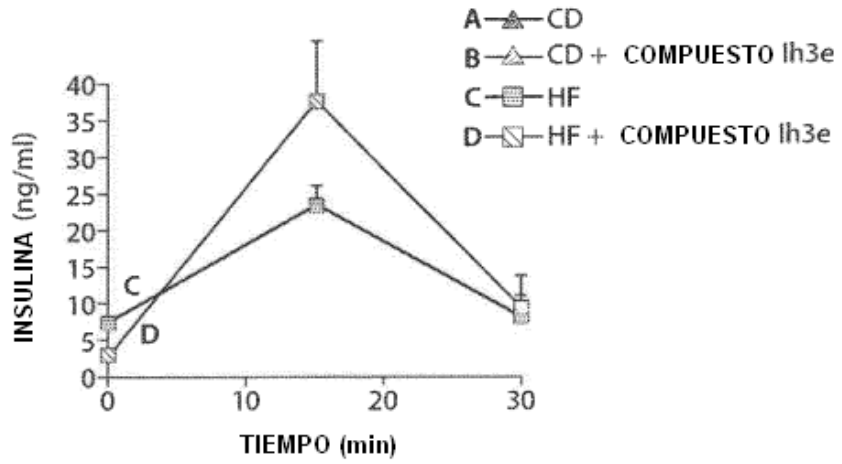


Fig. 5B

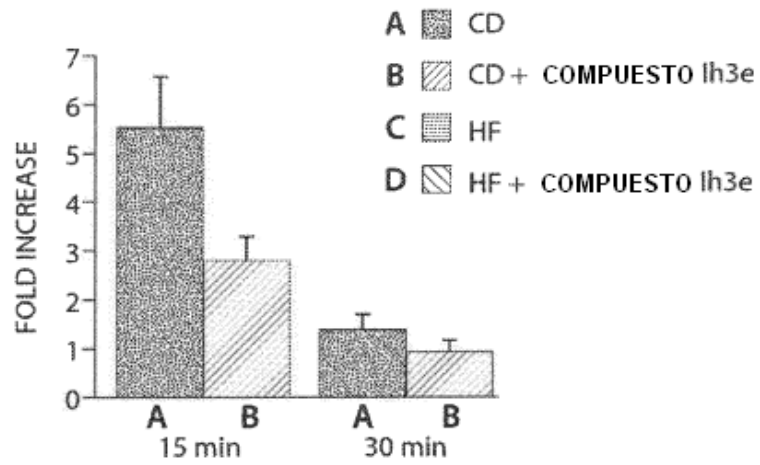


Fig. 5C

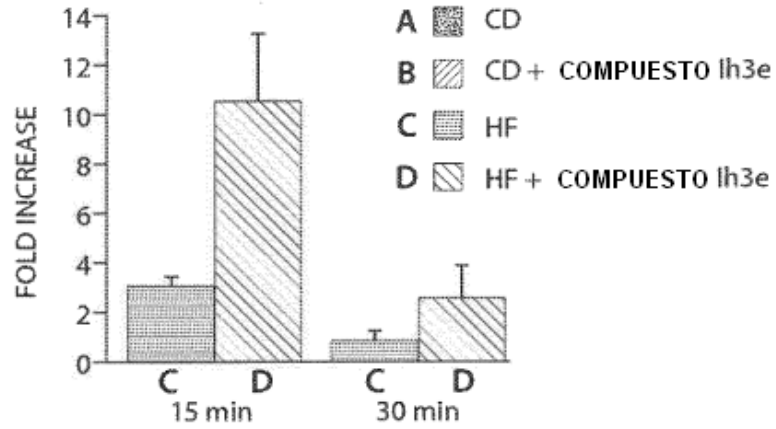


Fig. 5D





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

Fig. 6

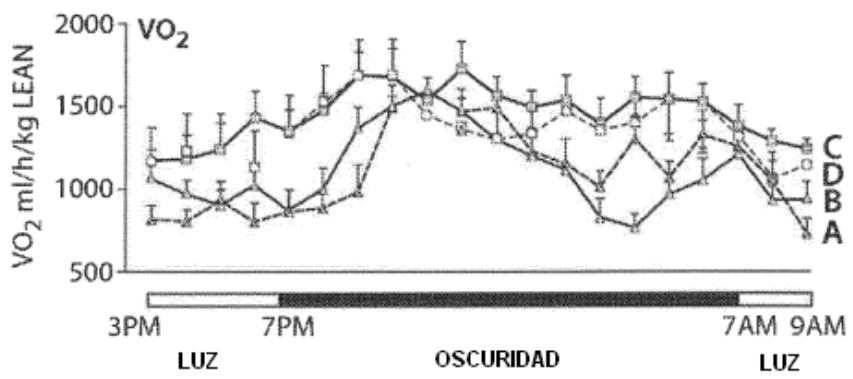


Fig. 6A

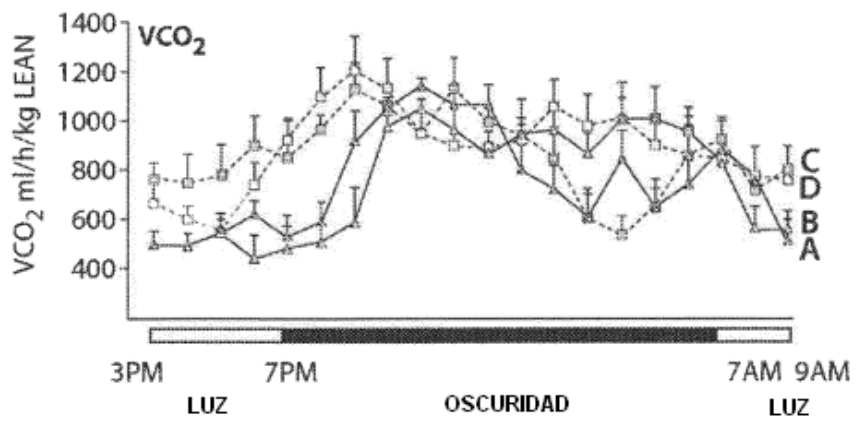


Fig. 6B

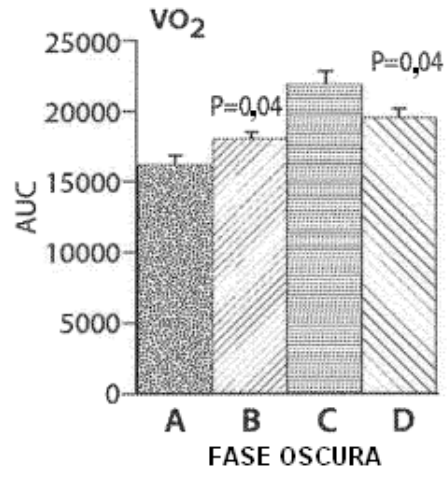


Fig. 6C

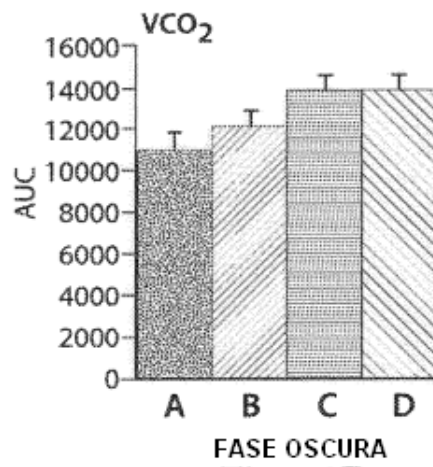


