

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 427**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)
C07J 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/EP2014/059896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14723820 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2997035**

54 Título: **Derivados 11-hidroxil-6-sustituídos de ácidos biliares y conjugados de aminoácidos de los mismos como moduladores de receptores farnesoides X**

30 Prioridad:

14.05.2013 US 201361823169 P

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

06.06.2018

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
10 Hudson Yards, 37th Floor
New York, NY 10001, US**

72 Inventor/es:

PELLICCIARI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 671 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados 11-hidroxil-6-sustituídos de ácidos biliares y conjugados de aminoácidos de los mismos como moduladores de receptores farnesoides X

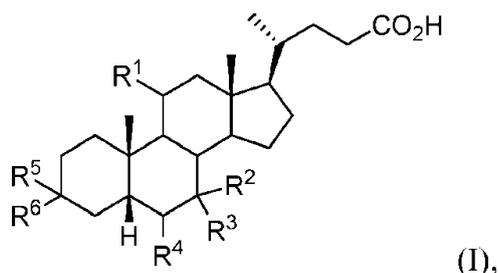
5

Antecedentes de la invención

El FXR es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligandos que incluye receptores para esteroides, retinoides y hormonas tiroideas (D. J. Mangelsdorf, et al., Cell 83: 841-850 (1995)). El análisis Northern e *in situ* muestra que FXR se expresa de manera más abundante en el hígado, intestino, riñón y suprarrenales (B.M. Forman, et al., Cell 81: 687-693 (1995) y W. Seol, et al., Mol. Endocrinol., 9: 72-85 (1995)). El FXR se une al ADN como un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR). El FXR de rata se activa mediante concentraciones micromolares de farnesoides tales como farnesol y hormona juvenil (B.M. Forman, et al., Cell 81: 687-693 (1995)). Sin embargo, estos compuestos no pudieron activar el FXR humano y de ratón, lo que deja en duda la naturaleza de los ligandos FXR endógenos. Varios ácidos biliares naturales (por ejemplo, ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA) y los conjugados de taurina y glicina de los mismos) sirven como ligandos de FXR y se unen a y activan FXR a concentraciones fisiológicas (WO-A-00/37077), como lo hace el derivado 6-alfa-etilo de CDCA (ácido obeticólico - véase, por ejemplo, J. Med. Chem. Vol 47(18) pp 4559-4569, (2004), compuesto 7). Los ácidos biliares son metabolitos del colesterol que se forman en el hígado y se secretan en el duodeno del intestino, donde tienen un papel importante en la solubilización y absorción de lípidos y vitaminas en la dieta. La mayoría de los ácidos biliares (~95%) se reabsorben posteriormente en el íleon y se devuelven al hígado a través del sistema circulatorio enterohepático. La conversión de colesterol a ácidos biliares en el hígado está bajo regulación de retroalimentación: los ácidos biliares regulan negativamente la transcripción del citocromo P450 7a (CYP7a), que codifica la enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos biliares. Se sugiere que FXR está implicado en la represión de la expresión de CYP7a por los ácidos biliares (D. W. Russell, Cell 97: 539-542 (1999)). En el íleon, los ácidos biliares inducen la expresión de la proteína de unión al ácido biliar intestinal (IBABP), que se une a los ácidos biliares con gran afinidad y puede estar implicada en su captación y tráfico celular. Se demuestra que los ácidos biliares median sus efectos sobre la expresión de IBABP a través de la activación de FXR, que se une a un elemento de respuesta de tipo IR-1 que se conserva en los promotores del gen IBABP humano, de rata y de ratón. Por lo tanto, el FXR está involucrado tanto en la estimulación (IBABP) como en la represión (CYP7a) de genes diana implicados en la homeostasis del ácido biliar y el colesterol. En consecuencia, existe una necesidad de moduladores de FXR adecuados para el desarrollo de fármacos. La presente invención aborda esta necesidad.

Resumen de la invención

La invención proporciona compuestos y métodos para preparar estos compuestos. Específicamente, la invención proporciona un compuesto de fórmula I:



40

o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son como se describen en el presente documento. Los compuestos de la invención son útiles para tratar y prevenir enfermedades y afecciones.

45

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50

La invención también proporciona los compuestos anteriores para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad y condición, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato, o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un aspecto, la enfermedad o condición es mediada por FXR.

55

La invención también proporciona la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o condición (por ejemplo, una enfermedad o condición mediada por FXR), en la que el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona una composición para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición (por ejemplo, una enfermedad o condición mediada por FXR), en la que la composición comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.
 10 En el caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad de un compuesto de la invención y un compuesto de comparación en un ensayo de transactivación en células HEK293T.

20 La Figura 2 es una serie de gráficos que muestran la falta de actividad de TGR5 de un compuesto de la invención en células enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 a nivel fisiológico (A) y en células de ovario de hámster chino (CHO) que sobreexpresan TGR5 (B) humano.

25 La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la actividad de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en la expresión reguladora de OST α (A), OST β (B), BSEP (C), MRP2 (D), CYP7A1 (E), SHP (F), FGF-19 (G) y UGT2B4 (H).

30 La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran la actividad de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en la regulación de PLTP implicada en el metabolismo lipídico (A), SREBP-1C (B), APOCII (C) y PPAR γ (D).

35 La Figura 5 es un gráfico que muestra la regulación de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en el gen PEPCK.

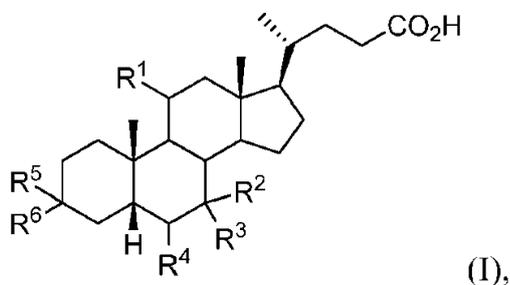
La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de ATP en células HepG2, tratadas con las concentraciones indicadas de un compuesto de la invención durante 4 horas.

40 La Figura 7 es una serie de gráficos que muestran el efecto colerético del Compuesto 100 para la administración id e iv (A), la secreción del Compuesto 100 a lo largo del tiempo para la administración id e iv (B) y la concentración plasmática del Compuesto 100 a lo largo del tiempo (C)

Descripción detallada de la invención

45 Compuestos de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:



50 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R¹ es hidroxilo;

55 R² es hidrógeno, hidroxilo, alquilo o halógeno, en donde dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^a;

R^3 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo o halógeno, en donde dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^b ;

5 R^4 es alquilo, alquenilo, alquinilo o halógeno, en el que dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^c ;

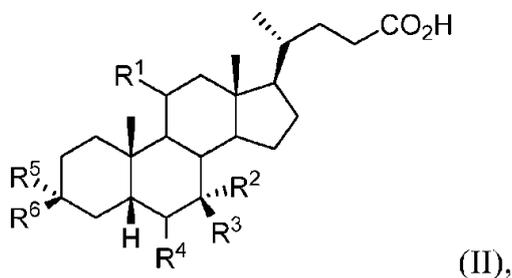
R^a , R^b y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;

10 R^5 es hidroxilo, OSO_3H , OSO_3^- , $OCOCH_3$, OPO_3H_2 , OPO_3^{2-} o hidrógeno; y

R^6 es hidroxilo, OSO_3H , OSO_3^- , $OCOCH_3$, OPO_3H_2 , OPO_3^{2-} o hidrógeno;

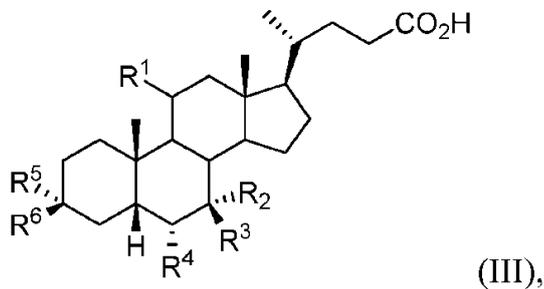
o tomados juntos R^5 y R^6 con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II:



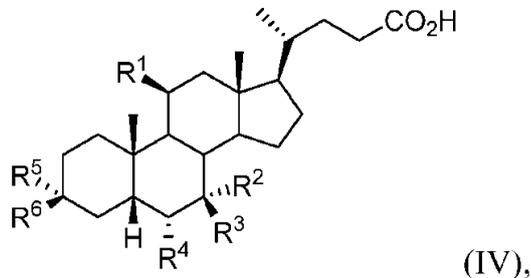
20 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula III:



25 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula IV:



30 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto es el compuesto (por ejemplo, el compuesto nativo, o el compuesto en forma no salina, no solvatada, y no conjugada).

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto es la sal farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto es el conjugado de aminoácidos. En un aspecto, el conjugado de aminoácidos es un conjugado de glicina. En un aspecto, el conjugado de aminoácidos es un conjugado de taurina.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en donde uno de R² o R³ es hidroxilo o halógeno y el R² o R³ restante es hidrógeno o alquilo no sustituido. En un aspecto, uno de R² o R³ es hidroxilo y el R² o R³ restante es hidrógeno.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en donde uno de R⁵ o R⁶ es hidroxilo y el resto R⁵ o R⁶ es hidrógeno.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R² es hidroxilo o halógeno. En un aspecto, R² es hidroxilo. En otro aspecto, R² es halógeno.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R³ es hidrógeno o alquilo no sustituido. En un aspecto, R³ es hidrógeno. En otro aspecto, R³ es metilo.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R² es hidroxilo y R³ es hidrógeno.

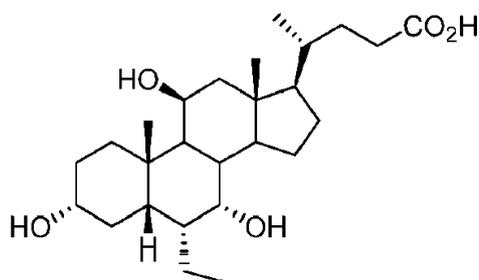
En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R⁵ es hidroxilo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R⁶ es hidrógeno.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en el que R² y R⁵ son cada uno hidroxilo y R³ y R⁶ son cada uno hidrógeno.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R⁴ es alquilo. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde R⁴ es alquilo no sustituido. En un aspecto, R⁴ es metilo, etilo, propilo o butilo. En un aspecto, R⁴ es metilo o etilo. En un aspecto, R⁴ es metilo. En un aspecto, R⁴ es etilo.

En un aspecto, la presente invención se refiere al compuesto



(100),

35

o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto es un agonista de FXR. En un aspecto, el compuesto de la invención es un agonista de FXR altamente potente. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR a una concentración por debajo de 1 μM, por debajo de 0.8 μM, por debajo de 0.6 μM, por debajo de 0.4 μM o por debajo de 0.2 μM (por ejemplo, medido mediante un ensayo AlphaScreen), en comparación con 15 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR a una concentración por debajo de 0.2 μM (por ejemplo, medida por un ensayo AlphaScreen). Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR con una EC₅₀ por debajo de 1 μM, por debajo de 0.8 μM, por debajo de 0.6 μM, por debajo de 0.4 μM o por debajo de 0.2 μM (por ejemplo, medido por un ensayo AlphaScreen), en comparación con 8.9 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR con una EC₅₀ por debajo de 0.2 μM (por ejemplo, medida por un ensayo AlphaScreen).

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto no es activo contra otros receptores nucleares. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto no activa TGR5 (por ejemplo, medido por un ensayo HTR-FRET TGR5, donde el TGR5 se expresa en un nivel fisiológico o es sobreexpresado).

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto induce apoptosis.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto no muestra efecto citotóxico en células hepáticas HepG2 humanas (por ejemplo, medido por un ensayo de liberación de LDH o un ensayo de ATP intracelular).

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en donde el compuesto no inhibe una o más isoformas de CYP450 seleccionadas de CYP1A2, CYP3A4 (sustrato verde), CYP3A4 (sustrato azul), CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP2E1. Por ejemplo, los compuestos de la invención tienen una IC₅₀ mayor que 10 µM medida por el ensayo de inhibición de CPY450.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III o IV, en el que el compuesto no inhibe el canal de potasio ERG humano.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto de la invención, o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un kit que contiene uno o más compuestos de la invención, o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, el kit contiene además un ingrediente farmacéuticamente aceptable.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un problema técnico que se resolverá mediante la presente invención es la identificación de nuevos compuestos que sean agonistas del receptor X de la hormona nuclear farnesoide (FXR), que representa un objetivo atractivo para el
 25 tratamiento de enfermedades hepáticas metabólicas y crónicas. Es bien sabido que los ácidos biliares naturales modulan no solo varios receptores de hormonas nucleares, sino que también son agonistas para el receptor acoplado a proteína G (GPCR) TGR5. La selectividad puede ser un problema para los compuestos farmacológicos dirigidos a modular un receptor hormonal nuclear. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto que sea un agonista de FXR específico, por ejemplo, un compuesto que no muestre actividad contra
 30 otros receptores nucleares o un compuesto que no active el ácido biliar GPCR TGR5. Otros problemas en el desarrollo de un compuesto farmacológico incluyen un perfil farmacocinético no adecuado, problemas de seguridad tales como toxicidad (por ejemplo, hígado) e interacciones fármaco-fármaco indeseables. Por consiguiente, otros objetivos de la presente invención son proporcionar compuestos que no sufran los problemas técnicos mencionados anteriormente, es decir, un compuesto que tenga un perfil farmacocinético adecuado, un compuesto que no ejerza
 35 un efecto citotóxico sobre las células, un compuesto que no inhiba las enzimas del citocromo P450 y/o un compuesto que no inhiba la hERG.

La patente y la literatura científica a las que se hace referencia en este documento establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia. En el caso de inconsistencias, prevalecerá la presente divulgación.

