

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 718**

51 Int. Cl.:

**C07J 9/00** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**C07J 31/00** (2006.01)

**C07J 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2015 PCT/EP2015/061802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 15731260 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3149019**

54 Título: **Derivados de colano para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por FXR y TGR5/GPBAR1**

30 Prioridad:

**29.05.2014 IT FI20140130**

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

**23.06.2020**

73 Titular/es:

**BAR PHARMACEUTICALS S.R.L. (100.0%)  
Via Sicilla, 2  
42124 Reggio Nell'Emilia, IT**

72 Inventor/es:

**ZAMPELLA, ANGELA y  
FIORUCCI, STEFANO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 768 718 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de colano para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por FXR y TGR5/GPBAR1

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos que tienen armazones de colano, dichos compuestos para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades mediadas por FXR y TGR5/GPBAR1.

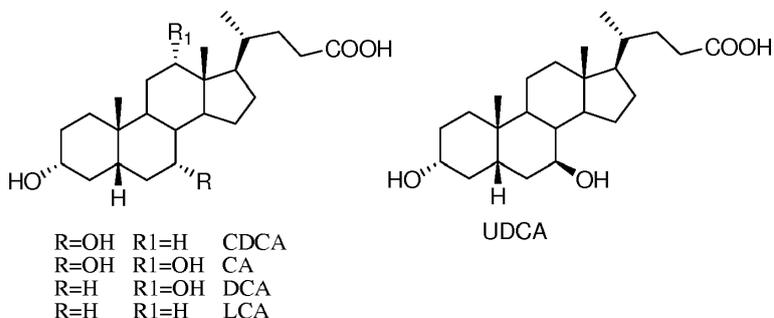
**Estado de la técnica**

Los ácidos biliares (BA) son moléculas de señalización que interactúan con dos tipos de receptores celulares dedicados, los receptores nucleares intracelulares y los receptores de la superficie celular. Los receptores nucleares incluyen el receptor farnesoide X (FXR), identificado como el sensor de ácido biliar endógeno (Makishima et al. Science, 1999, 284, 1362; Parks et al. Science 1999, 284, 1365).

Altamente expresado en tejidos enterohepáticos (hígado e intestino), el FXR regula la homeostasis de los ácidos biliares, incluyendo también las vías metabólicas la homeostasis de los lípidos y la glucosa (Zhang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 1006). Además, los agonistas de FXR proporcionan efectos antiinflamatorios y antifibróticos y anticancerígenos (Renga et al. FASEB J. 2012, 26, 3021-3031).

El receptor de la superficie celular de los ácidos biliares (GPBAR1, M-BAR1, GP-BAR1, TGR5) pertenece a la superfamilia similar a la rodopsina de los receptores acoplados a la proteína G (Takeda et al. FEBS Lett. 2002, 520, 97; Kawamata et al. J. Biol. Chem. 2003, 278, 9435).

La unión del ligando a TGR5/GPBAR1 da como resultado la elevación de los niveles de AMPc intracelular con la consiguiente activación de una cascada de señalización. GPBAR1 es altamente expresado en el hígado y en el intestino, pero también en los músculos, el cerebro, el tejido adiposo, los macrófagos y las células endoteliales. En el tejido adiposo muscular y pardo, TGR5/GPBAR1 aumenta el gasto de energía y el consumo de oxígeno (Watanabe et al. Nature 2006, 439, 484) en las células L enteroendocrinas, la activación de TGR5/GPBAR1 estimula la secreción de péptido similar al glucagón (GLP)-1, una incretina que mejora la liberación de insulina en el páncreas, regulando así los niveles de glucosa en sangre, la motilidad gastrointestinal y el apetito (Thomas et al. Cell. Metab. 2009, 10, 167).



Químicamente, los BA son derivados de la cadena lateral de colesterol truncados. Su repertorio molecular se genera en primer lugar en el hígado con la producción de ácidos biliares primarios, ácido cólico (CA) y ácido quenodesoxicólico (CDCA). La transformación por microbios en el intestino genera ácidos biliares secundarios, ácido desoxicólico (DCA) y ácido litocólico (LCA). En el cuerpo humano, los ácidos biliares se conjugan con glicina y taurina. La actividad hacia los dos receptores de BA depende de la estructura, siendo CDCA, el activador de FXR endógeno más potente, y LCA y TLCA, los agonistas naturales más fuertes de TGR5/GPBAR1.

Se ha observado prurito colestásico como un efecto secundario grave asociado con el uso de agonistas de FXR en PBC y un estudio reciente indicó que TGR5/GPBAR1 es la diana molecular involucrada en el desarrollo de este efecto secundario (Alemi et al. J. Clin. Invest. 2013, 123, 1513-1530).

El documento WO2013192097 describe el ácido 6-alfa-etil-quenodesoxicólico (6-ECDC), un potente y selectivo agonista de FXR dotado de efecto anticolostático. El documento WO2008002573 describe derivados de ácidos biliares como ligandos FXR para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por FXR.

El documento WO2010014836 y Sato H. (J Med Chem. 2008, 51, 4849) describen los moduladores de TGR5. D'Amore C. et al. (J. Med. Chem. 2014, 57, 937) describen el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de los

agonistas duales de GP-BAR1/FXR. D'Amore et al. describen los compuestos BAR502 y BAR504 como intermedios de síntesis.

Iguchi Y. et al. (J Lipid Res. 2010, 51, 1432) describen la función de los alcoholes biliares como ligandos de TGR5.

Kihira K. et al. (Steroids 1992, 57(4), 193-198) describen los compuestos BAR107 como intermedios de la síntesis.

Swaan P. W. et al. (J. Comp. Aid. Mol. Des. 1997, 11, 581-588), en un modelo molecular del portador de ácido biliar intestinal analizaron el ursocolato (el compuesto 15 allí, BARn406 en la presente memoria) entre un conjunto de productos conjugados de ácido biliar. BARn406 resultó tener una capacidad indetectable para inhibir el transporte de ácido taurocólico en células CaCo-2.

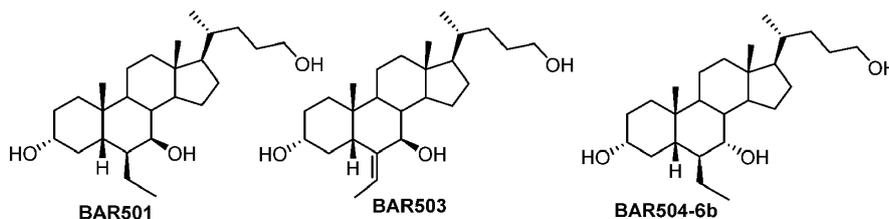
Burns et al. (Steroids 2011, 76(3), 291-300) describen la síntesis y la actividad olfativa de derivados de ácidos biliares sulfatados en la posición 5 no naturales en la lamprea marina (Petromyzon marinus). El compuesto 9e descrito en ese documento (compuesto BAR407 en la presente memoria) no provocó una respuesta olfativa.

Festa et al. (J. Med. Chem. 2014, 57, 8477) describen la síntesis de moduladores selectivos de FXR o GPBAR1.

El objetivo de la presente invención es la identificación de nuevos compuestos que contengan el armazón químico del colano y que modulen FXR y/o TGR5/GPBAR1.

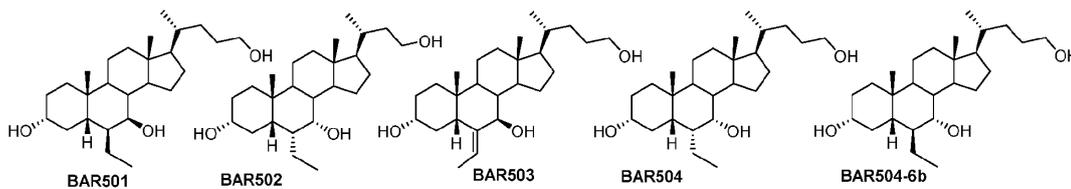
**Compendio de la invención**

El objeto de la presente invención es un compuesto de fórmula

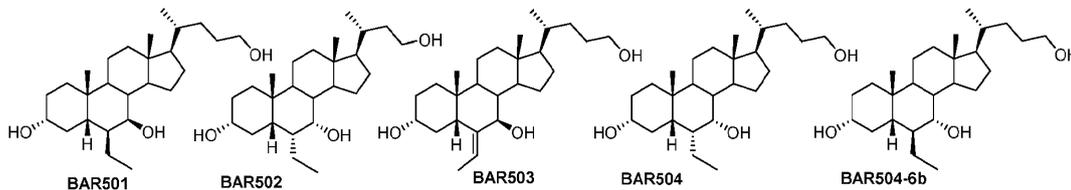


Se ha encontrado que los compuestos descritos anteriormente son moduladores de FXR o/y TGR5/GPBAR1 y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por FXR y TGR5/GPBAR1.

Por lo tanto, para un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso como medicamento, dicho compuesto de fórmula



Para un aspecto adicional, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula



para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos gastrointestinales, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas, cáncer, trastornos renales, trastornos inflamatorios y trastornos neurológicos (tales como accidente cerebrovascular). La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto como se describió anteriormente.