Fig. 6D

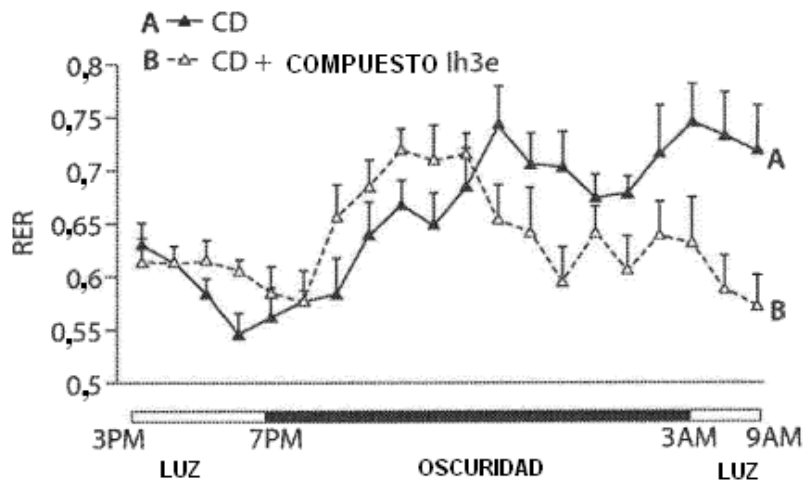


Fig. 7A

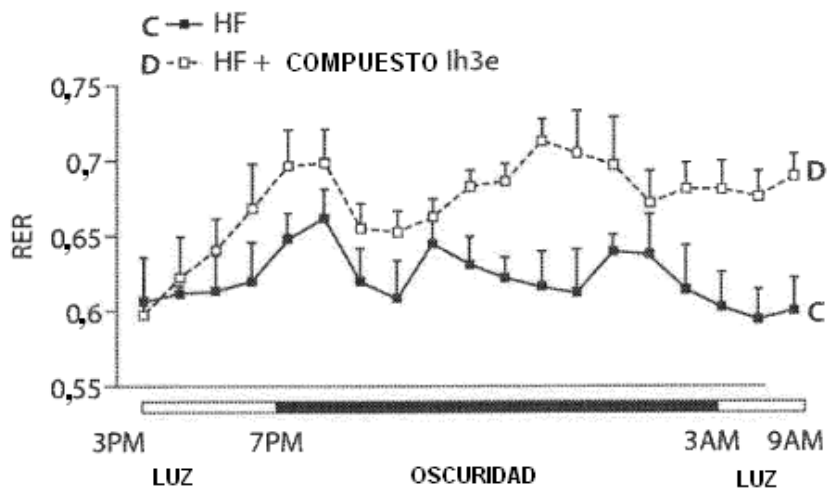


Fig. 7B

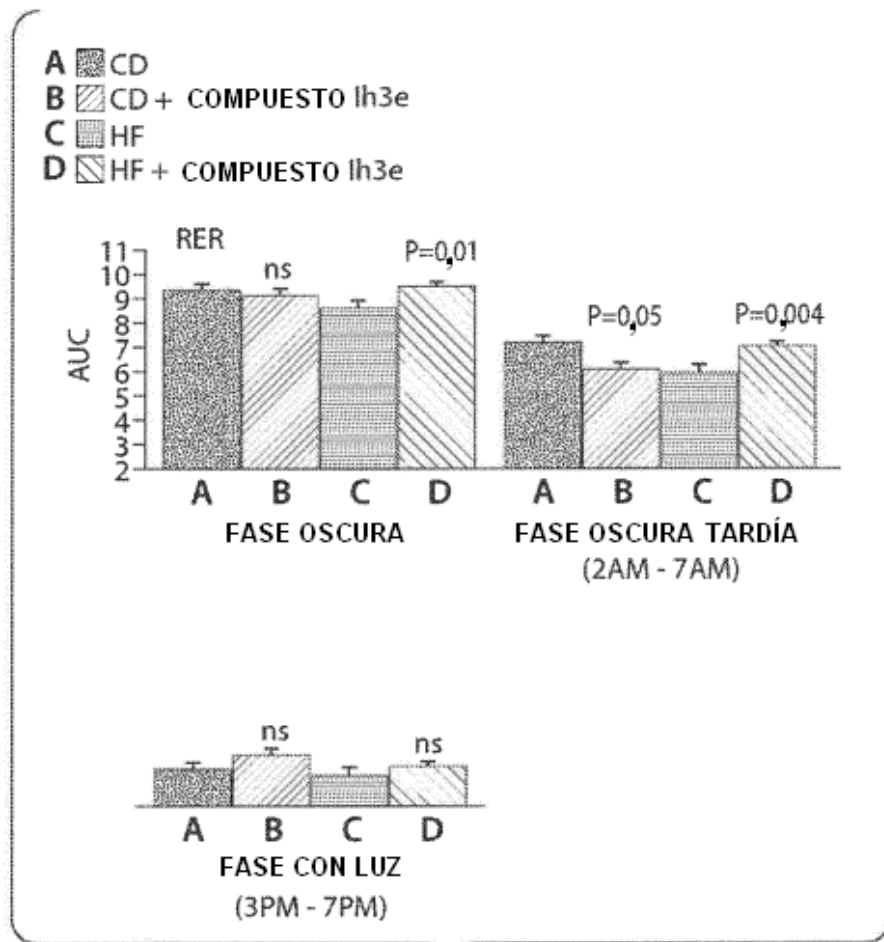


Fig. 7C

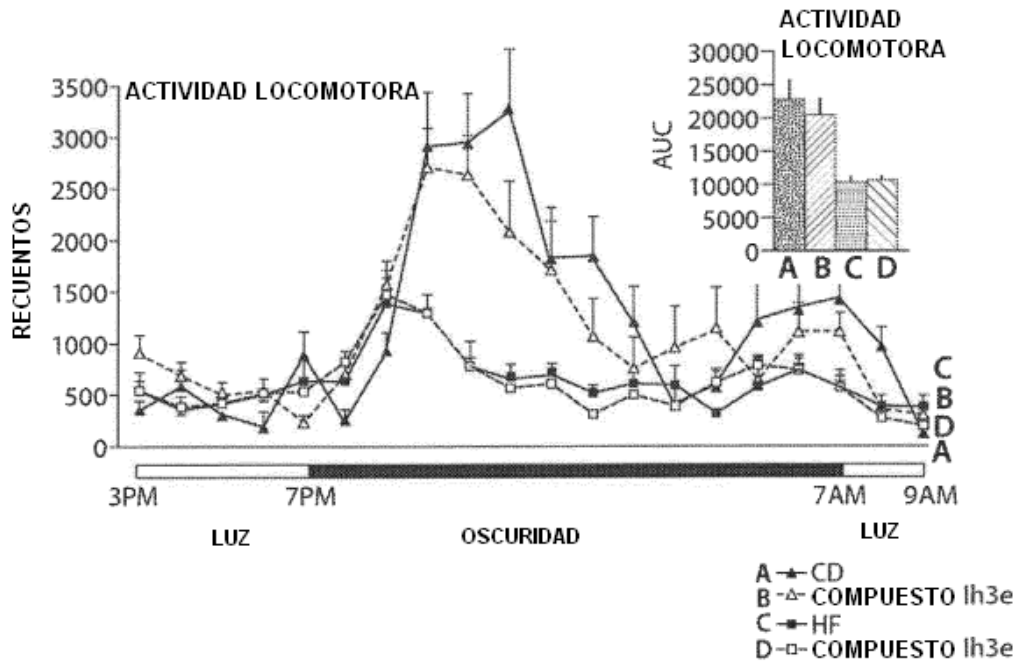


Fig. 8A

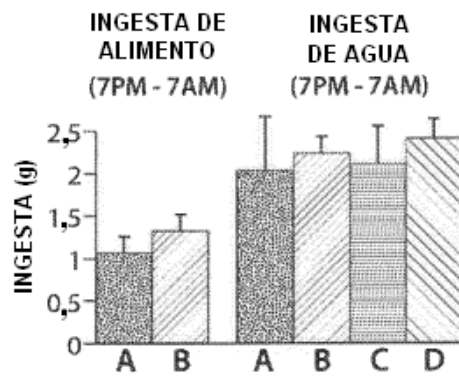


Fig. 8B





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

Fig. 9

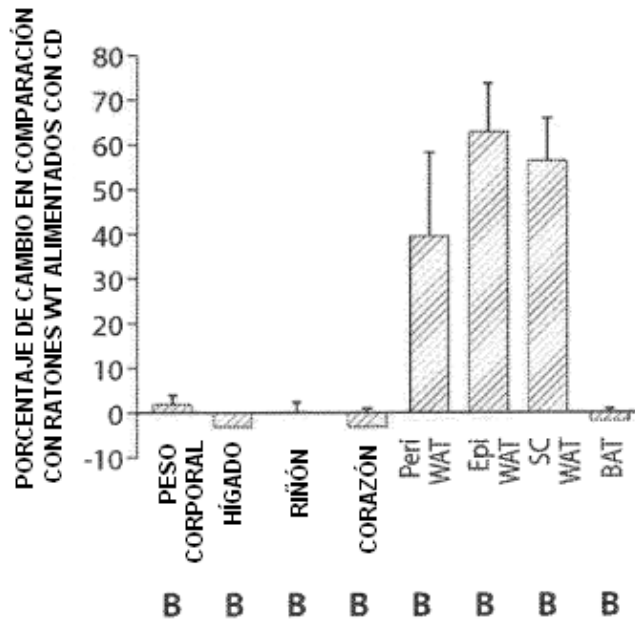


Fig. 9A