40 Para los fines de la presente invención, se usarán las siguientes definiciones (a menos que se indique expresamente lo contrario).

Los términos químicos generales usados en todas partes tienen sus significados habituales. Por ejemplo, el término
 45 alquilo se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado. El término "n-alquilo" se refiere a un grupo alquilo no ramificado. El término "alquilo C_x-C_y" se refiere a un grupo alquilo que tiene entre x e y átomos de carbono, inclusive, en el grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado. A modo de ilustración, pero sin limitación, el término "alquilo C₁-C₈" se refiere a una unidad estructural hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene 1, 2,
 50 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono. "C₁-C₆" se refiere a una unidad estructural hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. "Alquilo C₁-C₄" se refiere a una unidad estructural hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono, incluidos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y tert-butilo. El término "alquilo C₁-C₄" se refiere a unidades estructurales hidrocarburo de cadena lineal que tienen de 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono que incluyen metilo, etilo, n-propilo y n-butilo. El término "cicloalquilo C₃-C₆" se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. El término
 55 "cicloalquilo C₃-C₇" también incluye cicloheptilo. El término "cicloalquilo C₃-C₈" también incluye ciclooctilo. Cicloalquilalquilo se refiere a restos cicloalquilo unidos a través de una cadena de enlace alquilo, como, por ejemplo, pero sin limitación, ciclopropilmetilo, ciclopropiletilo, ciclopropilpropilo, ciclopropilbutilo, ciclobutilmetilo, ciclobutiletilo, ciclobutilpropilo, ciclobutilmetilo, ciclobutiletilo, ciclobutilpropilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo y ciclohexilpropilo. Cada grupo alquilo, cicloalquilo y cicloalquilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se especifica en este
 60 documento.

El término "cicloalquenilo C₄-C₈" se refiere a anillos de ciclobutenilo, ciclopentilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo que tienen uno o más sitios de insaturación, por ejemplo, uno o más dobles enlaces.

65 El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

El término "hidroxilo" significa OH.

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no experimenta espontáneamente transformación tal como por transposición, ciclización, eliminación, etc. Tal como se usa en el presente documento, se contempla que el término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos a menos que se especifique lo contrario. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y los mismos o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en la presente que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta invención no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

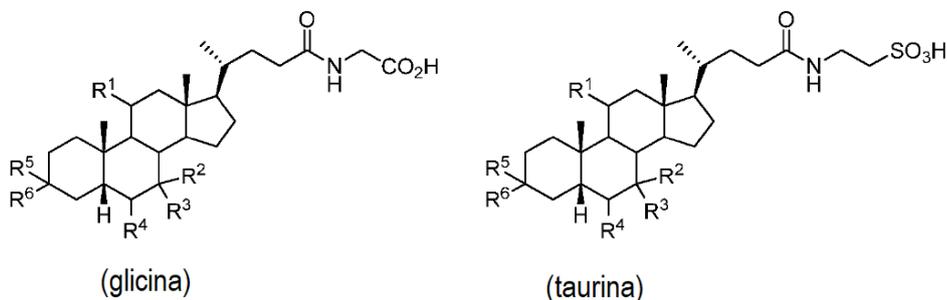
El término "farmacéutico" o "farmacéuticamente aceptable" cuando se usa aquí como un adjetivo, significa sustancialmente no tóxico y sustancialmente no perjudicial para el receptor.

Por "formulación farmacéutica" se entiende además que el vehículo, el disolvente, el excipiente y la sal deben ser compatibles con el ingrediente activo de la formulación (por ejemplo, un compuesto de la invención). Los expertos en esta técnica entienden que los términos "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" son generalmente intercambiables, y se usan así para los fines de esta solicitud.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de acuerdo con la invención serán fácilmente determinadas por un experto en la técnica e incluirán, por ejemplo, sales básicas tales como sales metálicas alcalinas o alcalinotérreas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas hechas de N,N'-dibenciletilendiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. También se pueden usar sales con aminas farmacéuticamente aceptables tales como lisina, arginina, trometamina y trietilamina. Tales sales de los compuestos de la invención se pueden preparar usando técnicas convencionales, a partir del compuesto de la invención haciendo reaccionar, por ejemplo, la base apropiada con el compuesto de la invención.

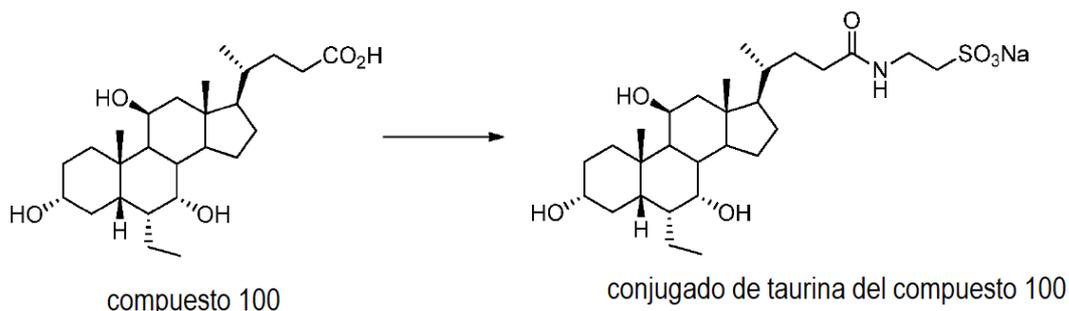
Cuando se usan en medicina, las sales de un compuesto de la invención deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales farmacéuticamente inaceptables pueden usarse convenientemente para preparar la correspondiente base libre o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado de aminoácidos" se refiere a un conjugado de un compuesto de la invención con cualquier aminoácido adecuado. En un aspecto, dicho conjugado de aminoácidos adecuado de un compuesto de la invención tendrá la ventaja añadida de una integridad mejorada en fluidos biliares o intestinales. La presente invención abarca los conjugados de glicina y taurina de cualquiera de los compuestos de la invención. Por ejemplo, los conjugados de glicina y taurina de un compuesto de fórmula I tienen la siguiente fórmula:



En un aspecto, los conjugados de glicina y taurina de un compuesto de la invención pueden ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los conjugados de aminoácidos de los compuestos de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido libre se puede acoplar al aminoácido de glicina o taurina usando condiciones de acoplamiento de péptido estándar.

En un aspecto, la sal de sodio del conjugado de taurina del Compuesto 100 puede prepararse de la siguiente manera.



El compuesto 100 se trata con una base (por ejemplo, Et₃N) y taurina en un disolvente prótico polar (por ejemplo, EtOH). La mezcla resultante se puede tratar con un reactivo de acoplamiento (por ejemplo, DMT-MM (cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio)). La mezcla de reacción se puede concentrar y disolver en una base (por ejemplo, solución acuosa al 3% p/v de NaOH). La mezcla de reacción resultante se puede extraer con un disolvente orgánico (por ejemplo, AcOEt). La fase acuosa se puede concentrar y filtrar en una almohadilla de sílice, eluyendo primero con, por ejemplo, H₂O (hasta pH neutro) y luego con, por ejemplo, H₂O/MeOH 80:20 v/v para dar el conjugado de taurina del Compuesto 100. Aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, glicina y taurina.

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas tales como, por ejemplo, hidratos.

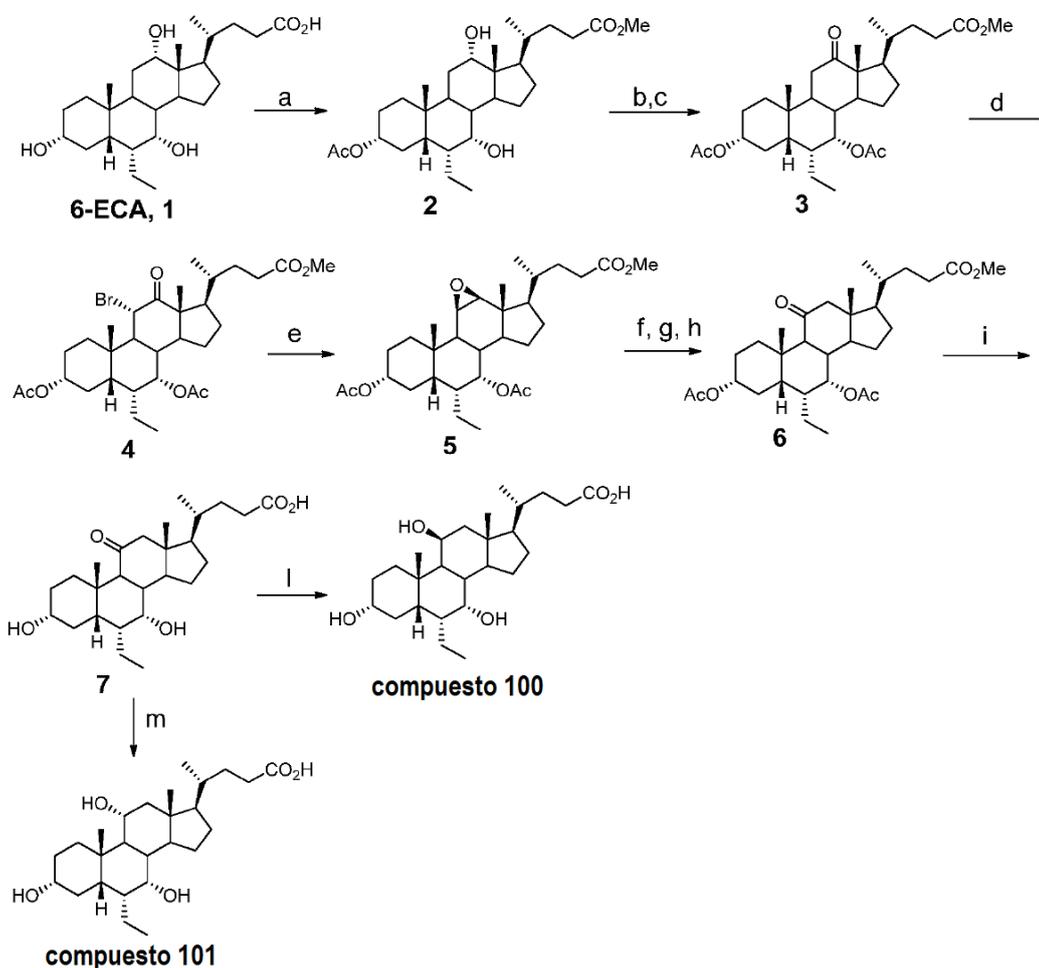
La presente invención proporciona métodos para la síntesis de los compuestos de la invención descritos en este documento. La presente invención también proporciona métodos detallados para la síntesis de diversos compuestos descritos de la invención de acuerdo con los siguientes esquemas como se muestra en los ejemplos.

Los procesos sintéticos de la invención pueden tolerar una amplia variedad de grupos funcionales, por lo tanto, se pueden usar diversos materiales de partida sustituidos. Los procedimientos generalmente proporcionan el compuesto final deseado en o cerca del final del proceso global, aunque puede ser deseable en ciertos casos convertir adicionalmente el compuesto en una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de la invención pueden prepararse de diversas maneras utilizando materiales de partida comercialmente disponibles, compuestos conocidos en la bibliografía o productos intermedios preparados fácilmente, empleando métodos y procedimientos sintéticos estándar bien conocidos por los expertos en la materia, o que serán evidentes para el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de este documento. Los métodos y procedimientos sintéticos estándar para la preparación de moléculas orgánicas y transformaciones y manipulaciones de grupos funcionales pueden obtenerse de la literatura científica relevante o de libros de texto estándar en el campo. Aunque no se limita a una o varias fuentes, textos clásicos como Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; and Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons: Nueva York, 1999, son libros de texto de referencia útiles y reconocidos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en la técnica. Las siguientes descripciones de métodos sintéticos están diseñadas para ilustrar, pero no limitar, procedimientos generales para la preparación de compuestos de la presente invención.

Todas las abreviaturas utilizadas en esta solicitud se encuentran en "Protective Groups in Organic Synthesis" by John Wiley & Sons, Inc, o MERCK INDEX de MERCK & Co., Inc, u otros libros de química o catálogos de productos químicos de un proveedor de productos químicos tal como Aldrich, o según el uso conocido en la técnica.

Esquema 1



- Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, p-TSA, ultrasonido, 3 h, cuantitativo; 2) Ac₂O, NaHCO₃ THF, reflujo 12 h, 85%; b) PCC, CH₂Cl₂, 6 h, 62%; c) Ac₂O, Bi(OTf)₃, CH₂Cl₂, 1 h, 91%; d) Br₂, benceno, 30°C durante la noche, 74%; e) NaBH₄, NaOAc, Pir, temperatura ambiente 2 días, 80%; f) HI 57%, AcOH, temperatura ambiente 30 minutos; g) CrO₃, AcOH, temperatura ambiente 45 min; h) polvo de Zn, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2M, MeOH, temperatura ambiente durante la noche, 65% del compuesto 5; 1) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70%; m) Na(s), sec-BuOH, 50°C, 70%.

La síntesis se basa en el uso de ácido 6 α -etil-cólico (6-ECA, 1) como material de partida que se preparó usando métodos conocidos en la técnica. Se trató 6-ECA (1) con p-TSA en MeOH bajo irradiación con ultrasonidos para dar el correspondiente éster metílico, que se protegió selectivamente en la posición C3 sometiendo a reflujo con Ac₂O en presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. El tratamiento del compuesto 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente seguido de tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el intermedio 3 α , 7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; aproximadamente 48% del compuesto 2).

