



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 850**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 3/00 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99967639 .8**

96 Fecha de presentación : **22.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1140079**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Ensayos para ligandos de receptores nucleares.**

30 Prioridad: **23.12.1998 US 135097 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2009

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Blanchard, Steven Gerard;**
Kliewer, Steven Anthony;
Lehmann, Jorgen;
Parks, Derek J.;
Stimmel, Julie Beth;
Willson, Timothy Mark;
Haffner, Curt Dare y
Maloney, Patrick Reed

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Ensayos para ligandos de receptores nucleares.

5 Antecedentes de la invención

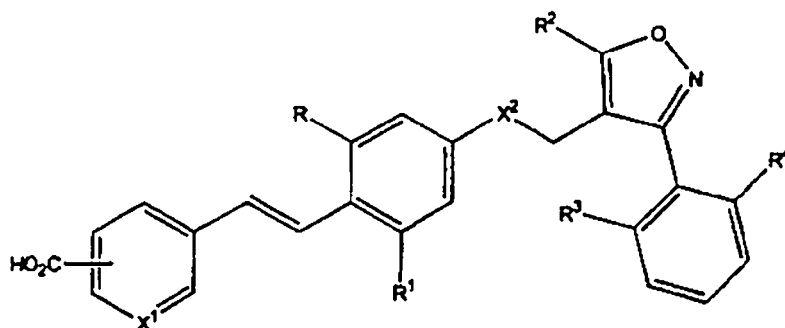
El Receptor Farnesoide X (FRX, del inglés "Farnesoid X Receptor") es un receptor nuclear huérfano identificado inicialmente a partir de una biblioteca de ADNc de hígado de rata que está relacionado muy estrechamente con el receptor de ecdisona de insecto. El FXR es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando que incluye receptores para las hormonas esteroidea, retinoidea y tiroidea (6). Los análisis de transferencia Northern e *in situ* muestran que el FXR se expresa más abundantemente en el hígado, el intestino, el riñón y adrenalmente (8;22). El FXR se une a ADN como heterodímero con el receptor de ácido 9-cis retinoico RXR. El heterodímero FXR/RXR se une preferencialmente a elementos de respuesta compuestos de dos medias posiciones de receptor nuclear del AG(G/T)TCA de consenso organizado como una réplica invertida y separados por un único nucleótido (estructura IR-1) (8). Una publicación previa demostró que el FXR de rata se activa mediante concentraciones micromolares de farnesoides tales como farnesol y hormona juvenil (8). Sin embargo, estos compuestos no activaron el FXR de ratón y humano, dejando en duda la naturaleza del ligando de FXR endógeno. La presente invención demuestra que varios ácidos biliares naturales se unen y activan el FXR en concentraciones fisiológicas (véase también las publicaciones recientes 17; 19; 24). Tal como se discute en la presente invención, los ácidos biliares que actúan como ligandos de FXR incluyen el ácido quenodesoxicólico (CDCA), el ácido desoxicólico (DCA), el ácido litocólico (LCA) y los conjugados de taurina y glicina de dichos ácidos biliares.

Los ácidos biliares son metabolitos del colesterol que se forman en el hígado y que son secretados en el duodeno del intestino, donde desempeñan un papel importante en la solubilización y absorción de lípidos y vitaminas de la dieta. La mayoría de los ácidos biliares (~95%) son reabsorbidos posteriormente en el íleo y son devueltos al hígado a través del sistema circulatorio enterohepático. La conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado se regula mediante retroalimentación: los ácidos biliares regulan a la baja la transcripción de citocromo P450 7a (CYP7a), que codifica la enzima que cataliza la etapa controlante de la cinética de biosíntesis de ácido biliar. Existen datos que sugieren que el FXR está implicado en la represión de la expresión de CYP7a por los ácidos biliares, aunque el mecanismo preciso sigue sin estar claro (21). En el íleo, los ácidos biliares inducen la expresión de la proteína de unión de ácido biliar intestinal (IBABP), una proteína citoplásmica que se une a ácidos biliares con una alta afinidad y que puede estar implicada en su captación y tráfico celular. Dos grupos investigadores han demostrado ahora que los ácidos biliares median sus efectos sobre la expresión de IBABP a través de la activación de FXR, que se une a un elemento de respuesta de tipo IR-1 que se conserva en los promotores génicos de IBABP de humano, rata y ratón (14; 17). Por tanto, el FXR está implicado tanto en la estimulación (IBABP) como en la represión (CYP7a) de genes diana implicados en la homeostasis de ácido biliar y de colesterol.