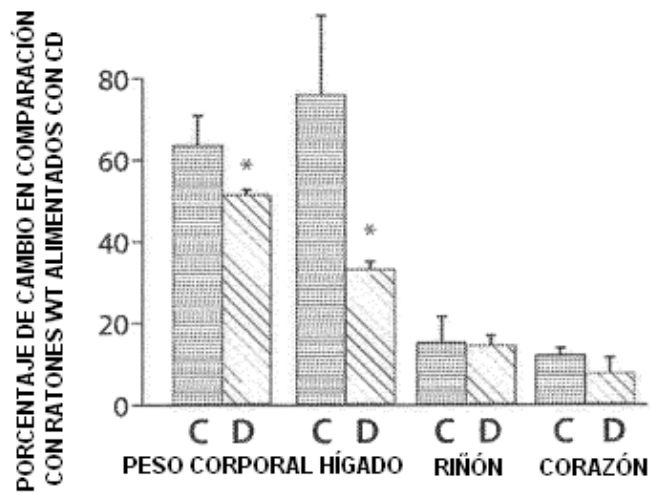


Fig. 9B

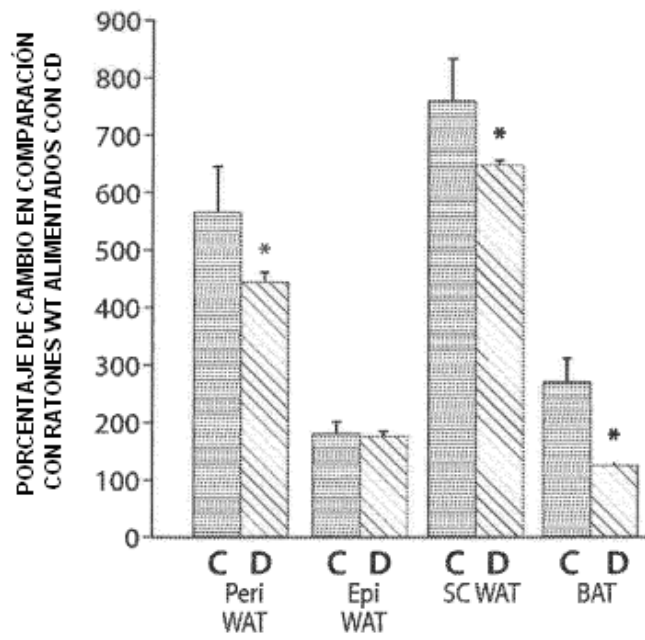


Fig. 9C

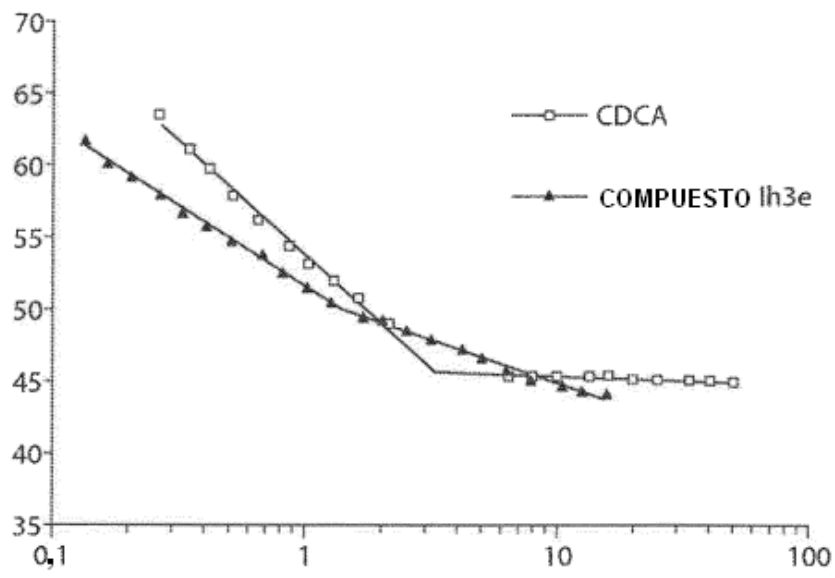


Fig. 10

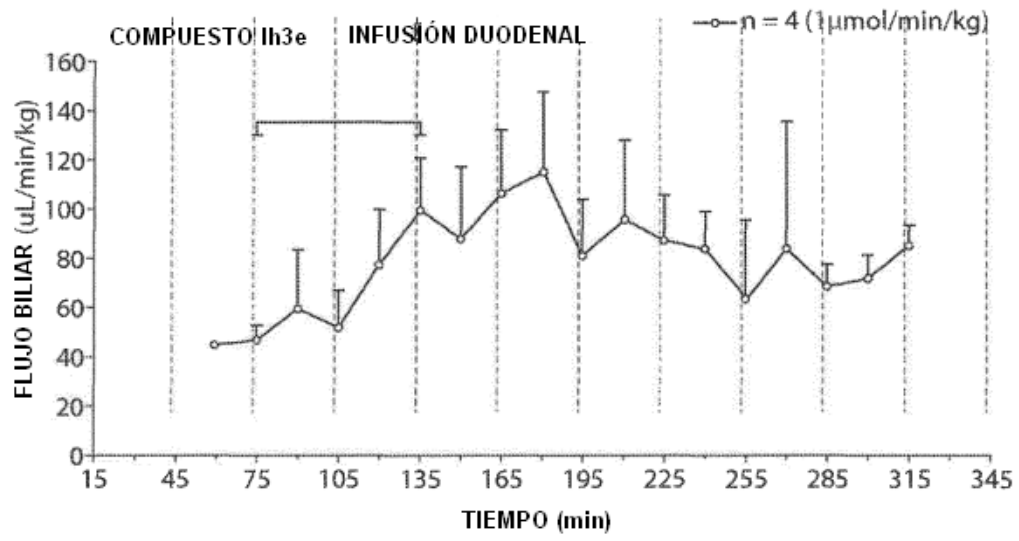


Fig. 11

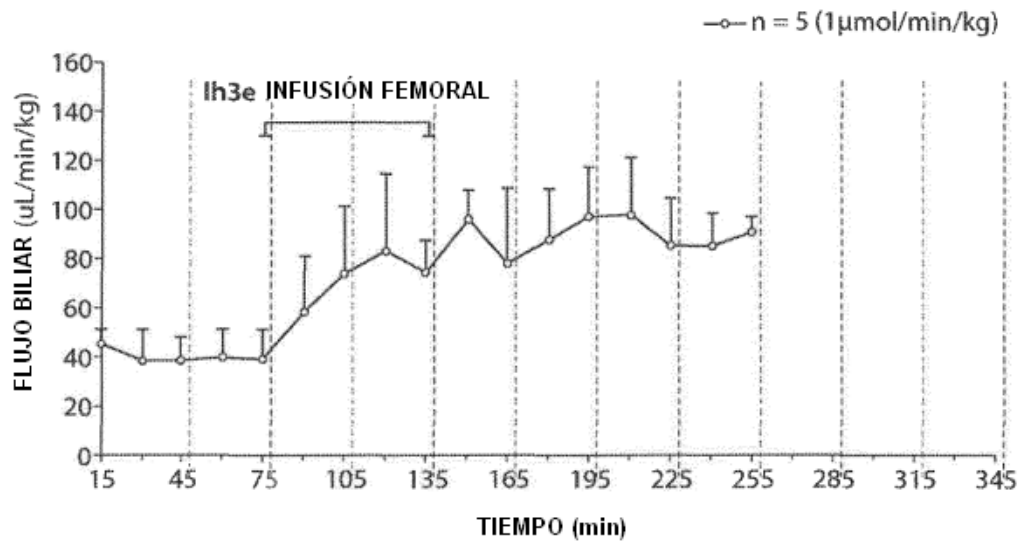


Fig. 12

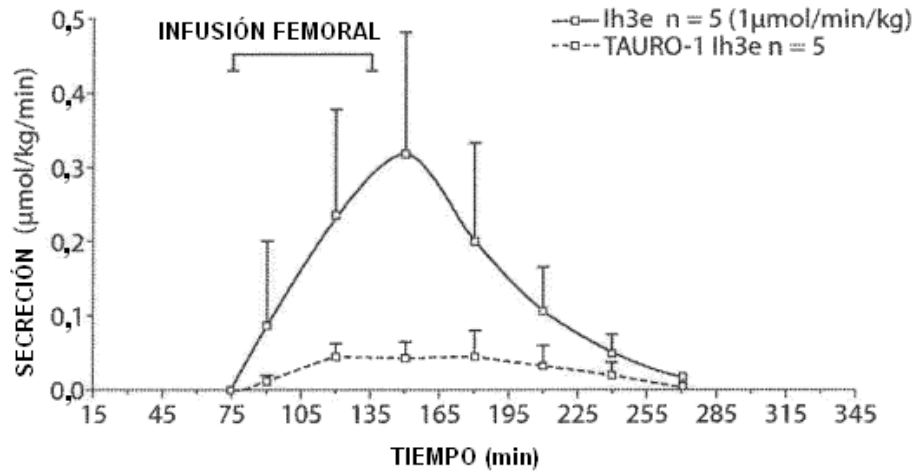


Fig. 13

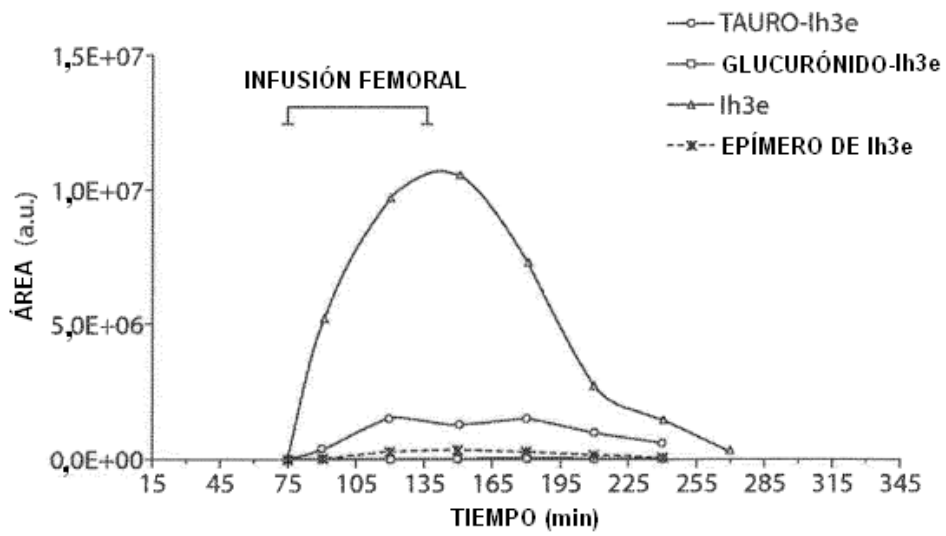
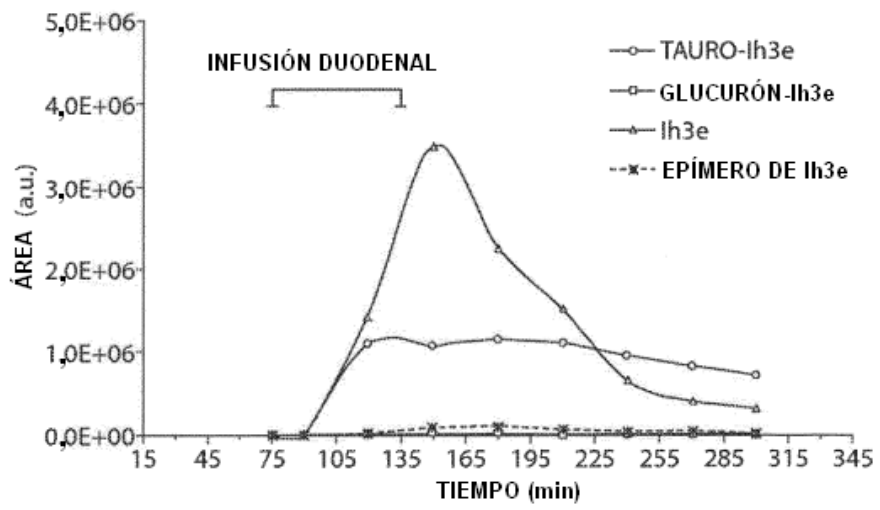
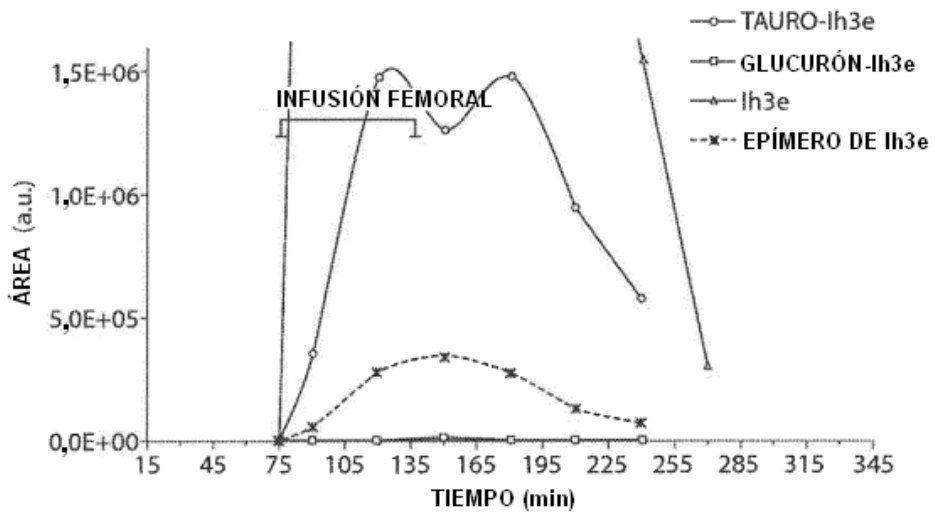