El tratamiento del compuesto 3 con Br₂ en benceno durante, por ejemplo, 12 h, produjo el compuesto 4. La reacción del compuesto 4 con NaBH₄ y NaOAc en piridina recién destilada dio el epóxido 11 β -12 β correspondiente (compuesto 5), en aproximadamente 59% de rendimiento después de purificación de gel de sílice. La reacción del compuesto 5 con HI en AcOH a temperatura ambiente proporcionó el intermediario de halohidrina que luego se oxidó en la posición C11 con CrO₃ en AcOH para generar el compuesto 6. La reacción del compuesto 6 con polvo de Zn en AcOH en ebullición e hidrólisis alcalina (NaOH/MeOH) proporcionó ácido 3 α ,7 α -hidroxi-12-ceto-5 β -colan-24-oico (compuesto 7, rendimiento de aproximadamente 65% del compuesto 5).

El compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el carbonilo C11 usando NaBH₄ en una mezcla de THF/H₂O=(4:1, v/v) para dar ácido 3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (Compuesto 100, aproximadamente 27% del compuesto 3), después de la purificación cromatográfica para proporcionar el Compuesto 100.

Alternativamente, el compuesto 7 se redujo con sodio en sec-BuOH a 50°C para dar el Compuesto 101 (aproximadamente 70% de rendimiento) después de la purificación.

"Solvato" significa una forma de adición de disolvente que contiene cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen una tendencia a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando así 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 retiene su estado molecular como H₂O, pudiendo formar tal combinación uno o más hidratos.

El término "disolvente adecuado" se refiere a cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, inerte para la reacción en curso que solubiliza suficientemente los reactivos para proporcionar un medio dentro del cual se efectúe la reacción deseada.

Los compuestos descritos en este documento pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo asimétricamente sustituido se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, por ejemplo por resolución de formas racémicas o por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. Muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en este documento, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente invención se describen y se pueden aislar como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Se comprenden todas las formas isoméricas quirales, diastereoméricas, racémicas y geométricas de una estructura, a menos que esté específicamente indicada la estereoquímica o la forma isomérica. Todos los procedimientos utilizados para preparar los compuestos de la presente invención y los compuestos intermedios preparados en ellos se consideran parte de la presente invención. Todos los tautómeros de los compuestos mostrados o descritos también se consideran parte de la presente invención. Además, la invención también incluye metabolitos de los compuestos descritos en este documento.

La invención también comprende compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los enumerados en las fórmulas de la invención, pero por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa más común en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, flúor, tales como ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ²H y ¹⁸F.

Los compuestos de la presente invención y las sales, solvatos o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H y ¹⁴C, son útiles en ensayos de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y con carbono 14, es decir, ¹⁴C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y factibilidad de detección. Los isótopos ¹¹C y ¹⁸F son particularmente útiles en la PET (tomografía por emisión de positrones). La PET es útil en imágenes cerebrales. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de esta invención generalmente pueden prepararse mediante técnicas conocidas en arte, por ejemplo llevando a cabo los procedimientos descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos a continuación, sustituyendo un reactivo isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. En una realización, los compuestos de la invención, sales, hidratos, solvatos o conjugados de aminoácidos de los mismos no están marcados isotópicamente.

Cuando cualquier variable (por ejemplo, R^x) aparece más de una vez en cualquier constituyente o fórmula para un compuesto, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra aparición. Así, por ejemplo, si se muestra que un grupo está sustituido con una o más unidades estructurales R^x, entonces R^x en cada aparición se selecciona independientemente de la definición de R^x. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles, pero solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables dentro de la valencia normal de un átomo designado.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "que trata" o "tratamiento" significa disminuir los síntomas, marcadores y/o cualquier efecto negativo de una condición en cualquier grado apreciable en un sujeto que actualmente padece la condición. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que exhibe solo signos tempranos de la condición con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad o condición.

Como se usa en este documento, el término "prevenir", "prevención" o "que previene" se refiere a cualquier método para prevenir o retrasar parcial o completamente la aparición de uno o más síntomas o características de una

enfermedad, trastorno y/o condición. La prevención se puede administrar a un sujeto que no muestre signos de una enfermedad o condición.

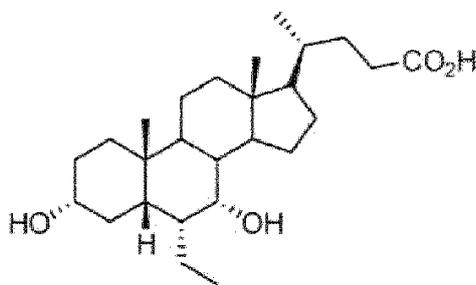
5 Como se usa en el presente documento, "sujeto" significa un ser humano o animal (en el caso de un animal, más típicamente un mamífero). En un aspecto, el sujeto es un humano. Tal sujeto puede considerarse que necesita tratamiento con un agonista de FXR.

10 Como se usa en este documento, "insaturado" se refiere a compuestos o estructuras que tienen al menos un grado de insaturación (por ejemplo, al menos un enlace doble o triple).

Como se usa en este documento, el término "un compuesto de la invención" incluye un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, II, III o IV, o cualquier compuesto explícitamente descrito en este documento.

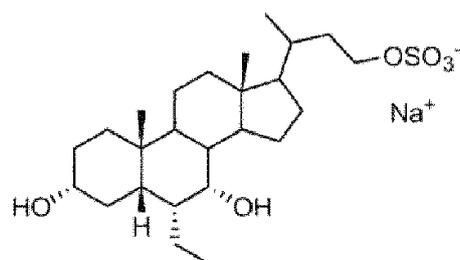
15 Como se usa en este documento, el receptor farnesoide X o FXR se refiere a todas las formas en mamíferos de tal receptor incluyendo, por ejemplo, isoformas de corte y empalme e isoformas naturales (véase, por ejemplo, Huber et al., Gene 290: 35-43 (2002)). Las especies de FXR representativas incluyen, sin limitación, FXR de rata (número de acceso de Gen Bank NM_021745), FXR de ratón (número de acceso de Genbank NM_009108) y FXR humano (número de acceso de GenBank NM_005123).

20 Como se usa en este documento, el Compuesto A es



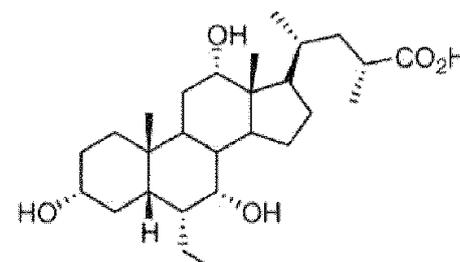
25 que también se conoce como ácido obeticólico, INT-747, 6ECDCA, ácido 6-alfa-etil-quenodesoxicólico o ácido 6α-etil-3α,7α-dihidroxi-5β-colan-24-oico.

Como se usa en este documento, el Compuesto B es



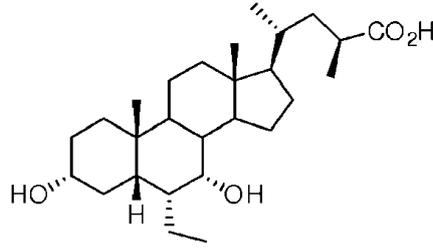
30 que también se conoce como INT-767 o sal sódica de 6α-etil-3α,7α,23-trihidroxi-24-nor-5β-colan-23-sulfato.

Como se usa en este documento, el Compuesto C es



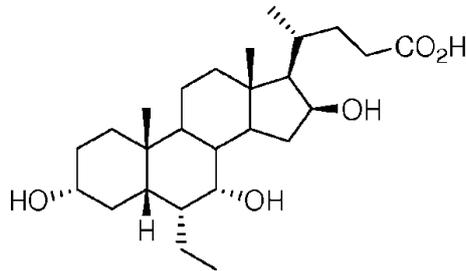
35 que también se conoce como ácido INT-777 o 6α-etil-23(S)-metil-3α,7α,12α trihidroxi-5β-colan-24-oico.

Como se usa en este documento, el Compuesto D es



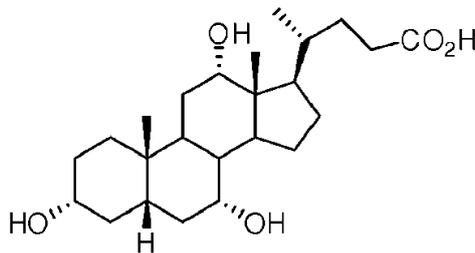
5 que también se conoce como ácido 6α-etil-23(R)-metilo quenodesoxicólico y S-EMCDCA.

Como se usa en este documento, el Compuesto E es



10

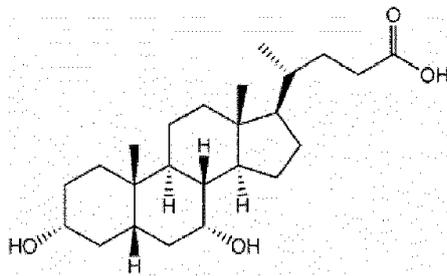
Como se usa en el presente documento, el ácido cólico es



15

que también se conoce como CA.

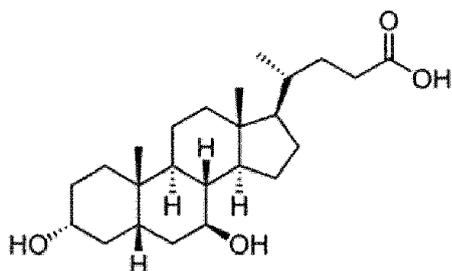
Como se usa en el presente documento, el ácido quenodesoxicólico es



20

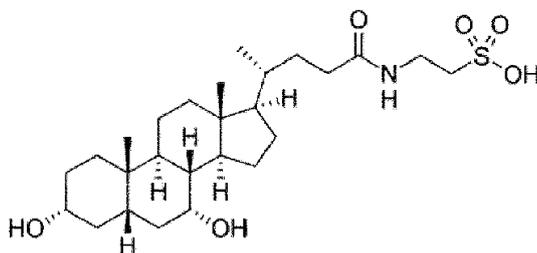
que también se conoce como CDCA.

Como se usa en el presente documento, el ácido ursodesoxicólico es



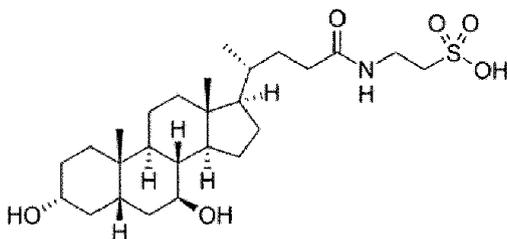
que también se conoce como UDCA.

5 Como se usa en el presente documento, el ácido tauroquenosodesoxicólico es



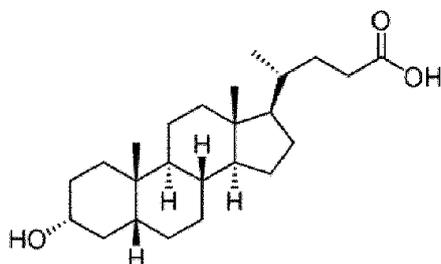
que también se conoce como TCDCA.

10 Como se usa en el presente documento, el ácido tauroursodesoxicólico es



15 que también se conoce como TUDCA.

Como se usa en el presente documento, el ácido litocólico es



20 que también se conoce como LCA.

Métodos de la invención

25 Los compuestos de la invención son útiles en terapia en sujetos tales como mamíferos, incluyendo humanos. En particular, los compuestos de la invención son útiles en un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición en un sujeto que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un aspecto, la enfermedad o condición está mediada por FXR (por ejemplo, el FXR juega un papel en el inicio o progreso de la enfermedad o condición). En un aspecto, la enfermedad o condición está mediada por una actividad de FXR disminuida. En un aspecto, la enfermedad o condición se selecciona de enfermedad cardiovascular,

30

enfermedad hepática crónica, trastorno de lípidos, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad metabólica, cáncer y enfermedad neurológica.

5 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar enfermedades cardiovasculares. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de enfermedades cardiovasculares. En un aspecto, la enfermedad cardiovascular se seleccionó de aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia e hipertrigliceridemia.

15 El término "hiperlipidemia" se refiere a la presencia de un nivel anormalmente elevado de lípidos en la sangre. La hiperlipidemia puede aparecer en al menos tres formas: (1) hipercolesterolemia, es decir, un nivel elevado de colesterol; (2) hipertrigliceridemia, es decir, un nivel elevado de triglicéridos; y (3) hiperlipidemia combinada, es decir, una combinación de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

20 El término "dislipidemia" se refiere a niveles anormales de lipoproteínas en plasma sanguíneo que incluyen tanto niveles deprimidos y/o elevados de lipoproteínas (por ejemplo, niveles elevados de LDL, VLDL y niveles deprimidos de HDL).

25 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para un uso seleccionado entre la reducción de los niveles de colesterol o la modulación del metabolismo del colesterol, el catabolismo, la absorción de colesterol dietético y el transporte inverso de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que afecta los niveles de colesterol, triglicéridos o ácidos biliares en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en un método para reducir triglicéridos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo o.

40 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de un estado de enfermedad asociado con un nivel elevado de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de la misma. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de un estado de enfermedad asociado con un nivel elevado de colesterol en un sujeto. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de un estado de enfermedad asociado con un nivel elevado de colesterol en un sujeto. En un aspecto, el estado de la enfermedad se selecciona entre enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho, enfermedad de la arteria carótida, accidentes cerebrovasculares, arteriosclerosis cerebral y xantoma.

50 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno lipídico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de un trastorno lipídico. En un aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir un trastorno lipídico.

55 Los trastornos lipídicos son el término para las anomalías de colesterol y triglicéridos. Las anomalías lipídicas se asocian con un mayor riesgo de enfermedad vascular, y especialmente ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares. Las anomalías en los trastornos de los lípidos son una combinación de la predisposición genética y la naturaleza de la ingesta dietética. Muchos trastornos de los lípidos están asociados con el sobrepeso. Los trastornos lipídicos también pueden estar asociados con otras enfermedades, como diabetes, síndrome metabólico (a veces llamado síndrome de resistencia a la insulina), tiroides poco activa o el resultado de ciertos medicamentos (como los que se usan para los regímenes de rechazo en personas que han tenido trasplantes).

