

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 240**

21 Número de solicitud: 201731488

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

C07J 75/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.06.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (45.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 LEIOA (Bizkaia) ES;
ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (35.0%);
INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE
BELLVITGE (IDIBELL) (5.0%) y
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (15.0%)**

72 Inventor/es:

**BAÑALES ASURMENDI, Jesús María;
BUJANDA FERNÁNDEZ DE PIÉROLA, Luis;
SANTOS LASO, Álvaro;
COSSÍO MORA, Fernando Pedro;
RIVILLA DE LA CRUZ, Iván;
CABALLERO CAMINO, Francisco Javier;
ESTELLER BADOSA, Manel y
GARCÍA MARÍN, José Juan**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES SELECTIVOS FRENTE A HDAC6 DERIVADOS DEL ÁCIDO URSODECOXICÓLICO**

57 Resumen:

Desarrollo de nuevos inhibidores selectivos frente a HDAC6 derivados del ácido ursodecoxílico.

La presente invención se dirige a compuestos derivados del ácido ursodecoxílico de fórmula (1), a procedimientos para su obtención, así como el uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades poliquísticas, en particular, enfermedad hepática poliquística autosómica dominante, enfermedad renal poliquística autosómica dominante o enfermedad renal poliquística autosómica recesiva.

ES 2 718 240 A1

DESCRIPCIÓN**DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES SELECTIVOS FRENTE A HDAC6
DERIVADOS DEL ÁCIDO URSODECOXICÓLICO**

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra dentro de los tratamientos terapéuticos dirigidos a enfermedades hepáticas poliquísticas. En particular, se refiere a una terapia que combina en una misma molécula derivada de ácido ursodecoxílico la capacidad de aumentar los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los colangiocitos humanos poliquísticos y de reducir la proliferación de dichos colangiocitos humanos, así como de inhibir selectivamente la actividad de la enzima HDAC6, mecanismos todos ellos involucrados en el desarrollo de las citadas enfermedades.

ANTECEDENTES

15 Las enfermedades hepáticas poliquísticas (también denominadas por sus siglas en inglés PLDs) constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes genéticos heredados de forma dominante [enfermedad hepática poliquística autosómica dominante (ADPLD: 1:100.000) y enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD: 1:1.000)] o recesiva [enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD: 20 1:20.000)], y que están caracterizados por el desarrollo progresivo de múltiples quistes biliares (> 20) que son la principal causa de morbilidad y mortalidad [Gevers, T.J. et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, 10(2), 101-108; Perugorria, M.J., et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(12), 750-761]. Además, un porcentaje elevado de estos pacientes desarrollan también enfermedad renal poliquística (también denominada por sus siglas en inglés PKD).

Actualmente, los tratamientos quirúrgicos y/o farmacológicos existentes no consiguen mejorar la prognosis de estas enfermedades, y el trasplante hepático se presenta como la única opción curativa. Por ello, es clave estudiar en detalle los mecanismos moleculares que rigen la patogenia de las enfermedades hepáticas poliquísticas para poder identificar nuevas dianas terapéuticas a nivel farmacológico.

Se ha demostrado previamente que la cistogénesis en las PLDs está caracterizada por diversas alteraciones funcionales en las células de los conductos biliares (i.e. colangiocitos) poliquísticos [Perugorria, M.J., et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(12), 750-761], tales como hiperproliferación [Banales, J.M. et al., *Hepatology*, 2009, 49(1), 160-174; Muñoz-Garrido, P. et al., *J. Hepatol.*, 2015, 63(4), 952-961], hipersecreción [Banales, J.M. et al., *Am. J. Pathol.*, 2008, 173(6), 1637-1646] aumento de actividad metaloproteolítica [Urribarri, A.D. et al., *Gut*, 2014, 63(10),

1658-1667], cambio en la expresión de microRNAs [Lee, S.O. et al., *J. Clin. Invest.*, 2008, 118(11), 3714-3724] y alteraciones morfológicas y funcionales del cilio primario [Masyuk, T.V. et al., *Am. J. Pathol.*, 2014, 184(1), 110-121] (i.e. organela sensora específica de los colangiocitos en el hígado) [Gradilone, S.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(48), 19138-19143; Masyuk, A.I., et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2008, 295(4), G725-734; Masyuk, A.I. et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2013, 304(11), G1013-1024; Masyuk, A.I. et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010, 299(4), G990-999].

Además, se ha comprobado que estos procesos patológicos están mediados intracelularmente por un aumento en los niveles de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) y con un descenso de calcio (Ca^{2+}), siendo su regulación considerada potencialmente terapéutica [Perugorria, M.J. et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(12), 750-761; Muñoz-Garrido, P. et al., *J. Hepatol.*, 2015, 63(4), 952-961; Gradilone, S.A. et al., *Gastroenterology*, 2011, 139(1), 304-314; Masyuk, T.V. et al., *Gastroenterology*, 2007, 132(3), 1104-1116]. En este sentido, se ha comprobado recientemente que la normalización de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los colangiocitos poliquísticos con ácido ursodesoxicólico (conocido por sus siglas en inglés UDCA) es capaz de bloquear parcialmente la cystogénesis hepática en diversos modelos experimentales de PLD [Munoz-Garrido, P. et al., *J. Hepatol.*, 2015, 63(4), 952-961].

El UDCA es un ácido biliar endógeno con propiedades coleréticas y hepatoprotectoras que se encuentra en baja concentración en el cuerpo humano y su administración crónica produce beneficios terapéuticos en enfermedades colestásicas hepáticas, como la colangitis biliar primaria (CBP) [Beuers, U. et al., *J. Hepatol.*, 2015, 62(1 Suppl), S25-37]. La administración oral de UDCA es bien tolerada, segura y es la única terapia internacionalmente aprobada para el tratamiento crónico de la CBP. En base a todos estos datos, se inició un Ensayo Clínico Multicéntrico Internacional Fase II (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02021110>) en el que se evaluó el potencial terapéutico del tratamiento crónico de pacientes PLD con UDCA. Así, se ha comprobado recientemente [D'Agnolo HMA. et al., *J. Hepatol.*, 2016, 65(3), 601-607] que el UDCA inhibe el crecimiento de los quistes hepáticos en pacientes con enfermedad renal poliquística (i.e. ADPKD) altamente sintomáticos (volumen hepático total > 2,5 litros) y además produce una mejoría significativa en su sintomatología. No obstante, la administración de UDCA no parece mostrar ningún beneficio en la reducción del volumen total del hígado en pacientes con enfermedad hepática poliquística avanzada (ADPLD). Se postula, por tanto, que son necesarios estudios

adicionales para averiguar si los pacientes con ADPKD y ADPLD responden de diferente manera al tratamiento con UDCA.

Puesto que el efecto terapéutico del UDCA en modelos animales y pacientes con PLD es parcial, es clave el estudio de terapias farmacológicas que actúen frente a diferentes vías de señalización involucradas en la patogenia de estas enfermedades, para así poder bloquear eficazmente su desarrollo y/o progresión.

Por otra parte, se ha comprobado que el crecimiento de los quistes hepáticos en las PLDs está mediado en parte por la sobreexpresión citoplasmática de HDAC6 (histone deacetylase 6), la cual promueve la desacetilación de la proteína estructural tubulina- α -acetilada en los cilios primarios de los colangiocitos [Gradilone, S.A. et al., *Am. J. Pathol.*, 2014, 184(3), 600-608]. Este hecho provoca malformaciones estructurales y funcionales de estas organelas que promueven la proliferación celular.

Así, se ha comprobado que la administración crónica de inhibidores farmacológicos de HDAC6 (i.e. Tubastatina, Tubacina y ACY-1215) provoca una disminución en la proliferación de colangiocitos derivados de pacientes con ADPKD y bloquea parcialmente el crecimiento de los quistes hepáticos en modelos experimentales (i.e. *in vitro* e *in vivo*) de PLD.

Además, Wu, M. et al. [*Kidney International*, 2016, 90(1), 20-22] mencionan que la mutación de un gen en una enfermedad poliquística renal conlleva un descenso en la concentración de Ca^{2+} intracelular, así como un aumento en los niveles de AMP cíclico, lo cual está relacionado con la sobreexpresión de la HDAC6. Se postula a partir de esto que el calcio y el AMP cíclico regulan la expresión y la actividad de la HDAC6.

En este sentido, Cebotaru, L. et al. [*Kidney International*, 2016, 90(1), 90-97] observaron que la tubacina previene la formación de quistes en células MDCK (un modelo *in vitro* de cistigénesis) y que el tratamiento con dicho compuesto regula los niveles de AMP cíclico, inhibiendo por tanto la proliferación celular. En los ensayos con un modelo animal de ADPKD se observa, además, que la tubacina reduce el crecimiento de quistes renales mediante la inhibición de células epiteliales que recubren los quistes, mejorando la función renal.

El documento WO2015/061684 describe también inhibidores de HDAC6 que responden a diferentes estructuras, algunas de las cuales conocidas previamente en la literatura (WO2011/091213), para el tratamiento de enfermedades poliquísticas, en particular, aquéllas derivadas de ARPKD (causada por la mutación del gen *Pkhd1*) y enfermedad ADPKD (causada por la mutación del gen *Pkd1* y *Pkd2*). Entre los grupos de pacientes a ser tratados con estos compuestos también se incluyen aquellos con

mutaciones en al menos uno de los genes PRKCSH y Sec63 que causan ADPLD. No obstante, los ejemplos aportados se han realizado en modelos animales de ARPKD.

Sin embargo, el estudio clínico de la eficacia terapéutica de estos inhibidores farmacológicos de HDAC6 está comprometido por la toxicidad periférica que presentan los inhibidores HDAC6 comerciales. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevos inhibidores de HDAC6 que presenten una vectorización más selectiva hacia las células de los conductos biliares y menor toxicidad periférica.

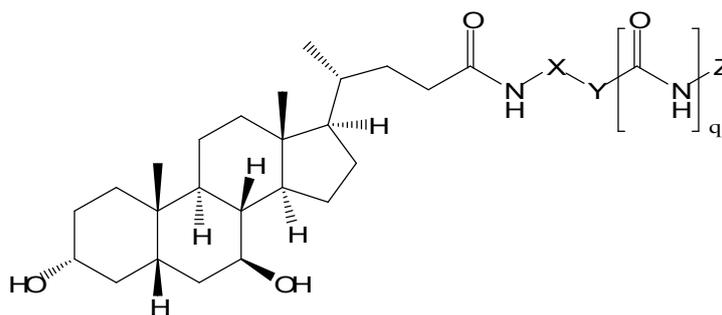
BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos inhibidores selectivos de HDAC6 derivados del ácido ursodesoxicólico (UDCA), los cuales mantienen las propiedades intrínsecas beneficiosas calcio-reguladoras del propio UDCA.

Así, los resultados experimentales llevados a cabo con estos nuevos derivados del UDCA han puesto de manifiesto que éstos aumentan los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los colangiocitos humanos poliquísticos en cultivo de forma similar al UDCA pero, además, inducen un descenso en la proliferación de dichos colangiocitos humanos de manera dosis-dependiente y de mayor magnitud que el UDCA. Por otro lado, las entidades químicas de esta invención han mostrado una inhibición selectiva de la actividad HDAC6, al menos, comparable con otros inhibidores de HDACs comerciales tales como la tricostatina.

Todos estos datos experimentales pondrían de manifiesto que la administración de estos nuevos compuestos en pacientes con enfermedades hepáticas poliquísticas podría tener un gran valor terapéutico en el tratamiento de las mismas.

Así, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

X es un grupo $-(CHR_1)_p$, donde R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo arilo C_6-C_{10} , y p es 0 o 1;

Y se selecciona de entre:

enlace sencillo;

$-(CH_2)_n$, siendo n 1, 2, 3, 4 ó 5;

arilideno o heteroarilideno, conectado con el resto de la molécula mediante uniones (1,3) o (1,4);

$-C(O)-N(H)-CH_2(Ar)-$; y

5 $-Ar-C(O)-N(H)-CH_2-(Ar)-$;

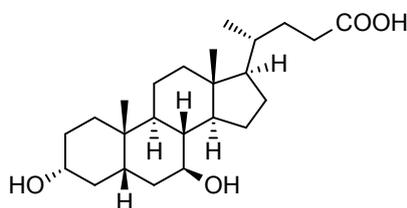
donde Ar significa arilideno;

q es 0 o 1;

Z se selecciona entre OH, SH y arilo opcionalmente sustituido,

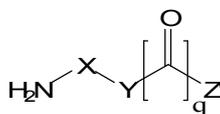
o un estereoisómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 Un segundo aspecto de la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de los compuestos de fórmula (I) que comprende hacer reaccionar el ácido ursodesoxicólico de fórmula (II):



(II)

- 15 con un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde X e Y son como se han definido previamente y Z' es un grupo precursor de los grupos Z definidos previamente, y posteriormente transformar los grupos Z' en los correspondientes grupos Z de la fórmula (I).

- 20 Un aspecto adicional de la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o un estereoisómero, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 La invención se dirige además a un compuesto de fórmula (I) como se ha definido previamente, o un estereoisómero, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento. Un aspecto adicional de la invención lo constituye un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o un estereoisómero, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso
- 30 en el tratamiento de enfermedades poliquísticas.

Un último aspecto de la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o un estereoisómero, una sal o solvato farmacéuticamente

aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer, malignidad hematológica, enfermedades proliferativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas e infecciones virales, en las cuales intervengan la actividad HDAC.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Inmunoblot representativo y cuantificación relativa de la expresión de HDAC6 en colangiocitos humanos normales y poliquísticos.

Figura 2. Curvas dosis-respuesta del efecto inhibitorio de los compuestos la, lb, y 4-(aminometil)-N-hidroxibenzamida sobre HDAC6.

Fig. 3. Niveles intracelulares de Ca^{2+} en colangiocitos humanos poliquísticos.

Figura 4. Estudios de vectorización del compuesto la y análisis de expresión génica de transportadores. A) Estudio del transporte del compuesto la a través de los transportadores OCT1 y OCT3. B) Niveles de expresión génica de los transportadores OCT1 y OCT3 en colangiocitos humanos normales (NHC3) y colangiocitos humanos poliquísticos (ADPKD).

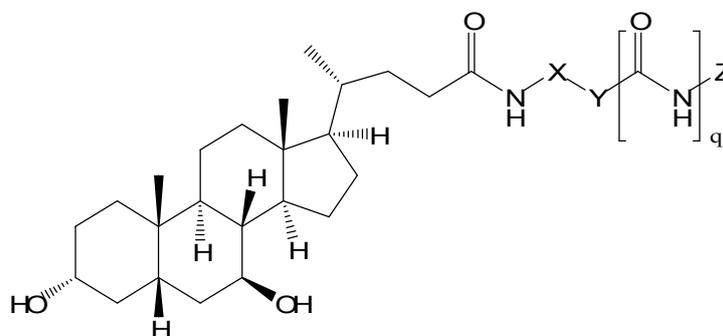
Figura 5. Proliferación de colangiocitos humanos poliquísticos cultivados en presencia de diferentes dosis de compuesto la.

Figura 6. Inmunoblot representativo de los niveles de tubulina- α -acetilada (Ac- α -tubulina) e histona 3 acetilada en lisina 9 (H3K9) en colangiocitos poliquísticos humanos en cultivo.