**Descripción detallada de la invención**

- 5 Se ha encontrado que los compuestos de acuerdo con la invención son moduladores de FXR o TGR5/GPBAR1 altamente selectivos o moduladores duales de FXR y TGR5/GPBAR1 y, por lo tanto, son útiles como medicamentos en particular para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos gastrointestinales, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades metabólicas, trastornos metabólicos, enfermedades infecciosas, cáncer, trastornos renales, trastornos inflamatorios y trastornos neurológicos tales como el accidente cerebrovascular.
- 10 En ciertas realizaciones, la enfermedad hepática se selecciona del grupo que consiste en enfermedades hepáticas crónicas que incluyen cirrosis biliar primaria (PBC), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a la nutrición parenteral, sobrecrecimiento bacteriano y colestasis asociada a sepsis, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis
- 15 no alcohólica (NASH), enfermedad de injerto contra anfitrión asociada al trasplante de hígado, trasplante de donante vivo, regeneración del hígado, fibrosis hepática congénita, enfermedad hepática granulomatosa, neoplasia maligna intra- o extrahepática, enfermedad de Wilson, hemocromatosis y deficiencia de alfa 1-antitripsina.
- 20 En ciertas realizaciones, la enfermedad gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (incluida la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la colitis indeterminada), síndrome del intestino irritable (SII), sobrecrecimiento bacteriano, pancreatitis aguda y crónica, malabsorción, colitis post-radiación y colitis microscópica.
- 25 En ciertas realizaciones, la enfermedad renal se selecciona del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefropatía hipertensiva, enfermedad glomerular crónica, que incluye glomerulonefritis crónica y glomerulopatía de trasplante crónica, enfermedades tubulointersticiales crónicas y trastornos vasculares del riñón.
- 30 En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión también conocida como hipertensión arterial, cardiopatía inflamatoria que incluye miocarditis y endocarditis, angina estable por cardiopatía isquémica, angina inestable, infarto de miocardio, enfermedad cerebrovascular incluyendo accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad cardíaca pulmonar incluyendo hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica (EAP), también conocida como enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad oclusiva de la arteria periférica y arteriopatía obliterante periférica.
- 35 En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en resistencia a la insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo I y tipo II, hipoglucemia, trastornos de la corteza suprarrenal, incluyendo la insuficiencia de la corteza suprarrenal.
- 40 En ciertas realizaciones, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en obesidad y afecciones asociadas a la cirugía bariátrica.
- 45 En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo de cáncer de hígado, cáncer de conducto biliar, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario y afecciones asociadas con la resistencia a la quimioterapia.
- 50 En ciertas realizaciones, el trastorno infeccioso se selecciona del grupo de enfermedades asociadas con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA) y trastornos relacionados, infección por virus B y virus C.
- 55 Los datos sobre la actividad de ciertos compuestos de la invención sobre FXR y TGR5/GPBAR1 se describen en la siguiente tabla. En esta tabla, las actividades para los compuestos de la invención sobre FXR y GPBAR1 se compararon con las de los compuestos de referencia: es decir, CDCA para FXR y TLCA para TGR5/GPBAR1. Cada compuesto se probó a una concentración 10 microM y la actividad de transactivación de CDCA sobre FXR y de TLCA sobre CRE (es decir, TGR5/GPBAR1) se consideró igual a 100%.

Tabla 1

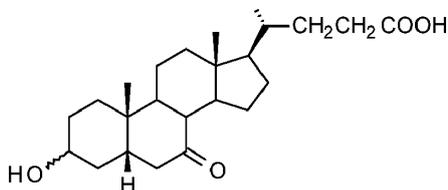
Compuestos de fórmula (I)	FXR	GPBAR1
	(% de actividad en comparación con 10 $\mu$ M CDCA)	(% de actividad en comparación con 10 $\mu$ M TLCA)
BAR501	9,9 $\pm$ 0,1	64,5 $\pm$ 0,5
BAR502	263,0 $\pm$ 32,0	74,5 $\pm$ 6,4
BAR503	68,8 $\pm$ 26,6	59,8 $\pm$ 0,1
BAR504	488,5 $\pm$ 17,5	103,0 $\pm$ 12,1
BAR504-6b	32,4 $\pm$ 14,1	75,3 $\pm$ 3,4

Para un aspecto, la presente invención se refiere a los compuestos mencionados anteriormente en donde los compuestos son agonistas duales de FXR y TGR5/GPBAR1. Un ejemplo seleccionado en este grupo es BAR502. Sorprendentemente, BAR502 no induce picazón cuando se administra a animales colestáticos mediante la administración de ANIT o Estrógeno. En los síndromes colestáticos, se cree que la acumulación de ácidos biliares en el organismo causa picazón. Recientemente, se demostró que TGR5/GPBAR1 mediaba en la picazón causada por la administración intradérmica de DCA y LCA (Alemi et al. J. Clin. Invest. 2013, 123, 1513-1530). En ensayos clínicos, la administración a pacientes que padecen cirrosis biliar primaria (PBC) de ácido obetecólico ha provocado picazón severa en aproximadamente 80% de los pacientes. Una ventaja específica y sorprendente de BAR502 es que este agente no induce picazón cuando se administra a animales que se vuelven colestáticos mediante la administración de  $\alpha$ -naftil-isotiocianato (ANIT) o  $17\alpha$ -etinilestradiol (dos modelos validados de colestasis). En estos entornos experimentales, la administración de BAR502 aumenta la supervivencia, atenúa los niveles de fosfatasa alcalina en suero y modula de forma sólida la expresión hepática de genes diana de FXR canónicos, incluyendo OSTa, BSEP, SHP y MDR1, sin inducir prurito. En el modelo de  $17\alpha$ -etinilestradiol, BAR502 atenúa la colestasis y da forma al conjunto de ácidos biliares sin inducir picazón, lo que demuestra que en los modelos de colestasis no obstructiva, BAR502 atenúa la lesión hepática sin causar picazón.

En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos que son agonistas de FXR altamente selectivos sin efectos sobre GPBAR1 cuando se administran solos pero eficaces para inhibir la activación de GPBAR1 causada por TLCA (10  $\mu$ M), comportándose así como antagonistas de GPBAR1. En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) en donde los compuestos son agonistas de GPBAR1 altamente selectivos sin efectos sobre FXR. En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) en donde los compuestos son antagonistas de GPBAR1 altamente selectivos sin efectos sobre FXR.

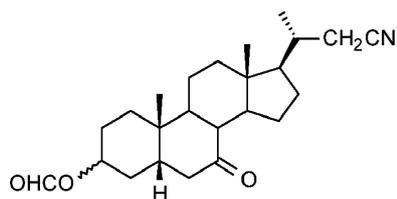
La presente invención se refiere también a procedimientos para preparar un compuesto como se describió anteriormente.

Para un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) como se describió anteriormente en donde  $n = 0$ , comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto un compuesto de fórmula (XII)



(XII)

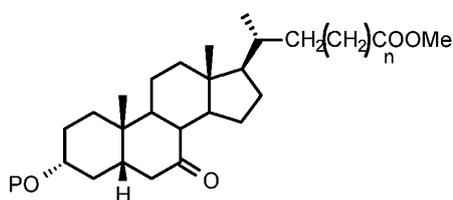
con HCOOH y HClO<sub>4</sub> y posteriormente poner en contacto el compuesto resultante con TFA, anhídrido trifluoroacético y NaNO<sub>2</sub> para obtener un compuesto de fórmula (VII)



(VII).

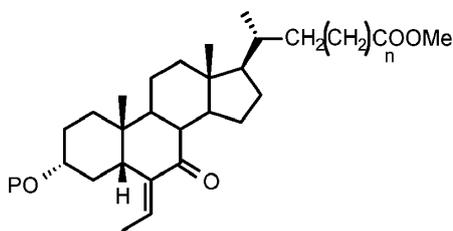
Las transformaciones químicas simples y bien conocidas pueden pasar a continuación de un compuesto de fórmula (VII) a un compuesto de fórmula (I) como se describió anteriormente, de modo que el grupo -CN puede hidrolizarse a COOH, así como el grupo OCHO puede hidrolizarse a un grupo hidroxilo o el grupo =O puede reducirse a grupo hidroxilo.

Para un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto descrito anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento someter un compuesto de fórmula (VIII) a una condensación aldólica, poniendo en contacto de ese modo un compuesto de fórmula (VIII)



(VIII)

en donde  $n = 0, 1$ , P es una función protectora alcohólica, preferiblemente OAc, con alquil litio, tal como  $n\text{BuLi}$ , y posteriormente con acetaldehído, preferiblemente en presencia también de  $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ , para obtener un compuesto de fórmula (IX)

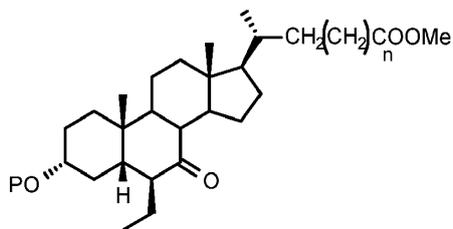


(IX)

en donde  $n$  y  $P$  se describen como anteriormente.

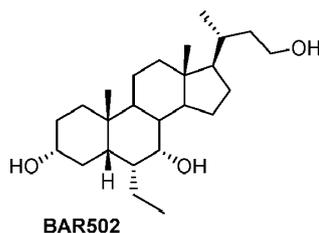
Una condensación aldólica es una reacción de adición de aldol, que podría implicar la adición nucleófila de un enolato de cetona a un aldehído, en donde una vez formado, el producto aldólico pierde una molécula de agua para formar un compuesto de carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Sometiendo un compuesto de fórmula (IX) a una hidrogenación catalítica, preferiblemente con  $\text{H}_2$  en presencia de  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , se puede obtener un compuesto de fórmula (X)

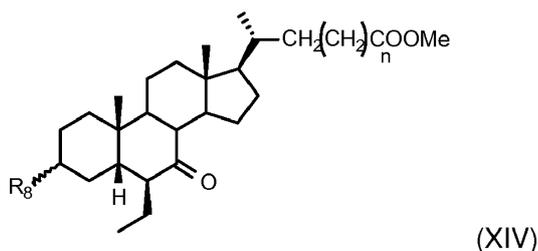


(X)

Para un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula

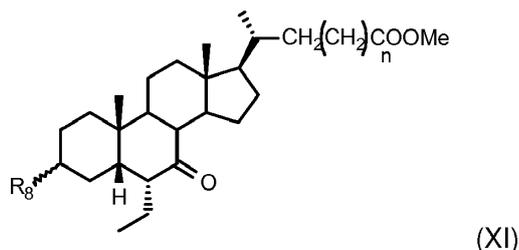


comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto un compuesto de fórmula (XIV)



en donde n es 0, R<sub>8</sub> es OAc;

con MeONa/MeOH para obtener la epimerización del estereocentro C6 obteniendo de ese modo un compuesto de fórmula (XI)



en donde n es 0, R<sub>8</sub> se describe como anteriormente. En caso de que R<sub>8</sub> sea OAc, el tratamiento con MeONa/MeOH proporciona simultáneamente la hidrólisis del grupo acetoxi C3, obteniendo de ese modo un compuesto de fórmula (XI) en donde R<sub>8</sub> es OH.

La reducción del carbonilo en C7 se puede obtener poniendo en contacto un compuesto de fórmula (X) con NaBH<sub>4</sub> o Ca(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> para obtener una mezcla de beta-OH (hasta 70% en el caso del compuesto BAR501) y alfa-OH en C7. El tratamiento posterior con LiBH<sub>4</sub> reduce, si está presente, la función éster metílico en la cadena lateral a -CH<sub>2</sub>OH y el grupo protector OAc en C3 a OH.