60 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para usar en el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de enfermedad que afectan al metabolismo lipídico (es decir, lipodistrofia) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de uno o más síntomas de una enfermedad que afecta

el metabolismo de los lípidos. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para usar en la prevención de uno o más síntomas de una enfermedad que afecta el metabolismo de los lípidos.

5 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la disminución de la acumulación de lípidos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad hepática crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de enfermedad hepática crónica. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de la enfermedad hepática crónica. En un aspecto, la enfermedad hepática crónica se selecciona de cirrosis biliar primaria (CBP), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), colangitis esclerosante primaria (CEP), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a la nutrición parenteral (PNAC), sobrecrecimiento bacteriano o colestasis asociada a sepsis, hepatitis autoinmune, hepatitis viral crónica, hepatopatía alcohólica, hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad de injerto contra huésped relacionada con trasplante hepático, regeneración hepática de trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, neoplasia intrahepática o extrahepática, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis y deficiencia de alfa 1 antitripsina.

25 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de colestasis, que incluyen complicaciones de colestasis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de uno o más síntomas de colestasis. En un aspecto, la invención se refiere a la prevención de uno o más síntomas de colestasis.

30 La colestasis típicamente es causada por factores dentro del hígado (intrahepáticos) o fuera del hígado (extrahepáticos) y conduce a la acumulación de sales biliares, bilirrubina de pigmento biliar y lípidos en el torrente sanguíneo en lugar de eliminarse normalmente. La colestasis intrahepática se caracteriza por una obstrucción generalizada de los conductos pequeños o por trastornos, como la hepatitis, que afectan la capacidad del cuerpo para eliminar la bilis. La colestasis intrahepática también puede ser causada por enfermedad hepática alcohólica, cirrosis biliar primaria, cáncer que se ha diseminado (metástasis) de otra parte del cuerpo, colangitis esclerosante primaria, cálculos biliares, cólico biliar y colecistitis aguda. También puede ocurrir como una complicación de una cirugía, una lesión grave, fibrosis quística, infección o alimentación intravenosa o ser inducido por medicamentos. La colestasis también puede ocurrir como una complicación del embarazo y a menudo se desarrolla durante el segundo y tercer trimestre.

45 La colestasis extrahepática es causada con mayor frecuencia por la coledocolitiasis (piedras del conducto biliar), las estenosis biliares benignas (estrechamiento no canceroso del conducto común), el colangiocarcinoma (carcinoma ductal) y el carcinoma pancreático. La colestasis extrahepática puede ocurrir como un efecto secundario de muchos medicamentos.

50 Un compuesto de la invención se puede usar para tratar o prevenir uno o más síntomas de colestasis intrahepática o extrahepática, incluyendo, sin limitación, artesisia biliar, colestasis obstétrica, colestasis neonatal, colestasis inducida por fármacos, colestasis provocada por la infección por hepatitis C, crónica enfermedad hepática colestásica, como cirrosis biliar primaria (CBP) y colangitis esclerosante primaria (CEP).

55 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para usar en potenciar la regeneración hepática en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, el método está mejorando la regeneración hepática para el trasplante de hígado.

60 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la fibrosis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar la fibrosis. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de la fibrosis.

65 De acuerdo con esto, como se usa en el presente documento, el término fibrosis se refiere a todos los trastornos fibróticos reconocidos, que incluyen fibrosis debida a afecciones o enfermedades patológicas, fibrosis debida a trauma físico ("fibrosis traumática"), fibrosis debida a daño por radiación y fibrosis debida a exposición a agentes quimioterapéuticos. Como se usa en este documento, el término "fibrosis de órganos" incluye, pero no se limita a,

fibrosis hepática, fibrosis de los riñones, fibrosis de pulmón y fibrosis del intestino. La "fibrosis traumática" incluye, pero no se limita a, fibrosis secundaria a cirugía (cicatrización quirúrgica), trauma físico accidental, quemaduras y cicatrización hipertrófica.

5 Como se usa en el presente documento, "fibrosis hepática" incluye fibrosis hepática debida a cualquier causa, que incluye pero no se limita a la fibrosis hepática inducida por virus tal como la debida a virus de la hepatitis B o C; exposición al alcohol (enfermedad hepática alcohólica), ciertos compuestos farmacéuticos que incluyen pero no se limitan a metotrexato, algunos agentes quimioterapéuticos y la ingestión crónica de arsénico o vitamina A en megadosis, estrés oxidativo, radioterapia contra el cáncer o ciertos productos químicos industriales, incluido, entre otros, el tetracloruro de carbono y dimetilnitrosamina; y enfermedades tales como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hígado graso, obesidad, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística, hemocromatosis, hepatitis autoinmune y esteatohepatitis. La terapia actual en la fibrosis hepática se dirige principalmente a eliminar el agente causal, por ejemplo, eliminar el exceso de hierro (por ejemplo, en el caso de la hemocromatosis), disminuir la carga viral (por ejemplo, en el caso de hepatitis viral crónica) o eliminar la exposición a toxinas (por ejemplo, en el caso de hepatopatía alcohólica). Los medicamentos antiinflamatorios como los corticosteroides y la colchicina también se conocen por su uso en el tratamiento de la inflamación que puede conducir a la fibrosis hepática.

20 Como es sabido en la técnica, la fibrosis hepática puede clasificarse clínicamente en cinco etapas de gravedad (S0, S1, S2, S3 y S4), habitualmente basándose en el examen histológico de una muestra de biopsia. S0 indica que no hay fibrosis, mientras que S4 indica cirrosis. Aunque existen varios criterios para clasificar la gravedad de la fibrosis hepática, en general las primeras etapas de la fibrosis se identifican por áreas discretas y localizadas de cicatrización en una (zona) portal del hígado, mientras que las etapas posteriores de fibrosis se identifican por fibrosis en puente (cicatrices que cruzan zonas del hígado).

25 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la fibrosis de órganos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la fibrosis es fibrosis hepática.

30 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de enfermedad gastrointestinal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar enfermedades gastrointestinales. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de enfermedades gastrointestinales. En un aspecto, la enfermedad gastrointestinal se selecciona de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome del intestino irritable (SII), sobrecrecimiento bacteriano, malabsorción, colitis posterior a la radiación y colitis microscópica. En un aspecto, la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

40 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad renal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de la enfermedad renal. En un aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir la enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad renal se selecciona de nefropatía diabética, glomeruloesclerosis segmentaria focal (GEFS), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía por trasplante crónico, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.

50 En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades metabólicas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de la enfermedad renal. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de la enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad metabólica se selecciona entre resistencia a la insulina, hiperglucemia, diabetes mellitus, diabetes y obesidad. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes tipo I. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes tipo II.

60 La diabetes mellitus, comúnmente llamada diabetes, se refiere a una enfermedad o condición que generalmente se caracteriza por defectos metabólicos en la producción y la utilización de glucosa, que provocan la falla en mantener niveles adecuados de azúcar en la sangre en el cuerpo.

65 En el caso de la diabetes de tipo II, la enfermedad se caracteriza por resistencia a la insulina, en la que la insulina pierde su capacidad de ejercer sus efectos biológicos en un amplio intervalo de concentraciones. Esta resistencia a la respuesta insulínica da como resultado una activación insulínica insuficiente de la captación de glucosa, la oxidación y el almacenamiento muscular y una represión inadecuada de la insulina en la lipólisis del tejido adiposo y

de la producción y secreción de glucosa en el hígado. La condición resultante es glucosa en sangre elevada, que se llama "hiperglucemia". La hiperglucemia no controlada se asocia con una mortalidad mayor y prematura debido a un mayor riesgo de enfermedades microvasculares y macrovasculares, incluida la retinopatía (la alteración o pérdida de la visión debido al daño de los vasos sanguíneos en los ojos); neuropatía (daño a los nervios y problemas en los pies debido al daño de los vasos sanguíneos al sistema nervioso); y nefropatía (enfermedad renal debida a daño de los vasos sanguíneos en los riñones), hipertensión, enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria. Por lo tanto, el control de la homeostasis de la glucosa es un enfoque críticamente importante para el tratamiento de la diabetes.

Se ha formulado la hipótesis de que la resistencia a la insulina unifica el agrupamiento de la hipertensión, la intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia, los niveles aumentados de triglicéridos y la disminución del colesterol HDL, y la obesidad central y general. La asociación de resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa, un aumento en triglicéridos plasmáticos y una disminución de las concentraciones de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, hipertensión, hiperuricemia, partículas de lipoproteínas de baja densidad más densas, más pequeñas y niveles circulantes de inhibidor del activador del plasminógeno-1, ha sido denominada como "Síndrome X". Por consiguiente, se proporcionan métodos para tratar o prevenir cualquier trastorno relacionado con la resistencia a la insulina que incluye el conjunto de estados de enfermedad, afecciones o trastornos que constituyen el "Síndrome X".

En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir el síndrome metabólico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar el síndrome metabólico. En un aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir el síndrome metabólico.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir el cáncer. En un aspecto, el cáncer es cáncer colorrectal.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de cálculos biliares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de cálculos biliares. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de cálculos biliares.

Un cálculo biliar es una concreción cristalina formada dentro de la vesícula biliar por la acumulación de componentes biliares. Estos cálculos se forman en la vesícula biliar, pero pueden pasar distalmente a otras partes del tracto biliar, como el conducto cístico, el conducto biliar común, el conducto pancreático o la ampolla de Vater. En raras ocasiones, en casos de inflamación severa, los cálculos biliares pueden erosionarse a través de la vesícula biliar hacia un intestino adherente que puede causar una obstrucción denominada íleoiliar. La presencia de cálculos biliares en la vesícula biliar puede conducir a una colecistitis aguda, una condición inflamatoria caracterizada por retención de bilis en la vesícula biliar y, a menudo, infección secundaria por microorganismos intestinales, principalmente *Escherichia coli* y especies de *Bacteroides*. La presencia de cálculos biliares en otras partes del tracto biliar puede causar la obstrucción de los conductos biliares, lo que puede conducir a afecciones graves como la colangitis ascendente o la pancreatitis.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de cálculos biliares del colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento de la enfermedad de cálculos biliares del colesterol. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de la enfermedad de cálculos biliares por colesterol.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en el tratamiento o prevención de enfermedad neurológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que así lo requiere una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas. En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para uso en la prevención de enfermedades neurológicas. En un aspecto, la enfermedad neurológica es apoplejía.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para su uso como se describe en el presente documento y en los que el compuesto se administra por vía oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalatoria, ocular, vaginal, rectal e intracerebroventricular. En un aspecto, la ruta es oral.

En un aspecto, el compuesto utilizado en uno o más de los métodos descritos en este documento es un agonista de FXR. En un aspecto, el compuesto es un agonista de FXR selectivo. En un aspecto, el compuesto no activa TGR5. En un aspecto, el compuesto no activa otros receptores nucleares implicados en rutas metabólicas (por ejemplo, tal como se mide mediante un ensayo AlphaScreen). En un aspecto, tales otros receptores nucleares implicados en rutas metabólicas se seleccionan de LXR β , PXR, CAR, PPAR α , PPAR δ , RAR α , VDR, TR, PR, RXR, GR y ER. En un aspecto, el compuesto induce la apoptosis.

En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de la invención para usar en la regulación del nivel de expresión de uno o más genes implicados en la homeostasis de los ácidos biliares.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para regular negativamente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados de CYP7 α 1 y SREBP-1C en una célula administrando a la célula un compuesto de la invención. En un aspecto, la invención se refiere a un método para regular al alza el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados de OST α , OST β , BSEP, SHP, UGT2B4, MRP2, FGF-19, PPAR γ , PLTP, APOCII y PEPCK en una célula administrando a la célula un compuesto de la invención.

La invención también se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o condición (por ejemplo, una enfermedad o condición mediada por FXR), en la que el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en el presente documento, donde el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también se refiere a una composición para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición (por ejemplo, una enfermedad o condición mediada por FXR), en la que la composición comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a una composición para uso en un método para tratar o prevenir una cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en el presente documento, donde la composición comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable en esto.

Formulaciones

Los métodos de la invención comprenden la etapa de administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que es suficiente para lograr el efecto indicado. Por consiguiente, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención utilizado en un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades o estados mediados por FXR será una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad o condición mediada por FXR.

De manera similar, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad hepática colestásica o el aumento del flujo biliar será una cantidad suficiente para aumentar el flujo biliar al intestino.

La cantidad del compuesto de la invención que se requiere para lograr el efecto biológico deseado dependerá de una serie de factores tales como el uso para el que está destinado, los medios de administración y el receptor, y será en última instancia a discreción del médico o veterinario asistente. En general, se puede esperar que una dosis diaria típica para el tratamiento de una enfermedad y condición mediada por FXR, por ejemplo, esté en el intervalo de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Esta dosis se puede administrar como una sola dosis unitaria o como varias dosis unitarias separadas o como una infusión continua. Dosis similares serían aplicables para el tratamiento de otras enfermedades, afecciones y terapias, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, un compuesto de la invención conjuntamente, y/o en mezcla, con al menos un vehículo o diluyente farmacéutico. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse en la prevención o el tratamiento de las enfermedades o afecciones anteriores.

El vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable y debe ser compatible con, por ejemplo, no tener un efecto perjudicial sobre los otros ingredientes en la composición. El vehículo puede ser sólido o líquido y preferiblemente se formula como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta que puede contener de 0.05 a 95% en peso del ingrediente activo. Si se desea, también pueden incorporarse otros ingredientes fisiológicamente activos en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Las formulaciones posibles incluyen aquellas adecuadas para administración oral, sublingual, bucal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal, tópica que incluye administración transdérmica, intranasal

- e inhalatoria. Los medios de administración más adecuados para un paciente en particular dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o condición que se trate o la naturaleza de la terapia que se use y de la naturaleza del compuesto activo, pero cuando sea posible, se prefiere la administración oral para la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por FXR. Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden proporcionarse como unidades discretas, tales como tabletas, cápsulas, sellos, pastillas, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvos o gránulos; como soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; o como emulsiones de aceite en agua o agua en aceite.
- Las formulaciones adecuadas para administración sublingual o bucal incluyen pastillas que comprenden el compuesto activo y, típicamente una base con sabor, tal como azúcar y goma arábica o tragacanto y pastillas que comprenden el compuesto activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o goma arábica de sacarosa.
- Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden típicamente soluciones acuosas estériles que contienen una concentración predeterminada del compuesto activo; la solución es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor deseado.
- Formulaciones adicionales adecuadas para administración parenteral incluyen formulaciones que contienen codisolventes y/o agentes complejantes fisiológicamente adecuados tales como tensioactivos y ciclodextrinas. Las emulsiones de aceite en agua también son formulaciones adecuadas para formulaciones parenterales. Aunque tales soluciones se administran preferiblemente por vía intravenosa, también se pueden administrar por inyección subcutánea o intramuscular.
- Las formulaciones adecuadas para la administración rectal se proporcionan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria que comprenden el ingrediente activo en uno o más vehículos sólidos que forman la base del supositorio, por ejemplo, manteca de cacao.
- Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica o intranasal incluyen ungüentos, cremas, lociones, pastas, geles, aerosoles y aceites. Los vehículos adecuados para tales formulaciones incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y combinaciones de los mismos.
- Las formulaciones de la invención se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, típicamente mezclando uniforme e íntimamente el compuesto activo con líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, en las proporciones requeridas y luego, si es necesario, dando forma a la mezcla resultante en la forma deseada.
- Por ejemplo, una tableta puede prepararse comprimiendo una mezcla íntima que comprende un polvo o gránulos del ingrediente activo y uno o más ingredientes opcionales, tales como un aglutinante, lubricante, diluyente inerte o agente dispersante de superficie activa, o mediante moldeo de una mezcla íntima de ingrediente activo en polvo y diluyente líquido inerte.
- Las formulaciones adecuadas para la administración por inhalación incluyen polvos o pulverizados de partículas finas que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados a dosis medidas.
- Para la administración pulmonar por la boca, el tamaño de partícula del polvo o gotas está típicamente en el intervalo de 0.5-10 μm , preferiblemente 1-5 μm , para asegurar la administración en el árbol bronquial. Para la administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula en el intervalo de 10-500 μm para asegurar la retención en la cavidad nasal.
- Los inhaladores de dosis medidas son dispensadores de aerosol presurizados, que contienen típicamente una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante el uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido, típicamente de 10 a 150 μl , para producir una pulverización de partículas finas que contiene el ingrediente activo. Los propelentes adecuados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más codisolventes, por ejemplo, tensioactivos de etanol, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitán, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.
- Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una niebla terapéutica de aerosol, ya sea por medio de la aceleración de un gas comprimido, típicamente aire u oxígeno, a través de un estrecho orificio venturi, o por medio de agitación ultrasónica. Las formulaciones adecuadas para uso en nebulizadores consisten en el ingrediente activo en un vehículo líquido y comprenden hasta 40% p/p de la formulación, preferiblemente menos de 20% p/p. El vehículo es típicamente agua o una solución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente hecha isotónica con fluidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes reguladores y tensioactivos.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración por insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden administrarse por medio de un insuflador o introducirse en la cavidad nasal a manera de rapé. En el insuflador, el polvo está contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente hechos de gelatina o plástico, que se perforan o abren *in situ* y el polvo se administra mediante aire aspirado a través del dispositivo por inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste o bien únicamente en el ingrediente activo o en una mezcla en polvo que comprende el ingrediente activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El ingrediente activo típicamente comprende de 0.1 a 100 p/p de la formulación.

10 Además de los ingredientes específicamente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes y las formulaciones adecuadas para administración intranasal pueden incluir perfumes.

15 Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera a fin de limitar el alcance de la invención.

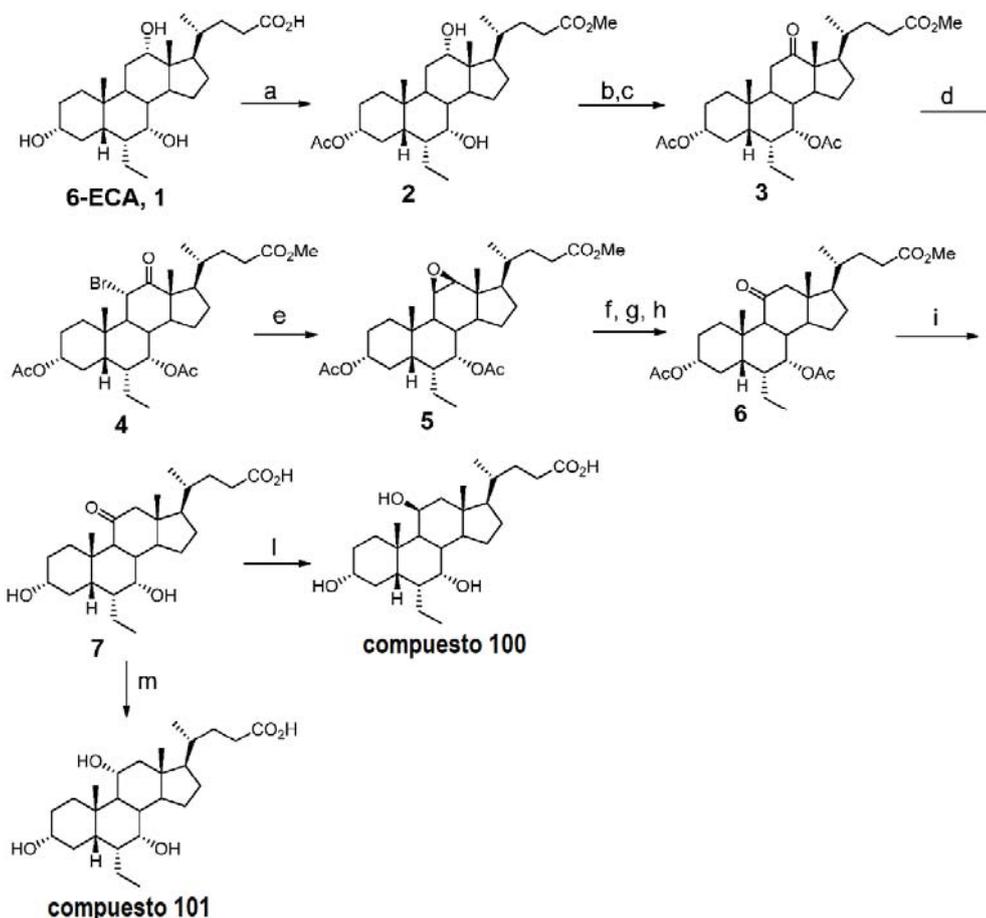
Ejemplos

20 En general, el potencial de un compuesto de la invención como candidato a fármaco puede analizarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la validación *in vitro* de FXR: su actividad y selectividad pueden evaluarse usando AlphaScreen (ensayo bioquímico); la expresión génica puede evaluarse usando RT-PCR (gen objetivo FXR); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) puede evaluarse usando el contenido de ATP, liberación de LDH y activación de caspasa-3. Para la validación *in vitro* para TGR5: su actividad y selectividad pueden evaluarse usando HTR-FRET (ensayo basado en células); la expresión génica puede evaluarse usando RT-PCR (gen diana de TGR5 (es decir, cFOS)); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) puede evaluarse usando el contenido de ATP, liberación de LDH y activación de caspasa-3. Las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción)/farmacocinéticas y la validación *in vivo* de los compuestos de la invención también se pueden estudiar utilizando métodos conocidos en la técnica.

30 Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos 100 y 101

Los compuestos 100 y 101 se sintetizaron de acuerdo con el esquema a continuación.

Esquema 1



Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, p-TSA, ultrasonido, 3 h, cuantitativo; 2) Ac₂O, NaHCO₃ THF, reflujo 12 h, 85 %; b) PCC, CH₂Cl₂, 6 h, 62%; c) Ac₂O, Bi(OTf)₃, CH₂Cl₂, 1 h, 91%; d) Br₂, benceno, 30°C durante la noche, 74%; e) NaBH₄, NaOAc, Pir, temperatura ambiente 2 días, 80%; f) HI 57%, AcOH, temperatura ambiente 30 minutos; g) CrO₃, AcOH, temperatura ambiente 45 min; h) polvo de Zn, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2M, MeOH, temperatura ambiente durante la noche, 65% del compuesto 5; l) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70%; m) Na(s), sec-BuOH, 50°C, 70%.

La síntesis se basa en el uso de ácido 6 α -etil-cólico (6-ECA, 1) como material de partida que se preparó usando métodos conocidos en la técnica. Se trató 6-ECA (1) con p-TSA en MeOH bajo irradiación con ultrasonido para dar el correspondiente éster metílico, que se protegió selectivamente en la posición C3 sometiendo a reflujo con Ac₂O en presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. Compuesto tratante 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente seguido de tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el intermedio 3 α ,7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; 48% del compuesto 2).

El tratamiento del compuesto 3 con Br₂ en benceno durante, por ejemplo, 12 h produjo el compuesto 4. La reacción del compuesto 4 con NaBH₄ y NaOAc en piridina recién destilada dio el epóxido 11 β -12 β correspondiente (compuesto 5), en aproximadamente 59% de rendimiento después de purificación de gel de sílice. La reacción del compuesto 5 con HI en AcOH a temperatura ambiente proporcionó el intermediario de halohidrina que luego se oxidó en la posición C11 con CrO₃ en AcOH para generar el compuesto 6. Reacción del compuesto 6 con polvo de Zn en AcOH en ebullición e hidrólisis alcalina (NaOH/MeOH) proporcionó ácido 3 α ,7 α -hidroxi-12-ceto-5 β -colan-24-oico (compuesto 7, rendimiento de aproximadamente 65% del compuesto 5).

El compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el carbonilo C11 usando NaBH₄ en una mezcla de THF/H₂O=(4:1, v/v) para dar ácido 3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (Compuesto 100, aproximadamente 27% del compuesto 3), después de la purificación cromatográfica para proporcionar el Compuesto 100.

Alternativamente, el compuesto 7 se redujo con sodio en sec-BuOH a 50°C para dar el Compuesto 101 (aproximadamente 70% de rendimiento) después de la purificación.

Ejemplo 2: El compuesto 100 es un agonista de FXR potente y específico

En el núcleo, los receptores nucleares unidos a ligandos (NR) modulan el inicio de la transcripción interactuando directamente con la maquinaria de transcripción basal o contactando factores puente llamados coactivadores (Onate SA, et al., Science 1995; 270: 1354-1357; Wang JC, et al., J Biol Chem 1998; 273: 30847-30850; Zhu Y, et al., Gene Expr 1996; 6: 185-195). La interacción ligando-dependiente de NRs con sus coactivadores ocurre entre la función de activación 2 (AF-2), localizada en el dominio de unión al ligando del receptor (LBD) y las casillas del receptor nuclear (caja NR) ubicadas en los coactivadores (Nolte RT, et al., Nature 1998; 395: 137-143). Varias líneas de evidencia han demostrado que la secuencia del péptido LXXLL presente en el recuadro NR representa un motivo característico que facilita la interacción de diferentes proteínas con la región AF-2 (Heery DM, et al., Nature 1997; 387: 733-736; Torchia J, et al., Nature 1997; 387: 677-684).

Se utilizó AlphaScreen con el objetivo de identificar nuevos moduladores aprovechando la interacción bimolecular que prevalece entre FXR y el motivo LXXLL presente en la caja NR del coactivador 1 del receptor de esteroides (SRC-1).

Se incubó FXR-LBD-GST humana con concentraciones crecientes de los ligandos indicados en presencia de péptido LXXLL SRC-1 biotinilado. La señal AlphaScreen aumenta cuando se forma el complejo receptor-coactivador. Los valores de EC₅₀ fueron 8.9 µM para el ácido quenodesoxicólico (CDCA, que es un control positivo), 0.16 µM para el Compuesto A y 0.16 µM para el Compuesto 100. Estos resultados son la media ± D.E. de muestras por triplicado de un experimento representativo de tres realizadas. El ensayo AlphaScreen es un ensayo muy robusto y reproducible, como se muestra por el factor Z' de 0.84 (Zhang JH, et al., J Biomol Screen 1999; 4: 67-73). Por lo tanto, el Compuesto 100 es un agonista de FXR altamente potente.

Además, los datos en la tabla a continuación muestran que el Compuesto 100 es selectivo para FXR humano y no es activo para TGR5 humano.

Tabla 1

Compuesto	Ensayo AlphaScreen FXR Humano	HTR-FRET (cAMP) Humano TGR5 (células NCI-H716)	HTR-FRET (cAMP) sobreexpresión de TGR5 humano
	Ref. CDCA = 15±3µM	Ref. LCA = 7±3µM	Reef. LCA = 0.9±0.1µM
Compuesto 100	0.180±0.02	Ninguna actividad	Ninguna actividad
Compuesto 101	3±2	41.5	
Compuesto A	0.2±0.018	15±5	
Compuesto B	0.03	0.63	
Compuesto C	175	0.9	

Además, utilizando el ensayo AlphaScreen, se demostró que el Compuesto 100 activa específicamente el FXR y no activa otros 13 receptores nucleares implicados en las vías metabólicas.