Figura 7. Análisis cuantitativo de la longitud ciliar en cultivos celulares de colangiocitos humanos normales y poliquísticos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como anteriormente se ha mencionado, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un derivado de ácido ursodesoxicólico, en concreto un compuesto de fórmula (I)



(I)

30 donde:

X es un grupo $-(CHR_1)_p$, donde R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo arilo C_6-C_{10} , y p es 0 o 1;

Y se selecciona de entre:

enlace sencillo;

5 $-(CH_2)_n$, siendo n 1, 2, 3, 4 ó 5;

arilideno o heteroarilideno, conectado con el resto de la molécula mediante uniones (1,3) o (1,4);

$-C(O)-N(H)-CH_2(Ar)-$;

$-Ar-C(O)-N(H)-CH_2-(Ar)-$;

10 donde Ar significa arilideno;

q es 0 o 1;

Z se selecciona entre OH, SH y arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido,

o un estereoisómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En el contexto de la presente invención los siguientes términos tienen el significado

15 que se detalla a continuación.

“Alquilo C_1-C_6 ” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, consistiendo dicha cadena en de 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente, de 1 a 3 átomos de carbono, que no contiene ninguna insaturación, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-

20 butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. El radical alquilo C_1-C_6 puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes, en particular, se puede encontrar sustituido por un grupo terminal arilo o heteroarilo.

“Arilo C_6-C_{10} ” se refiere a un radical de anillo aromático que comprende de 6 a 10 átomos de carbono, incluso más particularmente 6 átomos de carbono. Según una

25 realización particular, arilo es un radical fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo, preferiblemente radical fenilo o naftilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes, en particular, se puede encontrar sustituido por $C(O)NHOH$; alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado; SH; NH_2 ; arilo C_6-C_{10} ; heteroarilo C_5-C_6 .

30 “Arlideno” se refiere a un sistema de anillo aromático que comprende de 6 a 10 átomos de carbono, incluso más particularmente 6 átomos de carbono y que se encuentra unido a la molécula a través de dos enlaces. Según una realización particular, arilideno es un grupo fenileno, naftileno, indenileno, preferiblemente es un grupo radical fenileno unido a la molécula mediante uniones (1,3) o (1,4).

35 “Heteroarilideno” se refiere a un sistema de anillo aromático de 3 a 10 miembros estable, preferiblemente un anillo aromático de 5 ó 6 miembros, que comprende átomos de carbono, y desde uno hasta cinco heteroátomos seleccionados del grupo

que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente uno o dos heteroátomos. El grupo heteroarilideno se encuentra unido a la molécula a través de dos enlaces. Ejemplos de tal heteroarilideno incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de bencimidazol, benzotiazol, furano, tiofeno, pirrol, piridina, pirimidina, isotiazol, imidazol, indol, purina, quinolina o tiadiazol. Preferiblemente es un radical derivado de furano que se encuentra unido a la molécula mediante uniones (1,3).

Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma de sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables o en forma de solvatos.

La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que, cuando se administran al receptor, pueden proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como el descrito en el presente documento. “Farmacéuticamente aceptable” se refiere preferiblemente a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o una reacción no favorable similar, tal como trastornos gástricos, mareo y similares, cuando se administra a un ser humano o animal. Preferiblemente, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno de estado o federal o está incluido en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida de modo general para su uso en animales, y de manera más particular en seres humanos.

La preparación de sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir del compuesto original, que contiene restos básicos, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, las sales de acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glucamina y sales básicas de aminoácidos.

El término “solvato” según esta invención ha de entenderse como que significa cualquier forma del compuesto activo según la invención que tiene otra molécula (lo

más probablemente un disolvente polar) unida al mismo mediante enlace no covalente. Ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato. Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina, tanto como compuestos libres o como solvatos. Los métodos de solvatación son conocidos dentro de la técnica.

En una relación particular, p es 1. En otra realización particular p es 0.

En una realización particular q es 1 y en otra realización particular q es 0.

En una realización particular X es $-(CH_2)_p-$, donde p es 1.

En otra realización particular Y es un enlace sencillo. Más particularmente, si Y es un enlace sencillo, entonces p es 0. Incluso aún más particular es el caso en el que Y es un enlace sencillo, p es 0 y q es 0.

En otra realización particular, Y es arilideno o heteroarilideno, preferiblemente un radical derivado de furano.

En una realización aún más particular, cuando Y es arilideno o heteroarilideno, p es 1.

Incluso más preferible es el caso en el que Y es arilideno o heteroarilideno, p es 1 y R_1 es hidrógeno.

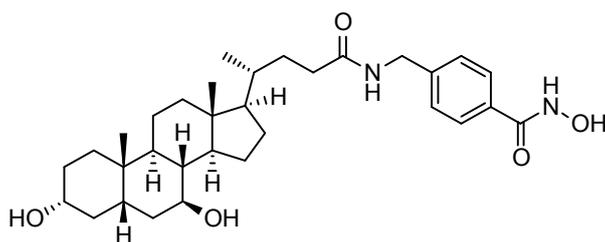
En otra realización particular, Y es $-(CH_2)_n$, donde n es 1, 2, 3, 4 o 5, preferiblemente n es 1, 2, 3 o 4.

En otra realización particular q es 1.

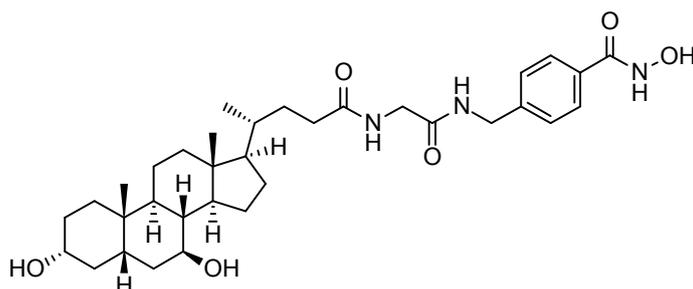
En otra realización particular Y es $-(CH_2)_n-$ y q es 1. Incluso es más preferido el caso en el que Y es $-(CH_2)_n-$, q es 1 y Z es OH.

En otra realización particular Z es OH, SH o un arilo opcionalmente sustituido por al menos uno entre NH_2 , SH y un fenilo. En una realización más preferida, Z es OH.

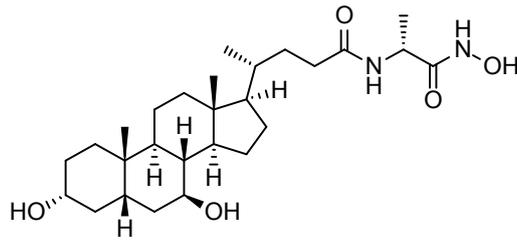
En una forma de realización preferida, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de entre los siguientes:



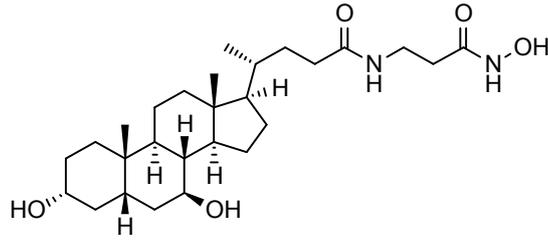
(Ia)



(Ib)

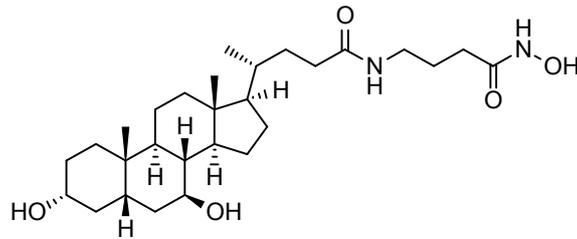


(Ic)

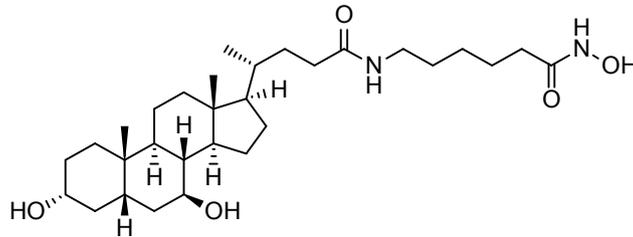


5

(Id)

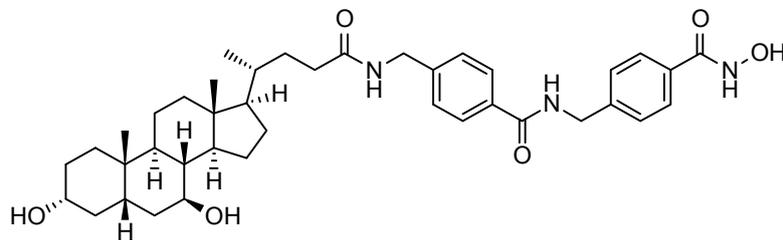


(Ie)

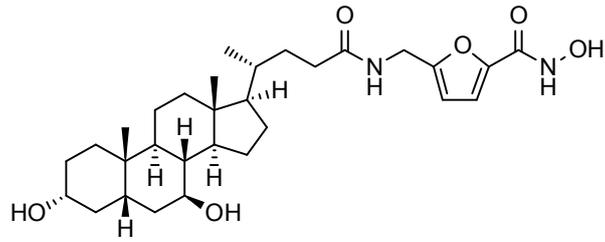


10

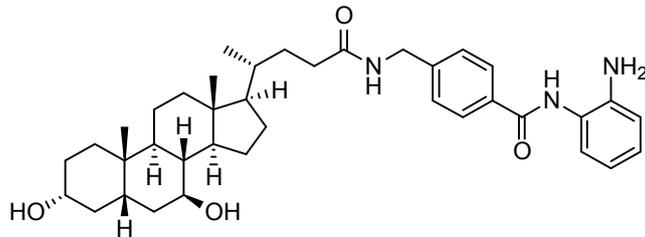
(If)



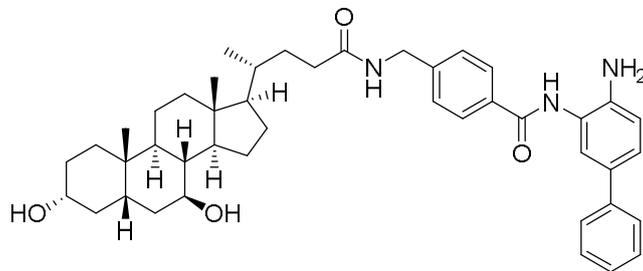
(Ig)



(Ih)

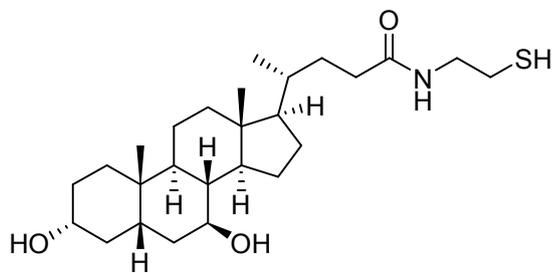


(Ii)

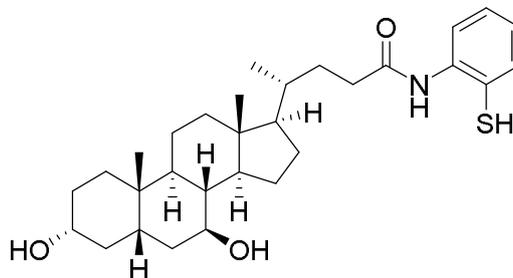


(Ij)

5



(Ik)



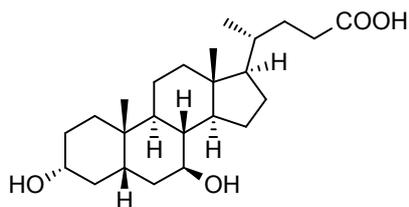
(Il)

10

o de sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

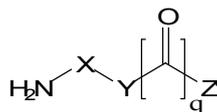
Un aspecto adicional de la invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula (I), donde dicho procedimiento comprende:

hacer reaccionar el ácido ursodesoxicólico de fórmula (II):



(II)

con un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde:

X es un grupo $-(CHR_1)_p$, donde R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo arilo C_6-C_{10} , y p es 0 o 1;

10 Y se selecciona de entre:

enlace sencillo;

$-(CH_2)_n$, siendo n 1, 2, 3, 4 ó 5;

arilideno o heteroarilideno, conectado con el resto de la molécula mediante uniones (1,3) o (1,4);

15 $-C(O)-N(H)-CH_2(Ar)-$; y

$-Ar-C(O)-N(H)-CH_2-(Ar)-$;

donde Ar significa arilideno;

q es 0 o 1;

y donde Z' es un grupo precursor de los grupos Z definidos previamente, y

20 posteriormente transformar los grupos Z' en los correspondientes grupos Z de la fórmula (I).

En una realización preferente, Z' es un grupo alcoxilo como por ejemplo metoxilo, etoxilo o terc-butoxilo, así como los ácidos correspondientes.

Otro aspecto de la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende
25 al menos un compuesto de fórmula (I) como se ha definido previamente, o un estereoisómero, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones
30 o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

En una realización preferida las composiciones farmacéuticas se encuentran en forma oral. Formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden ser

comprimidos y cápsulas y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la preparación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio; disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato de sodio.

Las composiciones orales sólidas pueden prepararse mediante métodos convencionales de mezclado, relleno o preparación de comprimidos. Pueden usarse operaciones de mezclado repetidas para distribuir el principio activo por todas las composiciones que emplean grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos pueden prepararse, por ejemplo, mediante granulación en seco o en húmedo y opcionalmente pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, en particular con un recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para la administración parenteral, tal como disoluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma de dosificación unitaria apropiada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes de carga, agentes de tamponamiento o tensioactivos.

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos habituales tales como los descritos o a los que se hace referencia en las Farmacopeas Española y Estadounidense y textos de referencia similares.

En general, la cantidad administrada eficaz de un compuesto de la invención dependerá de la eficacia relativa del compuesto elegido, la severidad del trastorno que está tratándose y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos activos se administrarán normalmente una o más veces al día por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diariamente, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,01 hasta 1000 mg/kg/día.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse con al menos otro fármaco para proporcionar una terapia de combinación. El al menos otro fármaco puede formar parte de la misma composición, o puede proporcionarse como una composición separada para la administración al mismo tiempo o a tiempos diferentes.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), o un estereoisómero, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), o un estereoisómero, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo, para su uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad poliquística.

También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad poliquística que comprende la administración a un paciente que lo necesita de un compuesto de fórmula (I), o un estereoisómero, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de esta memoria descriptiva significa la administración de un compuesto o una composición farmacéutica según la invención para prevenir, mejorar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. “Tratamiento” también engloba prevenir, mejorar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

Por enfermedad poliquística debe entenderse una enfermedad caracterizada por la formación de quistes.

Las enfermedades poliquísticas pueden incluir colangiopatías, un grupo de enfermedades hepáticas de diferentes etiologías en las cuales los colangiocitos son las células diana. En particular, estas enfermedades cursan o están mediadas por un descenso en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en dichos colangiocitos, así como por un aumento en la proliferación de dichos colangiocitos. Los datos experimentales aportados han demostrado que los compuestos de fórmula (I) de la presente invención permiten regular los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los colangiocitos humanos poliquísticos y, además, inducen un descenso en la proliferación de dichos colangiocitos.

Por tanto, los compuestos de la invención pueden emplearse para inhibir la proliferación de colangiocitos.

En una realización particular, la colangiopatía es una enfermedad hepática poliquística. Dicha enfermedad puede cursar sola o junto con enfermedad renal poliquística.

Por tanto, en una realización particular, la enfermedad poliquística se selecciona entre enfermedad renal poliquística, enfermedad hepática poliquística y una combinación de ambas.