La reducción de carbonilo en C7 se puede obtener poniendo en contacto un compuesto de fórmula (XI) o el compuesto correspondiente que tiene COOH en la cadena lateral, con LiBH<sub>4</sub> obteniendo casi exclusivamente alfa-OH en C7. Simultáneamente el tratamiento con LiBH<sub>4</sub> reduce, si está presente, la función éster metílico en la cadena lateral a -CH<sub>2</sub>OH y el grupo protector OAc en C3 a OH. Sometiendo un compuesto de fórmula (IX) a una reducción de NaBH<sub>4</sub> seguida de tratamiento con LiBH<sub>4</sub>, se produjo la reducción en C7 y en la cadena lateral con desprotección simultánea, en particular desacetilación, en C3, para obtener un compuesto en donde R<sub>1</sub> es alfa-OH, R<sub>2</sub> es = CH-CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> es beta-OH, n = 0,1 y R es CH<sub>2</sub>OH.

Sometiendo el compuesto anterior en donde R<sub>1</sub> es alfa-OH, R<sub>2</sub> es = CH-CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> es beta-OH, n = 0,1 y R es CH<sub>2</sub>OH a una hidrogenación catalítica, preferiblemente con H<sub>2</sub> y Pd(OH)<sub>2</sub>/C, se puede obtener un compuesto de fórmula (I) en donde R<sub>1</sub> es alfa-OH, R<sub>2</sub> es alfa-Et, R<sub>3</sub> es beta-OH, n = 0,1 y R es CH<sub>2</sub>OH.

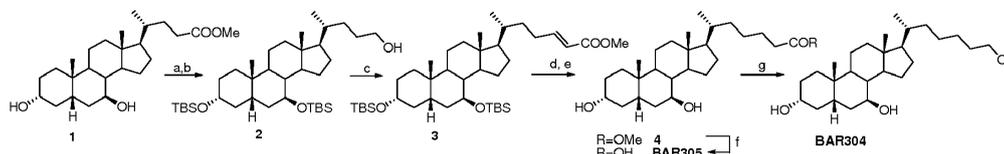
La presente invención se podría comprender mejor a la luz de los ejemplos y la sección experimental a continuación.

### Sección experimental

#### Química

Ejemplo 1. Preparación de compuestos de fórmula (I) en donde R<sub>2</sub>= H (no forma parte de la invención)  
Ejemplo 1A. Síntesis de derivados de bis-*homo*-ursodesoxicicolano

Una secuencia de reacción de cuatro etapas en **1**, que incluye la protección de las funciones alcohólicas en C3 y C7, la reducción del éster metílico de la cadena lateral y la posterior oxidación de Swern de recipiente único/homologación de Wittig C2 proporcionó el éster metílico protegido de  $\Delta^{24,25}$ -bis-homoUDCA. La hidrogenación del doble enlace de la cadena lateral y la desprotección de la función alcohólica proporcionaron éster metílico de bis-homoUDCA **4**, que se utilizó como material de partida en la preparación de BAR305 y su correspondiente alcohol, BAR304, mediante tratamiento con LiOH y LiBH<sub>4</sub>, respectivamente.



10 a) 2,6-lutidina, trifluorometanosulfonato de t-butildimetilsililo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; b) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, rendimiento cuantitativo a lo largo de dos etapas; c) DMSO, cloruro de oxalilo, TEA seco, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C a continuación (trifenilfosforaniliden)acetato de metilo, 76%; d) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C tipo Degussa, THF/MeOH 1:1, rendimiento cuantitativo; e) HCl 37%, MeOH, rendimiento cuantitativo; f) NaOH 5% en MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 v/v, 60%; g) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, 77%.

15 Etapa a, b) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-5 $\beta$ -colan-24-ol (**2**)

El Compuesto **1** (1,2 g, 3 mmoles) se protegió en las dos funciones alcohólicas siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937 para obtener 1,9 g de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo (rendimiento cuantitativo) en forma de agujas incoloras, que se sometió a la siguiente etapa sin ninguna purificación.

25 Se añadieron metanol (850  $\mu$ L, 21 mmoles) y LiBH<sub>4</sub> (10,5 mL, 2 M en THF, 21 mmoles) a una solución de éster metílico (1,9 g, 3 mmoles) en THF seco (30 mL) a 0°C siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937. La purificación por medio de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 99:1 y TEA al 0,5%) proporcionó **2** en forma de un sólido de color blanco (1,8 g, rendimiento cuantitativo).

Etapa c) Preparación en recipiente único de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-25,26-bishomo-5 $\beta$ -col-24-en-26-oato de metilo (**3**).

30 Se añadió DMSO (2,1 mL, 30 mmoles) gota a gota durante 15 minutos a una solución de cloruro de oxalilo (7,5 mL, 15 mmoles) en diclorometano seco (30 mL) a -78°C en atmósfera de argón. Después de 30 minutos, se añadió mediante una cánula una solución de **2** (1,8 g, 3 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco y la mezcla se agitó a -78°C durante 30 min. Se añadió Et<sub>3</sub>N (2,5 mL, 18 mmoles) gota a gota. Después de 1 h, se añadió (trifenilfosforaniliden)- acetato de metilo (2,0 g, 6 mmoles) y la mezcla se dejó calentando a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de NaCl y la fase acuosa se extrajo con éter dietílico (3x100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación por medio de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 95:5 y TEA al 0,5%) proporcionó el compuesto **3** en forma de un aceite incoloro (1,5 g, 76%).

40 Etapa d) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-26-oato de metilo. Una solución del compuesto **3** (1,5 g, 2,3 mmoles) en THF seco/MeOH seco (25 mL/25 mL, v/v) se hidrogenó en presencia de Pd(OH)<sub>2</sub> al 5% peso en carbón activado tipo Degussa (20 mg) siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937 proporcionando 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-26-oato de metilo (1,5 g, rendimiento cuantitativo) que se sometió a la etapa e) sin purificación.

45 Etapa e) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-26-oato de metilo (**4**)

Se disolvió 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(*tert*-butildimetilsililoxi)-25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-26-oato de metilo (1,5 g) en metanol (70 mL). A la solución, se le añadió HCl (2 mL, 37% v/v) siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937 proporcionando **4** en forma de un sólido amorfo incoloro (1,0 g, rendimiento cuantitativo).

50 Etapa f) Preparación de ácido 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-26-oico (BAR305). Una porción de compuesto **4** (430 mg, 1 mmol) se hidrolizó con NaOH (400 mg, 10 mmoles) en una solución de MeOH: H<sub>2</sub>O 1:1 v/v (20 mL) durante 4 h a reflujo. Una muestra analítica se purificó por medio de HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5  $\mu$ m; 4,6 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5) como eluyente (velocidad de flujo 1 mL/min) (t<sub>R</sub>= 5 min).

**BAR305:** C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>

El RMN <sup>1</sup>H se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,47 (2H, m, H-3 y H-7), 2,27 (2H, t, J = 7,2 Hz, H<sub>2</sub>-25), 0,96 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,94 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

60 El RMN <sup>13</sup>C se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  178,2, 72,1, 71,9, 57,6,

56,7, 44,8, 44,5, 44,0, 41,6, 40,7, 38,6, 38,0, 36,9, 36,8, 36,1, 35,3, 35,2, 30,9, 29,8, 27,9, 26,7, 26,6, 23,9, 22,4, 19,3, 12,7.

Etapa g) 25,26-bishomo-5 $\beta$ -colan-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,26-triol (BAR304). El Compuesto **4** (500 mg, 1.2 mmoles) se redujo en las mismas condiciones operativa descritas en la etapa b). La purificación por medio de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/metanol 9:1) proporcionó BAR304 en forma de un aceite incoloro (375 mg, 77%). Una muestra analítica se purificó por medio de HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5  $\mu$ m; 4,6 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15) como eluyente (velocidad de flujo 1 mL/min) (tR = 9 min).

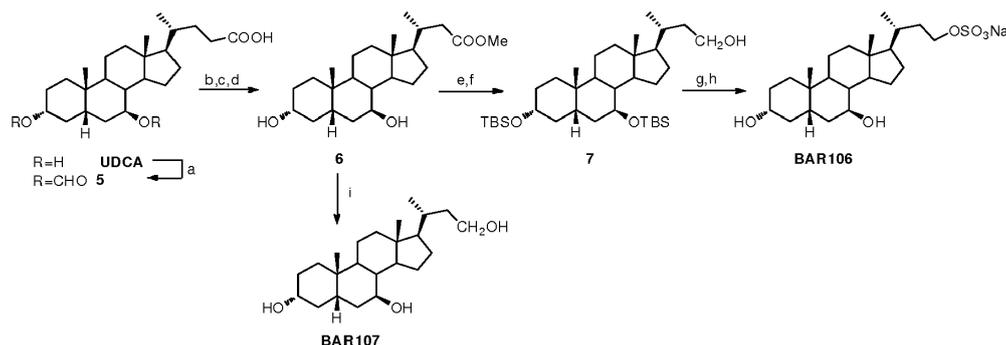
BAR 304: C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,53 (2H, t, *J* = 6,5 Hz, H<sub>2</sub>-26), 3,48 (2H, m, H-3 y H-7), 0,95 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,93 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  72,1, 71,9, 63,0, 57,5, 56,7, 44,7, 44,4, 44,0, 41,6, 40,7, 38,5, 37,9, 37,2, 37,0, 36,1, 35,2, 33,7, 30,9, 29,8, 27,9, 27,4, 27,1, 23,9, 22,4, 19,4, 12,7.

Ejemplo 1B. Síntesis de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-il-23-sulfato de sodio (BAR106) y 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-ol (BAR107)

Se preparó BAR106 a partir de UDCA mediante una secuencia de reacción que comprendía la performilación en los grupos hidroxilo, la degradación de un carbono de Beckmann en C24 y la transformación del grupo carboxilo C23 en el correspondiente intermedio éster metílico. La protección en los grupos hidroxilo en C-3 y C-7 como silil éteres, la reducción a éster metílico en C23, la sulfatación en la función alcohólica primaria en C23 y finalmente la desprotección proporcionaron BAR106 bruto en forma de una sal de amonio. La purificación en Amberlite y a continuación por medio de HPLC proporcionó el BAR106 del título en forma de una sal de sodio.



a) HCOOH, HClO<sub>4</sub>, 96%; b) TFA, anhídrido trifluoroacético, NaNO<sub>2</sub>, 96%; c) KOH 30% en MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 v/v, 97%; d) p-TsOH, MeOH seco, 98%; e) 2,6-lutidina, trifluorometanosulfonato de t-butildimetilsililo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 88%; f) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, rendimiento cuantitativo; g) Et<sub>3</sub>N·SO<sub>3</sub>, DMF, 95°C; h) HCl 37%, MeOH, a continuación Amberlite CG-120, MeOH, 86% a lo largo de dos etapas; i) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, rendimiento cuantitativo.