La presente invención ha realizado el descubrimiento útil de ligandos de FXR, así como de métodos para determinar los genes regulados por la interacción con FXR y que afectan a dichos genes. Por tanto, este descubrimiento proporciona métodos para regular la homeostasis de ácido biliar y de colesterol, la absorción de ácidos grasos y la digestión de proteínas y carbohidratos.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un compuesto que se une a receptor Farnesoide X, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula (I):



en la que X¹ es CH ó N; X² es O ó NH; R y R¹ pueden ser de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno ó CF₃; R² es alquilo inferior; R³ y R⁴ pueden ser de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno, CF₃, OH, O-alquilo ó O-polihaloalquilo.

La presente invención proporciona además un compuesto de fórmula II para su uso en la modulación de un gen cuya expresión está regulada por FXR en un mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Muestra que el CDCA activa de forma selectiva FXR en comparación con otros receptores. Se cotransfectaron células CV-1 con varias quimeras GAL4-receptor nuclear (25) y con el plásmido informador (UAS)₅-tk-CAT (26). Las células fueron tratadas con CDCA 100 μ M. Los extractos celulares fueron evaluados posteriormente para determinar la actividad de CAT (26). Los datos están expresados para cada receptor como inducción de plegamiento de la actividad de CAT referido a células tratadas con vehículo, y representan la media de tres puntos de datos $\pm$ SD.

Figura 2. Muestra la activación de FXR por ácidos biliares. (A) Estructuras químicas de los principales ácidos biliares humanos. (B) Los FXR de longitud completa de humano (barras de color) y murino (barras blancas) son activados por CDCA, LCA y DCA. Los ensayos de CAT se llevaron a cabo con extractos de células CV-1 transfectadas con plásmidos de expresión para FXR humano o murino, RXR α humano y el plásmido informador FXREhsp27-tk-CAT (27, 28). Las células fueron tratadas con 100 μ M del ácido biliar indicado o farnesol, o con 10 μ M de esteroide indicado o TTNPB. Colesterol (CH). (C a E) Análisis de dosis-respuesta de ácidos biliares sobre FXR humano. Los ensayos fueron realizados como se ha indicado antes con 1; 3,3; 10; 33 ó 100 μ M de CDCA, LCA o DCA. (F) El FXR humano no es activado por conjugados de CDCA en células CV-1. El ensayo se llevó a cabo como antes con 100 μ M de CDCA libre o conjugado. (G) El FXR humano es activado por ácidos biliares conjugados en células CV-1 que expresan el gen IBAT humano. El ensayo se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente excepto porque las células fueron transfectadas adicionalmente con un plásmido de expresión para el gen humano IBAT (pCMV-HISBT), y fueron tratadas con 3 μ M del ácido biliar indicado. Los datos están expresados como inducción de plegamiento de la actividad de CAT referido a células tratadas con vehículo, y representan la media de tres puntos de datos $\pm$ SD (26).

Figura 3. Muestra que los ácidos biliares libres y conjugados se unen a FXR. (A) El CDCA y sus conjugados aumentan la unión de SRC1 a FRX. El ensayo de sensibilidad de ligando FRET realizado con 10 nM de LBD de FRX biotinilada marcada con alofococianina conjugada con estreptavidina, 10 nM de un péptido SRC1 marcado con quelato de europio conjugado con estreptavidina, y 100 μ M del compuesto indicado. Los datos están expresados como la media $\pm$ SD derivada de tres experimentos independientes. (B) Análisis de dosis-respuesta de unión de CDCA a FXR. El ensayo de sensibilidad de ligando FRET se realizó en presencia de concentraciones crecientes de CDCA (círculos blancos), glico-CDCA (triángulo blanco), tauro-CDCA (cuadrados blancos) o ácido cólico (círculos negros). (C) El LCA, el DCA y el TTNPB compiten con el CDCA para la unión de FXR. Los ensayos de sensibilidad de ligando FRET fueron llevados a cabo en presencia de CDCA 50 μ M y de concentraciones crecientes de LCA (círculos blancos), DCA (cuadrados blancos) y TTNPB (círculos negros).