En una realización particular, los compuestos de la invención se emplean en el tratamiento de pacientes que tienen una o más mutaciones en al menos uno de los genes PRKCSH (Sustrato de la Proteína Kinasa C 80K-H) y Sec63. Estas mutaciones causan enfermedad hepática poliquística sin que se vea involucrado el riñón. Dicha enfermedad se conoce comúnmente como enfermedad hepática poliquística autosómica dominante, siendo sus siglas en inglés ADPLD. Por tanto, en una

realización particular, la enfermedad poliquística es enfermedad hepática poliquística autosómica dominante.

En otra realización particular, los compuestos de la invención se emplean en el tratamiento de pacientes que tienen una o más mutaciones en al menos uno de los genes Pkd1 y Pkd2, los cuales codifican las proteínas asociadas a los cilios, policistina-1 (PC1) y policistina-2 (PC2) y que causan degeneración quística del hígado y riñones en enfermedad renal poliquística autosómica dominante, siendo sus siglas en inglés ADPKD. Por tanto, en una realización particular, la enfermedad poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica dominante.

En otra realización particular, los compuestos de la invención se emplean en el tratamiento de pacientes que tienen una o más mutaciones en el gen Pkhd1 el cual está asociado con la enfermedad renal poliquística autosómica recesiva. En consecuencia, en una realización particular, la enfermedad poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica recesiva.

15

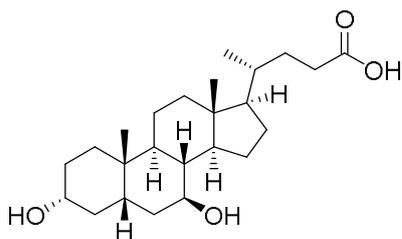
Ejemplos

Los siguientes métodos A a C describen los procedimientos para obtener compuestos según la invención.

Método A:

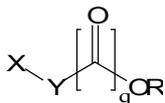
El método A representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (I) que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

a) ácido Ursodeoxicólico de fórmula (II):



(II)

b) un compuesto de fórmula (III):



donde X e Y son como se ha definido anteriormente y R es un grupo alcóxicarbonilo,

c) un reactivo de activación del grupo carboxilo;

d) una base de naturaleza orgánica o inorgánica; y

e) una amina terciaria, la cual se selecciona entre las aminas alifáticas cíclicas o acíclicas con entre 1 y 10 átomos de C, y alcanos aromáticos con entre 9 y 15 átomos de carbonos.

Para los fines de la invención, la reacción se puede llevar a cabo mediante la mezcla formada por los cinco compuestos [(a) a (e)] anteriormente nombrados y se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros cuatro en el disolvente orgánico y a la temperatura de -85°C a $+25^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a 0°C . A partir de la última adición de uno de los cinco componentes anteriormente nombrados, se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente y se monitoriza su avance mediante TLC. Una vez que la reacción de acoplamiento ha terminado, el compuesto final, es un éster. La mezcla de reacción se trató con HCl NaHCO_3 (solución acuosa saturada) y NaCl (solución acuosa saturada), y secada sobre MgSO_4 . Finalmente se elimina el disolvente a vacío. El producto así obtenido, es purificado mediante cromatografía en columna.

15 **Método B**

El método B representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (I) a partir también de los cinco compuestos mencionados en el Método A. Asimismo, la mezcla de reacción formada por los elementos anteriormente nombrados se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros en disolvente orgánico y a la temperatura de -85°C a $+25^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a 0°C . Una vez terminada la adición se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente. El progreso de la reacción fue seguido mediante cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción de acoplamiento, el éster obtenido es disuelto en un disolvente orgánico y se le hace reaccionar con la mezcla de hidróxido de litio o sodio, dimetoxietano y agua, a temperaturas comprendidas entre -4°C y $+25^{\circ}\text{C}$, rindiendo así, tras el tratamiento correspondiente, los compuestos de fórmula general (I).

Método C

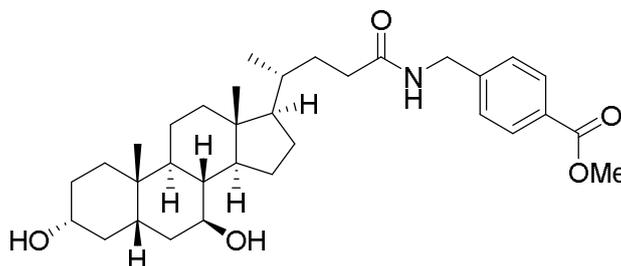
El método C representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (I) a partir también de los cinco compuestos mencionados en el Método A. Asimismo, la mezcla de reacción formada por los elementos anteriormente nombrados se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros en disolvente orgánico y a la temperatura de -85°C a $+25^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a 0°C . Una vez terminada la adición se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente. El progreso de la reacción es seguido mediante cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción de acoplamiento, el éster obtenido se adiciona sobre una mezcla del clorhidrato de

hidroxilamina y fenolftaleína en presencia de un exceso de metóxido sódico en metanol como disolvente. Una vez completada la reacción se obtiene, tras en tratamiento necesario en cada caso, los correspondientes compuestos de fórmula (I).

Para facilitar la comprensión de las ideas precedentes, se describen a continuación unos ejemplos de realización de la presente invención. Dichos ejemplos poseen un carácter meramente ilustrativo.

Ejemplo 1: Preparación de metil 4-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)

10 pentanamida) metil)benzoato.

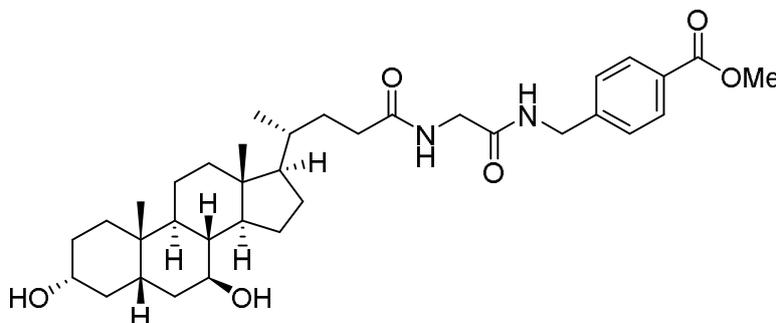


Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

A una disolución en DMF (2.5 ml) del ácido ursodeoxicólico (392.6 mg, 1 mmol) se le añadió el clorhidrato de metil 4-(aminomethyl) benzoato (201.7 mg, 1 mmol), TBTU (385.3 mg, 1.2 mmol). La disolución fue enfriada hasta los 0 °C en atmósfera inerte y se añadió gota a gota una disolución de Et₃N en DMF (1.1 ml, 3.26 M). El progreso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 horas. A continuación se evaporó el disolvente a presión reducida, y el residuo fue disuelto en acetato de etilo (20 ml) y la solución resultante fue lavada con HCl (3x10 ml disolución), NaHCO₃ (3x10 ml, solución acuosa saturada) y NaCl (2x10 ml solución acuosa saturada), y secada sobre MgSO₄. Finalmente se eliminó el disolvente a vacío. El producto así obtenido, fue purificado mediante cromatografía en columna, utilizando como fase móvil una mezcla 10:1 (v/v) diclorometano:metanol. Sólido blanco. Rdto 84%; p.f. 114-116 °C; IR 3293, 2927, 2862, 1720, 1650, 1277, 1106 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.39 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.32 (dd, J = 6.0, 2.7 Hz, 2H), 3.88 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.29 (s, 2H), 2.28 – 2.02 (m, 2H), 1.96 – 1.61 (m, 6H), 1.55 – 1.25 (m, 10H), 1.25 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.83 (m, 7H), 0.60 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.77, 166.06, 145.50, 129.16, 128.06, 127.26, 69.77, 69.48, 55.89, 54.77, 52.01, 43.10, 43.01, 42.22, 41.80, 39.86, 38.78, 37.74, 37.28, 34.93, 34.86, 33.76, 32.42, 31.67, 30.25, 28.20, 26.71,

23.32, 20.89, 18.44, 12.00; HRMS (ESI) para $C_{33}H_{49}NO_5Na$ calculado $[M + Na]^+$: 562.3509. Obtenido: 562.3515.

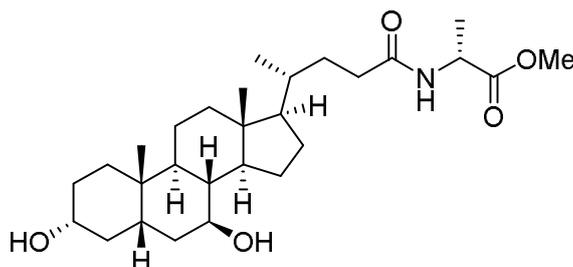
Ejemplo 2: Preparación de metil 4-((2-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)acetamido)metil)benzoato.



Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Ácido Ursodeoxicólico (120 mg, 0.27 mmol) clorhidrato de metil 4-
 10 (aminometil)benzoato (53.8 mg, 0.27) TBTU (104 mg, 0.32 mmol) Et_3N (0.3 ml 3.26 M en DMF). Sólido blanco. Rdto. 63%; p. f. 145-147 °C; IR 3354, 2932, 2861, 1720, 1654, 1281, 1111, 847 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.41 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.09 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.45 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.71 (d, $J = 5.8$ Hz,
 15 2H), 3.29 (2H), 2.25 – 1.96 (m, 2H), 1.95 – 1.59 (m, 5H), 1.55 – 1.25 (m, 9H), 1.25 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.85 (m, 7H), 0.60 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 173.14, 169.42, 166.12, 145.21, 129.17, 128.09, 127.31, 69.75, 69.49, 55.89, 54.79, 52.11, 43.11, 43.04, 42.19, 41.78, 38.75, 38.28, 37.76, 37.29, 35.02, 34.86, 33.79, 32.21, 31.46, 30.27, 28.22, 26.76, 23.35, 20.88, 18.53, 12.08. HRMS (ESI) para
 20 $C_{28}H_{47}NO_4$ calculado $[[M + H] + [-H_2O]]^+$: 579.3798. Obtenido: 579.3783.

Ejemplo 3: Preparación de metil((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahydro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoil)-L-alanina.

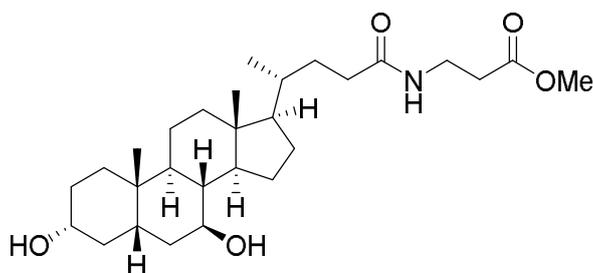


25

Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Ácido Ursodeoxicólico (392.6 mg, 1 mmol) clorhidrato del éster metílico de la L-Alanina (139.6 mg, 1 mmol) TBTU (385.3 mg, 1.2 mmol) y Et₃N (1.1 ml, 3.26 M) Sólido blanco Rdto 45%; 103-105 °C; IR 3296, 2928, 2863, 1739, 1650, 1209, 1049 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.23 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 2.19 – 1.88 (m, 3H), 1.88 – 1.57 (m, 4H), 1.56 – 1.27 (m, 9H), 1.27 – 0.93 (m, 12H), 0.93 – 0.82 (m, 7H), 0.61 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.26, 172.52, 69.71, 69.45, 55.87, 54.71, 51.72, 47.41, 43.07, 43.01, 42.16, 38.71, 37.72, 37.27, 34.87, 34.82, 33.75, 31.94, 31.47, 30.24, 28.16, 26.71, 23.31, 20.84, 18.47, 16.93, 12.03; HRMS (ESI) para C₂₈H₄₈NO₅ calculado [M + H]⁺: 478.3532. Obtenido: 478.3531.

Ejemplo 4: Preparación de metil 3-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) propionato.



15

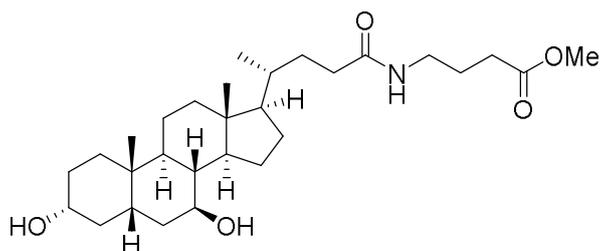
Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Ácido Ursodeoxicólico (392.6 mg, 1 mmol) clorhidrato del éster metílico de la β-Alanina (153.6 mg, 1 mmol), TBTU (385.3 mg, 1.2 mmol) Et₃N (1.1 ml 3.26 M). Sólido blanco. Rdto 66%; p. f. 84-86 °C; IR 3292, 2927, 2862, 1734, 1647, 1180, 1049 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.85 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.29 (2H), 3.24 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.12 – 1.89 (m, 4H), 1.89 – 1.59 (m, 4H), 1.53 – 1.25 (m, 9H), 1.24 – 0.90 (m, 11H), 0.87 (t, *J* = 3.3 Hz, 7H), 0.61 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.63, 171.30, 69.70, 69.45, 59.86, 55.86, 54.69, 43.06, 43.00, 42.16, 38.71, 37.72, 37.26, 34.90, 34.82, 34.65, 33.90, 33.75, 32.29, 31.60, 30.24, 28.15, 26.70, 23.31, 20.84, 18.45, 14.08, 12.01; HRMS (ESI) para C₂₉H₅₀NO₅ calculado [M + H]⁺: 492.3689. Obtenido: 492.3684.

25

Ejemplo 5: Preparación de ((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) butanoato de metilo.

30

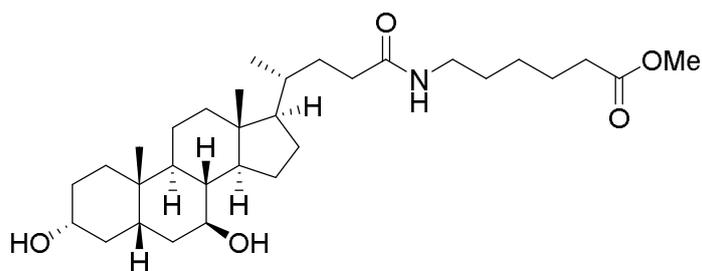


Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Ácido Ursodeoxicólico (392.6 mg, 1 mmol) clorhidrato del éster metílico del 4-aminobutirato (153.6 mg, 1 mmol) TBTU (385.3 mg, 1.2 mmol) Et₃N (1.1 ml 3.26 M).

- 5 Sólido blanco. Rdto 37 %; p. f. 92-94 °C; IR 3295, 2927, 2862, 1736, 1646, 1170, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.77 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.02 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.15 – 2.00 (m, 1H), 2.01 – 1.53 (m, 9H), 1.54 – 1.24 (m, 8H), 1.24 – 0.90 (m, 7H), 0.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 7H), 0.60 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.04, 172.45,
- 10 69.67, 69.41, 55.83, 54.66, 51.20, 43.03, 42.97, 42.13, 38.68, 37.69, 37.60, 37.23, 34.87, 34.79, 33.72, 32.38, 31.63, 30.65, 30.21, 28.14, 26.67, 24.52, 23.28, 20.80, 18.42, 11.96; HRMS (ESI) para C₂₉H₅₀NO₅ calculado [M + H]⁺: 492.3689. Obtenido: 492.3686.

- 15 **Ejemplo 6:** Preparación de 6-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoato)hexanoato de metilo.