Etapas a, d) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-oato de metilo (**6**).

El ácido ursodesoxicólico (2,0 g, 5,1 mmoles) se transformó en 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-oato de metilo (**6**, 1,6 g, 87%) siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937.

Etapas e) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(terc-butildimetilsililoxi)-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo

El Compuesto **6** (1,2 g, 3,0 mmoles) se protegió en los grupos hidroxilo en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa a). La purificación por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando hexano/acetato de etilo 9:1 y trietilamina al 0,5% como eluyente, proporcionó éster metílico protegido (1,6 g, 88%).

Etapas f) Preparación de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -di(terc-butildimetilsililoxi)-5 $\beta$ -colan-24-ol (**7**)

El éster metílico de cadena lateral (818 mg, 1,3 mmoles) se redujo en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa b). La purificación por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando hexano/acetato de etilo 98:2 y trietilamina al 0,5% como eluyente, proporcionó **7** (770 mg, rendimiento cuantitativo).

Etapas g, h) Preparación de sulfato de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colan-23-il-23-sodio (BAR106)

El complejo de trietilamina-trióxido de azufre (2,0 g, 11 mmoles) se añadió a una solución de **7** (660 mg, 1,1 mmoles) en DMF seco (25 mL) siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en J. Med. Chem. 2014, 57, 937. La HPLC

en Nucleodur 100-5 C18 (5 µm; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35) como eluyente (velocidad de flujo 3 mL/min), proporcionó 442 mg (86% a lo largo de dos etapas) de BAR106 (*t<sub>R</sub>* = 8,4 min).

**BAR 106:** C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>6</sub>S

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 4,04 (2H, m, H<sub>2</sub>-23), 3,48 (2H, m, H-3 y H-7), 1,00 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,97 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,72 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

Etapas i) Preparación de 3α,7β-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BAR107)

El Compuesto **6** se transformó en BAR107 en las mismas condiciones operativas descritas en la etapa f.

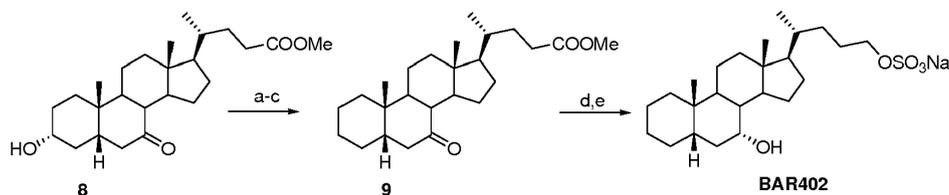
**BAR107:** C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 3,60 (1H, m, H-7), 3,51 (1H, m, H-3), 3,50 (2H, m, H<sub>2</sub>-23), 0,97 (3H, d, ovl, H<sub>3</sub>-21), 0,96 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,72 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 72,1, 71,9, 60,8, 57,5, 57,1, 44,8, 44,5, 44,0, 41,6, 40,7, 39,9, 38,6, 38,0, 36,1, 35,2, 34,1, 31,0, 29,8, 27,9, 23,9, 22,4, 19,5, 12,6;

Ejemplo 1C. Síntesis de sulfato de 7α-hidroxi-5β-colan-24-il-24-sodio (BAR402)

La tosilación y eliminación en el grupo hidroxilo C-3 en el éster metílico **8** seguido de reducción del doble enlace, posterior tratamiento con LiBH<sub>4</sub> y sulfatación regioselectiva en el grupo hidroxilo primario C-24 proporcionaron BAR402.



a) p-TsCl, piridina, rendimiento cuantitativo; b) LiBr, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, reflujo, c) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, THF/MeOH 1:1, temperatura ambiente, rendimiento cuantitativo; d) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, 79°C; e) Et<sub>3</sub>N·SO<sub>3</sub>, DMS, 95°C.

Etapas a-c) Preparación de 7-ceto-5β-colan-24-oato de metilo (**9**)

A una solución de **8** (965 mg, 2,5 mmoles) en piridina seca (100 mL), se le añadió cloruro de tosilo (4,7 g, 25,0 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se vertió en agua fría (150 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 150 mL). La capa orgánica combinada se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (150 mL) y agua (150 mL), y a continuación se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a vacío para proporcionar 1,4 g de 3α-tosiloxi-7-ceto-5β-colan-24-oato de metilo (rendimiento cuantitativo). Se añadieron bromuro de litio (434 mg, 5,0 mmoles) y carbonato de litio (370 mg, 5,0 mmoles) a una solución de 3α-tosiloxi-7-ceto-5β-colan-24-oato (1,4 g, 2,5 mmoles) en DMF seco (30 mL), y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se vertió lentamente en una solución de HCl al 10% (20 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). La capa orgánica combinada se lavó sucesivamente con agua, solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua, y a continuación se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó hasta sequedad para proporcionar 965 mg de residuo oleoso (rendimiento cuantitativo), que se sometió a la siguiente etapa sin ninguna purificación. La hidrogenación en Pd(OH)<sub>2</sub> en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa d, proporcionó 975 mg de **9** (rendimiento cuantitativo), que se sometió a la siguiente etapa sin ninguna purificación.

Etapas d) Preparación de 5β-colan-7α, 24-diol

Tratamiento con LiBH<sub>4</sub> en el compuesto **9** en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa b y la purificación por medio de gel de sílice (acetato de etilo-hexano, 85:15) proporcionó 5β-colan-7α, 24-diol en forma de un sólido de color blanco (714 mg, 79%).

Etapas e) Preparación de sulfato de 7α-hidroxi-5β-colan-24-il-24-sodio (BAR402). La sulfatación en C24 se realizó en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1B, etapa g) para proporcionar BAR402 bruto en forma de una sal de amonio. RP18/HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5 µm; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10) como eluyente (velocidad de flujo 3 mL/min) proporcionó BAR402 (*t<sub>R</sub>* = 6,6 min) en forma de una sal de sodio.

**BAR402:** C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>NaO<sub>5</sub>S

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 3,96 (2H, t, J = 6,6 Hz, H<sub>2</sub>-24), 3,78 (1H, br s, H-7), 0,96 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,92 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,69 (3H, s, H<sub>3</sub>-18);

El RMN  $C^{13}$  se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando  $CD_3OD$  como disolvente:  $\delta$  69,7, 69,4, 57,7, 51,6, 45,0, 43,8, 41,2, 41,0, 39,0, 37,1, 37,0, 36,3, 34,2, 33,3, 31,7, 29,5, 29,0, 27,3, 24,8, 24,3, 22,7, 21,9, 19,2, 12,3

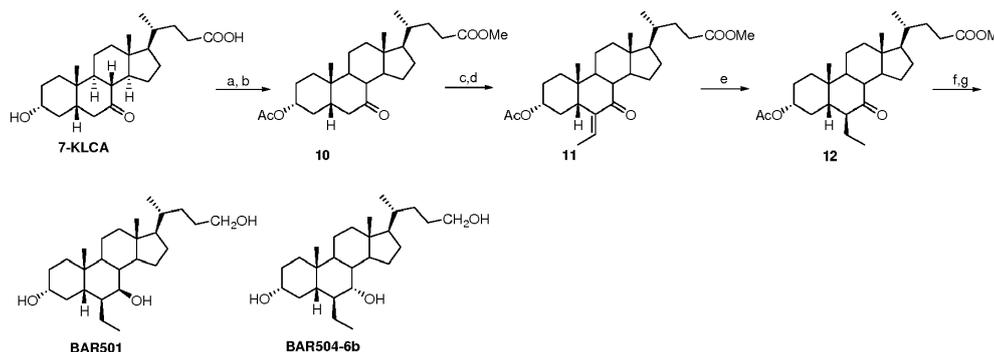
*Ejemplo 2. Preparación de compuestos de fórmula (I) en donde  $R_2 = Et$  o  $=CH-CH_3$*

5

Ejemplo 2A. Síntesis de 6 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-ol (BAR501)

10

La formación de éster metílico y la acetilación en el grupo hidroxilo C-3 en 7-KLCA facilitaron el compuesto intermedio a un 84% de rendimiento en dos etapas. La adición aldólica a un intermedio de silil enol éter generó **11** que se hidrogenó en el doble enlace exocíclico ( $H_2$  en  $Pd(OH)_2$ ) proporcionando **12** a un 80% de rendimiento en tres etapas. El tratamiento con  $NaBH_4$  en metanol seguido de la reducción con  $LiBH_4$  en el producto de reacción bruto proporcionaron una mezcla cuya purificación por HPLC (88%  $MeOH:H_2O$ ) proporcionó BAR501 puro con un rendimiento de 79% con respecto a su epímero C7, BAR504-6b.



15

a) p-TsOH,  $MeOH$  seco; b) anhídrido acético, piridina, rendimiento 84% a lo largo de dos etapas; c) DIPA, n-BuLi, TMSCl, TEA seco, THF seco  $-78^\circ C$ ; d) acetaldehído,  $BF_3(OEt)_2$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $-60^\circ C$ , 80% a lo largo de dos etapas.

20 Etapas a-d). Preparación de 3 $\alpha$ -acetoxi-6-etilideno-7-ceto-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo (**11**)

25

A una solución de ácido 7-cetolitolicólico (5 g, 12,8 mmoles), disuelto en 100 mL de metanol seco, se le añadió ácido p-toluenosulfónico (11 g, 64,1 mmoles). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se inactivó mediante la adición de una solución saturada de  $NaHCO_3$ . Después de la evaporación del metanol, el residuo se extrajo con  $EtOAc$  (3x150 mL). El extracto combinado se lavó con salmuera, se secó con  $Na_2SO_4$ , y se evaporó para proporcionar el éster metílico en forma de un sólido amorfo (5,13 g, rendimiento cuantitativo).

30

En la solución del éster metílico (5,13 g, 12,7 mmoles) en piridina seca (100 mL), se añadió un exceso de anhídrido acético (8,4 mL, 89 mmoles). Cuando se completó la reacción, la piridina se concentró a vacío. El residuo se vertió en agua fría (100 mL) y se extrajo con  $AcOEt$  (3 x 150 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ( $Na_2SO_4$ ) y se concentraron para proporcionar un residuo que se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando hexano/acetato de etilo 8:2 y tiretilamina al 0,5% como eluyente (4,8 g de **10** en forma de un sólido de color blanco, 84% de rendimiento a lo largo de dos etapas).