Tabla 2

Compuesto	Activación de FXR	Activación de LXR β	Activación de PXR	Activación de CAR	Activación de PPAR α	Activación de PPAR δ	Activación de PPAR γ
(Estándar de referencia)	(CDCA = 10-20 μ M)	(T0901317 = 0.08 μ M)	(SR-12183 = 0.062 μ M)	(CITCO = 0.005 μ M)	(GW7647 = 0.003 μ M)	(GW0742 = 0.004 μ M)	(GW1929 = 0.012 μ M)
	EC ₅₀ (μ M)						
Compuesto A	0.16	Ninguna actividad					
Compuesto B	0.03	Ninguna actividad	Ninguna actividad	44*	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad
Compuesto 100	0.16	Ninguna actividad					

Compuesto	Activación de RAR α	Activación de VDR	Activación de TR	Activación de PR	Activación de RXR	Activación de GR	Activación de ER
(Estándar de referencia)	(ATRA = 0.001 μ M)	(Di-HydroxyVitamin D3 = 0.005 μ M)	(T3 = 0.0001 μ M)	(Corticosterone = 0.050 μ M)	(9cisRA = 0.004 μ M)	(Budesonide = 0.0002 μ M)	(Estradiol = 0.001 μ M)
	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)
Compuesto A	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad
Compuesto B	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad
Compuesto 100	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad

*: agonista inverso.

Valores para el compuesto B tomados de Rizzo G., et al., Mol. Pharm., 2010; 78: 617-630.

- 5 La activación de FXR por el Compuesto 100 también se probó en ensayos de transactivación basados en células con el uso de la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con la quimera Gal4-FXR-LBD y el sistema (UAS)5-Luc (Figura 1). La activación de FXR por el Compuesto 100 fue comparable a la inducida por el compuesto A, lo que indica que estos compuestos son potentes agonistas de FXR en ensayos basados en células. La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad del Compuesto 100 en comparación con el compuesto A en un ensayo de transactivación en células HEK293T. NT indica células transfectadas con vector FXR sin exposición al compuesto A o al compuesto 100. Los valores están representados en μ M.

15 Los ácidos biliares (BA) modulan no solo varios receptores de hormonas nucleares, sino que también son agonistas para el receptor acoplado a proteína G (GPCR) TGR5 (Makishima M, et al., Science 1999; 284: 1362-1365; Parks D.J., et al., Science 1999; 284: 1365-1368; Maruyama T, et al., Biochem Biophys Res Commun 2002; 298: 714-719; Kawamata Y, et al., J Biol Chem 2003; 278: 9435-9440) La señalización a través de FXR y TGR5 modula varias vías metabólicas, regulando no solo la síntesis de BA y la recirculación enterohepática, sino también la homeostasis de triglicéridos, colesterol, glucosa y energía. Para evaluar la capacidad de un compuesto de la invención para activar TGR5, se cribaron el Compuesto 100 y otros compuestos de comparación para un aumento del AMPc intracelular como una lectura para la activación de TGR5. Las células humanas enteroendocrinas NCI-H716 que expresan constitutivamente TGR5 se expusieron a concentraciones crecientes de Compuesto 100, y los niveles de cAMP intracelular se midieron mediante TR-FRET. El ácido litocólico (LCA) se usó como control positivo.

25 Como se muestra en la Figura 2A, el Compuesto 100 no induce la actividad de TGR5 en células que expresan el receptor fisiológicamente ya que no se observó cambio en el nivel de AMPc intracelular. Para evaluar adicionalmente si el Compuesto 100 podría unirse a TGR5, se expone una línea celular clonal que sobreexpresa TGR5 a diferentes concentraciones de Compuesto 100. Los resultados ilustrados en la Figura 2B muestran que incluso con la sobreexpresión del receptor TGR5, el Compuesto 100 no tenía efecto relevante. La Figura 2A es un gráfico que muestra la actividad de TGR5 del Compuesto 100 (sin actividad) y LCA en células enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 a nivel fisiológico. Los resultados se muestran como la media \pm S.D. de muestras por triplicado de un experimento representativo de tres realizadas. La Figura 2B es un gráfico que muestra la actividad de TGR5 del Compuesto 100 (sin actividad) y el LCA en células humanas de ovario de hámster (CHO) que sobreexpresan TGR5.

Ejemplo 3: Genes diana FXR modulados por el Compuesto 100

Para evaluar la capacidad del Compuesto 100 para modular los genes diana FXR, se realizaron ensayos cuantitativos de RT-PCR. Las células HepG2 se seleccionaron como una línea celular relevante para determinar si un compuesto de la invención puede regular la red genética FXR endógena. La capacidad de un compuesto de la invención para inducir genes diana de FXR se evaluó aislando ARN total de células tratadas durante la noche con 1 μM de compuestos A, B y 100. El compuesto A se establece como un potente agonista selectivo de FXR y el compuesto B se establece como un potente agonista FXR/TGR5. El perfil de activación del gen del compuesto 100 en células HepG2 se comparó con los perfiles de los compuestos A y B. (Pellicciari, R, et al., *J Med Chem.* 2002; 15 de agosto; 45: 3569-72; Rizzo, G, et al., *Mol. Pharm.*, 2010; 78: 617-630).

FXR regula la expresión de varios genes diana implicados en la homeostasis de BA. En resumen, FXR juega un papel central en varias vías metabólicas, incluyendo, por ejemplo, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo de los ácidos biliares y el metabolismo de los hidratos de carbono. Con respecto al perfil de expresión génica, los genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos incluyen, por ejemplo, APOCII, APOE, APOAI, SREBP-1C, VLDL-R, PLTP y LPL; los genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos biliares incluyen, por ejemplo, OST α/β , BSEP, MRP2, SHP, CYP7A1, FGF19, SULT2A1 y UGT2B4; y los genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos incluyen, por ejemplo, PGC1a, PEPCK y GLUT2.

Como se muestra en las Figuras 3A-3H, la activación del FXR del compuesto 100 reprime indirectamente la expresión de las enzimas biosintéticas de BA CYP7A1 aumentando los niveles del receptor nuclear SHP en el hígado y el intestino y aumentando el nivel de FGF19 (Goodwin, B, et al., *Mol. Cell* 2000; 6: 517-526). El FXR activado del compuesto 100 también regula positivamente la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de BA, que incluyen BSEP y OST α y OST β . Los BA recién sintetizados se conjugan con taurina o glicina y luego se secretan activamente en la vesícula biliar, FXR regula ambos procesos críticos. Los BA monoaniónicos y dianiónicos conjugados se secretan activamente en la vesícula biliar por BSEP y la proteína 2 relacionada con múltiples fármacos (MRP2), respectivamente. Estos transportadores pertenecen a la familia de transportadores ABC y ambos son inducidos por FXR a nivel transcripcional. La regulación de estos transportadores ABC es de importancia crítica para evitar la acumulación de BA en el hígado y la consiguiente lesión hepática (Schinkel AH, et al., *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.* *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 13 de septiembre).

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la actividad del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en la regulación de la expresión de OST α (A), OST β (B), BSEP (C), MRP2 (D), CYP7A1 (E), SHP (F), FGF-19 (G) y UGT2B4 (H). Tenga en cuenta en las Figuras 3A-3H, el eje y muestra cambio en plegamientos en la expresión relativa a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres repeticiones.

La activación de FXR contribuye al transporte de colesterol inverso, un proceso que da como resultado el suministro de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para la eliminación biliar y la consiguiente eliminación fecal (Lambert, G, et al., *J Biol Chem* 2003; 278, 2563-70). En este escenario metabólico, FXR regula la expresión de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), responsable de la transferencia de fosfolípidos y colesterol de LDL a HDL, lipoproteínas hepáticas, como ApoE, ApoC-I, ApoC-IV y receptor de barrido B1 (SRB1), que está involucrado en la absorción hepática de HDL.

FXR controla el metabolismo de triglicéridos (TG) al regular la lipogénesis hepática de novo y la eliminación de triglicéridos. Tras la activación por el Compuesto 100, FXR regula la expresión de SREBP-1c, un factor de transcripción que desempeña un papel crítico en la estimulación de la síntesis de ácidos grasos y lipogénesis (Figuras 4A-4D) (Landrier, JF, et al., *J Clin Invest* 2004; 113, 1408-18). Además de la reducción de la lipogénesis de novo, la activación de FXR también modula la eliminación de TG. Este efecto reductor de TG adicional de FXR se explica a nivel molecular mediante la inducción de genes clave, tales como Apo-C-I1 LPL y receptor de VDL (Kast, HR, et al., *Mol Endocrinol* 2001; 15, 1720-8)

La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran la actividad del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en la regulación de PLTP implicada en el metabolismo lipídico (A), SREBP-1C (B), APOCII (C) y PPAR γ (D). Nótese que en las Figuras 4A-4D, el eje y muestra cambio plegamientos en la expresión con respecto a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres repeticiones.

FXR también puede tener un papel en el metabolismo de carbohidratos. (Ma K, et al., *J Clin Invest.* 2006; 116: 1102-9). Se estudió la regulación del gen PEPCK (Figura 5) usando el Compuesto 100. La Figura 5 es un gráfico que muestra la regulación del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en el gen PEPCK. El eje y muestra cambios en plegamientos en la expresión con respecto a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres repeticiones.

Colectivamente, los estudios de expresión génica mostraron que el Compuesto 100 modula los mismos genes diana de FXR que el compuesto A o B (también véase la Tabla 3).

Tabla 3

Gen	Compuesto A (1µM)	Compuesto B (1µM)	Compuesto 100 (1µM)
OST α	arriba	arriba	arriba
OST β	arriba	arriba	arriba
BSEP	arriba	arriba	arriba
SHP	arriba	arriba	arriba
CYP7 α 1	abajo	abajo	abajo
UGT2B4	arriba	arriba	arriba
MRP2	arriba	arriba	arriba
FGF-19	arriba	arriba	arriba
PPAR γ	arriba	arriba	arriba
PLTP	arriba	arriba	arriba
APOCII	arriba	arriba	arriba
PEPCK	arriba	arriba	arriba
SREBP-1C	abajo	abajo	abajo

5

Ejemplo 4: El compuesto 100 no ejerce efectos citotóxicos en células HepG2.

Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* del Compuesto 100, se emplearon dos métodos de ensayo diferentes. Los ensayos evaluaron la viabilidad celular midiendo los niveles de ATP y la citotoxicidad midiendo la liberación de LDH. El nucleótido trifosfato de adenosina (ATP) representa la fuente de energía en el nivel molecular básico, ya que es una molécula multifuncional que se usa en cada célula como una coenzima y es una parte integral del ADN mitocondrial (Kangas L, et al., Medical Biology, 1984; 62, 338-343; Crouch SPM, et al., J. Immunol. Methods, 1993; 160, 81-88; Petty RD, et al., J. Biolumin. Chemilumin. 1995; 10, 29-34). Se lo ha llamado la "unidad molecular monetaria" en lo que respecta a la transferencia de energía intracelular. Esto es para asegurar el importante papel del ATP en el metabolismo y una caída en el contenido de ATP es el primer paso para revelar el daño celular (Storer RD, et al., Mutation Research, 1996; 368, 59-101; Cree IA, Andreotti PE., Toxicology in Vitro, 1997; 11, 553-556).

Se determinó la viabilidad celular como medida del ATP intracelular relacionado con el tiempo de exposición y concentración de los compuestos de prueba (Sussman, NL., Promega Cell Notes, Issue 3.2002).

La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de ATP en células HepG2, tratadas con las concentraciones indicadas de compuestos durante 4 h. Demostró que todas las células en presencia de diferentes concentraciones de Compuesto 100 eran viables como células tratadas con el vehículo solo, es decir, todas las células tratadas con el Compuesto 100 permanecían viables (100%). Se utilizó LCA, un ácido biliar citotóxico bien conocido como comparador y se usó tamoxifeno como controles positivos para los ensayos.

Un método adicional para determinar la viabilidad de las células es detectar la integridad de la membrana que define la compartimentación celular. La medición de la fuga de componentes fuera del citoplasma, en membranas celulares dañadas, indica la pérdida de la integridad de la membrana, y la liberación de LDH es el método utilizado para determinar la toxicidad común en las células. Se trataron células HepG2 con el Compuesto 100, se realizaron diluciones en serie, se añadieron diluciones de LCA a las células en placas como control del ensayo junto con ausencia de células y células sin tratar. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de compuesto de ensayo.

Los resultados muestran que el Compuesto 100 no induce ningún efecto citotóxico sobre las células HepG2. El ácido litocólico aumentó la liberación de LDH a 70 µM, mientras que el control del tamoxifeno ejerció los efectos citotóxicos a aproximadamente 25 µM (véase la Tabla 4).

Tabla 4

Compuesto	Integridad de la membrana EC ₅₀ (µM) (medición por LDH)
Tamoxifen	35±10
LCA	75±5
Compuesto A	190±30
Compuesto B*	670
Compuesto 100	Sin toxicidad (100% de células vivas)
Compuesto 101	Sin toxicidad (100% de células vivas)
* Rizzo et al., Mol. Pharm. 2010	

Ejemplo 5: El compuesto 100 no inhibe las enzimas del citocromo P450.

5 Para evaluar el potencial del Compuesto 100 para las interacciones fármaco-fármaco, se investigaron las seis isoformas principales de CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4). (Obach, RS, et al., J Pharmcol Exp Ther, 2006; 316(1): páginas 336-48).