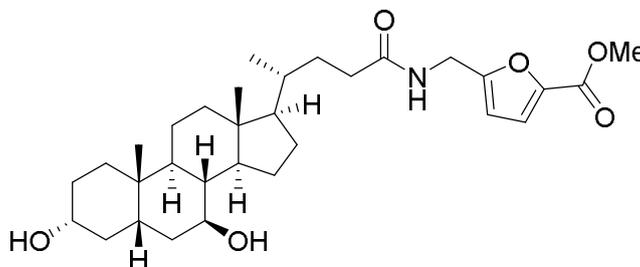


Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

- 20 Ácido Ursodeoxicólico (392.6 mg, 1 mmol), clorhidrato del éster metílico del 6-aminohexanoato (181.7 mg, 1 mmol) TBTU (385.3 mg, 1.2 mmol) y Et₃N (1.1 ml 3.26 M). Sólido blanco. Rdto 42%; p. f. 78-80 °C; IR 3299, 2926, 2861, 1736, 1644, 1165, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.29 (2H), 2.99 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.14 – 1.56 (m, 10H), 1.56 – 0.91 (m, 20H), 0.88 (d, *J* = 7.2 Hz, 8H), 0.60 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.26, 172.28, 69.70, 69.45, 55.87, 54.70, 51.15, 43.06, 43.00, 42.16, 38.71, 38.12, 37.71, 37.26, 34.90, 34.82, 33.75,
- 25

33.22, 32.44, 31.69, 30.24, 28.82, 28.16, 26.70, 25.84, 24.15, 23.30, 20.83, 18.45, 12.00; HRMS (ESI) para $C_{31}H_{54}NO_5$ calculado $[M + H]^+$: 520.4002. Obtenido: 520.3997.

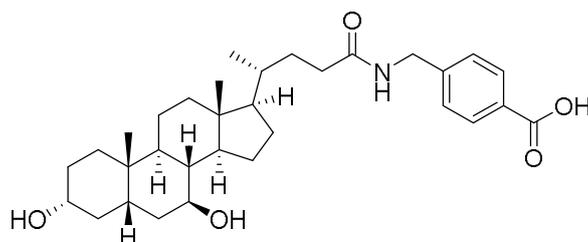
Ejemplo 7: Preparación de 5-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta [a] fenantren-17-yl) pentanamida) metil) furan-2-carboxilato de metilo.



Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Ácido Ursodeoxicólico (145 mg, 0.37 mmol), clorhidrato del éster metílico del 5-(aminometil)furan-2-carboxilato (70.9 mg, 0.37) TBTU (146.4 mg, 0.46 mmol) Et_3N (0.41 ml 3.26 M). Sólido blanco. Rdto 52%; p. f. 240-242 °C; IR 3463, 3285, 2935, 1705, 1683, 1518, 1210, 763 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.38 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.39 (s, 2H), 2.09 (m, $J = 39.5$, 14.2, 7.9 Hz, 2H), 1.96 – 1.58 (m, 5H), 1.54 – 1.24 (m, 10H), 1.24 – 0.90 (m, 8H), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 7H), 0.58 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 172.63, 158.23, 157.68, 142.62, 119.31, 109.11, 69.71, 69.45, 55.85, 54.69, 51.65, 43.06, 43.00, 42.16, 39.99, 38.71, 37.72, 37.27, 35.57, 34.86, 34.82, 33.75, 32.20, 31.54, 30.24, 28.15, 26.70, 23.30, 20.83, 18.42, 11.99; HRMS (ESI) para $C_{31}H_{51}N_2O_6$ calculado $[M + NH_4]^+$: 547.3745. Obtenido: 547.3738.

Ejemplo 8: Preparación de 4-(((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) metil)ácido benzoico.



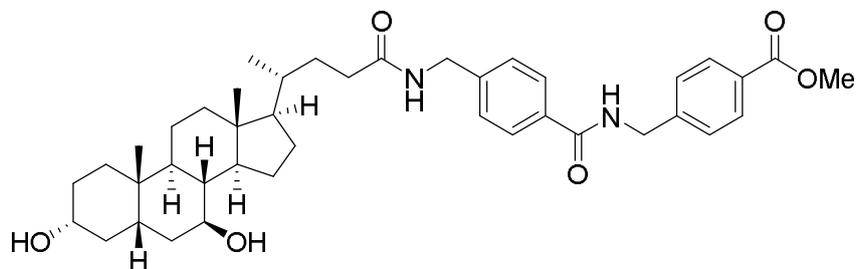
25

Este compuesto fue preparado siguiendo los procedimientos descritos en el método B. Metil 4-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-yl) pentanamida) metil)benzoato

(1079 mg, 2 mmol) y NaOH (8.7 ml 0.5M). Rdto 90%; p. f. 155-157 °C; IR 3288, 2922, 2851, 1638, 1542, 1281, 1015 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.85 (s, 1H), 8.37 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.48 – 4.39 (m, 1H), 4.34 – 4.28 (m, 2H), 3.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.29 (2H), 2.24 – 2.01 (m, 2H), 1.98 – 1.60 (m, 6H), 1.53 – 1.26 (m, 10H), 1.26 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.85 (m, 7H), 0.61 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.67, 167.15, 145.01, 129.30, 129.19, 127.10, 69.73, 69.47, 55.88, 54.76, 43.09, 43.01, 42.18, 41.77, 39.84, 38.74, 37.73, 37.27, 34.89, 34.83, 33.76, 32.38, 31.65, 30.25, 28.19, 26.72, 23.32, 20.85, 18.44, 12.01; HRMS (ESI) para $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{NO}_5$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 525.3532. Obtenido: 525.3538.

10

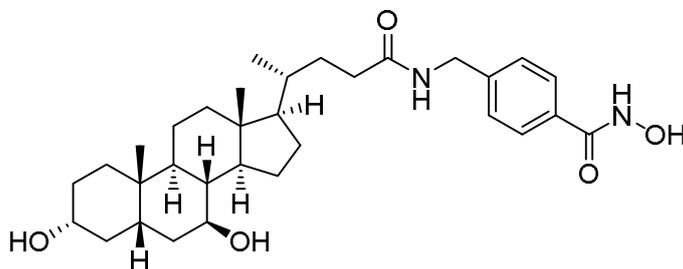
Ejemplo 9: Preparación ((4-(((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-17-il)pentanamida)metil)benzamido)metil)benzoato de metilo.



Este compuesto fue preparado siguiendo los procedimientos descritos en el método A. 4-(((4R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S, 13R, 14S -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)metil) ácido benzoico. (200 mg, 0.38 mmol), clorhidrato de metil 4-(aminometil)benzoato (76.6 mg 0.38 mmol), TBTU (146.4 mg 0.46 mmol) y Et_3N (0.42 ml 3.26 M). Sólido blanco. Rdto 60%; p. f. 139-141 °C; IR 3301, 2926, 2861, 1719, 1638, 1276, 1107, 1047 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.08 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.36 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.55 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.45 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.36 – 4.15 (m, 2H), 3.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.29 (2H), 2.23 – 2.01 (m, 2H), 1.97 – 1.59 (m, 6H), 1.55 – 1.25 (m, 10H), 1.25 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.82 (m, 7H), 0.61 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.67, 166.11, 145.41, 143.37, 132.52, 129.25, 128.10, 127.29, 126.95, 69.73, 69.48, 55.88, 54.77, 52.06, 43.10, 43.02, 42.40, 42.18, 41.71, 38.73, 37.73, 37.28, 34.91, 34.84, 33.77, 32.41, 31.68, 30.25, 28.20, 26.73, 23.32, 20.86, 18.46, 12.04; HRMS (ESI) para $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_6$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 673.4216. Obtenido: 673.4214.

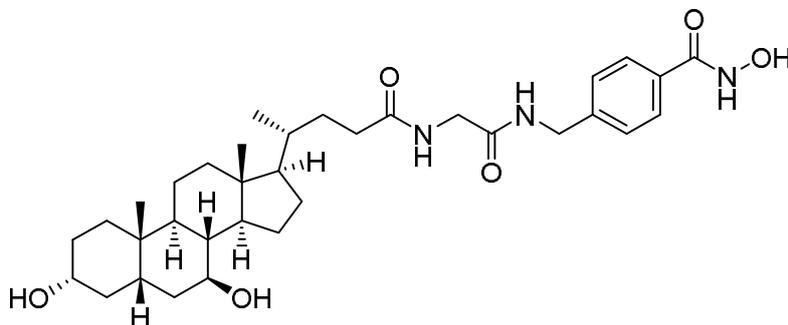
30

Ejemplo 10 (Síntesis Ia): Preparación de 4-((2-((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)acetamido)metil)-N-hidroxibenzamida.



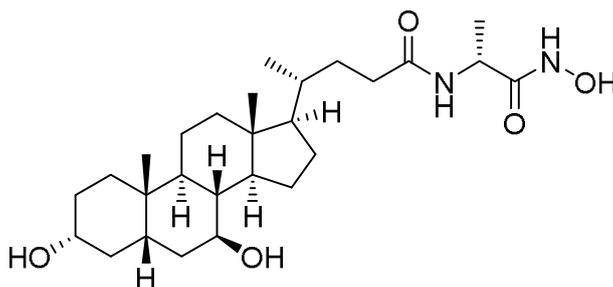
- 5 Este compuesto fue preparado siguiendo el método C descrito anteriormente.
 A una disolución que contiene clorhidrato de hidroxilamina (694.9 mg, 10 mmol) y fenolftaleína (1 mg) bajo atmósfera inerte y a 0 °C, se le adicionó gota a gota una suspensión de metóxido sódico en metanol (disolución preparada previamente 2.0g, 37 mmol, 5 ml) hasta que se observó un viraje de color permanente de blanco a rosa.
- 10 Seguidamente se añadió metil 4-(((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)metil)benzoato (539.4 mg, 1 mmol) disuelto en metanol seco (1 ml). Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente, y se monitorizó su evolución por cromatografía en capa fina. Los reactivos iniciales fueron consumidos
- 15 después de 90 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió agua destilada (10 ml) y el medio de reacción y se acidificó con ácido acético glacial. A continuación se extrajo el producto con éter dietílico (3x20 ml). Las fracciones orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO₄ y evaporadas bajo presión reducida. El producto así obtenido fue redisoluto en metanol (1 ml) y precipitado con agua. Este precipitado fue filtrado y
- 20 el disolvente fue evaporado. De esta manera se obtuvo el producto del título como un sólido blanco. Rdto 61 %; p.f. 170-172 °C; IR 3275, 2927, 2862, 1638, 1535, 1012 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.17 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.34 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.44 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 5.9, 3.6 Hz, 2H), 3.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.29 (2H). 2.24 – 2.01 (m, 2H), 1.99 – 1.59 (m, 6H), 1.56 – 1.26 (m, 10H), 1.26 – 0.94 (m, 7H), 0.94 – 0.84 (m, 7H), 0.62 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.63, 163.99, 143.06, 131.18, 126.92, 126.83, 69.73, 69.47, 55.88, 54.76, 43.09, 43.02, 42.18, 41.71, 39.85, 38.73, 37.73, 37.27, 34.93, 34.84, 33.77, 32.38, 31.67, 30.25, 28.21, 26.73, 23.33, 20.86, 18.44, 12.04; HRMS (ESI) para C₃₂H₄₇N₂O₄ calculado [[M + H] + [-H₂O]]⁺: 523.3536. Obtenido:
- 30 523.3536.

Ejemplo 11 (Síntesis Ib): Preparación de 4-((2-((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)acetamido)metil)-N-hidroxibenzamida.



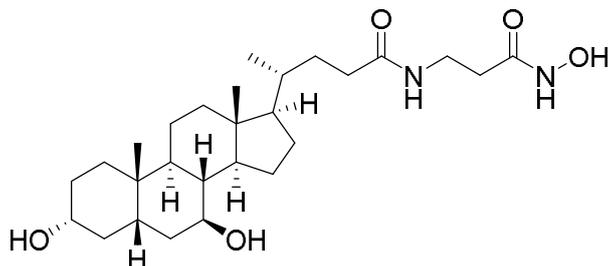
- 5 Este compuesto fue preparado siguiendo el método C descrito anteriormente.
- 4-((2-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamida)acetamido)metil)benzoato (83.9 mg, 0.14 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (97.3 mg, 1.4 mmol), fenoltaleína (1 mg) y metóxido sódico (2.0 g, 37
- 10 mmol, disolución preparada previamente.). Sólido blanco. Rdto 42% p. f. 153-155 °C; IR 3217, 2928, 2864, 1641, 1534, 1013 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.17 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.35 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.05 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.46 – 4.40 (m, 1H), 4.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.29 (2H), 2.11 (m, $J = 57.0, 14.2, 10.0, 5.6$ Hz,
- 15 2H), 1.97 – 1.89 (m, 1H), 1.90 – 1.58 (m, 5H), 1.54 – 1.25 (m, 10H), 1.25 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.83 (m, 7H), 0.61 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.04, 169.24, 164.03, 142.70, 131.21, 126.94, 126.81, 69.71, 69.46, 55.87, 54.73, 43.07, 43.01, 42.17, 42.10, 41.71, 38.72, 37.72, 37.27, 34.98, 34.83, 33.76, 32.18, 31.42, 30.25, 28.18, 26.72, 23.31, 20.85, 18.51, 12.05; HRMS (ESI) para $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_6$
- 20 calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 598.3856. Obtenido: 598.3857.

Ejemplo 12 (Síntesis Ic): Preparación de (R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta [a] fenantreno-17-il) -N-((S) -1-(hidroxi-amino)-1-aminopropan-2-il) pentanamida.



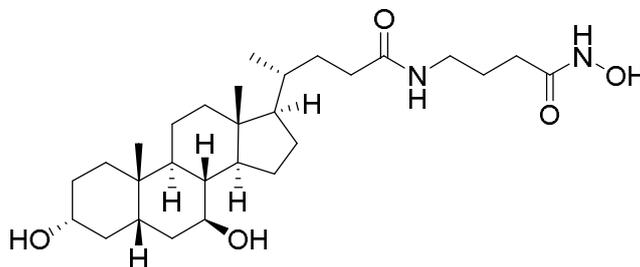
Este compuesto fue preparado siguiendo los procedimientos descritos en el método C. Metil((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahydro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoil)-L-alanina clorhidrato de hidroxilamina (278 mg, 4 mmol), fenolftaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0 g, 37 mmol). El compuesto fue aislado como un sólido blanco Rdto 22%; p. f. 170-172 °C; IR 3265, 2928, 2863, 1642, 1537, 1047 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.17 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.29 (2H), 2.13 (m, J = 14.8, 10.2, 5.2 Hz, 1H), 2.04 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.55 (m, 4H), 1.54 – 1.24 (m, 10H), 1.22 – 0.93 (m, 11H), 0.88 (d, J = 6.1 Hz, 7H), 0.61 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.19, 169.09, 69.71, 69.45, 55.87, 54.71, 45.74, 43.07, 43.01, 42.16, 38.72, 37.72, 37.26, 35.03, 34.83, 33.75, 32.10, 31.48, 30.24, 28.18, 26.72, 23.31, 20.84, 18.49, 12.04. HRMS (ESI) para $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 479.3485. Obtenido: 479.3483.

Ejemplo 13 (Síntesis Id): Preparación de (4R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecano-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-N-(3-(hidroxiamino)-3-oxopropil) pentanamida.



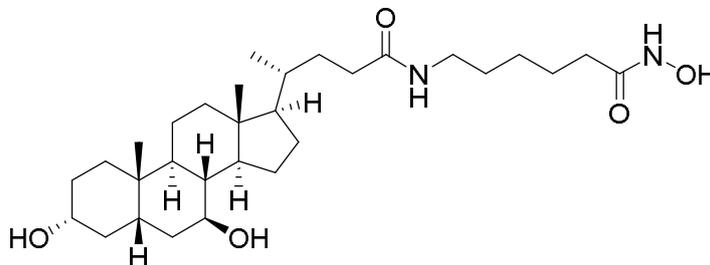
Este compuesto fue preparado siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el método C. Metil 3-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahydro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) propionato (298 mg, 0.61 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (424.5 mg, 6.1 mmol), fenolftaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0g, 37 mmol). El producto fue obtenido como un sólido blanco. Rdto 59%; p. f. 180-182 °C; IR 3271, 2927, 2862, 1638, 1542, 1047 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.82 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.86 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 3.30 (s, 2H), 3.19 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.99 – 1.56 (m, 8H), 1.54 – 1.24 (m, 8H), 1.23 – 0.90 (m, 9H), 0.87 (d, J = 4.4 Hz, 7H), 0.61 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.53, 167.03, 69.71, 69.45, 55.86, 54.70, 43.07, 43.01, 42.16, 39.99, 38.71, 37.72, 37.27, 35.27, 34.98, 34.83, 33.75, 32.53, 32.35, 31.59, 30.24, 28.17, 26.71, 23.31, 20.84, 18.47, 12.04; HRMS (ESI) para $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 479.3485. Obtenido: 479.3480.