Figura 4. Tal como se muestra en la Figura 4a, el CDCA indujo la interacción entre el FXR y el péptido SRC-1. El análisis de dosis-respuesta mostró que el CDCA ligado a FXR con un valor de EC₅₀ de $\sim$ 4,5 μ M (Figura 4b), que se encuentra claramente dentro del rango de concentración intestinal de este ácido biliar. Cabe destacar que los ácidos biliares relacionados estrechamente, ácido cólico y ácido desoxicólico, no tuvieron ningún efecto en el ensayo FRET de FXR, lo que demuestra la especificidad de la unión de CDCA a FXR (Figura 4a).

Lo siguiente en ser examinado fue si el CDCA activaba FXR en células. Se transfectaron temporalmente células CV-1 con un plásmido de expresión que codifica el FXR humano y una construcción informadora que contiene el hsp27-EcRE, un elemento de respuesta que es conocido por ser activado por el heterodímero FXR/RXR. Se pudo alcanzar una activación de 130 veces el valor inicial del heterodímero FXR/RXR con CDCA 100 μ M (Figura 4c).

Figura 5. Muestra la unión de ligando a FXR medida a través de la modulación de la formación del heterodímero FXR:RXR.

Descripción detallada de la invención

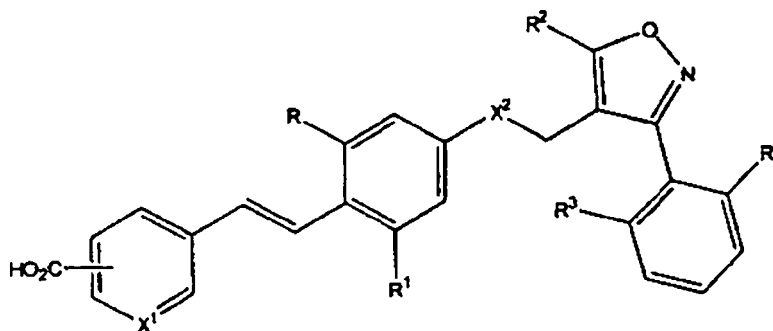
La presente invención hace uso de una estrategia de desarrollo de ensayo genérico de receptores nucleares, utilizando dominios de unión de ligandos purificados. El concepto de desarrollo de ensayo genérico se ha extendido para desarrollar ensayos *in vitro* que detecten la unión de ligando mediante la monitorización de los cambios inducidos por el ligando en la heterodimerización del receptor. Esta estrategia ha sido demostrada usando tanto proximidad de centelleo como fluorimetría homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) en los ejemplos anexos, pero no se restringe a estos métodos. También se puede usar otras técnicas de marcado y de medición. Sin embargo, el uso de proximidad de centelleo o de HTRF proporciona una metodología más sencilla y práctica.

Otro aspecto que se emplea es un ensayo de péptido-receptor nuclear para identificar ligandos. Este ensayo utiliza transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y puede usarse para evaluar si los ligandos putativos se unen a FXR. El ensayo FRET se basa en el principio de que los ligandos inducen cambios conformacionales en los receptores nucleares que facilitan las interacciones con las proteínas coactivadoras requeridas para la activación transcripcional.

En la FRET, una molécula fluorescente dadora transfiere energía a través de una interacción dipolo-dipolo no radiante a una molécula aceptora (que normalmente es una molécula fluorescente). La FRET es una técnica espectroscópica estándar para medir distancias en el intervalo de 10 a 70 Å. Mediante la transferencia de energía, que depende de la distancia R⁻⁶ entre el dador y el aceptor, se reduce la fluorescencia del dador y aumenta o se sensibiliza la fluorescencia del aceptor. La FRET se usa frecuentemente tanto en la ciencia de los polímeros como en biología estructural,

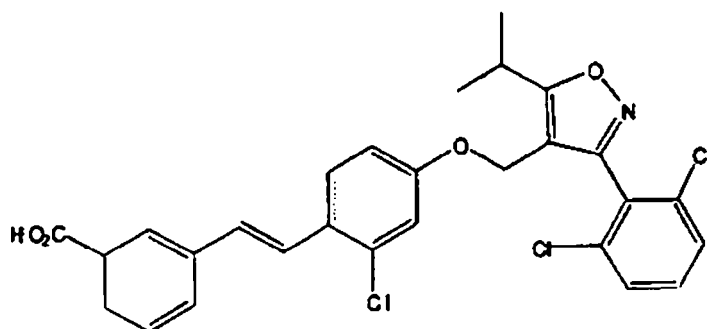
y recientemente ha sido usada para estudiar complejos macromoleculares de ADN, ARN y proteínas. Además, Mathis ha usado criptatos de europio con la Aloficocanina multicromofórica para lograr un R_0 extremadamente grande de 90 Å (29).