Fig. 14A



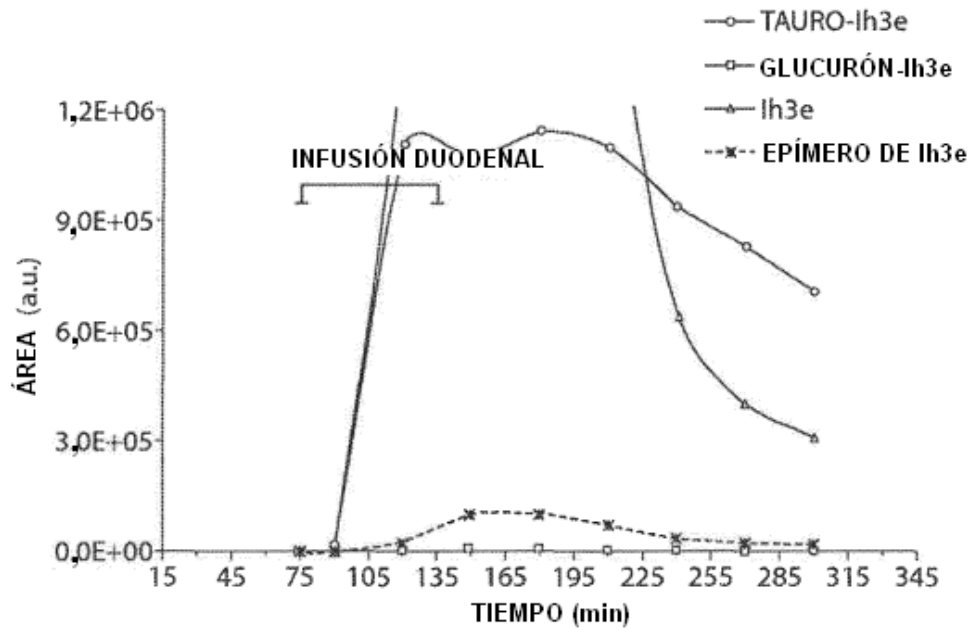


Fig. 14D

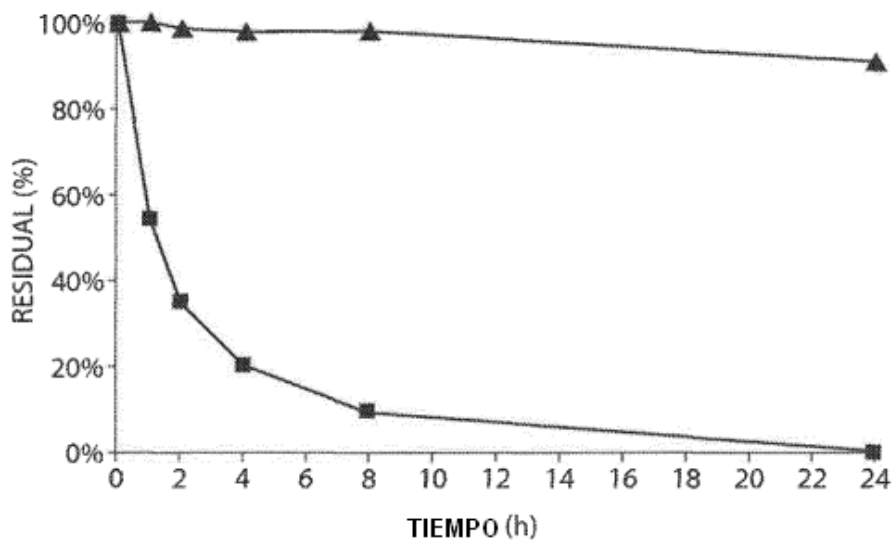


Fig. 15

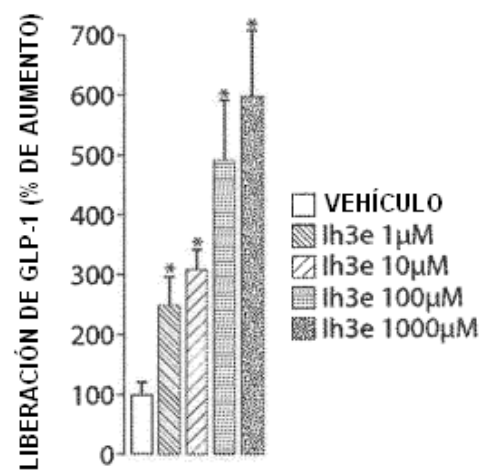


Fig. 16

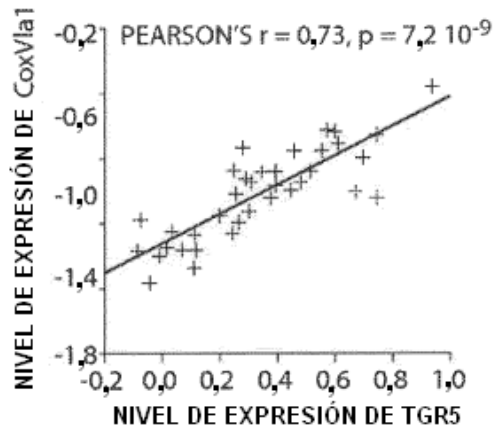


Fig. 17A

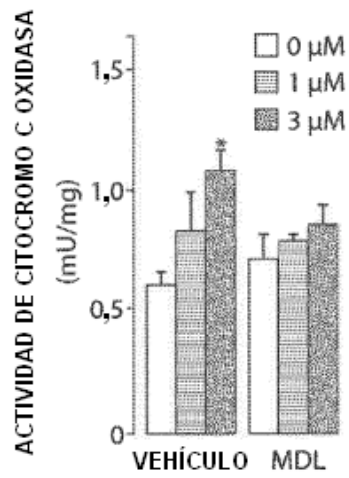


Fig. 17B

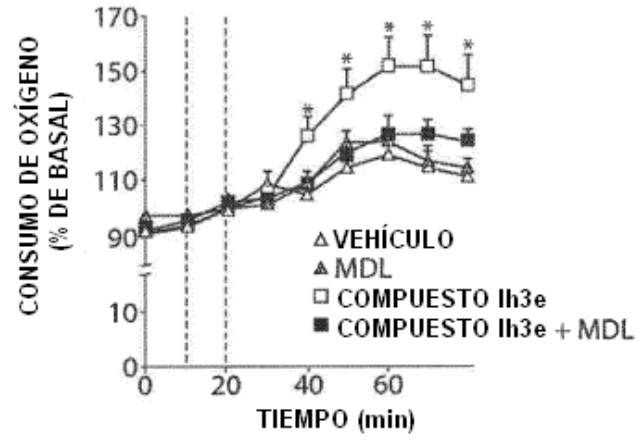


Fig. 17C

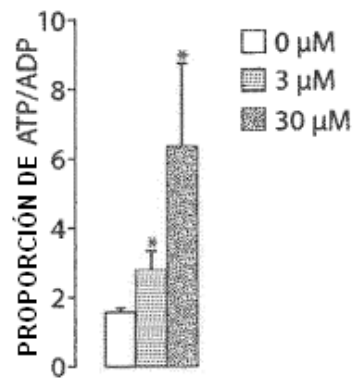


Fig. 17D

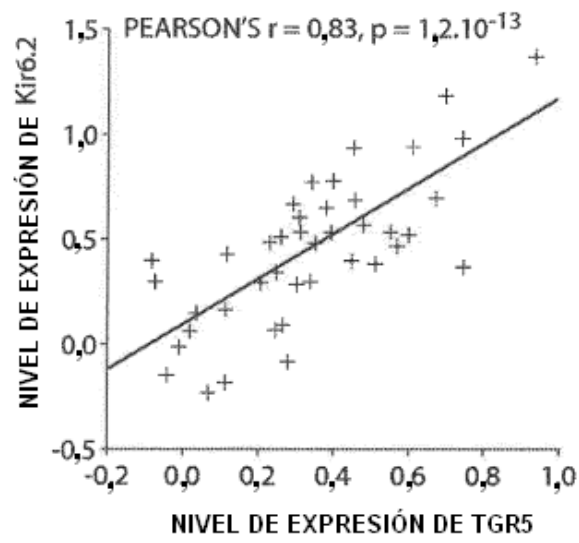


Fig. 17E

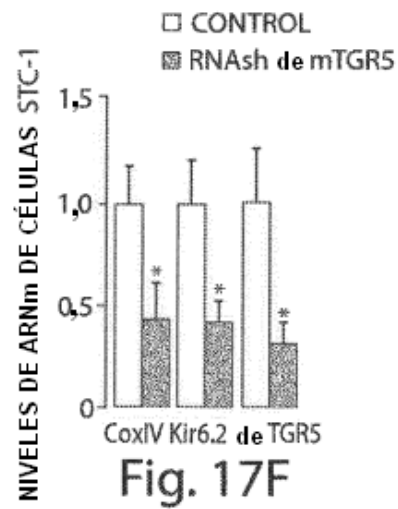


Fig. 17F

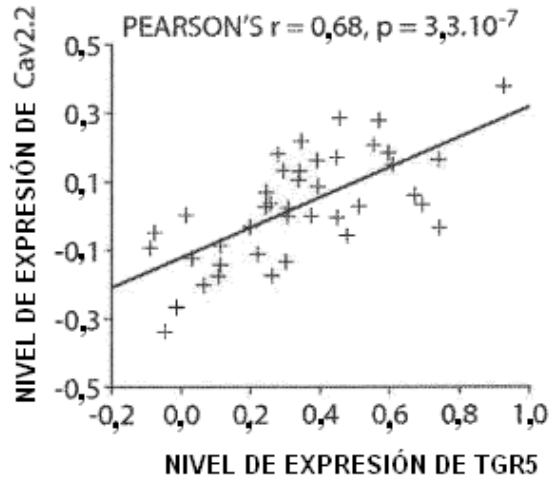


Fig. 18A