Ejemplo 14 (Síntesis Ie): Preparación de (R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-N-(4-(hidroxiamino)-4-oxobutil)pentanamida.



5 Este compuesto fue preparado siguiendo los procedimientos descritos en el método C. ((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) butanoato de metilo. (165 mg, 0.34 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (236.6 mg, 3.4 mmol), fenoltaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0 g, 37 mmol, disolución preparada
10 previamente). El compuesto fue aislado como un sólido blanco. Rdto 54%; p. f. 165-167 °C; IR 3269, 2928, 2862, 1643, 1550, 1047 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.81 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.00 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.16 – 1.91 (m, 6H), 1.89 – 1.54 (m, 7H), 1.54 – 1.25 (m, 9H), 1.25 – 0.92 (m, 9H), 0.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 7H), 0.62 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ
15 172.45, 168.69, 69.71, 69.45, 55.87, 54.70, 43.07, 43.01, 42.17, 38.72, 38.05, 37.72, 37.27, 34.97, 34.83, 33.76, 32.43, 31.67, 30.24, 29.91, 28.18, 26.72, 25.45, 23.31, 20.84, 18.48, 12.03; HRMS (ESI) para $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_5$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 493.3641. Obtenido: 493.3642.

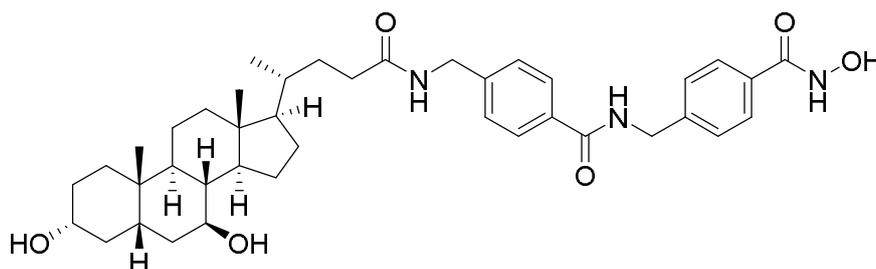
20 **Ejemplo 15 (Síntesis If):** Preparación de 6-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) -N-hidroxihexanamida.



Este compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento descrito en el método C.
25 6-((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanida)hexanoato de metilo (200 mg, 0.38 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (262.9, 3.8 mmol),

fenolftaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0 g, 37 mmol, disolución preparada previamente). El compuesto fue aislado como un sólido blanco. Rdto 43%; p. f. 125-127 °C; IR 3269, 2927, 2861, 1642, 1547, 1047 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.32 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.29 (2H), 2.98 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.06 (m, *J* = 14.5, 9.7, 5.2 Hz, 1H), 2.00 – 1.53 (m, 9H), 1.55 – 1.26 (m, 14H), 1.26 – 0.90 (m, 9H), 0.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 7H), 0.61 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.28, 168.99, 69.71, 69.45, 55.87, 54.70, 43.07, 43.00, 42.16, 38.72, 38.27, 37.72, 37.26, 34.93, 34.82, 33.75, 32.43, 32.20, 31.69, 30.24, 28.93, 28.18, 26.71, 26.04, 24.88, 23.31, 20.84, 18.47, 12.02; HRMS (ESI) para C₃₀H₅₃N₂O₅ calculado [M + H]⁺: 521.3954. Obtenido: 521.3955.

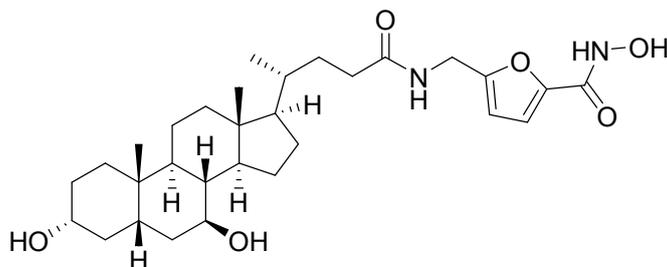
Ejemplo 16 (Síntesis Ig): Preparación de 4-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamido)metil)-N-(4-(hidroxycarbamoil)encil)benzamida.



Este compuesto fue preparado siguiendo la metodología C descrita anteriormente. ((4-(((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanamido)metil)benzamido)metil)benzoato de metilo. (133.7 mg, 0.2 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (139.2, 2 mmol), fenolftaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0 mg, 37 mmol, disolución preparada previamente). El compuesto fue aislado como un sólido blanco. Rdto 60 %; p. f. 187-189 °C; IR 3288, 2922, 2851, 1638, 1542, 1015 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.03 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.33 (dd, *J* = 10.4, 8.0 Hz, 4H), 4.50 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.46 – 4.40 (m, 1H), 4.36 – 4.22 (m, 2H), 3.88 (s, 1H), 3.92 (2H), 2.28 – 1.99 (m, 2H), 1.99 – 1.56 (m, 5H), 1.54 – 1.25 (m, 9H), 1.25 – 0.94 (m, 8H), 0.94 – 0.84 (m, 8H), 0.61 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.63, 166.03, 164.08, 143.29, 142.96, 132.60, 131.26, 127.24, 126.99, 126.90, 69.71, 69.46, 55.86, 54.74, 43.08, 43.01, 42.35, 42.16, 41.69, 39.99, 38.71, 37.71, 37.27, 34.91, 34.82, 33.76, 32.38, 31.66, 30.24, 28.18, 26.72, 23.31,

20.84, 18.45, 12.03; HRMS (ESI) para $C_{40}H_{54}N_3O_5$ calculado $[[M + H] + [-H_2O]]^+$: 656.4064. Obtenido: 656.4054.

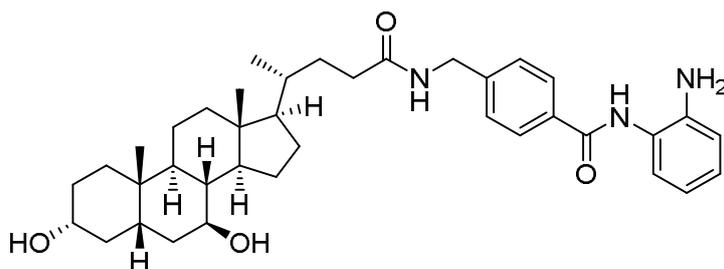
Ejemplo 17 (Síntesis Ih): Preparación de 5 - (((R)-4 - ((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamido)metil)-N-hidroxifuran-2-carboxamida.



Este compuesto fue preparado siguiendo la metodología C descrita anteriormente.

5-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta [a] fenantren-17-il) pentanamida) metil) furan-2-carboxilato de metilo (79.4 mg, 0.15 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (104.4, 1.5 mmol), enolftaleína (1 mg), y metóxido sódico (2.0 mg, 37 mmol, disolución preparada previamente). El compuesto fue aislado como un sólido blanco. Rdto 47%; p. f. 149-151 °C; IR 3272, 2929, 2864, 1644, 1540, 1016 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.02 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.30 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.26 (d, $J = 5.2$ Hz, 0H), 2.24 – 1.97 (m, 2H), 1.97 – 1.56 (m, 6H), 1.56 – 1.25 (m, 9H), 1.25 – 0.93 (m, 7H), 0.93 – 0.83 (m, 8H), 0.60 (s, 3H).; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.57, 156.39, 154.91, 144.99, 113.56, 108.14, 69.71, 69.45, 55.86, 54.69, 43.07, 43.01, 42.16, 38.71, 37.72, 37.27, 35.62, 34.93, 34.83, 33.76, 32.18, 31.52, 30.24, 28.16, 26.71, 23.31, 20.84, 18.45, 12.03; HRMS (ESI) para $C_{30}H_{45}N_2O_5$ calculado $[[M + H] + [-H_2O]]^+$: 513.3329. Obtenido: 513.3327.

Ejemplo 18 (Síntesis Ii): Preparación de N- (2-aminofenil) -4-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) metil) benzamida

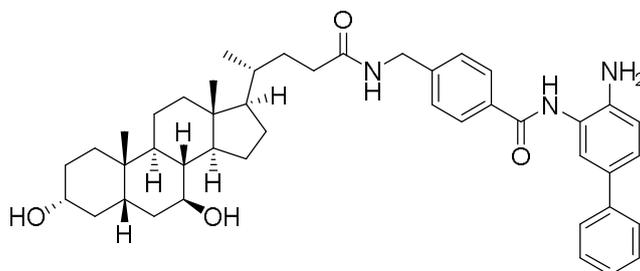


Este compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento A descrito anteriormente.

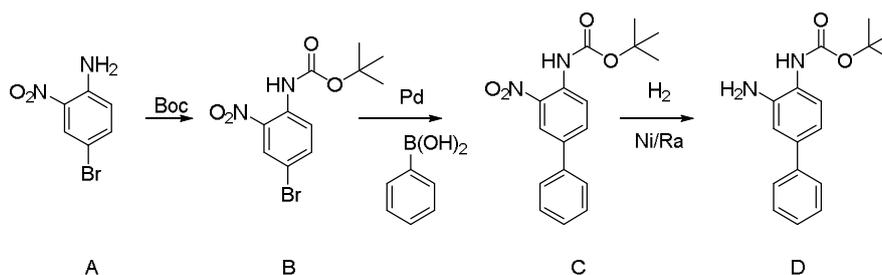
- 5 4-(((R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) metil)ácido benzoico. (200 mg, 0.38 mmol) o-fenilendiamina (41.1 mg 0.38 mmol) TBTU (146.4 mg 0.46 mmol) y Et₃N (0.42 ml 3.26 M). El compuesto se aisló como un sólido blanco. Rdto 39 %; p. f. 168-170 °C; IR 3294, 2927, 2862, 1647, 1505, 1048, 745 cm⁻¹; ¹H
- 10 NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.61 (s, 1H), 8.38 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.04 – 6.92 (m, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 6.69 – 6.49 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.42 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.37 – 4.25 (m, 2H), 3.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.29 (2H), 2.25 – 2.01 (m, 2H), 1.98 – 1.58 (m, 6H), 1.56 – 1.27 (m, 9H), 1.27 – 0.94 (m, 5H), 0.94 – 0.82 (m, 10H), 0.62 (s, 3H); ¹³C
- 15 NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.63, 165.05, 143.38, 143.11, 132.99, 127.74, 126.81, 126.66, 126.43, 123.32, 116.23, 116.11, 69.70, 69.46, 55.87, 54.75, 43.08, 43.01, 42.15, 41.71, 38.71, 37.71, 37.26, 34.91, 34.82, 33.75, 32.39, 31.69, 30.24, 28.19, 26.72, 23.31, 20.84, 18.45, 12.03; HRMS (ESI) para C₃₈H₅₄N₃O₄ calculado [M + H]⁺: 616.4114. Obtenido: 616.4110.

20

Ejemplo 19 (Síntesis Ij): Preparación de N-(4-amino-[1,1'-bifenil]-3-il)-4-(((R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) pentanamida) metil) benzamida.



- 25 Procedimiento para la preparación de terc-butil (3-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)carbamato.



A continuación se describe la síntesis de *tert*-butil (3-amino-[1,1'-bifenil]-4-il) carbamato.

A una disolución de 4-bromo-2-nitroanilina (A) (2.4 g 11.05 mmol) y Boc-anhídrido (Dicarbonato de di-*tert*-butilo) (5.08 ml, 22.11 mmol) en THF (20 ml) se le añadió una cantidad catalítica de DMAP (4-dimetilamino piridina). La reacción se mantuvo en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente a baja presión y el aceite obtenido fue disuelto en THF (10 ml). Seguidamente se añadió NaOH (10 ml, de una disolución 2N) y la reacción se mantuvo en agitación durante 18 horas a 65 °C. Transcurrido ese tiempo se añadió NaOH (10 mmol) y se mantuvo la reacción en agitación durante 4 horas adicionales a 65 °C. El progreso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina. El disolvente fue eliminado a vacío, dando lugar a residuo sólido, el cual se filtró y se lavó con agua destilada (2 x 20 ml) obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo, el cual se utilizó directamente para el siguiente paso de reacción para la obtención de C .

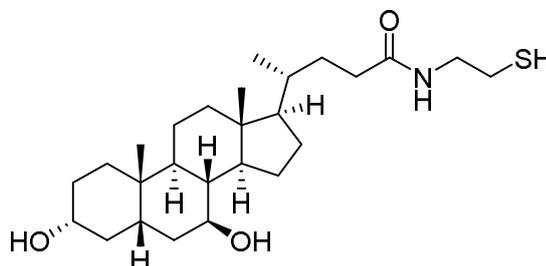
A una mezcla de reacción en DME/H₂O (2:1, 5 ml) que contiene al correspondiente *tert*-butil carbamato (1 g, 3.15 mmol), obtenido anteriormente y al ácido fenilborónico (422.91 mg 3.46 mmol) y carbonato sódico (491.8 mg, 4.73 mmol), en se le añadió Pd(PPh₃)₄ (10%, 0.346 mmol) y se mantuvo en agitación durante 20 horas a 110 °C y atmosfera inerte. Transcurridos este tiempo de reacción, se añadió agua, y el producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Las fases orgánicas juntaron y se se lavaron con agua (2 x 10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El sólido de color amarillo así obtenido, se purificó por cromatografía obteniéndose el producto deseado C. El último paso de la reacción consiste en la reducción del grupo NO₂ a NH₂, el cual se llevó a cabo utilizando un hidrogenador catalítico modular (H-Cube Pro de THALESNano) y un CatCart o sistema de catalizador en cartucho, el cual en este caso contiene Ni/Ra o Pd/C soportado. Para llevar a cabo la reacción se disolvió el compuesto (X) en 500 ml de MeOH y se hizo pasar a través del sistema catalítico a una velocidad de flujo de 1 ml/min, 50 °C y una presión de 10 bares. El disolvente fue eliminado a vacío dando lugar a un sólido de color blanco que se corresponde con el producto deseado D. Una

vez terminada la reacción de acoplamiento a través del método A, se procedió a la liberación del grupo protector BOC, utilizando para ello condiciones ácidas. (HCl, TFA, etc) para dar lugar al compuesto deseado como un sólido blanco.

Rdto 22%; p. f. 163-165 °C; IR 3321, 2927, 2862, 1649, 1489, 1048, 760, 698 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.70 (s, 1H), 8.39 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.59 – 7.49 (m, 3H), 7.45 – 7.29 (m, 5H), 7.25 (q, *J* = 7.3, 6.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.43 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J* = 5.9, 3.8 Hz, 2H), 3.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), s 3.29 ppm (s, 2H) COSY, 2.29 – 1.88 (m, 3H), 1.89 – 1.59 (m, 6H), 1.54 – 1.26 (m, 10H), 1.26 – 0.97 (m, 4H), 0.97 – 0.83 (m, 9H), 0.62 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.66, 165.23, 143.46, 142.74, 140.17, 132.98, 128.78, 128.13, 127.81, 126.83, 126.00, 125.49, 124.75, 124.65, 123.60, 116.52, 69.71, 69.46, 55.88, 54.75, 43.09, 43.01, 42.16, 41.73, 38.72, 37.72, 37.27, 34.93, 34.83, 33.76, 32.41, 31.70, 30.24, 28.20, 26.73, 23.31, 20.85, 18.46, 12.04; HRMS (ESI) para C₄₄H₅₈N₃O₄ calculado [M + H]⁺: 692.4427. Obtenido: 692.4414.