10 Para determinar la interacción entre el Compuesto 100 y las enzimas del citocromo P450, el Compuesto 100 se analizó por su capacidad para inhibir (o no) la producción de una señal fluorescente, utilizando proteínas CYP450 recombinantes (baculosomas, Invitrogen), sustratos e inhibidores (Bidstrup, TB, et al., Br J Clin Pharmacol, 2003; 56(3): página 305-14). Como control positivo, se probó un inhibidor selectivo para cada isoforma del CYP450 en la misma placa (Tabla 5).

Tabla 5

CPY450	Compuesto A IC ₅₀ (µM)	Compuesto B IC ₅₀ (µM)	Compuesto 100 IC ₅₀ (µM)
CYP1A2	>10	>10	>10
Referencia:			
Furafilina = 0.5µM			
CYP3A4 (Sustrato verde)	>10	>10	>10
Referencia:			
Ketoconazol = 0.044µM			
CYP3A4 (Sustrato azul)	>10	>10	>10
Referencia:			
Ketoconazol = 0.04µM			
CYP2C9	>10	>10	>10
Referencia:			
Sulfafenazol = 0.4µM			
CYP2C19	>10	>10	>10
Referencia:			
Miconazol = 0.06µM			
CYP2D6	>10	>10	>10
Referencia:			
Quinidina = 0.01µM			
CYP2E1	>10	>10	>10
Referencia:			
DCC = 0.4µM			

IC₅₀ >10 μM significa que el compuesto no inhibe el CYP450. Los resultados obtenidos demostraron que el Compuesto 100, al igual que los compuestos A y B, no inhibe las enzimas del citocromo P450 probadas, lo que muestra que el Compuesto 100 probablemente no estará influenciado por los efectos de la interacción fármaco-fármaco. (Rizzo, G, et al., Mol Pharm, 2010; 78: 617-630).

5

Ejemplo 6: El Compuesto 100 no inhibe el canal de potasio ERG humano

Para determinar la función del canal iónico, se empleó el ensayo de polarización en fluorescencia de hERG Predictor™, ya que proporciona un método eficiente para una determinación inicial de la propensión de los compuestos de ensayo a bloquear el canal hERG (Dorn, A, et al., J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47). El ensayo se basa en la suposición de que la actividad de los canales de potasio hERG contribuye al potencial de membrana en reposo en las células transfectadas permanentemente, y por lo tanto un bloqueo de los canales de hERG debería dar como resultado una despolarización de la membrana celular. El ensayo se diseñó para identificar posibles bloqueadores de los canales de hERG al producir datos que se correlacionan con precisión con los estudios de electrofisiología con pinzamiento de parche. Los resultados del ensayo Predictor demuestran una alta correlación con los obtenidos a partir de las técnicas de pinzamiento de parche (Tabla 6) (Dorn, A, et al., J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47).

15

Tabla 6

	Pinzamiento de parche*	Radioligando*	FP
Compuesto	IC ₅₀ (nM)		
Astemizol	1.2	1	1.3
Dofetilida	12	40	6.9
Terfenadina	16	30	23
E-4031	48	20	34
Bepridil	550	170	210
Tioridazina	1250	510	708
Fluoxetina	990	2230	4310
Amitriptilina	10000	2440	11200

20

La Tabla 6 muestra la comparación de los valores de IC₅₀ generados con el ensayo de polarización en fluorescencia de hERG Predictor™ con los valores de IC₅₀ informados a partir de los ensayos de Pinzamiento de parche y de desplazamiento de radioligando.

25

Se usaron preparaciones de membrana de células de ovario de hámster chino transfectadas de manera estable con canal de potasio hERG para evaluar el efecto inhibitor potencial del Compuesto 100 en este canal usando el ensayo de polarización en fluorescencia Predictor. La reducción de la polarización de la membrana como resultado de la inhibición del canal de potasio hERG se correlaciona directamente con una reducción de la polarización en fluorescencia (FP). Los resultados muestran que, al igual que los compuestos A y B, el Compuesto 100 no bloquea ni inhibe el canal de potasio hERG.

30

El ensayo se realizó por triplicado usando una dosis-respuesta de 16 puntos del compuesto de prueba y los controles positivos E-4031 y tamoxifeno. Se obtuvo una IC₅₀ de 15 nM (ΔmP = 163) para E-4031 y 1.4 μM (ΔmP = 183) para tamoxifeno. La ventana de ensayo de más de 100 mP (milipolarización) se considera buena. El valor de Z' fue 0.78 indicando un ensayo excelente. Las curvas de regresión no lineal se obtuvieron mediante el análisis GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), para calcular los valores de IC₅₀.

35

En resumen, la señalización a través de FXR modula una variedad de rutas metabólicas, por lo que los moduladores de FXR selectivos son candidatos atractivos para el tratamiento de una gama de enfermedades crónicas que afectan enfermedades hepáticas, renales y metabólicas. Los resultados en los ejemplos descritos en este documento caracterizan el Compuesto 100, como un agonista de FXR potente y específico.

40

De manera notable, aunque activó potentemente el FXR, el Compuesto 100 no mostró actividad contra otros receptores nucleares y no activó el ácido biliar GPCR TGR5. Además de una alta selectividad del receptor nuclear, el Compuesto 100 posee un perfil farmacológico adecuado para un fármaco candidato. El compuesto 100 no muestra efecto citotóxico en células hepáticas HepG2 humanas, lo que indica una falta de toxicidad hepática y no inhibe ninguna de las enzimas CYP450 probadas, lo que indica que el compuesto 100 carece de riesgo significativo de interacción fármaco-fármaco. Además, el Compuesto 100 no inhibe el canal de potasio ERG humano.

45

La selectividad y la potencia combinadas del Compuesto 100 junto con sus propiedades favorables similares a las del fármaco, en particular un excelente perfil de seguridad, hacen que el Compuesto 100 sea un candidato atractivo para tratar y prevenir enfermedades.

5 Ejemplo 7: Propiedades fisicoquímicas del compuesto 100

Las propiedades fisicoquímicas del Compuesto 100 tales como solubilidad en agua, concentración micelar crítica, tensión superficial y LogP_A se determinaron usando métodos conocidos en la técnica. Estas propiedades del Compuesto 100 se compararon con análogos naturales y sintéticos (Tabla 7).

10

Tabla 7

Ácido biliar	$W_s^{(a)}$ (μM)	$\text{CMC}^{(b)}$ (mM)	$\text{ST}_{\text{CMC}}^{(c)}$ (Dinas/cm)	$\text{LogP}_A^{(d)}$
Compuesto 100	143-150	15.8	47.8	0.8
CA	273	9-11	49.0	1.1
CDCA	32	3.2	45.5	2.2
UDCA	7-7.5	6-10	50.5	2.2
TCDCA	hs	3.0	-	0.9
TUDCA	hs	2.2	-	1.1
Compuesto A	9	2.9	43.2-48.8	2.5
Compuesto B	hs	1.3	43.3-47.9	2.0
Compuesto C	99	2	50.1	1.4
Compuesto D	15	-	-	2.9
Compuesto E	120	5.9	52.4	1.6

^a W_s : la solubilidad en agua se refiere a BA como especie protonada y, por lo tanto, no se evalúa para el Compuesto B, TCDCA y TUDCA que son altamente solubles (hs);

^bCMC: Concentración micelar crítica determinada en solución de NaCl 0.15 M en agua;

^c ST_{cmc} : Tensión superficial en CMC en solución de NaCl 0.15 M en agua;

^d LogP_A : 1 Coeficiente de partición en octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas;

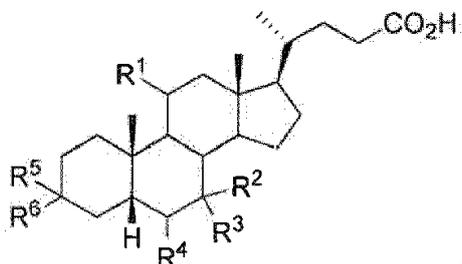
Ejemplo 8: Farmacocinética y metabolismo en ratas con fístula biliar después de la administración id e iv: *in vivo*

15 A los modelos *in vivo*, ratas, se les administró una dosis única de Compuesto 100 a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Kg}$ 1 hora (véanse las Figuras 7A, 7B y 7C). La Figura 7A es un gráfico que muestra el efecto colerético del Compuesto 100 para la administración id e iv. La Figura 7B es un gráfico que muestra la secreción del Compuesto 100 a lo largo del tiempo para la administración id e iv. La Figura 7C es un gráfico que muestra la concentración en plasma del Compuesto 100 a lo largo del tiempo.

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ es hidroxilo;

R² es hidrógeno, hidroxilo, alquilo o halógeno, en donde dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^a;

R³ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo o halógeno, en donde dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^b;

R⁴ es alquilo, alquenilo, alquinilo o halógeno, en el que dicho alquilo no está sustituido o está sustituido con uno o más R^c;

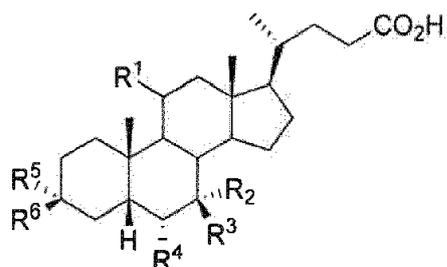
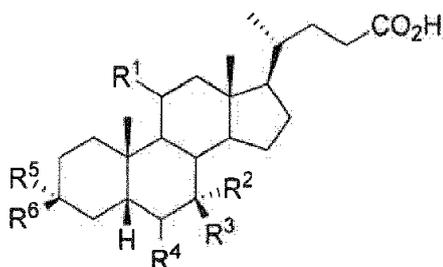
R^a, R^b y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;

R⁵ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻ o hidrógeno; y

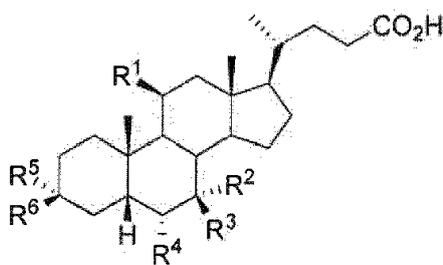
R⁶ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻ o hidrógeno;

o tomados juntos R⁵ y R⁶ con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo.

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



o



o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los mismos.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde uno de R² o R³ es hidroxilo o halógeno y el R² o R³ restante es hidrógeno o alquilo no sustituido.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde uno de R^2 o R^3 es hidroxilo y el R^2 o R^3 restante es hidrógeno.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde uno de R^5 o R^6 es hidroxilo y el R^5 o R^6 restante es hidrógeno.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R^2 es hidroxilo o halógeno.

7. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde R^3 es hidrógeno o alquilo no sustituido.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en donde R^3 es metilo.

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R^2 es hidroxilo y R^3 es hidrógeno.

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde R^5 es hidroxilo.

11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde R^6 es hidrógeno.

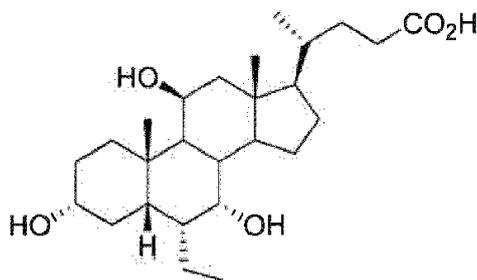
12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 9-11, en donde R^2 y R^5 son cada uno hidroxilo y R^3 y R^6 son cada uno hidrógeno.

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde R^4 es alquilo.

14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde R^4 es alquilo no sustituido.

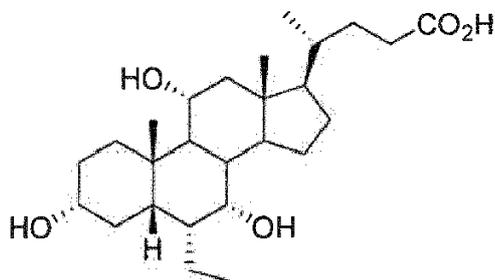
15. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde R^4 es etilo.

16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de la siguiente fórmula:



o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de la siguiente fórmula:



o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

19. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o condición mediada por FXR en un sujeto.

20. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha enfermedad o condición mediada por FXR se selecciona de enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática crónica, trastorno de lípidos, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad metabólica, cáncer y enfermedad neurológica.