35

A una solución de diisopropilamina (23 mL, 0,16 moles) en THF seco (50 mL) se le añadió gota a gota una solución de n-butil litio (60 mL, 2,5 M en hexano, 0,15 moles) a  $-78^\circ C$ . Después de 30 minutos, se añadió trimetilclorosilano (27,1 mL, 0,21 moles). Después de 30 minutos adicionales, se añadió una solución de compuesto **10** (4,8 g, 10,7 mmoles) en THF seco (70 mL). La reacción se agitó a  $-78^\circ C$  durante 45 minutos adicionales y a continuación se añadió trietilamina (54 mL, 0,38 moles). Después de 1 h, la mezcla de reacción se dejó calentar a  $-20^\circ C$ , se trató con solución acuosa saturada de  $NaHCO_3$  (100 mL) y se llevó a temperatura ambiente en 2 h. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron a continuación con solución saturada de  $NaHCO_3$ , agua y salmuera. Después de secar sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, el residuo se evaporó a vacío para proporcionar 6 g de residuo de color amarillo, que se diluyó en  $CH_2Cl_2$  seco (50 mL) y se enfrió a  $-78^\circ C$ . En esta solución agitada, se le añadieron gota a gota acetaldehído (3 mL, 53 mmoles) y  $BF_3 \cdot OEt_2$  (13,5 mL, 0,107 moles). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a  $-60^\circ C$  y se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla se sofocó con una solución acuosa saturada de  $NaHCO_3$  y se extrajo con  $CH_2Cl_2$ . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  anhidro y concentraron a vacío.

40

La purificación por medio de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 9:1 y TEA al 0,5%) proporcionó el compuesto **11** (4,1 g, 80%). El análisis de RMN demostró una razón diastereomérica E/Z > 95%. La configuración E en el doble enlace exocíclico se estableció mediante el acoplamiento dipolar  $H_3-26$  ( $\delta$  1,67)/ $H-5$  ( $\delta$  2,62) en espectro Noesy (400 MHz, tiempo de mezcla 400 ms).

50

## ES 2 768 718 T3

(E)-3 $\alpha$ -acetoxi-6-etiliden-7-ceto-5 $\beta$ -colan-24-oato (11): C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente:  $\delta$  6,16 (1H, q,  $J$  = 7,0 Hz, H-25), 4,74 (1H, m, H-3), 3,64 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2,62 (1H, dd,  $J$  = 13,0, 3,6 Hz, H-5), 1,98 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1,67 (3H, d,  $J$  = 7,0 Hz, H<sub>3</sub>-26), 1,00 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,92 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,67 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente:  $\delta$  204,5, 174,6, 170,7, 143,1, 130,2, 72,5, 54,5, 51,4, 50,7, 48,6, 45,2, 43,5, 39,1, 38,9, 35,1, 34,9, 34,1, 33,4, 31,0, 30,9, 28,4, 25,9 (2C), 22,8, 21,4, 21,2, 18,4, 12,7, 12,2.

Etapas e) Preparación de 3 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -etil-7-ceto-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo (12).

Una solución de **11** (4,0 g, 8,5 mmoles) en THF seco/MeOH seco (100 mL, 1:1 v/v) se hidrogenó en presencia de Pd(OH)<sub>2</sub> al 20% en peso sobre carbón activado (100 mg) tipo Degussa. La mezcla se transfirió a un aparato PARR convencional y se lavó con nitrógeno y a continuación con hidrógeno varias veces. El aparato fue sacudido bajo 344,738 Pa (50 psi) de H<sub>2</sub>. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h.

El catalizador se filtró a través de Celite, y el producto filtrado recuperado se concentró a vacío para proporcionar **12** (4,0 g, rendimiento cuantitativo).

3 $\alpha$ -Acetoxi-6 $\beta$ -etil-7-ceto-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo (12): C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  4,65 (1H, m, H-3), 3,66 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2,56 (1H, t,  $J$  = 11,5 Hz, H-8), 2,35 (1H, m, H-23a), 2,22 (1H, m, H-23b), 1,99 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1,22 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,92 (3H, d,  $J$  = 6,3 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,83 (3H, t,  $J$  = 7,2 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,67 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  214,7, 174,3, 170,2, 72,6, 61,7, 54,8, 51,3, 49,0, 48,5, 45,3, 42,7, 42,3 (2C), 38,6, 35,4, 35,1, 35,0, 31,0, 30,8, 28,0 (2C), 26,4, 25,7, 24,7, 21,3, 21,1, 18,2, 12,9, 11,9. La configuración  $\beta$  del grupo etilo en C-6 se determinó mediante acoplamiento dipolares H<sub>3</sub>-26 ( $\delta$  0,83)/H<sub>3</sub>-19 ( $\delta$  1,22) y H-8 ( $\delta$  2,56)/H-25 ( $\delta$  1,83) en espectro Noesy (400 MHz, tiempo de mezcla 400 ms).

Etapas f, g) Preparación de 6 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-ol (BAR501).

A una solución en metanol del compuesto **12** (1,18 g, 2,5 mmoles), se le añadió un gran exceso de NaBH<sub>4</sub> a 0°C. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se añadieron gota a gota agua y MeOH durante un período de 15 minutos a 0°C, observándose efervescencia. Después de la evaporación de los disolventes, el residuo se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt (3x50 mL). El extracto combinado se lavó con salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó para proporcionar 1,3 g de un residuo bruto que se sometió a la siguiente etapa sin purificación adicional. El residuo bruto se trató con LiBH<sub>4</sub> (2 M en THF) en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa b). La purificación por HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5  $\mu$ m; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (88:12) como eluyente (velocidad de flujo 3 mL/min), proporcionó 802 mg de BAR501 (79%, t<sub>R</sub> = 11 min).

Alternativamente, la etapa f se realizó con Ca(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, producido in situ.

A una solución de compuesto **12** (500 mg, 1,05 mmoles) y etanol absoluto (4 mL), a 0°C, se le añadió CaCl<sub>2</sub> (466 mg, 4,2 mmoles). A la misma solución se le añadió una solución de NaBH<sub>4</sub> (159 mg, 4,2 mmoles) en etanol absoluto (4 mL). Después de 4 h a -5°C, se añadió MeOH gota a gota. A continuación, después de la evaporación de los solventes, el residuo se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt (3x50 mL). El extracto combinado se lavó con salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó para proporcionar 500 mg de un residuo bruto que se sometió a la etapa g sin purificación adicional.

**BAR501:** C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova 700 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,74 (1H, dd,  $J$  = 10,3, 6,0 Hz, H-7), 3,51 (1H, ovl, H-3), 3,49 (2H, ovl, H<sub>2</sub>-24), 1,00 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,97 (3H, d,  $J$  = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,96 (3H, t,  $J$  = 7,6 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,72 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova 175 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  75,3 71,9, 63,6, 57,5, 56,5, 51,6, 45,7, 44,9, 42,1, 41,5, 40,4, 40,3, 37,1, 35,8, 32,4, 30,7, 30,3, 29,7, 29,6, 28,3, 26,2, 23,4, 22,1, 19,4, 14,8, 12,7.

Ejemplo 2B. Preparación de 6 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-ol (BAR504-6b)

Se preparó BAR504-6b como se describe en el Ejemplo 2A ( $t_R = 20,4$  min).

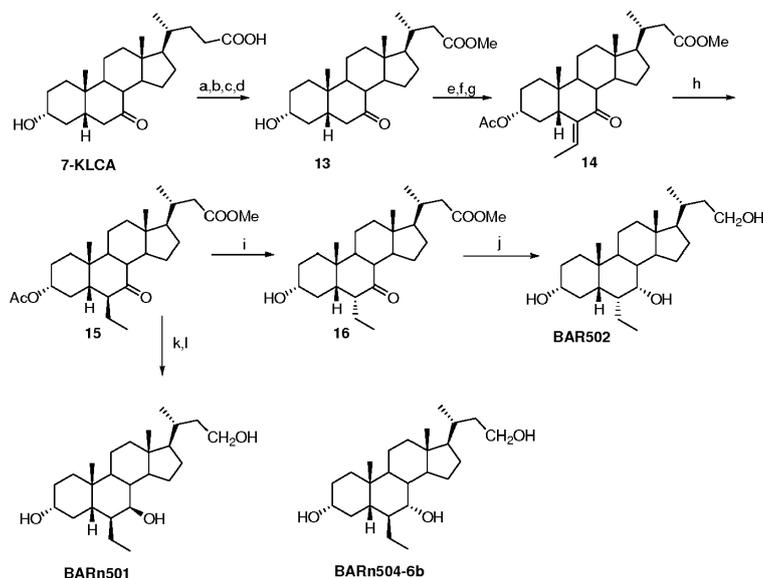
**BAR504-6b:**  $C_{26}H_{46}O_3$

5 El RMN  $H^1$  se registró en Varian Inova 700 MHz, utilizando  $CD_3OD$  como disolvente:  $\delta$  3,60 (1H, s, H-7), 3,51 (2H, m, H<sub>2</sub>-24), 3,35 (1H, ovl, H-3), 2,30 (1H, q,  $J = 13,5$  Hz, H-4a), 0,97 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,95 (3H, t,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,94 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

10 El RMN  $C^{13}$  se registró en Varian Inova 175 MHz, utilizando  $CD_3OD$  como disolvente:  $\delta$  71,9, 71,8, 62,7, 56,8, 51,7, 50,5, 46,7, 42,5, 41,4, 40,1, 36,6, 36,4, 36,2, 36,0, 33,2, 32,4, 30,1, 29,5, 28,8, 28,5, 25,3, 23,9, 20,7, 18,4, 13,7, 11,4.

15 Ejemplo 2C. Síntesis de 6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-ol (BAR502), 6 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-ol (BARn501- no forma parte de la invención) y 6 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-24-*ni*-5 $\beta$ -colan-23-ol (BARn504-6b)

15 Se sometió 7-KLCA (1 g, 2,56 mmoles) a degradación de Beckmann en C24 y metilación en C-23 facilitando **13** con un rendimiento de 66%. La acetilación en C-3 y alquilación proporcionaron **14** que se hidrogenó proporcionando **15**. El tratamiento con MeONa/MeOH proporcionó la hidrólisis concomitante en C-3 y la epimerización en C-6. La reducción simultánea en la función éster metílico de C-23 y en el grupo carbonilo C-7 proporcionó BAR502 con un rendimiento de 89%. El intermedio **15** (250 mg, 0,54 mmoles) también se utilizó como material de partida en la preparación de BARn501 y BARn504-6b.