15

Ejemplo 20 (Síntesis Ik): Preparación de (R)-4-((3R, 5S, 7S, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17R) -3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-N-(2-mercaptoethyl) pentanamide.



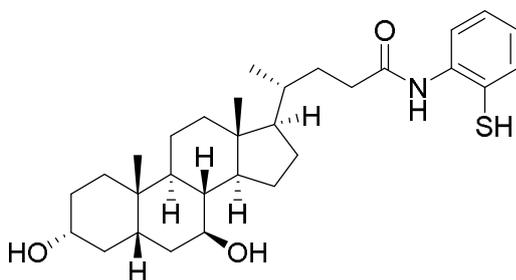
20 Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente.

Acido Ursodeoxicólico (250 mg, 0.63 mmol) con el clorhidrato de 2-(trityltio)ethan-1-amina (202.3 mg, 0.63 mmol). Para la liberación del grupo trityl y se añadió ácido trifluoroacético (0,60 ml, y trietilsilano (0,20 ml,) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras estas dos horas, se añadió NaHCO₃ (7,7 ml, solución acuosa saturada) y la mezcla resultante se agitó durante 60 minutos. La fase orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener 103 mg del producto deseado como un sólido blanco. Rdto. 36 % m.p. 116-117 ° C;

30 IR 3403, 3381, 3231, 1679, 1638, 1523, 1487, cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 12.08 (s, 1H), 8.07 (s, 1H) 4.47 (s, 1H), 3.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.34 – 3.26 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.99 – 1.90 (m, 1H), 1.92 – 1.76 (m, 1H), 1.70

(dd, $J = 7.9, 4.1$ Hz, 3H), 1.46 (q, $J = 7.8, 6.5$ Hz, 4H), 1.47 – 1.35 (m, 3H), 1.38 – 1.22 (m, 4H), 1.26 – 1.04 (m, 5H), 1.00 (dd, $J = 18.7, 9.4$ Hz, 1H), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 7H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ 174.88, 69.71, 69.44, 55.83, 54.66, 43.08, 42.99, 42.35, 42.16, 40.17, 39.97, 39.80, 38.71, 37.71, 37.25, 34.83, 33.74, 30.76, 30.23, 28.16, 27.60, 26.70, 23.30, 20.84, 18.29, 12.02. HRMS (ESI) para $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{S}$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 451.3212. Obtenido: 451.3214.

Ejemplo 21 (Síntesis II): (R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-10,13-dimetilhexadecanohidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-N-(2-mercaptofenil) pentanamida.



Este compuesto se preparó siguiendo el método A descrito anteriormente y teniendo en cuenta las modificaciones descritas para el ejemplo anterior.

Acido Ursodeoxicólico (250 mg, 0.63 mmol) con el clorhidrato de 2-(trilitio)anilina (302.09 mg, 0.63 mmol). Sólido marrón. Rendimiento 42%; m.p. 157-158 °C; IR: 3398, 3386, 3225, 1672, 1640, 1520, 1489 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 9.89 (s, 1H), 8.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.727 (m, 3H), 7.16 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.42 (sa, 1H), 3.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.29 (2H), 2.24 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.99 – 1.90 (m, 1H), 1.92 – 1.76 (m, 1H), 1.75 (dd, $J = 7.9, 4.1$ Hz, 3H), 1.46 (q, $J = 7.8, 6.5$ Hz, 4H), 1.47 – 1.35 (m, 3H), 1.38 – 1.24 (m, 4H), 1.26 – 1.08 (m, 5H), 1.02 (dd, $J = 18.7, 9.4$ Hz, 1H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 7H), 0.73 (s, 3H). C NMR (101 MHz, MeOH- d_4) δ 172.63, 145.00, 133.00, 127.70, 126.81, 125.65, 69.46, 55.87, 54.75, 43.08, 43.01, 42.15, 41.71, 38.71, 37.71, 34.82, 33.75, 32.39, 31.69, 30.24, 28.19, 26.72, 23.31, 20.84, 18.45, 12.03. HRMS (ESI) para $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{S}$ calculado $[\text{M} + \text{H}]^+$: 499.3214. Obtenido: 499.3212.

Ejemplo 22. Análisis de expresión de distintas enzimas HDAC en cultivos celulares y tejido hepático de pacientes con enfermedad hepática poliquística e individuos normales.

La expresión de HDAC6 en colangiocitos humanos normales y poliquísticos en cultivo se analizó utilizando un anticuerpo primario (HDAC6 (H-300) sc-11420, Santa Cruz) específico y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich). La

expresión de la proteína se cuantificó utilizando un sistema de quimioluminiscencia (Amersham, GE Healthcare). La proteína GAPDH se utilizó como control de carga.

Mediante estos ensayos de inmunoblot se ha confirmado que la expresión de HDAC6 se encuentra aumentada en los colangiocitos humanos poliquísticos (ADPKD) en comparación con los colangiocitos humanos normales (NHC3) (Fig. 1).

Ejemplo 23. Evaluación de la actividad inhibitoria de los Compuestos Ia y Ib sobre distintas enzimas HDAC.

Componentes del ensayo:

10 Sustratos peptídicos: todos los ensayos HDAC se realizaron utilizando sustratos peptídicos acetilados marcados con 7-amino-4-metilcumarina (AMC):

- Sustrato para isoformas HDAC1, 2, 3, 6, 10, 11 y ensayos de extracto nuclear HeLa: péptido fluorogénico acetilado a partir de residuos de p53, 379-382 (RHKKAc).

15 - Sustrato para isoformas HDAC 4, 5, 7, 9: Boc-L-Lys fluorogénico (s-trifluoroacetilo) - AMC.

- Sustrato para ensayos HDAC8: péptido fluorogénico acetilado de residuos de p53, 379-382 (RHKAckAc).

Tampón de ensayo. Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM (suplementado con 1 mg / ml de BSA para la dilución) (BioMol Cat. # KI-143).

20 Enzimas:

- Ensayo HDAC1: HDAC1 humana 75 nM (número de acceso de GenBank NM_004964): longitud completa con etiqueta GST C-terminal, PM = 79,9 kDa, expresada por sistema de expresión de baculovirus en células Sf9 (BioMol Cat. # SE-456).

25 - Ensayo HDAC2: HDAC2 humana 5 nM (número de acceso de GenBank Q92769): longitud completa con marcador His C-terminal, PM = 60 kDa, expresada por sistema de expresión de baculovirus en células Sf9 (BioMol Cat. # SE-500).

30 - Ensayo HDAC3: HDAC3 / NcoR2 humana 2,3 nM (número de acceso GenBank NM_003883 para HDAC3, número de acceso GenBankNM_006312 para NcoR2): complejo de HDAC3 humano, longitud completa con marcador His C-terminal, MW = 49,7 kDa y NCOR2 humano, Etiqueta GST N-terminal, MW = 39 kDa, coexpresada en sistema de expresión de baculovirus (BioMol Cat. # SE-507).

35 - Ensayo HDAC4: HDAC4 humana 266 nM (Nº de acceso GenBank NM_006037): Aminoácidos 627-1085 con etiqueta GST N-terminal, PM = 75,2 kDa, expresada en sistema de expresión de baculovirus (BioMol, Hamburgo, Alemania).

- Ensayo HDAC5: HDAC5 humana 588 nM (número de acceso de GenBank NM_001015053): longitud completa con etiqueta GST N-terminal, PM = 150 kDa,

expresada por sistema de expresión de baculovirus en células Sf9 (BioMol, Hamburgo, Alemania).

- 5 - Ensayo HDAC6: HDAC6 humana 13 nM (nº de acceso de GenBank BC069243): longitud completa con etiqueta GST N-terminal, PM = 159 kDa, expresada por sistema de expresión de baculovirus en células Sf9 (BioMol Cat. # SE-508).
- Ensayo HDAC7: HDAC7 humana 962 nM (nº de acceso de GenBank AY302468): extremo 518 de aminoácidos con etiqueta GST N-terminal, PM = 78 kDa, expresada en sistema de expresión de baculovirus (BioMol, Hamburgo, Alemania).
- 10 - Ensayo HDAC8: HDAC8 humana 19 nM (Nº de registro GenBank NM018486): longitud completa, PM = 42 kDa, expresada en un sistema de expresión de E. coli (BioMol Cat. # SE-145).
- Ensayo HDAC9: HDAC9 humana 986 nM (Nº de registro de GenBank NM178423): Aminoácidos 604-1066 con marcador His C-terminal, PM = 50,7 kDa, expresada en sistema de expresión de baculovirus (BioMol, Hamburgo, Alemania).
- 15 - Ensayo HDAC10: HDAC10 humana 781 nM (Nº de acceso de GenBank NM_032019): Aminoácidos 1 - 631 con etiqueta GST Nterminal, PM = 96 kDa, expresada por sistema de expresión de baculovirus en células Sf9 (BioMol Cat. # SE - 559).
- Ensayo HDAC11: HDAC1 1 humana 781 nM (número de acceso GenBank 20 NM_BC009676) con etiqueta GST N-terminal, PM = 66 kDa, expresada en sistema de expresión de baculovirus (BioMol Cat. # SE-560).
- Ensayo extracto nuclear de células HeLa: 25 ng / µl Extracto nuclear de células HeLa: Preparado por extracción alta en sal de núcleos HeLa (línea celular de cáncer de cuello uterino humano), este extracto es una fuente rica de actividad HDAC (BioMol 25 Cat. # KI-140).

Procedimiento de ensayo:

Se incubaron 50 µl de sustrato peptídico (ver sección "sustratos peptídicos" más arriba) y una concentración óptima de la enzima correspondiente (ver sección "enzimas" más arriba) en el tampón de ensayo a una concentración final de DMSO del 30 1% en presencia de concentraciones de gradiente de inhibidores (modo IC50 de 10 dosis con dilución en serie y 3 replicas) a 30 ° C durante 2 h. Las reacciones se llevaron a cabo en una microplaca de 96 pocillos para fluorometría en un volumen de reacción de 50 µl. Después de la reacción de desacetilación, se añadió a cada pocillo Fluor-de-Lys-Developer (BioMol Cat. # KI-105) para digerir el sustrato desacetilado, 35 produciendo de este modo la señal fluorescente. La reacción se llevo a cabo durante 45 minutos a 30 ° C con 5% de CO2; luego se midió la señal de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de

emisión a 460 nm en un fluorómetro de lectura de microplacas (GeminiXS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Una curva de Deacetylated Standard (Biomol, Cat. # KI-142; hecha de 100 µM con dilución 1: 2 y 10 dosis, 6 µl) permitió la conversión de la señal fluorescente en micromoles de producto desacetilado. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado (n=6 de tres experimentos independientes). Las IC50 se calcularon ajustando los datos experimentales a una curva dosis-respuesta. Como control negativo se usó DMSO; Como inhibidor de control positivo se usó Tricostatina A (Biomol Cat. # GR-309).

Se han llevado a cabo ensayos de actividades enzimáticas en once enzimas HDACs, incluyendo HDAC6.

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1 y Figura 2.

	Compuesto la	Compuesto lb	TSA	TMP269	UDCA
	IC50 (M)	IC50 (M)	IC50 (M)	IC50 (M)	IC50 (M)
HDAC1	8.45E-06±1.86E-06	7.59E-06±4.15E-07	1.83E-08±1.10E-08	-	-
HDAC2	>1.00E-05	>1.00E-05	4.81E-08±2.73E-08	-	-
HDAC3	8.05E-06±9.06E-07	8.60E-06±7.47E-07	2.27E-08±1.08E-08	-	-
HDAC4	>1.00E-05	-	-	3.49E-07±6.16E-08	-
HDAC5	>1.00E-05	>1.00E-05	-	2.97E-07±3.71E-08	-
HDAC6	1.58E-07±7.15E-08	1.15E-07±4.82E-08	3.45E-09±1.59E-09	-	-
HDAC7	6.84E-06±1.39E-06	>1.00E-05	-	1.19E-07±6.82E-08	-
HDAC8	9.24E-07±5.26E-07	6.66E-07±4.48E-07	3.25E-07±3.83E-08	-	-
HDAC9	9.12E-06±4.04E-07	5.13E-06	-	3.73E-08±8.89E-09	-
HDAC10	>1.00E-05	6.57E-06±2.80E-06	5.85E-08±5.09E-08	-	-
HDAC11	2.24E-06±7.51E-07	2.50E-06±9.36E-07	3.05E-06±6.01E-07	-	-

Tabla 1. IC50 del efecto inhibitorio de los Compuestos la, lb y ácido ursodeoxicólico (UDCA) sobre distintas enzimas HDAC, utilizando tricostatina (TSA) y TMP269 como controles positivos de inhibición.

Estos datos indican que los compuestos la y lb presentan alta selectividad y capacidad inhibitoria frente a la enzima HDAC6 (rango nanomolar) comparable a otros inhibidores de HDAC6 como la tricostatina. Esta capacidad inhibitoria es menor frente al resto de enzimas HDAC (rango micromolar) (tabla 1), lo que demuestra su selectividad hacia HDAC6. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que el ácido

ursodeoxicólico no presenta actividad inhibitoria sobre ninguna HDAC en el rango de concentraciones ensayadas (tabla 1). En el caso de la 4-(aminometil)-N-hidroxi-benzamida (presente en ambos compuestos), si bien este compuesto mostró cierta actividad inhibitoria sobre HDAC6, con una IC50 de $2.45E^{-06} \pm 2.85E^{-07}$, dicha actividad se ve considerablemente aumentada tras el acoplamiento de esta entidad química a los ácidos ursodeoxicólico (Ia) y glicoursodeoxicólico (Ib) (Figura 2).

ND.: No determinado

10 ***Ejemplo 24. Estudio del efecto del Compuesto la sobre los niveles intracelulares de Ca²⁺ en colangiocitos humanos poliquísticos in vitro.***

Tal y como se ha descrito previamente [Banales JM et al. Hepatology 2009; Perugorria MJ et al. Nature Reviews G&H; Munoz-Garrido P et al. Journal of Hepatology 2015] los colangiocitos poliquísticos (humano y rata) se caracterizan por presentar un descenso en los niveles intracelulares de Ca²⁺, lo cual promueve su proliferación. Además, se ha comprobado que el tratamiento crónico con UDCA es capaz de inhibir parcialmente la proliferación de los colangiocitos humanos poliquísticos a través de la normalización de los niveles intracelulares de Ca²⁺ en modelos experimentales [Munoz-Garrido P et al. Journal of Hepatology 2015] y pacientes [D'Agnolo HMA, et al. Journal of Hepatology 2016] con PLD. Por ello, se ha evaluado si las nuevas entidades químicas la y Ib (Figura 3, solo se muestra resultado para Ia) mantienen las propiedades reguladoras del Ca²⁺ intrínsecas del UDCA cuando no se modifica su esqueleto hidrocarbonado. Para ello, se ha utilizado el método de medición de Ca²⁺ intracelular "Fluo-4 AM" (Thermo Fisher Scientific). Como control positivo se ha utilizado un ionóforo de Ca²⁺ (i.e. A23187, Sigma). Nuestros datos indicaron que el compuesto la preserva las propiedades Ca²⁺ moduladoras del UDCA aumentando los niveles intracelulares de Ca²⁺ en los colangiocitos humanos poliquísticos (Figura 3).