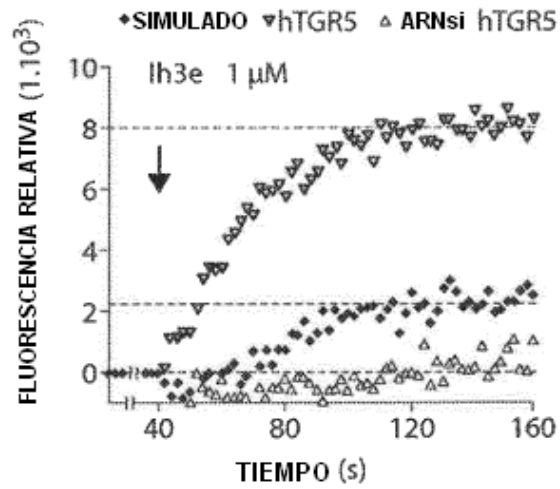


Fig. 18B

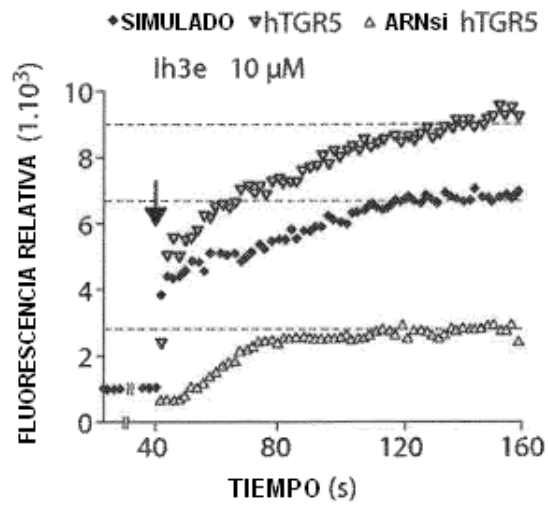


Fig. 18C

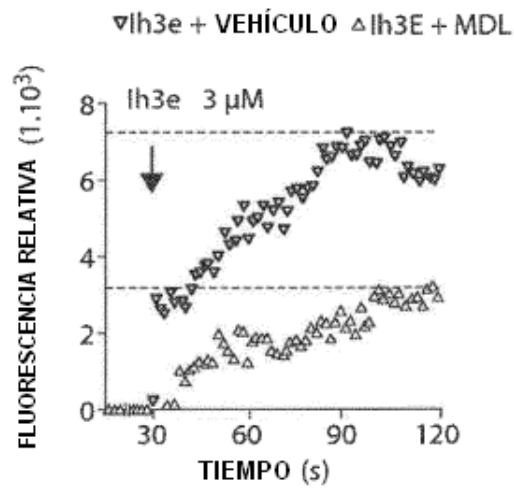


Fig. 18D

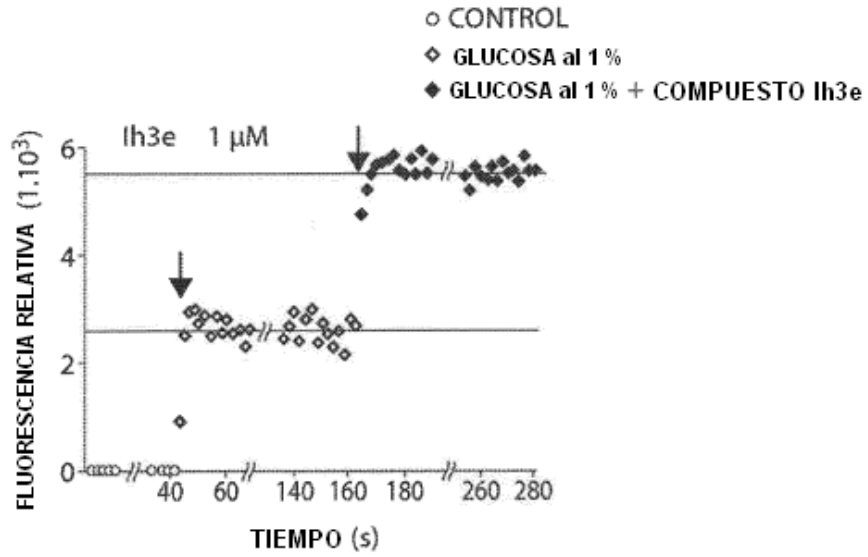


Fig. 18E

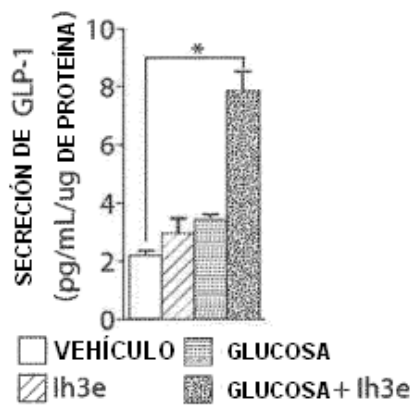


Fig. 18F

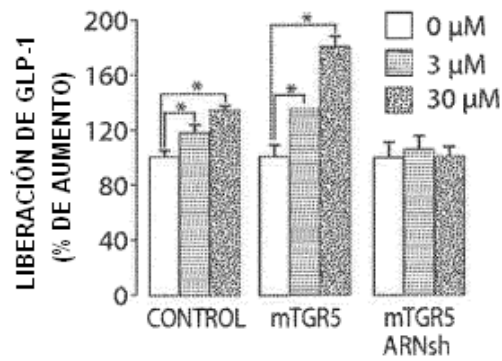


Fig. 18G

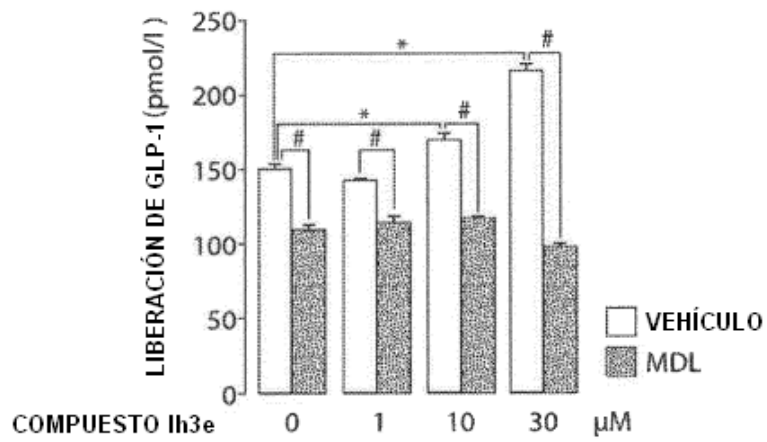


Fig. 18H

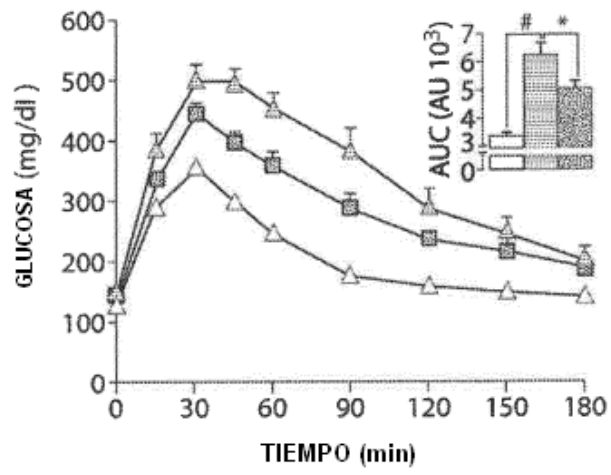


Fig. 19A

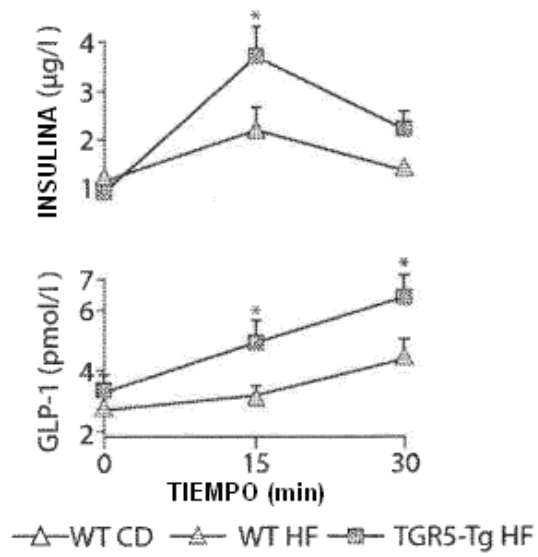


Fig. 19B

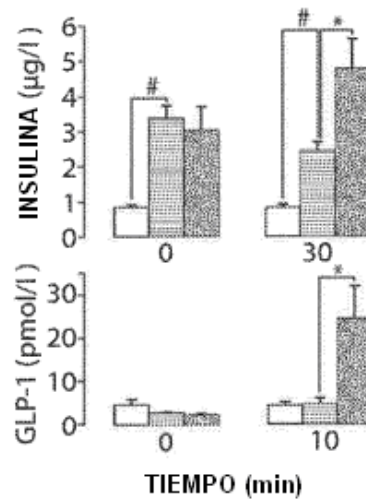


Fig. 19C

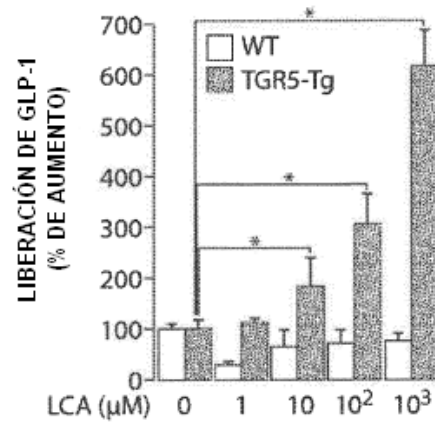