La presente invención utiliza los anteriores ensayos para el descubrimiento de ligandos de FXR. La invención proporciona que un compuesto que se caracteriza por la siguiente fórmula (I) es un ligando de FXR:



en la que X^1 es CH ó N; X^2 es O ó NH; R y R^1 pueden ser de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno ó CF_3 ; R^2 es alquilo inferior; R^3 y R^4 pueden ser de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno, CF_3 , OH, O-alquilo ó O-polihaloalquilo.

Un ejemplo de dicho ligando es el GW4064, un ligando de FXR potente y selectivo, que se caracteriza por la siguiente fórmula (II):



Por tanto, la presente invención proporciona un método para regular ácido biliar, colesterol y homeostasis de lípidos usando un compuesto, tal como ácido biliar (particularmente CDCA) o un compuesto sintético, tal como GW4064, que se une al receptor nuclear de FXR.

La unión del receptor nuclear de FXR puede dar como resultado la alteración de la expresión de varios genes que el FXR ayuda a regular, que incluyen genes implicados en la absorción y digestión de lípidos en el intestino delgado y en la homeostasis de lípidos en el hígado. Los ejemplos de dichos genes pueden incluir, aunque sin limitación, genes implicados en el transporte de ácido biliar, la absorción de lípidos, la biosíntesis de colesterol, la proteólisis, el metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis de glucosa, la traducción de proteínas, el transporte electrónico y el metabolismo hepático de ácidos grasos. Cabe destacar que el FXR a menudo actúa como un heterodímero con el Receptor Retinoide X (el heterodímero FXR/RXR). El método de la invención incluye el uso de esta tecnología para afectar a la homeostasis de ácido biliar y de colesterol de tal modo que, al final, se puedan modificar los niveles de colesterol y de lípidos, y para tratar enfermedades en un mamífero, incluyendo el hombre, en el que la regulación de los niveles de ácido biliar, colesterol y lípidos sea importante.

Por tanto, la presente invención proporciona un método para modular un gen cuya expresión está regulada por FXR en un mamífero, que comprende administrar al mamífero un ligando de FXR: (a) Genes Regulados a la Baja en el Hígado, tal como apolipoproteína B -2,7; inhibidor de proteinasa en plasma alfa-1-inhibidor III grupo 3 (m22360) -2,7; L-gulono-gamma-lactona oxidasa (d12754) -2,2; enzima bifuncional peroxisomal enoil-CoA:hidrotasa-3-hidroxiacil-CoA (k03249) -2,0; proteína hepática de unión de ácido graso (L-FABP, m13501) -2,0; CYP4A2 (m57719) -1,9; CYP3A23 (x96721) -1,8; CYP3A1 (x64401) -1,6; (b) Genes Regulados al Alza en el Hígado, tal como el homólogo de compañero de heterodímero pequeño (d86580) +6,6, la proteína de respuesta al crecimiento inducido por insulina, CL-6 (113619) +5,9; el factor de elongación 2, EF-2 (y07504) +4,3; el cornichón de ratón +4,0; el receptor de proteína quinasa C (u03390) +3,1; citocromo mitocondrial c oxidasa (m27315) +2,7; cistationa gamma-liasa (x53460, d17370) +2,3; fosfoenolpiruvato citosólico carboxiquinasa (k03243) +2,1; histidasa (m58308) +2,1; S-

adenosilmetionina sintetasa (x60822) +2,0; lanosterol 14-alfa-dentilasa (u17697)+1,9; purinoceptor P2U acoplado a proteína G (146865) +1,9; escualeno hepático sintetasa (m95591) +1,5; (c) genes que tienen una expresión alterada en el intestino: lipasa (x61925) -9,5; lipasa pancreática (d88534) -4,4; colipasa (m58370) -10,2; fosfolipasa pancreática A-2 (d00036) -7,4; amilasa pancreática (m24962) -8,1; carboxipeptidasa A1 (m23986) -6,1; carboxipeptidasa A2 (m23721) -5,4; carboxipeptidasa B (m23959) -4,2; tripsina pancreática I (j00778) -6,8; tripsinógeno catiónico pancreático (m16624), tripsinógeno pancreático II (v01274) -3,6; elastasa I (v01234, I00112) -2,0; elastasa II (I00118, I00124) -4,6; I-BABP (I22788) +2,3; proteína intestinal de unión de ácidos grasos (FABP, k01180) -1,8; escualeno hepático sintetasa (m95591) +1,9; receptor C de proteína quinasa (u03390) +1,6; factor de elongación 2, EF-2 (y07504) +2,4; homólogo de compañero de heterodímero pequeño (d86580) +2,2. A través de los métodos descritos en la presente memoria se pueden determinar otros genes adicionales.