30 ***Ejemplo 25. Determinación de los mecanismos moleculares de entrada (vectorización/transporte) del Compuesto la en los colangiocitos humanos normales y poliquísticos in vitro.***

Los transportadores de ácidos biliares y cationes orgánicos expresados en hepatocitos y colangiocitos se sobre-expresaron en células HepG2 (OCT1) y células CHO (OCT3). La eficacia del proceso se confirmó mediante la medida de la abundancia de mRNA (qPCR), proteína (WB) y la correcta inserción en la membrana plasmática (inmunofluorescencia). Los estudios de captación incluyeron la comparación de la eficiencia de captación del compuesto con respecto a dihidroetidio (DHE) en el caso

de OCT3, y sorafenib en el caso de OCT1 (controles positivos) así como la sensibilidad del proceso a la inhibición por sustrato inducida por la administración conjunta del compuesto y quinina. El contenido celular de todos los compuestos se determinó por HPLC-MS/MS en triple cuadrupolo tras su extracción del sistema celular
5 utilizado en cada caso.

El análisis de los niveles de expresión (mRNA) de los transportadores se llevaron a cabo en colangiocitos humanos normales y poliquísticos en cultivo mediante qPCR utilizando el aparato 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Para ello se emplearon cebadores correspondientes (sentido y antisentido) para amplificar
10 fragmentos específicos de cDNA utilizando el kit iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD). La expresión del gen RPL22 se utilizó como control interno de carga para normalizar la expresión de cada muestra

Los datos indicaron que, al igual que el fármaco Sorafenib, el Compuesto la se transporta de manera específica a través de OCT1 en células hepáticas (Fig. 4A), pero
15 no por ASBT o OATP1B1 (datos no mostrados), dicho efecto viéndose inhibido por la presencia de quinina (inhibidor de OCT1).

Nuestros datos indican que el compuesto la se transporta a través de OCT1 en células hepáticas (Fig. 4B,C), pero no por ASBT o OATP1B1 (datos no mostrados). Este hecho se vio asociado con un aumento de sobreexpresión de OCT1, así como de
20 expresión de OCT3, a nivel de mRNA en los colangiocitos humanos poliquísticos (PLD) en comparación con los colangiocitos humanos normales (NHC) (Fig. 4B,C); por el contrario, no se encontraron cambios de expresión de OATP2B1, NTCP y ASBT entre ambos tipos celulares (datos no mostrados).

25 ***Ejemplo 26. Evaluación del papel del Compuesto la sobre la proliferación de los colangiocitos humanos normales y poliquísticos in vitro.***

Se analizó la proliferación de los colangiocitos humanos poliquísticos a 48 horas en ausencia o presencia de diferentes dosis de compuesto la (10, 50, 100, μ M) en un medio de cultivo quiescente. Para ello, se utilizó el protocolo de proliferación CFSE
30 (Invitrogen) utilizando citometría de flujo. Nuestros datos preliminares muestran que la nueva entidad química la inhibe la proliferación de los colangiocitos humanos poliquísticos de manera dosis-dependiente (10, 50, 100 μ M) y con mayor intensidad que el UDCA (100 μ M) (Figura 5).

Los datos obtenidos muestran que el compuesto la inhibe la hiper-proliferación de los
35 colangiocitos humanos poliquísticos *in vitro* de manera dosis-dependiente (Fig. 5).

Ejemplo 27. Análisis del efecto de la nueva familia de entidades químicas HDAC6i-UDCA sobre la morfología de los cilios primarios de los colangiocitos humanos poliquísticos in vitro.

La expresión de tubulina- α -acetilada (Ac- α tubulina) e histona 3 acetilada en la lisina 9 (Ac-H3K9) en colangiocitos humanos poliquísticos en cultivo se analizó utilizando anticuerpos primarios específicos contra estas dos proteínas y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (de Sigma-Aldrich). La expresión de cada proteína la proteína se cuantificó utilizando un sistema de quimioluminiscencia (Amersham, GE Healthcare). La proteína GAPDH se utilizó como control de carga.

Mediante inmunoblot se ha comprobado que la expresión de la tubulina- α -acetilada del cilio primario de los colangiocito humanos poliquísticos (PLD) se encuentra disminuida en condiciones basales en comparación con los colangiocitos humanos normales (NHC). Sin embargo, dicha expresión aumenta significativamente en presencia del Compuesto la (Fig. 6).

Ejemplo 28. Estudio de biodistribución y propiedades hepatotrópicas del Compuesto la tras su administración a ratas normales y PCK (modelo animal de PLD).

Se trataron de forma crónica (2 meses) ratas PCK con el Compuesto la (7mg/kg/día mediante administración oral). Los datos indicaron que el tratamiento crónico con el compuesto la disminuyó de manera significativa los niveles de la transaminasa hepática ALT, i.e. marcador de daño hepático aumentado de forma basal en las ratas PCK. Este dato indica que el Compuesto la puede estar promoviendo un efecto hepatoprotector en las ratas PCK.

Ejemplo 29. Análisis del efecto del Compuesto Ib sobre la morfología de los cilios primarios de los colangiocitos humanos poliquísticos in vitro.

Tinción ciliar. Las células cultivadas en cubreobjetos se lavaron con PBS, se fijaron con metanol y se bloquearon durante una hora en tampón de bloqueo a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios γ -tubulina (1: 100; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y α -tubulina acetilada (1: 1000; Sigma-Aldrich) o IFT88 (1: 100; ProteinTech, Rosemont, IL, EE. UU.) se incubaron durante la noche a 4 ° C. Después del lavado, los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 y 488 se combinaron con los anticuerpos primarios (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Prolong Gold Antifade con Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se observaron los portaobjetos y se tomaron imágenes usando microscopía confocal de barrido láser con

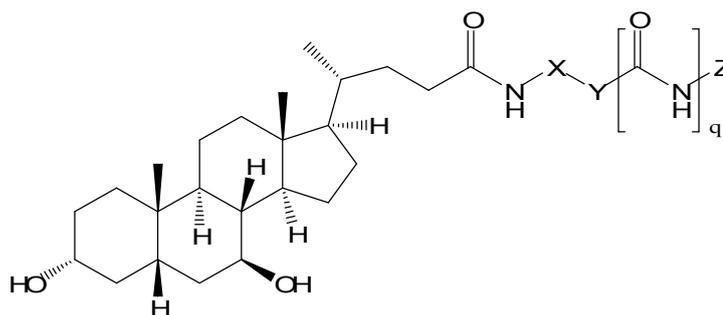
un objetivo 60X (NIKON C1si Confocal Spectral Imaging System, NIKON Instruments Co., Melville, NY, EE. UU.). El campo se amplió a 4X para observar cilios individuales. Las imágenes se abrieron con EZ-C1 3.90 Freeviewer y se agregó una barra de escala. Las imágenes se convirtieron a archivos Tiff y se cuantificaron utilizando
5 ImageJ Software. Se midió la barra de escala guardada en la imagen y se estableció la escala. Usando la herramienta a mano alzada, se trazaron los cilios y se tomaron medidas.

Por otra parte se ha observado que la longitud basal de los cilios de colangiocitos humanos normales (NHC3) es mayor que la de los cilios presentes en los
10 colangiocitos humanos poliquísticos, PLD. Esta longitud se ve aumentada de manera significativa tras el tratamiento de los colangiocitos humanos poliquísticos con el compuesto Ib. Por otra parte, el tratamiento de los colangiocitos humanos normales con el compuesto Ib no produjo variaciones significativas en la longitud de los cilios en estas células (Figura 7).

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

5 donde:

X es un grupo $-(CHR_1)_p$, donde R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo arilo C_6-C_{10} , y p es 0 o 1;

Y se selecciona de entre:

enlace sencillo;

10 $-(CH_2)_n$, siendo n 1, 2, 3, 4 ó 5;

arilideno o heteroarilideno, conectado con el resto de la molécula mediante uniones (1,3) o (1,4);

$-C(O)-N(H)-CH_2(Ar)-$, y

$-Ar-C(O)-N(H)-CH_2-(Ar)-$;

15 donde $-Ar-$ significa arilideno;

q es 0 o 1;

Z se selecciona entre OH, SH y arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido,

o un estereoisómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde p es 1.

20 3. Compuesto según reivindicaciones 1 o 2, donde q es 1.

4. Compuesto según reivindicaciones 1 o 2, donde q es 0.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde Z es OH, SH o un arilo opcionalmente sustituido por al menos uno entre NH_2 , SH y un fenilo.

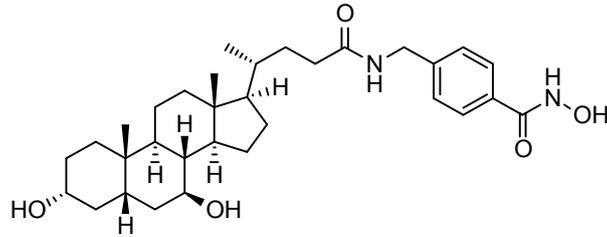
25 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X es $-(CH_2)_p-$ y p es 1.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde Y es arilideno o heteroarilideno.

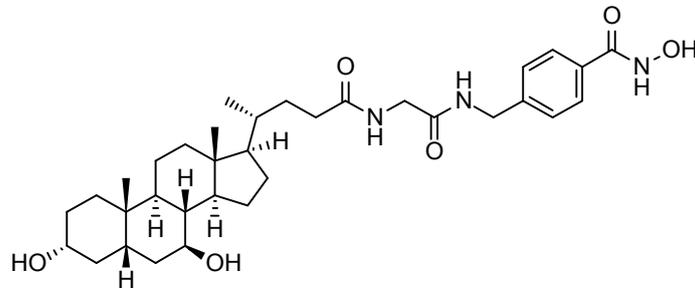
8. Compuesto según reivindicación 7, donde p es 1.

30 9. Compuesto según reivindicaciones 7 u 8, donde R_1 es hidrógeno.

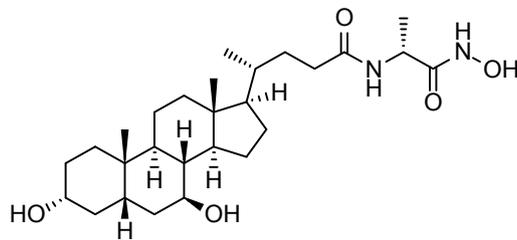
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde Y es $-(CH_2)_n$, donde n es 1, 2, 3 o 4.
11. Compuesto según reivindicación 10, donde q es 1.
12. Compuesto según reivindicaciones 11 o 12, donde Z es OH.
- 5 13. Compuesto según reivindicación 1, donde Y es un enlace sencillo.
14. Compuesto según reivindicación 13, donde p es 0 y q es 0.
15. Compuesto según reivindicación 1 seleccionado entre los siguientes compuestos:



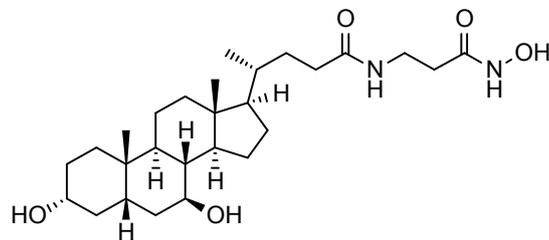
(1a)



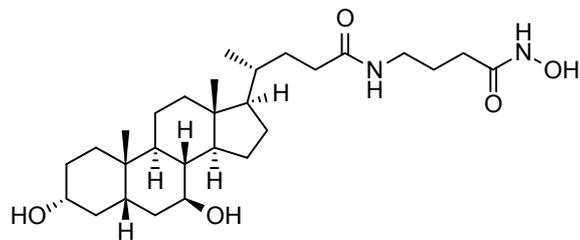
(1b)



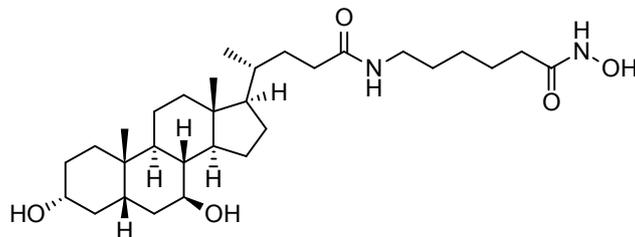
(1c)



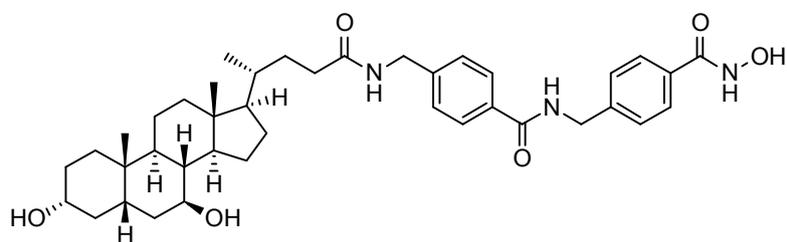
(1d)



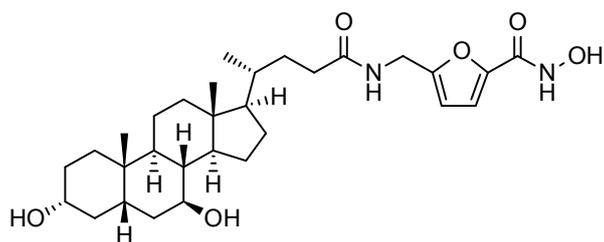
(Ie)



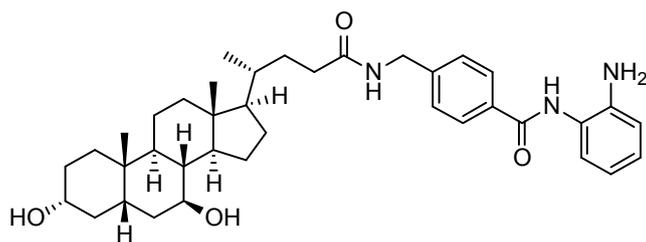
(If)



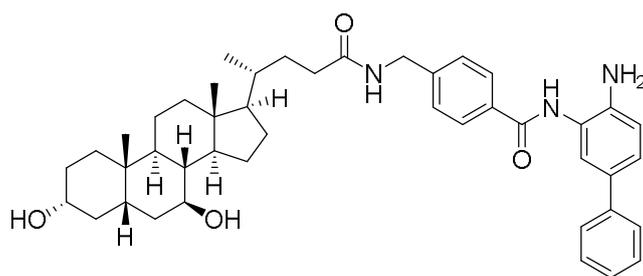
(Ig)



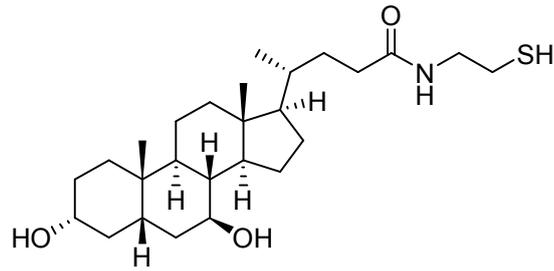
(Ih)



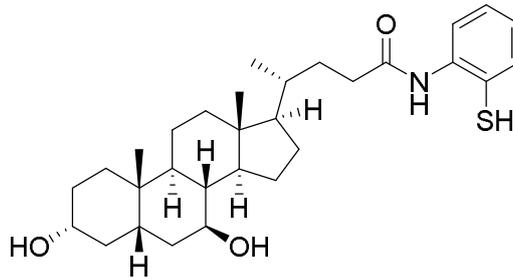
(Ii)



(Ij)



(Ik)