Fig. 19D

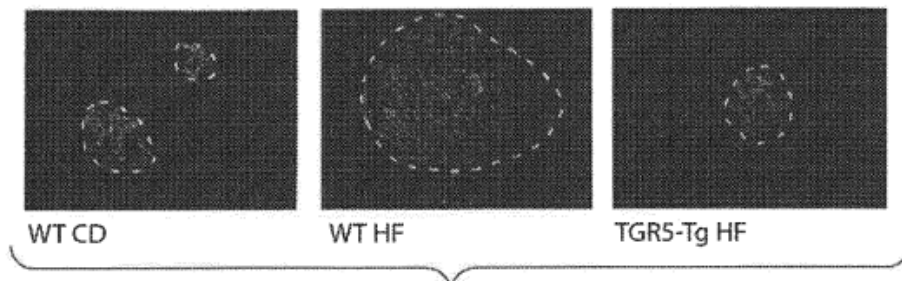


Fig. 19E

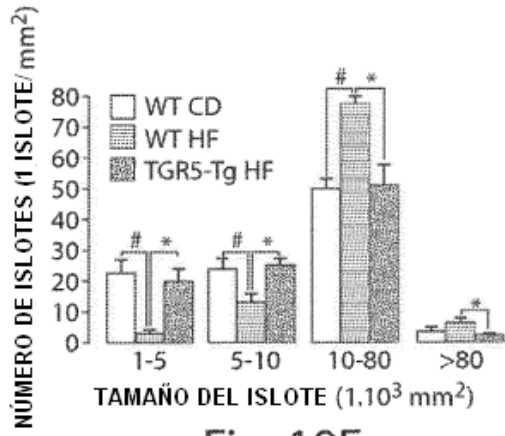


Fig. 19F

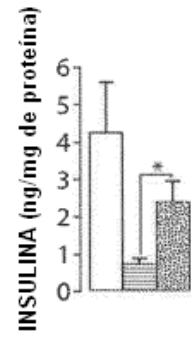


Fig. 19G

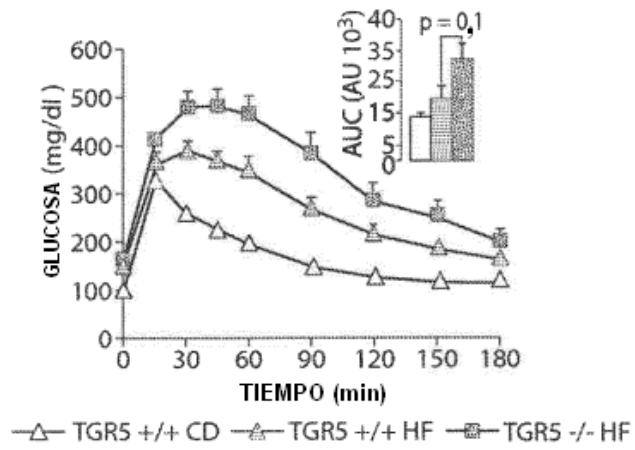


Fig. 19H

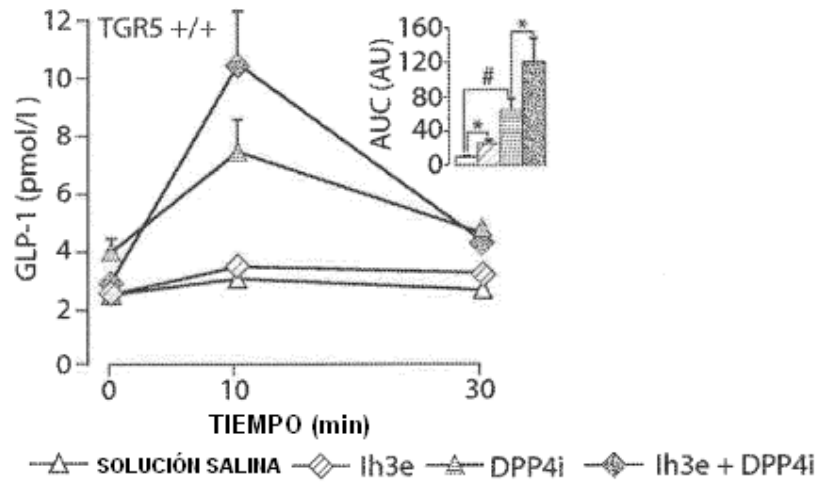


Fig. 19I

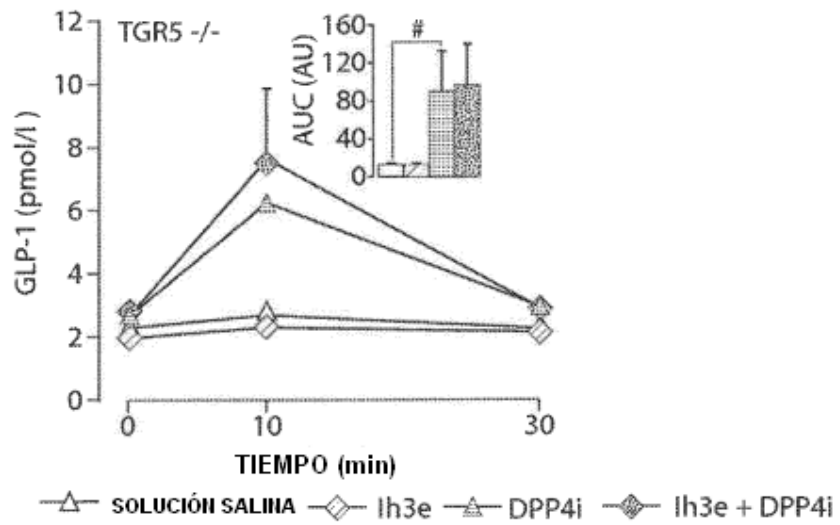


Fig. 19J

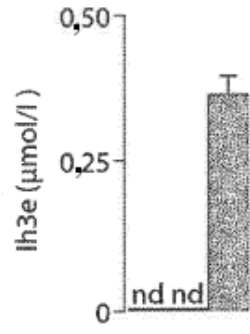


Fig. 20A

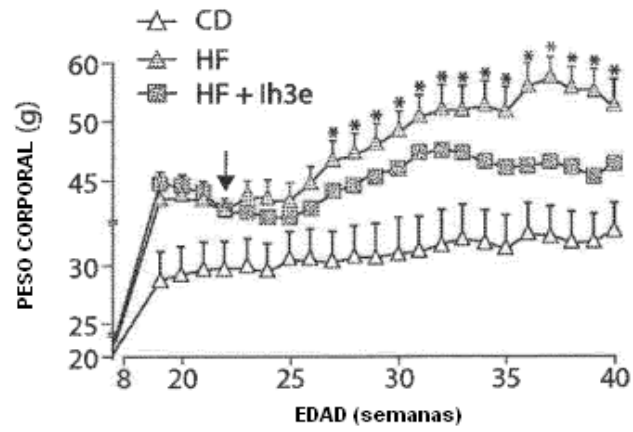


Fig. 20B

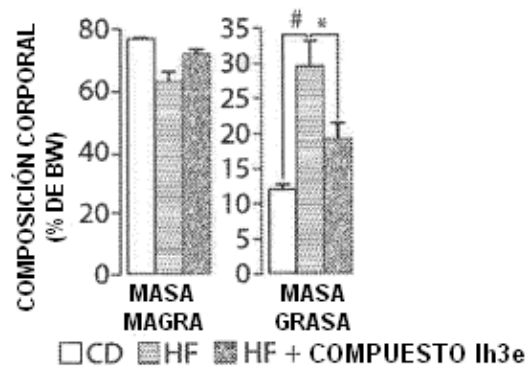


Fig. 20C

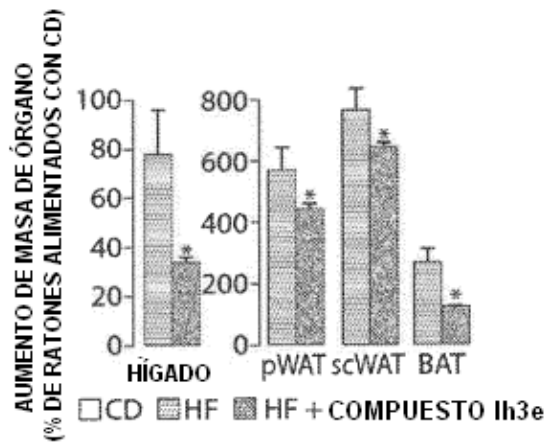