Figura 1

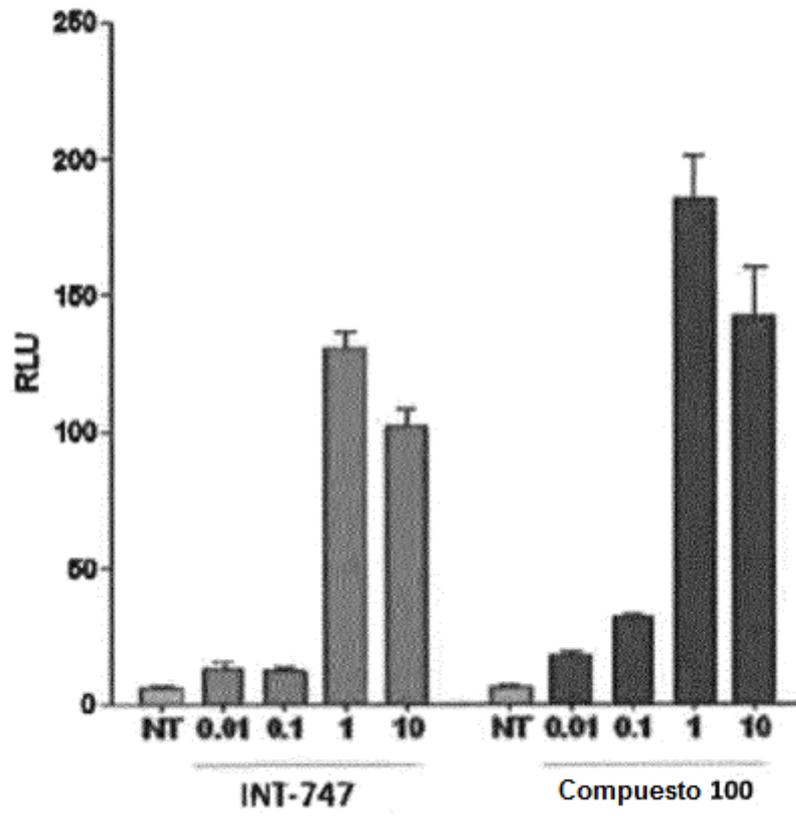
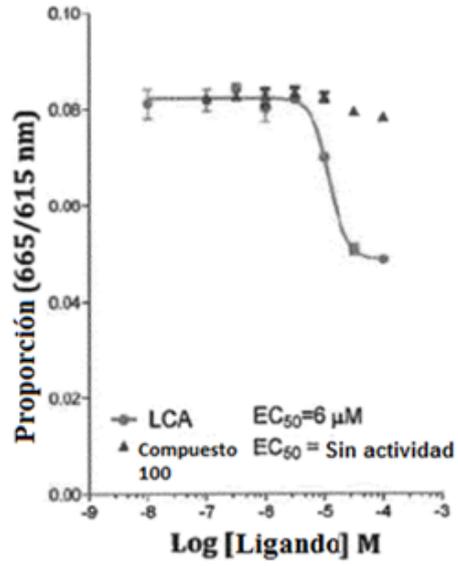


Figura 2

A



B

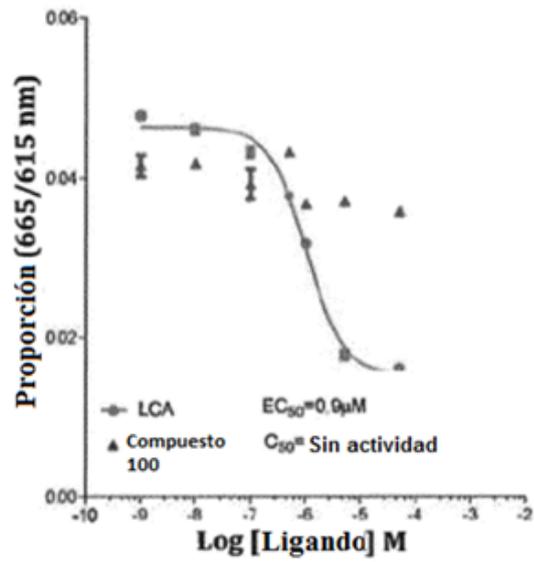


Figura 3

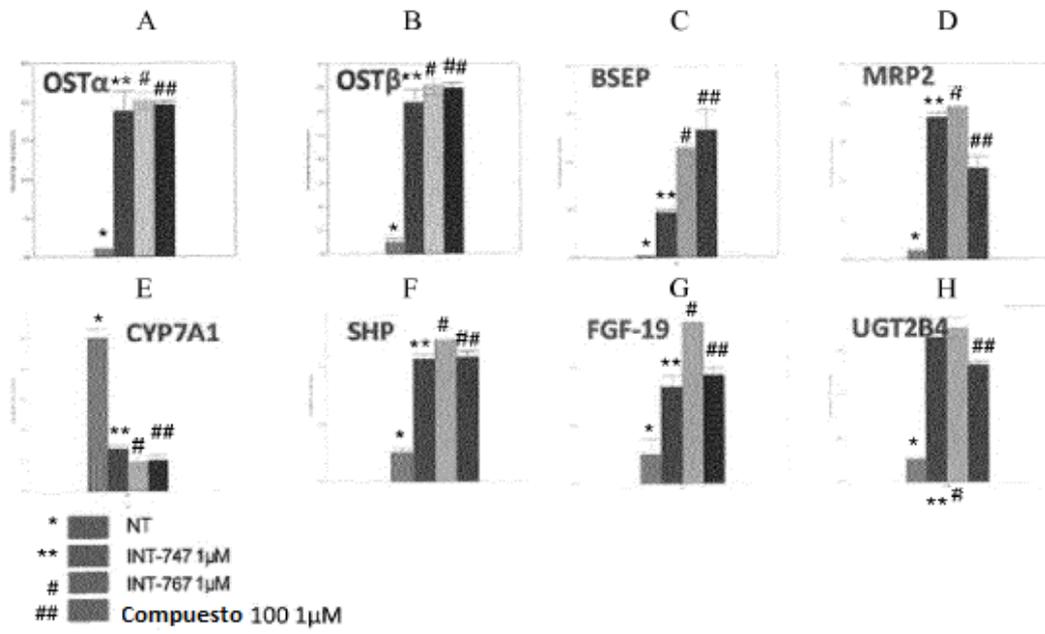


Figura 4

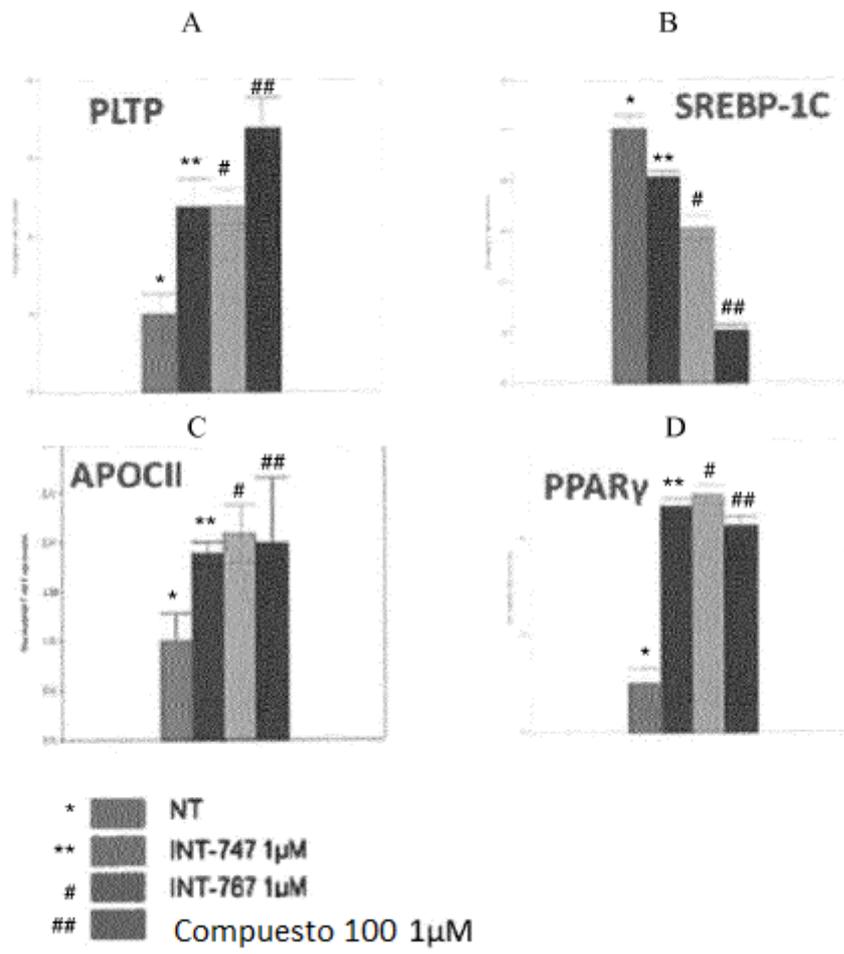
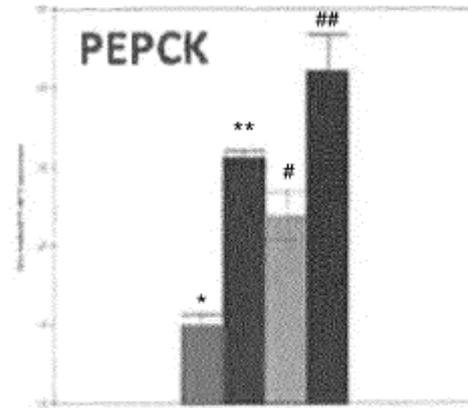


Figura 5



- * ■ NT
- ** ■ INT-747 1µM
- # ■ INT-767 1µM
- ## ■ Compuesto 100 1µM

Figura 6

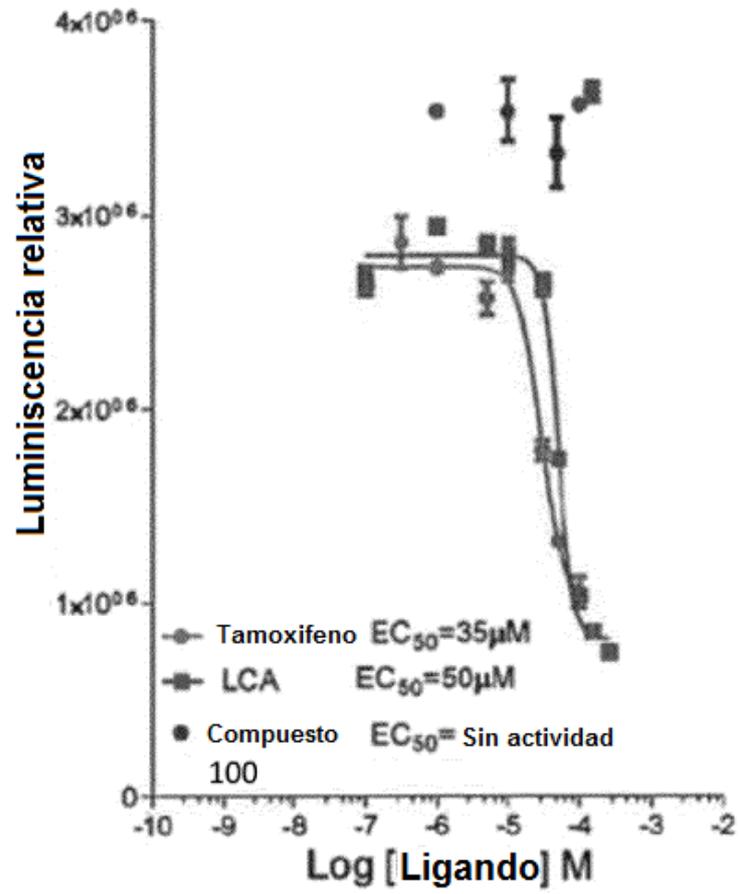
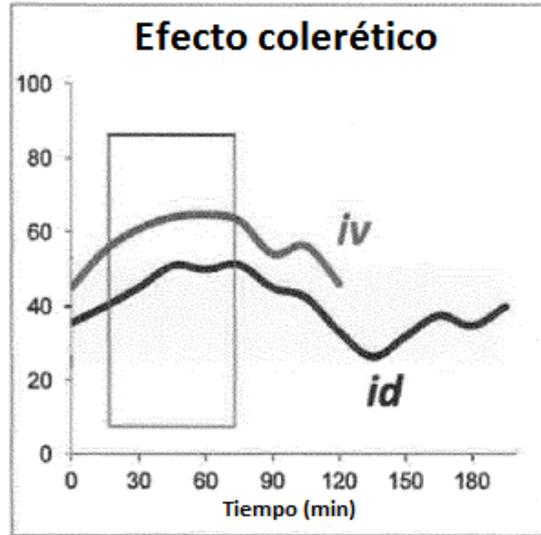
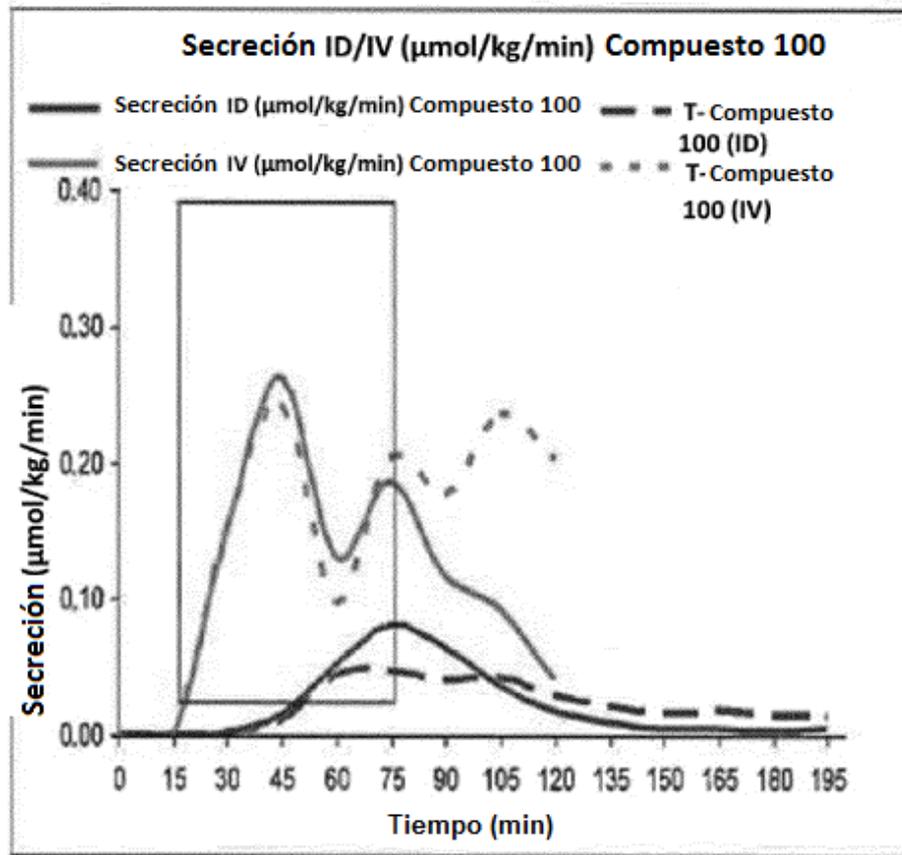


Figura 7

A



B



C