25 a)  $HCOOH$ ,  $HClO_4$ ; b) TFA, anhídrido trifluoroacético,  $NaNO_2$ ; c)  $KOH$  30% en  $MeOH/H_2O$  1:1 v/v, 88% a lo largo de tres etapas; d)  $p-TsOH$ ,  $MeOH$  seco; e) anhídrido acético, piridina; f) DIPA,  $n-BuLi$ ,  $TMSCl$ , TEA seco, THF seco  $-78^\circ C$ ; g) acetaldehído,  $BF_3(OEt)_2$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $-60^\circ C$ , 60% a lo largo de cuatro etapas; h)  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2$ , THF/MeOH 1:1, rendimiento cuantitativo; i) MeONa, MeOH; j)  $LiBH_4$ , MeOH, THF seco,  $0^\circ C$ , 77% a lo largo de dos etapas.

30 Etapas a-d) Preparación de 7-ceto-24-*nor*-LCA de metilo (**13**)

30 El Compuesto **13** (660 mg, 1,69 mmoles, 66% a lo largo de cuatro etapas) se preparó a partir de 7-KLCA en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1B, etapas a-d).

35 Etapas e-h) Preparación de 3 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -etil-7-ceto-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-oato de metilo (**15**). El Compuesto **13** (660 mg, 1,69 mmoles) se sometió a las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapas b-d para obtener 603 mg de **14** (78% a lo largo de tres etapas). El análisis de RMN demostró una razón diastereomérica E/Z > 95%. La configuración E en el doble enlace exocíclico se estableció mediante el acoplamiento dipolar H<sub>3</sub>-25 ( $\delta$  1,67)/H-5 ( $\delta$  2,61) en espectro Noesy (400 MHz, tiempo de mezcla 400 ms).

40 (E)-3 $\alpha$ -acetoxi-6-etiliden-7-ceto-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-oato (**14**):  $C_{28}H_{42}O_5$  El RMN  $H^1$  se registró en Varian Inova 400 MHz, utilizando  $CDCl_3$  como disolvente:  $\delta$  6,17 (1H, q,  $J = 7,2$  Hz, H-24), 4,75 (1H, m, H-3), 3,64 (3H, s,  $COOCH_3$ ), 2,61 (1H, dd,  $J = 13,1, 4,0$  Hz, H-5), 1,98 (3H, s,  $COCH_3$ ), 1,67 (3H, d,  $J = 7,2$  Hz, H<sub>3</sub>-25), 1,00 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,97 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,67 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente: δ 204,5, 174,2, 170,5, 143,0, 130,6, 72,5, 54,7, 51,4, 50,7, 48,6, 45,3, 43,7, 41,5, 39,1, 38,8, 34,6, 34,2, 33,6, 33,4, 28,5, 25,9 (2C), 22,8, 21,3 (2C), 19,7, 12,7, 12,1. La hidrogenación en Pd (OH)<sub>2</sub> en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapa e, proporcionó 600 mg de **15** (rendimiento cuantitativo).

La configuración β del grupo etilo en C-6 se determinó mediante acoplamiento dipolares H<sub>3</sub>-25 (δ 0,83)/H<sub>3</sub>-19 (δ 1,22) en espectro Noesy (400 MHz, tiempo de mezcla 400 ms).

3α-acetoxi-6β-etil-7-ceto-24-nor-5β-colan-23-oato (**15**): C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente: δ 4,65 (1H, m, H-3), 3,67 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2,60 (1H, t, J = 11,2 Hz, H-8), 2,43 (1H, dd, J = 14,2, 2,6 Hz, H-22a), 1,98 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1,88 (1H, m ovl, H-6), 1,22 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,98 (3H, d, J = 6,4 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,83 (3H, t, J = 7,0 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente: δ 215,3, 174,0, 170,5, 72,8, 61,9, 55,0, 51,4, 49,2, 48,7, 45,5, 42,9, 42,6, 41,4, 38,7 (2C), 35,6, 35,3, 34,9, 28,3 (2C), 26,5, 25,9, 24,8, 21,4, 21,3, 19,6, 13,0, 12,1.

Etapas i, j) Preparación de 6α-etil-3α,7α-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BAR502)

A una solución de compuesto **15** (450 mg, 1,0 mmoles) y metanol seco (4 mL), se le añadió MeONa (20 mL, 0,5 M en MeOH, 10 mmoles). Después de 24 h, se añadió gota a gota H<sub>2</sub>O. A continuación, después de la evaporación de los solventes, el residuo se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt (3x50 mL). El extracto combinado se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó para proporcionar **16** que se sometió a la etapa g sin más purificación.

6α-Etil-3α-hidroxi-7-ceto-24-nor-5β-colan-23-oato de metilo (**16**): C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente: δ 3,64 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3,45 (1H, m, H-3), 2,83 (1H, q, J = 7,3 Hz, H-6), 2,51 (1H, t, J = 11,2 Hz, H-8), 2,45 (1H, dd, J = 14,5, 3,2 Hz, H-22a), 1,26 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,98 (3H, d, J = 6,6 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,81 (3H, t, J = 7,0 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,73 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente: δ 214,9, 175,4, 71,6, 56,2, 53,2, 52,0, 51,9, 51,0, 50,5, 45,2, 43,8, 42,2, 40,2, 36,7, 35,3, 34,8, 32,5, 30,5, 29,4, 25,6, 24,0, 22,9, 20,1, 20,0, 12,6, 12,4.

El Compuesto **16** se sometió a reducción con LiBH<sub>4</sub> en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 1A, etapa g. La cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano/EtOAc 6:4 proporcionó BAR502 (274 mg, 70% en dos etapas). Se obtuvo una muestra analítica por HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; 4,6 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (88:12) como eluyente (velocidad de flujo 1 ml/min, t<sub>R</sub> = 10,8 min).

**BAR502**: C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 3,65 (1H, s, H-7), 3,61 (1H, m, H-23a), 3,53 (1H, m, H-23b), 3,31 (1H, m, H-3), 0,97 (3H, d, J = 6,6 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,92 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,91 (3H, t, J = 7,0 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN-C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 73,2, 71,1, 60,7, 57,7, 51,4, 46,9, 43,8, 42,9, 41,3, 40,9, 39,8, 36,7, 36,5, 34,6, 34,5, 34,2, 31,2, 29,4, 24,5, 23,7, 23,4, 21,8, 19,3, 12,1, 11,9.

Etapas k, l). Preparación de 6β-etil-3α,7β-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BARn501) y 6β-etil-3α,7α-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BARn504-6b). El Compuesto 15 (100 mg, 0,22 mmoles) se sometió a las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapas f-g. La purificación por HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (86:14) como eluyente (velocidad de flujo 3 ml/min), proporcionó 47 mg de BARn501 (54%, t<sub>R</sub> = 11 min) y 20 mg de BARn504-6b (23%, t<sub>R</sub> = 15 min).

**BARn501**: C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 3,73 (1H, dd, J = 10,5, 5,5 Hz, H-7), 3,61 (1H, m, H-23a), 3,51 (1H, m, ovl, H-23b), 3,51 (1H, m, ovl, H-3), 0,98 (3H, d, ovl, H<sub>3</sub>-21), 0,97 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,96 (3H, t, ovl, H<sub>3</sub>-25), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 75,2, 71,8, 60,8, 57,5, 56,6, 51,5, 45,5, 44,8, 42,0, 41,4, 40,7, 40,3, 39,9, 36,9, 36,0, 34,2, 30,5, 29,6, 28,3, 26,2, 23,4, 22,0, 19,4, 14,7,

12,9.

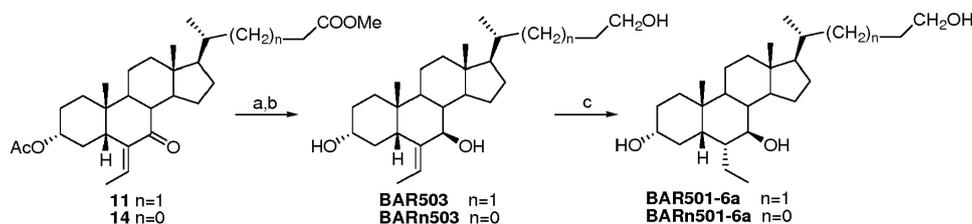
**BARn504-6b:** C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>

5 El RMN <sup>1</sup>H se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 3,63 (1H, m, H-23a), 3,60 (1H, m, H-7), 3,55 (1H, m, H-23b), 3,37 (1H, m, H-3), 2,30 (1H, q, J = 12,5 Hz, H-4a), 0,97 (3H, d, J = 6,6 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,95 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,95 (3H, t, J = 7,0 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,72 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

10 El RMN <sup>13</sup>C se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 72,8, 72,7, 60,8, 57,9, 52,7, 51,4, 47,5, 43,7, 42,3, 41,0, 39,9, 37,5, 37,3, 36,7, 34,2, 33,3, 31,0, 29,6, 29,4, 26,2, 24,8, 21,6, 19,3, 14,5, 12,1.

15 Ejemplo 2D. Síntesis de 6-etiliden-3α,7β-dihidroxi-5β-colan-24-ol (BAR503), 6α-etil-3α,7β-dihidroxi-5β-colan-24-ol (BAR501-6a - no forma parte de la invención), 6-etiliden-3α,7β-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BARn503 - no forma parte de la invención) y 6α-etil-3α,7β-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BARn501-6a - no forma parte de la invención)

El intermedio **11** se sometió a reducción con NaBH<sub>4</sub> seguida de tratamiento con LiBH<sub>4</sub>. Alternativamente, se llevó a cabo de manera directa el tratamiento con LiAlH<sub>4</sub>, lo que permitió la reducción concomitante en C-24 y C-7. BAR503 también se utilizó como material de partida para BAR501-6a por hidrogenación sobre catalizador Pd(OH)<sub>2</sub>. El mismo protocolo sintético se realizó en el intermedio **14** produciendo los derivados en la posición 23 correspondientes, BARn503 y BARn501-6a.



25 a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH; b) LiBH<sub>4</sub>, MeOH seco, THF, 0°C, 85% a lo largo de dos etapas; c) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, THF:MeOH 1:1 v/v.