Fig. 20D

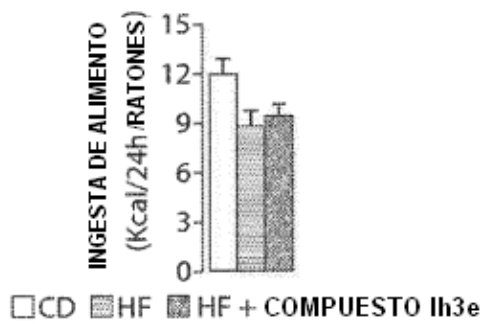


Fig. 20E

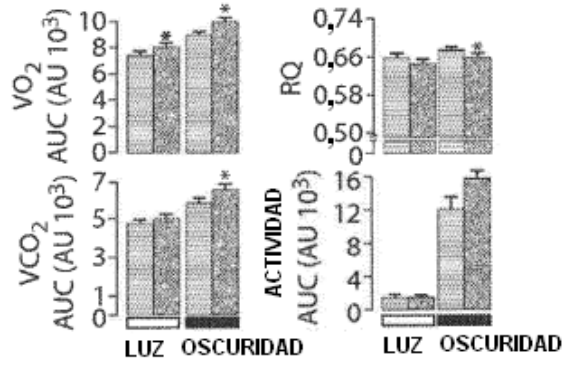


Fig. 20F

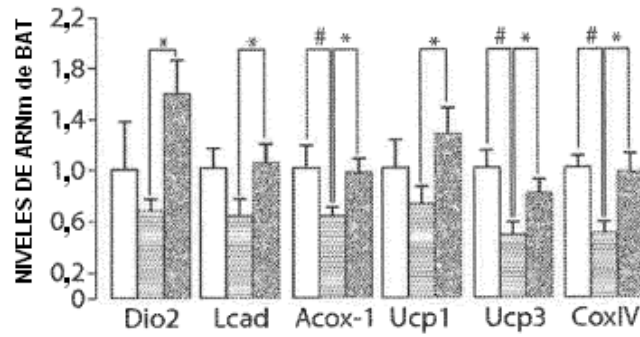


Fig. 20G

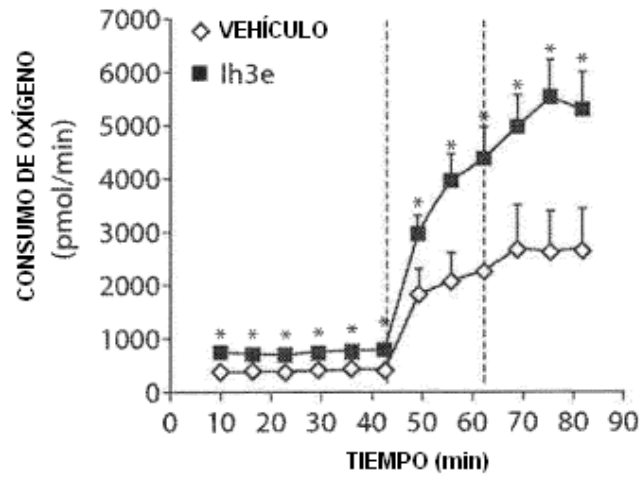


Fig. 20H

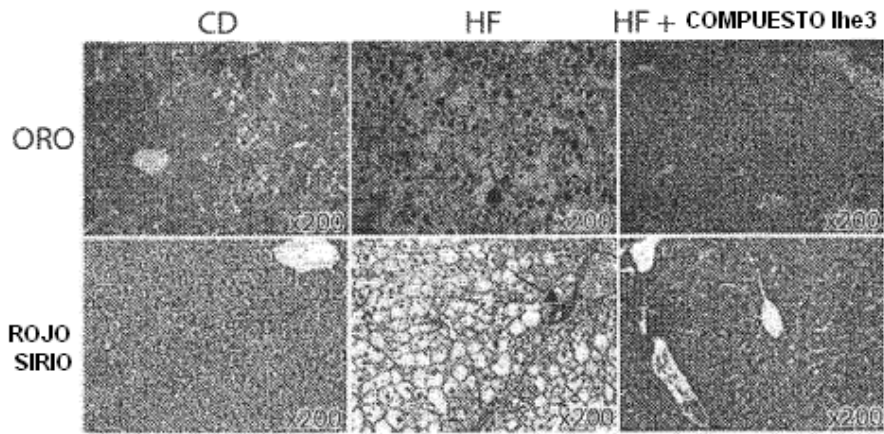


Fig. 20I

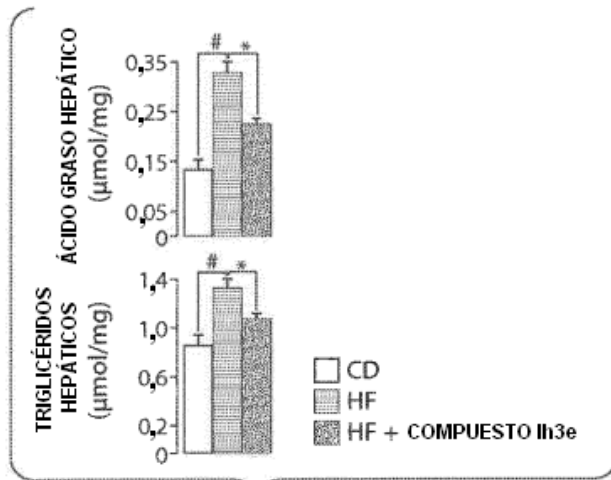


Fig. 20J

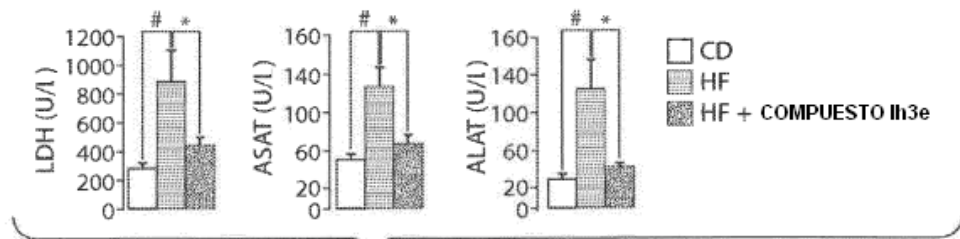


Fig. 20K

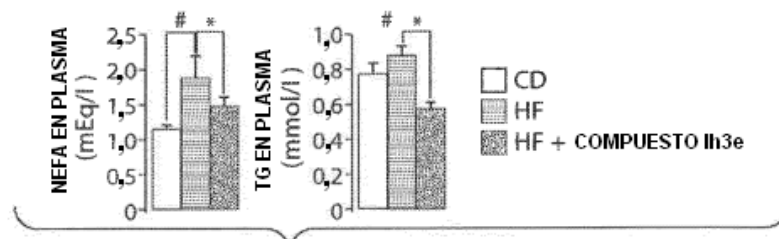


Fig. 20L

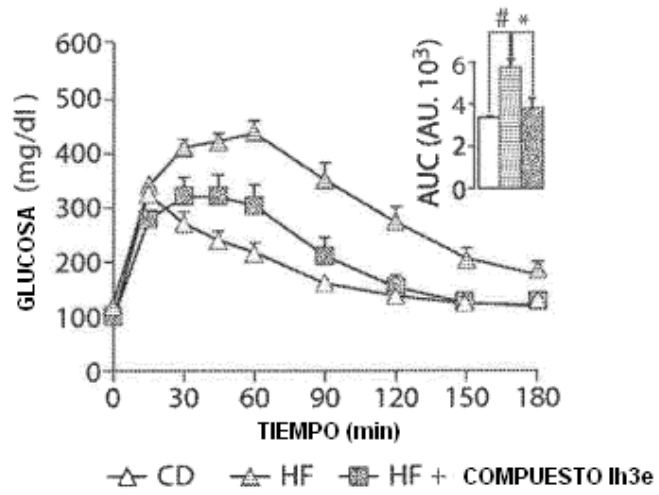


Fig. 21A

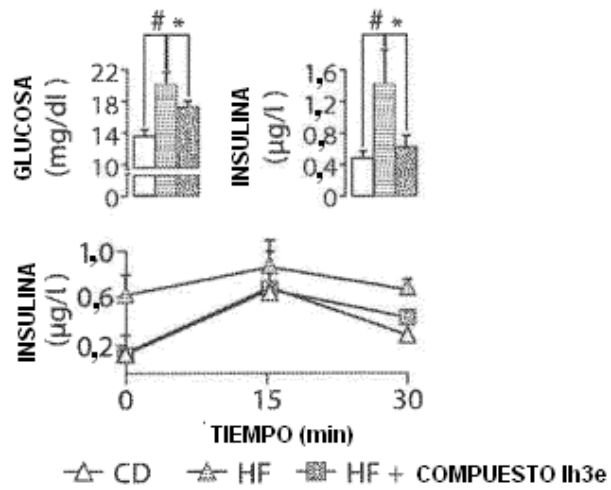


Fig. 21B