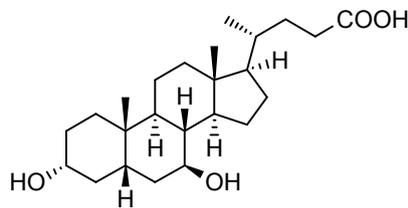
(II)

5 o estereoisómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

16. Un procedimiento para la obtención de los compuestos de fórmula (I) que comprende:

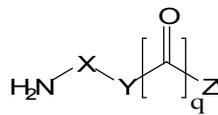
hacer reaccionar al ácido ursodesoxicólico de fórmula (II):

10



(II)

con un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde:

15

X es un grupo $-(CHR_1)_p$, donde R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo arilo C_6-C_{10} , y p es 0 o 1;

Y se selecciona de entre:

enlace sencillo;

$-(CH_2)_n$, siendo n 1, 2, 3, 4 ó 5;

20

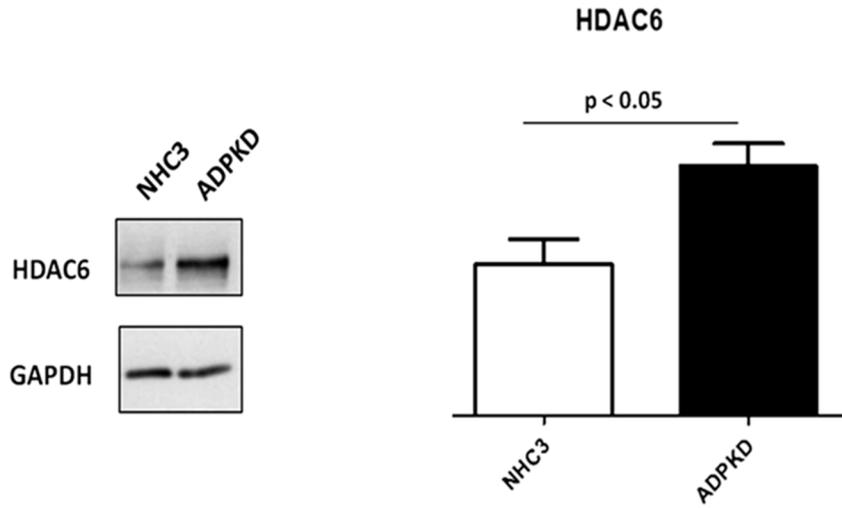


Figura 1

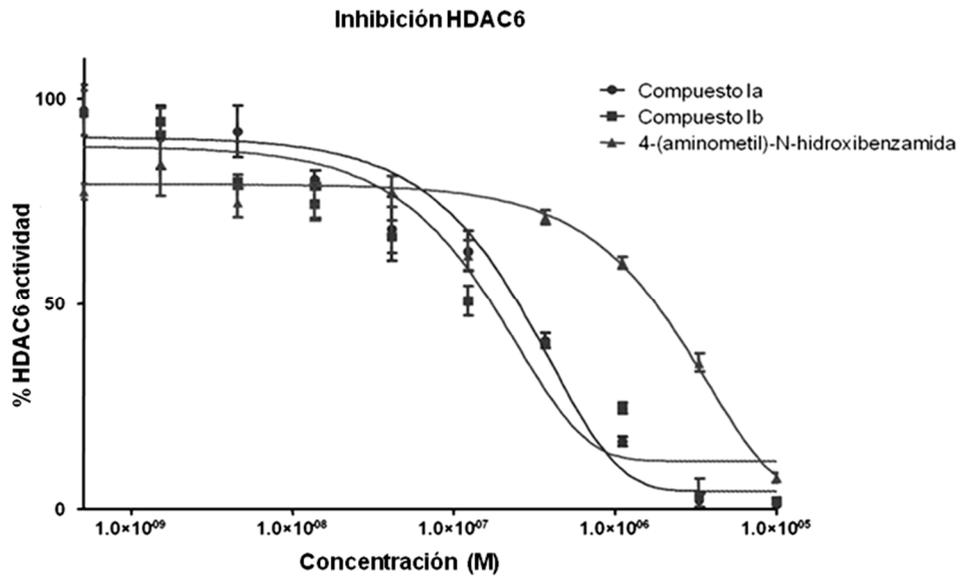


Figura 2

**Niveles intracelulares de Ca²⁺
en colangiocitos humanos poliquísticos**

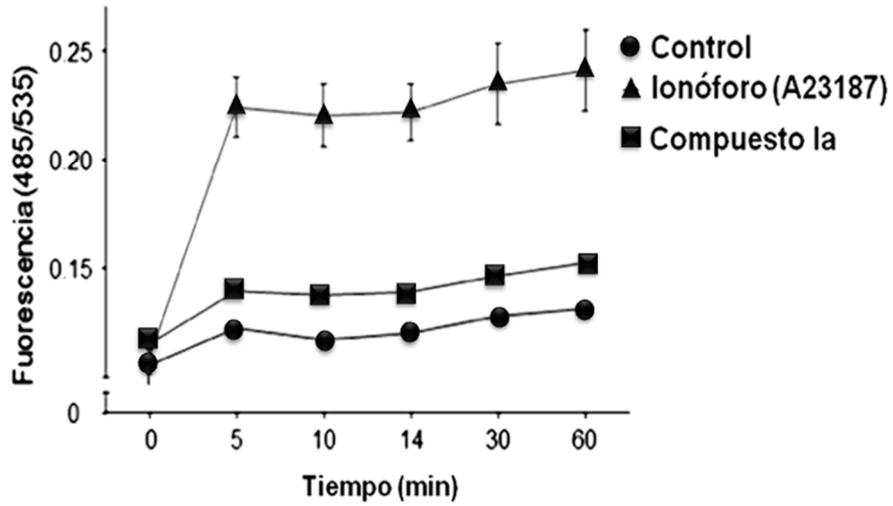


Figura 3

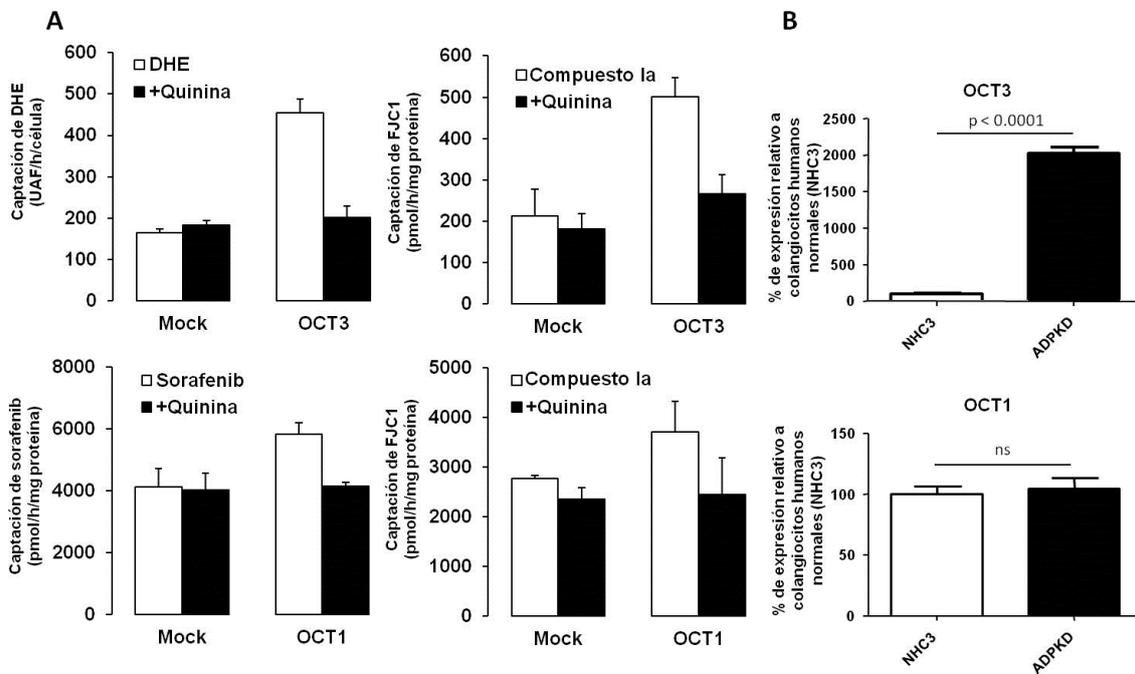


Figura 4

Colangiocitos humanos poliquísticos

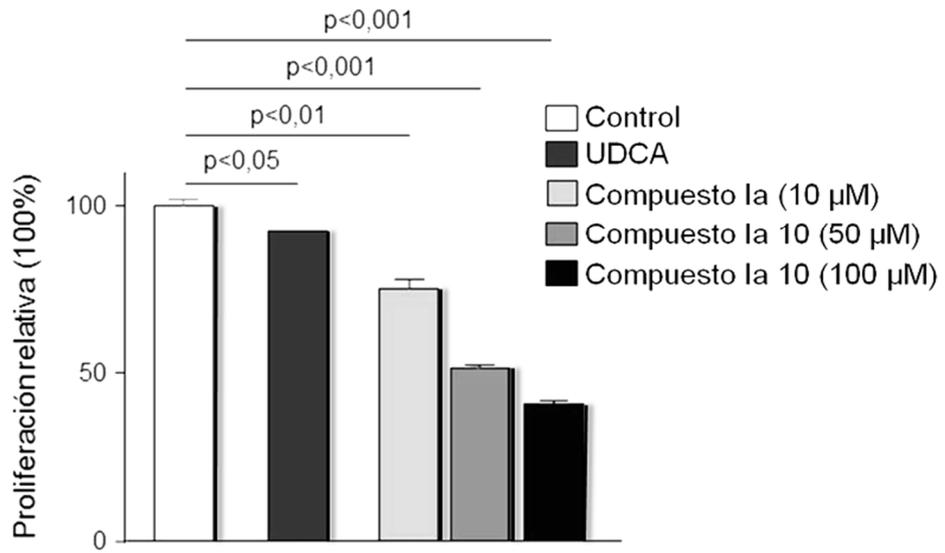


Figura 5

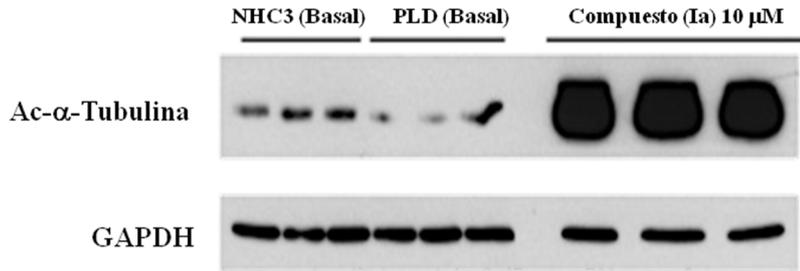


Figura 6

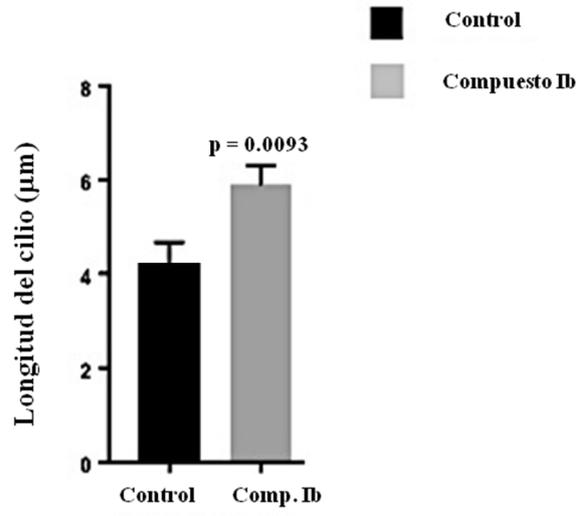


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201731488

②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NOPONEN, V. et al. "Bile acid-cysteamine conjugates: Structural properties, gelation, and toxicity evaluation". Steroids 2012, Volumen 77, Número 3, páginas 193-203. ISSN: 0039-128X. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.11.006. [Disponible en línea el 22.11.2011]. Ver página 193, resumen; página 194, figura 1; página 195, esquema 1.	1,2,4-6,10,12,13,15,16
X	SHARMA, R. et al. "Ursodeoxycholic Acid Amides As Novel Glucocorticoid Receptor Modulators". Journal of Medicinal Chemistry 2011, Volumen 54, Número 1, páginas 122-130. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm100860s. [Disponible en línea el 15.12.2010]. Ver página 122, resumen; página 123, esquema 1 y columna 1, párrafo 4; página 127, sección experimental.	1,2,4-6,10,13,14,16-18,22
X	FINI, A. et al. "Quantitative Structure-Antimicrobial Activity Relationship in 5β-Cholanyl-24-benzylamine Derivatives". Journal of Pharmaceutical Sciences 1990, Volumen 79, Número 7, páginas 603-605. ISSN: 0022-3549. https://doi.org/10.1002/jps.2600790712 . Ver página 603, resumen, sección experimental y tabla I; página 604, tabla II.	1,2,4-6,10,13,14,16-18,22
X	VALKONEN, A. et al. "Syntheses and structural study of bile acid amidoalcohols". Steroids 2008, Volumen 73, Número 12, páginas 1228-1241. ISSN: 0039-128X. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.06.006. [Disponible en línea el 27.06.2008]. Ver página 1228, resumen; página 1229, columna 1 y esquema 2; página 1230, experimental.	1,2,4-6,10,12-14,16-18,22
X	SHIMIZU, K. et al. "Preparation and chromatography of the hydroxamic acids of some bile acids". The Journal of Biochemistry 1958, Volumen 45, Número 1, páginas 13-16. ISSN: 0021-924X (en línea, 1756-2651). https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126795 . Ver página 13, experimental; página 15, tabla II.	1,4,5,13,14,16
X	KEUNE, W.-J. et al. "Rational Design of Autotaxin Inhibitors by Structural Evolution of Endogenous Modulators". Journal of Medicinal Chemistry 2017, Volumen 60, Número 5, páginas 2006-2017. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01743. [Disponible en línea el 06.02.2017]. Ver página 2006; resumen e introducción; página 2007, esquema 1; página 2008, tabla I.	1,2,4,6,10,13,14,16-18,22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.11.2018

Examinador
G. Esteban García

Página
1/3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201731488

②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SHARMA, R. et al. "Bile acid toxicity structure-activity relationships: Correlations between cell viability and lipophilicity in a panel of new and known bile acids using an esophageal cell line (HET-1A)". Bioorganic and Medicinal Chemistry 2010, Volumen 18, Número 18, páginas 6886-6895. ISSN: 0968-0896. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.07.030. [Disponible en línea el 19.07.2010]. Ver página 6886, resumen e introducción.	1-22
A	MUNOZ-GARRIDO, P. et al. "Ursodeoxycholic Acid Inhibits Hepatic Cystogenesis in Experimental Models of Polycystic Liver Disease". Journal of Hepatology 2015, Volumen 63, Número 4, páginas 952-961. ISSN: 0168-8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.05.023. [Disponible en línea el 01.06.2015]. Ver página 952, resumen.	1-22
A	GUPTA, K.D. et al. "Histone deacetylases in monocyte/macrophage development, activation and metabolism: refining HDAC targets for inflammatory and infectious diseases". Clinical and Translational Immunology 2016, Volumen 5, e62, páginas 1-10. ISSN: 2050-0068/16. DOI: 10.1038/cti.2015.46. [Disponible en línea el 29.01.2016]. Ver página 1, resumen.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.11.2018

Examinador

G. Esteban García

Página

2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07J9/00 (2006.01)

C07J41/00 (2006.01)

C07J75/00 (2006.01)

A61K31/575 (2006.01)

A61P1/16 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07J, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL, NCBI, GOOGLE SCHOLAR