Etapas a, b). Preparación de 6-etiliden-3α,7β-dihidroxi-5β-colan-24-ol (BAR503) y 6-etiliden-3α,7β-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol (BARn503).

30 El Compuesto **11** (1 g, 2,11 mmoles) se sometió a las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapas f, g. La purificación por HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (88:12) como eluyente (velocidad de flujo de 3 ml/min), proporcionó 727 mg de BAR503 (85% en dos etapas, t<sub>R</sub> = 9,2 min). Alternativamente, el tratamiento con LiAlH<sub>4</sub> en **11** proporcionó BAR503.

**BAR503:** C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>

40 El RMN <sup>1</sup>H se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 5,66 (1H, q, J = 6,9 Hz, H-25), 3,90 (1H, d, J = 9,8 Hz, H-7), 3,55 (1H, m, H-3), 3,50 (2H, m, H<sub>2</sub>-24), 2,50 (1H, dd, J = 4,0, 13,1 Hz, H-5), 1,62 (3H, d, J = 6,9 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,97 (3H, d, J = 6,8 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,81 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

El RMN <sup>13</sup>C se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 142,7, 114,5, 73,4, 71,1, 63,6, 57,1, 56,1, 45,2, 44,9, 44,2, 40,7, 40,2, 36,3, 36,2, 35,9, 34,7, 32,4, 30,2, 29,5, 28,8, 27,4, 22,6, 21,5, 18,5, 11,8, 11,7.

45 El mismo protocolo sintético se realizó con el intermedio 14. La purificación por HPLC en un Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; 10 mm d.i. x 250 mm) con MeOH/H<sub>2</sub>O (86:14) como eluyente (velocidad de flujo 3 ml/min), proporcionó BARn503 (t<sub>R</sub> = 8 min).

**BARn503:** C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>

50 El RMN <sup>1</sup>H se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 5,66 (1H, q, J = 6,8 Hz, H-24), 3,92 (1H, d, J = 9,9 Hz, H-7), 3,60 (1H, m, H-23a), 3,56 (1H, m, H-3), 3,55 (1H, m, H-23b), 2,52 (1H, dd, J = 3,7, 13,2 Hz, H-5), 1,63 (3H, d, J = 6,8 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,98 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,95 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

55 El RMN <sup>13</sup>C se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente: δ 143,7, 115,4, 74,1, 71,8, 60,8, 58,0, 57,1, 46,1, 45,9, 45,1, 41,6, 41,1, 39,9, 37,0, 36,4, 35,8, 34,1, 30,9, 29,8, 28,1, 23,5, 22,5, 19,5, 12,7, 12,6.

Etapa c). Preparación de 6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-ol (BAR501-6a) y 6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-ol (BARn501-6a) Se sometió BAR503 (350 mg, 0,86 mmoles) a las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapa e, obteniendo BAR501-6a con rendimiento cuantitativo.

5 **BAR501-6a:** C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,50 (2H, t, *J* = 6,8 Hz, H<sub>3</sub>-24), 3,44 (1H, m, H-3), 3,07 (1H, t, *J* = 9,8 Hz, H-7), 0,96 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,95 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,86 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

10 El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  76,5, 72,3, 63,6, 57,9, 57,3, 46,3, 45,0, 44,8, 41,8, 41,0, 39,9, 37,0, 36,4, 35,5, 33,3, 31,3, 31,0, 30,3, 29,8, 27,8, 24,3, 22,5, 22,0, 19,3, 12,8, 11,8.

15 Se sometió BARn503 a las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapa e, obteniendo BARn501-6a con rendimiento cuantitativo.

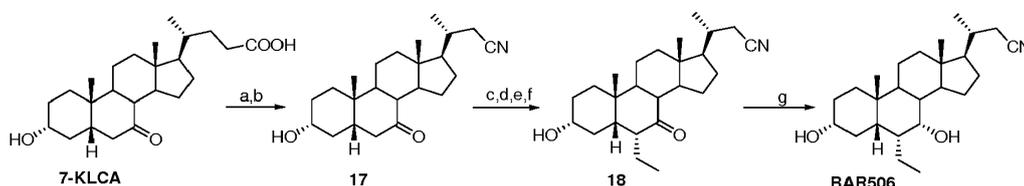
**BARn501-6a:** C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>

20 El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,62 (1H, m, H-23a), 3,54 (1H, m, H-23b), 3,45 (1H, m, H-3), 3,08 (1H, t, *J* = 9,8 Hz, H-7), 0,97 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,95 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,86 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,73 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

25 El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova a 100 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  76,4, 72,5, 60,8, 57,9, 57,2, 46,2, 45,1, 44,7, 41,8, 41,2, 40,0, 39,8, 36,5, 35,6, 34,2, 31,2, 30,9, 29,9, 27,9, 24,1, 22,7, 22,0, 19,5, 12,7, 11,7.

Ejemplo 2E Síntesis de 6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-24-*nor*-5 $\beta$ -colan-23-nitrilo (BAR506 - no forma parte de la invención)

30 Se transformó 7-KLCA en nitrilo 17 siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito en el Ejemplo 1B, etapas a-b. La alquilación seguida de reducción del doble enlace y epimerización en C-6 en las mismas condiciones operativas descritas en el ejemplo 2A, etapas c-d y en el ejemplo 2C, etapa i, respectivamente proporcionaron 18. El tratamiento con LiBH<sub>4</sub> como en el ejemplo 2C, etapa j, proporcionó el grupo hidroxilo 7 $\alpha$  deseado en BAR506.



35 a) HCOOH, HClO<sub>4</sub>; b) TFA, trifluoroacetic anhydride, NaNO<sub>2</sub>; c) DIPA, *n*-BuLi, TMSCl, TEA dry, THF dry -78 °C; d) acetaldehyde, BF<sub>3</sub>(OEt)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -60 °C; e) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, THF/MeOH 1:1; f) MeONa, MeOH; g) LiBH<sub>4</sub>, MeOH, THF dry, 0 °C

a) HCOOH, HClO<sub>4</sub>; b) TFA, anhídrido trifluoroacético, NaNO<sub>2</sub>; c) DIPA, *n*-BuLi, TMSCl, TEA seco, THF seco -78°C; d) acetaldehído, BF<sub>3</sub>(OEt)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -60°C; e) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, TMF/MeOH 1:1; f) MeONa, MeOH; g) LiBH<sub>4</sub>, MeOH, THF seco, 0°C

40 **BAR506:** C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>2</sub>

El RMN H<sup>1</sup> se registró en Varian Inova 700 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  3,66 (1H, br s, H-7), 3,31 (1H, ovl, H-3), 2,46 (1H, dd, *J* = 3,8, 16,9 Hz, H-22a), 2,34 (1H, dd, *J* = 7,4, 16,9 Hz, H-22b), 1,16 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,91 (3H, t, *J* = 7,5 Hz, H<sub>3</sub>-25), 0,92 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0,73 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

45 El RMN C<sup>13</sup> se registró en Varian Inova 175 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente:  $\delta$  120,3, 72,9, 70,9, 56,1, 51,5, 46,7, 43,4, 42,9, 41,4, 40,2, 36,5, 36,2, 34,3 (2C), 34,2, 30,7, 29,2, 24,9, 24,4, 23,4, 23,3, 21,9, 18,5, 12,1, 11,6.

50 Actividades biológicas. La actividad de los compuestos seleccionados se probó in vitro utilizando un modelo de células completas transfectadas con genes informadores para establecer la selectividad de los compuestos que se muestran en la tabla 1 hacia FXR y TGR5/GPBAR1 en comparación con el ácido quenodesoxicólico (CDCA) y el TLCA. CDCA es un ácido biliar primario que funciona como un ligando endógeno para FXR, mientras que TLCA es un ligando fisiológico para TGR5/GPBAR1. En este ensayo, se cultivaron células HepG2 (una línea celular derivada de hígado) a 37°C en medio esencial mínimo con sales de Earl que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células HEK-293T se cultivaron a 37°C en D-MEM que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Los experimentos

de transfección se realizaron utilizando Fugene HD de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos a  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Para la transactivación mediada por FXR, las células HepG2 se transfectaron con 100 ng de pSG5-FXR, 100 ng de pSG5-RXR, 100 ng de pGL4.70, un vector que codifica el gen Renilla humano y 250 ng del vector informador p(hsp27)-TK-LUC que contenía el elemento de respuesta a FXR IR1 clonado del promotor de la proteína de choque térmico 27 (hsp27).

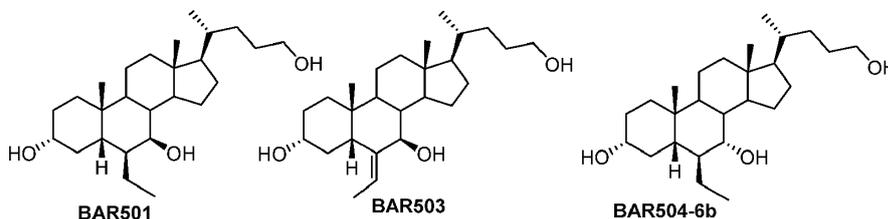
Para la transactivación mediada por GPBAR1, las células HEK-293T se transfectaron con 200 ng de pGL4.29, un vector informador que contenía un elemento de respuesta a AMPc (CRE) que impulsa la transcripción del gen informador luciferasa luc2P, con 100 ng de pCMVSPORT6-GPBAR1 humano, y con 100 ng de pGL4.70, un vector que codifica el gen Renilla humano. En los experimentos de control, las células HEK-293T se transfectaron solo con los vectores pGL4.29 y pGL4.70 para excluir cualquier posibilidad de que los compuestos pudieran activar el CRE de una manera independiente de GPBAR1. A las 24 h de la transfección, las células se estimularon durante 18 h con TLCA 10  $\mu$ M como agente de control o agonistas putativos de GPBAR1 a la misma concentración. Después de los tratamientos, las células se lisaron en 100  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-fosfato 25 mM, pH 7,8; DTT 2 mM; 10% de glicerol; 1% de Triton X-100), y se sometieron a ensayo 20  $\mu$ L de producto lisado celular para determinar la actividad luciferasa utilizando el sistema de ensayo de luciferasa. La luminiscencia se midió utilizando un luminómetro Glomax 20/20. Las actividades luciferasa se normalizaron frente a las actividades de Renilla. El antagonismo contra FXR de GPBAR1/TGR5 se midió como porcentaje de actividad en el ensayo de transactivación que demanda TLCA como ejemplo de agonismo.