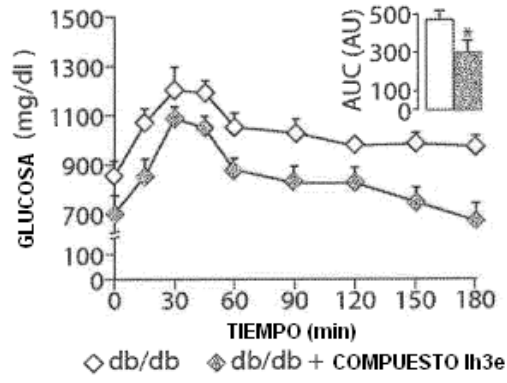


Fig. 21C

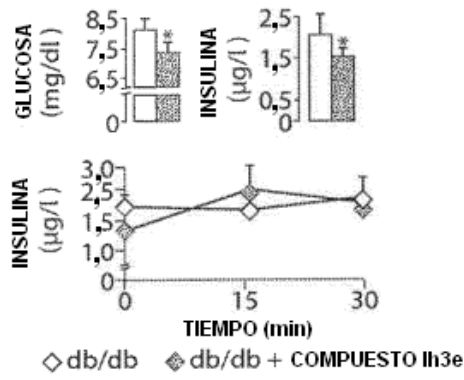


Fig. 21D

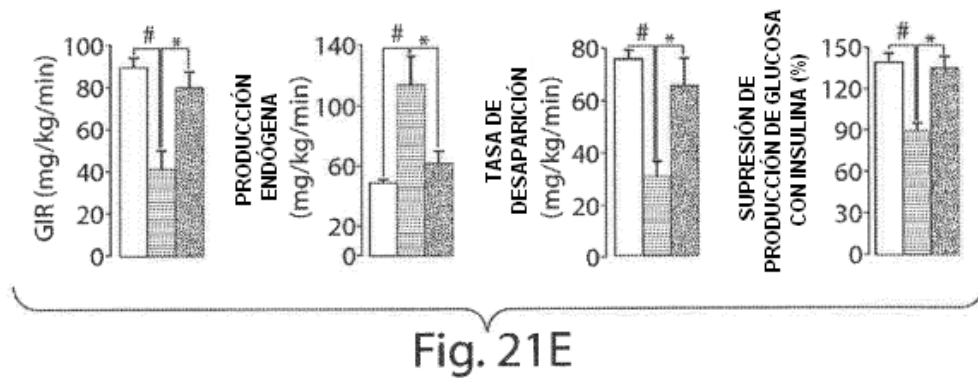
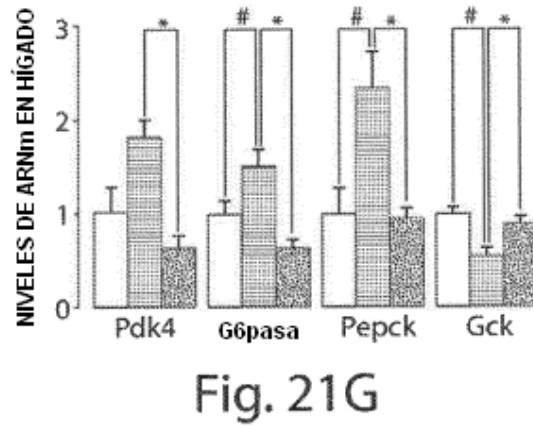
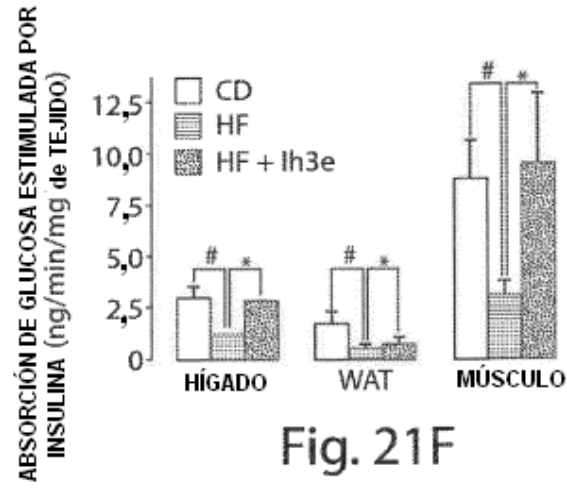


Fig. 21E



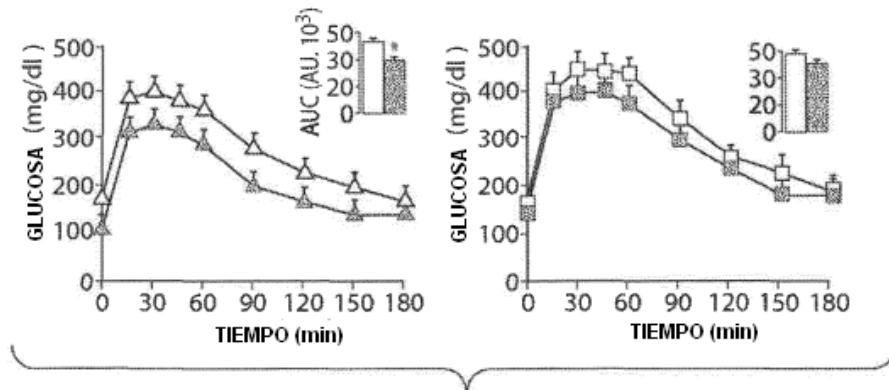


Fig. 22A

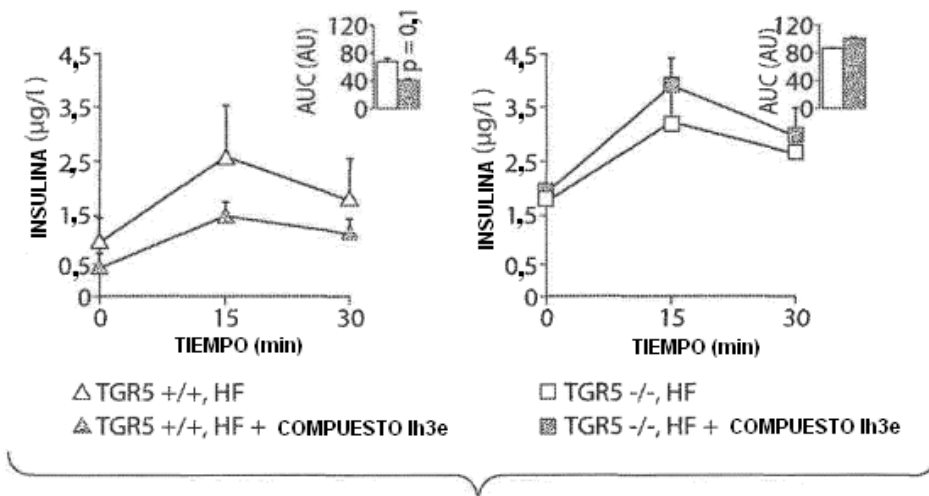


Fig. 22B

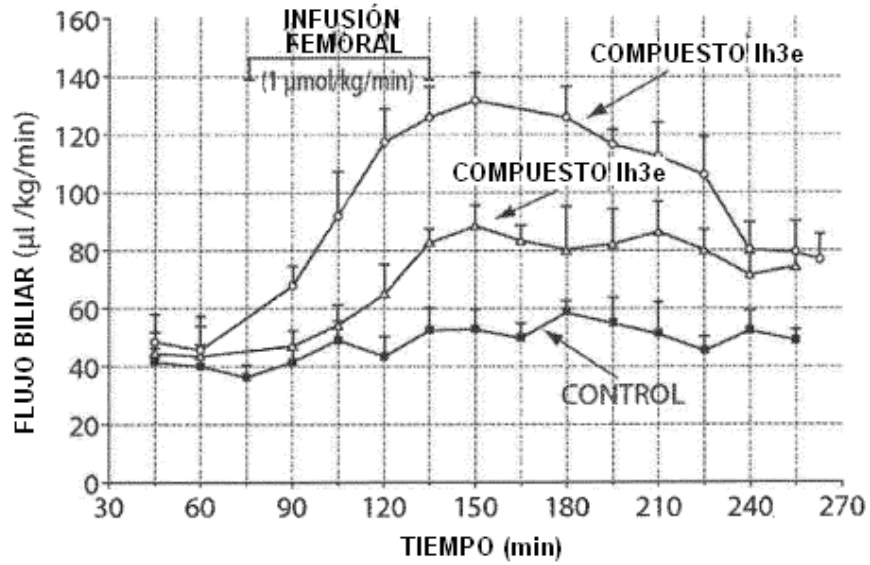


Fig. 23

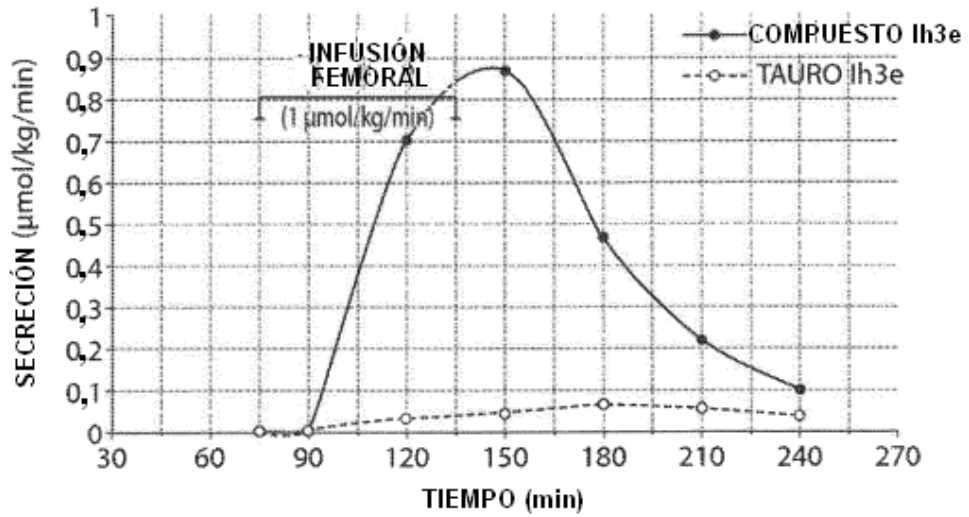


Fig. 24

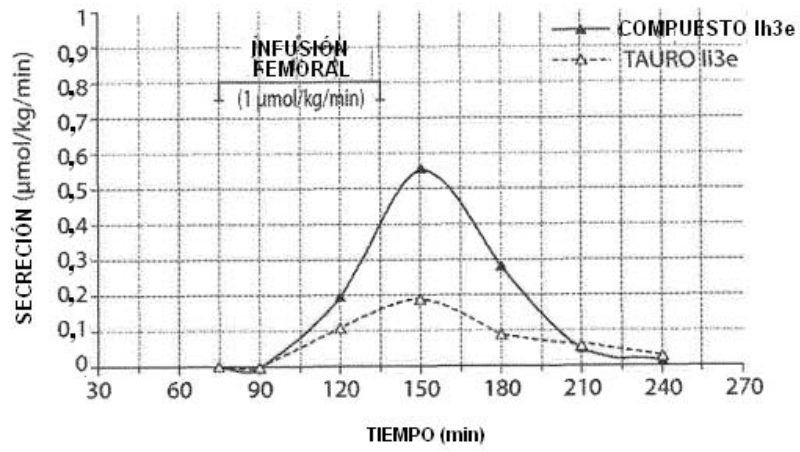


Fig. 25

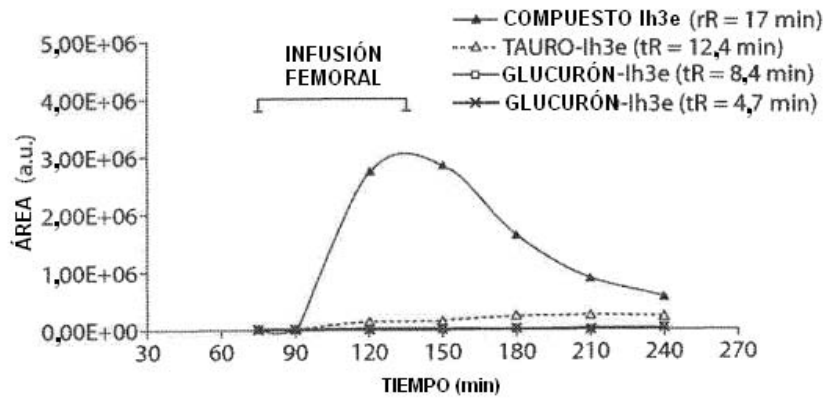


Fig. 26