Animales y protocolos. Se alojaron ratones con el gen GPBAR1 inactivado ("null") (GPBAR1-B6 = ratones GPBAR12/2, generados directamente en un fondo C57BL/6NCrl) y compañeros de camada congénicos en C57BL/6NCrl a temperaturas (22°C) y fotoperiodos (12:12 horas de ciclo de luz/oscuridad) controlados, permitiendo el acceso sin restricciones a comida convencional para ratones y agua del grifo y se aclimataron a estas condiciones durante al menos 5 días antes de su inclusión en un experimento.

Prueba de rascado. Se utilizaron ratones macho GPBAR1<sup>-/-</sup> y sus compañeros de camada congénicos (de 8 a 12 semanas de edad) para estos estudios. El pelo en la base del cuello se afeitó y los ratones se colocaron en cilindros individuales en un estante de vidrio. Se dibujó una circunferencia de aprox. 0,5 cm de diámetro en el cuello y se inyectaron agentes de prueba en esta zona. Los ratones se aclimataron a la sala experimental, el aparato de retención y los investigadores durante períodos de 2 horas durante 2 días sucesivos antes de los experimentos. El comportamiento de rascado fue cuantificado por 2 observadores que desconocían los agentes o los genotipos probados. Un rasguño se definió como el levantamiento de la extremidad posterior al sitio de inyección y a continuación la colocación de la pata en el suelo, independientemente del número de golpes. Si los recuentos diferían en más de 5 rasguños durante un período de 30 minutos, ambos observadores reevaluaban los registros. Los resultados se expresaron como el número de eventos de rascado durante 30 o 60 minutos de observación. Los agentes probados fueron: DCA (25  $\mu$ g), TLCA (25  $\mu$ g), UDCA (25  $\mu$ g) y BAR502 (25  $\mu$ g), o con ácido betulínico (50  $\mu$ g), ácido oleanólico (50  $\mu$ g). LCA y DCA se disolvieron en DMSO y los otros agentes en NaCl al 0,9% (10  $\mu$ L). En otro entorno experimental a los ratones GPBAR1<sup>-/-</sup> y sus compañeros de camada congénicos se les administró alfa-naftilisotiocianato (ANIT) (25 mg/kg, *per os*) disuelto en aceite de oliva o aceite de oliva solo (ratones de control) o con la combinación de ANIT más BAR502 (15 mg/kg una vez al día, *por os*) durante 10 días. El día 5 se evaluó el rascado espontáneo durante 60 minutos y después de la inyección subcutánea de 25  $\mu$ g de DCA. Los niveles séricos de bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina se midieron mediante pruebas de química clínica de rutina realizadas en un analizador automático Hitachi 717. Para el modelo de estrógenos, a los ratones C57BL6 de tipo salvaje se les administraron 10 mg/kg i.p. con 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol (17 $\alpha$ E<sub>2</sub>) disuelto en PEG o PEG solo (ratones de control) o la combinación de 17 $\alpha$ E<sub>2</sub> y BAR502 (15 mg/kg al día, *por os*) durante 8 días. Al final del estudio, se registraron el rascado espontáneo y el rascado inducido por la inyección s.c. de 25  $\mu$ g de DCA. También se midieron el peso de la vesícula biliar y los niveles séricos de bilirrubina y fosfatasa alcalina. A lo largo de los estudios, los investigadores fueron evaluados visualmente por lo menos dos veces al día de lunes a viernes y una vez al día durante el fin de semana por investigadores y por personal altamente capacitado de la instalación de animales, incluido el veterinario de la instalación de animales. Los animales se pesaron diariamente y se sacrificaron en los puntos de tiempo indicados o cuando sus condiciones clínicas se volvían críticas según lo evaluado mediante una reducción de peso corporal superior al 25% del peso basal en 7 días. Además, los animales fueron sacrificados cuando en la evaluación diaria demostraron incapacidad para elevarse o deambular. Los ratones fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital sódico (> 100 mg/kg i.p.).

REIVINDICACIONES

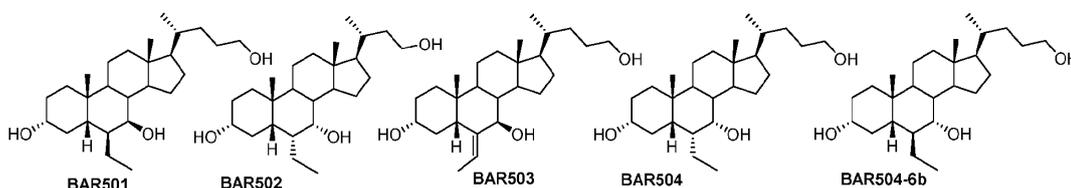
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



5

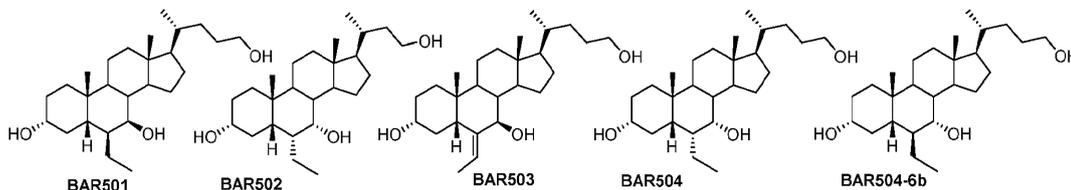
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, siendo dicho compuesto 6β-etil-3α,7β-dihidroxi-5β-colan-24-ol.

10 3. Un compuesto para su uso como medicamento, seleccionándose dicho compuesto del grupo que consiste en



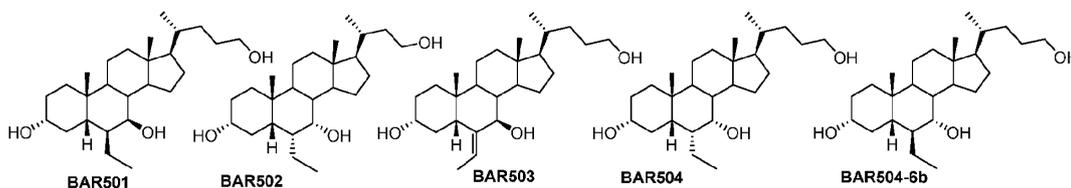
15 4. Un compuesto para su uso como medicamento, de acuerdo con la reivindicación 3, seleccionándose dicho compuesto del grupo que consiste en 6β-etil-3α,7β-dihidroxi-5β-colan-24-ol y 6α-etil-3α,7α-dihidroxi-24-nor-5β-colan-23-ol.

20 5. Un compuesto para su uso, como modulador de FXR y/o TGR5/GPBAR1, en la prevención y/o el tratamiento de trastornos gastrointestinales, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas, cáncer, trastornos renales, trastornos inflamatorios y trastornos neurológicos, seleccionándose dicho compuesto del grupo que consiste en

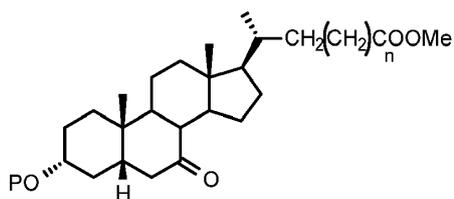


25 6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en BAR501, BAR503 y BAR504-6b como se define en la reivindicación 1 y al menos otro ingrediente farmacéutico.

30 7. Un procedimiento para preparar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

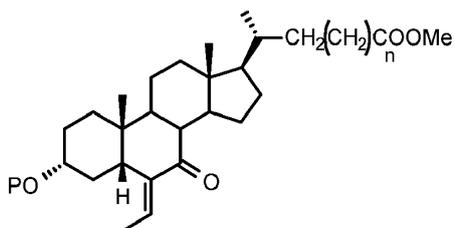


35 comprendiendo dicho procedimiento someter un compuesto de fórmula (VIII) a una condensación aldólica poniendo en contacto de ese modo un compuesto de fórmula (VIII)



(VIII)

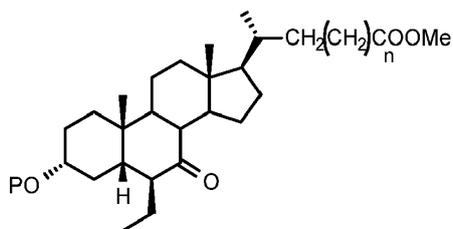
en donde n es 0 o 1, P es un grupo protector de hidroxilo, con alquil litio, tal como nBuLi, y posteriormente con acetaldehído, preferiblemente también en presencia de  $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ , para obtener un compuesto de fórmula (IX)



(IX)

5

en donde n y P se describen como anteriormente y sometiendo a continuación el compuesto de fórmula (IX) a una hidrogenación catalítica, para obtener un compuesto de fórmula (X)

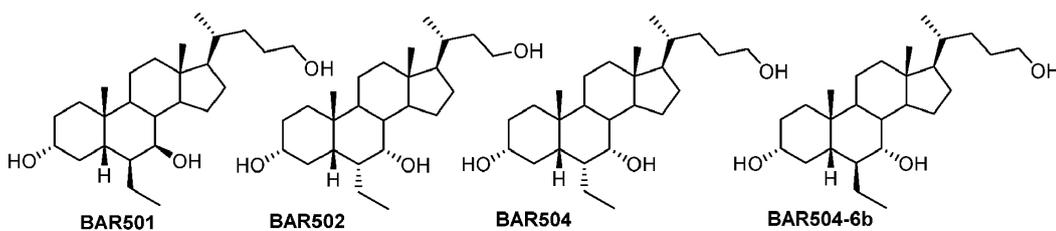


(X)

10

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, para preparar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

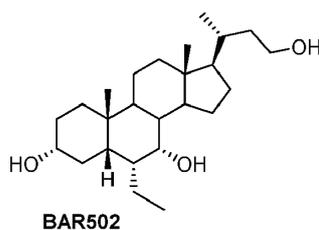
15



en donde el compuesto de fórmula (X) se somete a reducción de carbonilo en C7 poniendo en contacto el compuesto de fórmula (X) con  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$  para obtener una mezcla de alfa-OH y beta-OH en C7; y posteriormente se somete a un tratamiento con  $\text{LiBH}_4$  que reduce completamente la función éster metílico en la cadena lateral a  $-\text{CH}_2\text{OH}$ .

20

9. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula



BAR502

25

comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto con  $\text{MeONa}/\text{MeOH}$  un compuesto de fórmula (XIV)