Al hablar de modulación se puede indicar modulación al alza o a la baja, alteración en el momento de la expresión u otros medios de modulación, tal como se conoce en la técnica. La modulación de estos genes puede usarse para efectuar tratamientos de una variedad de enfermedades y trastornos, particularmente aquellos discutidos en la presente memoria.

Adicionalmente, también se ha descubierto que el CDCA, el ácido litocólico (LCA) y el ácido desoxicólico (DCA), y sus derivados conjugados se unen a FXR en concentraciones que son consistentes con las encontradas en tejidos y de las que se sabe que regulan la transcripción génica. Estos ácidos biliares son activadores altamente eficaces del FXR en ensayos informadores basados en células. Con las formas conjugadas de los ácidos biliares, sólo se observa activación en las células que expresan un transportador de ácido biliar. Por tanto, los derivados conjugados, que contabilizan ~98% de todos los ácidos biliares en la bilis humana, probablemente representan ligandos de FXR naturales en los tejidos que expresan transportadores de ácido biliar, mientras que las formas no conjugadas pueden actuar como ligandos en tejidos que no expresan dichas proteínas transportadoras.

Como puede observarse en los ejemplos mostrados más adelante, que incluyen estudios relativos a genes cuya expresión es alterada por el funcionamiento del FXR, el presente método puede usarse en una variedad de tratamientos, que incluyen el uso de agonistas de FXR para bloquear la absorción de ácidos grasos en el intestino para el tratamiento de dislipidemia (reducción de triglicéridos, ácidos grasos libres), obesidad y enfermedades asociadas (aterosclerosis); el uso de agonistas de FXR para bloquear la digestión de proteínas y carbohidratos en el intestino para el tratamiento de la obesidad; el uso de antagonistas de FXR para bloquear desde cero la biosíntesis de colesterol en el hígado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con niveles altos de colesterol, incluyendo la aterosclerosis y piedras en la vesícula; el uso de antagonistas de FXR para bloquear la inducción de expresión de SHP-1 (y la consiguiente represión de CYP7A) para el tratamiento de enfermedades relacionadas con niveles altos de colesterol, incluyendo aterosclerosis y piedras en la vesícula; el uso de antagonistas de SHP-1 para bloquear la represión mediada por SHP-1 de CYP7A para el tratamiento de enfermedades relacionadas con niveles altos de colesterol, incluyendo aterosclerosis y piedras en la vesícula. Puesto que el FXR se une a ADN como un heterodímero obligado con RXR, se puede hacer uso de compuestos selectivos a RXR (agonistas o antagonistas) para producir cualquiera de los efectos mencionados antes a través del heterodímero FXR/RXR.

Un marcador radioactivo adecuado proporcionado por la invención sería GW4064 radiomarcado o un derivado de fórmula (I).

Un compuesto de fórmula I ó II puede marcarse de forma detectable empleando medios conocidos en la técnica. El GW4064 radiomarcado o un derivado radiomarcado de fórmula (I) pueden usarse en un ensayo competitivo de unión para detectar compuestos que interactúen directamente con FXR. Los ejemplos de ensayos competitivos de unión incluyen ensayos SPA en los que el FXR es ligado a una partícula de SPA en presencia de GW4064 radiomarcado. Los compuestos que interactúan directamente con FXR desplazarán el GW4064 radiomarcado conduciendo a una señal detectable (véase Nichols, Anal. Biochem. 1998).

Ejemplo 1

RXR α LBD

Dominios de unión de ligando de receptor retinoide X humano alfa

El RXR-alfa LBD (aminoácidos 225-462) se expresó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) como una proteína de fusión marcada con polihistidina amino-terminal. La expresión estuvo controlada por un promotor de T7 inducible por IPTG. El ADN que codifica esta proteína recombinante y una marca de histidina modificada fue subclonado en el vector de expresión pRSETa (Invitrogen). La secuencia usada en la construcción de RXR-alfa LBD derivó del número de acceso del Genbank X52773.

Se cultivaron lotes de fermentación de diez litros en medios Rich P₀ con 0,1 mg/mL de ampicilina a 25°C durante 12 horas, se enfrió a 9°C y se mantuvo a esa temperatura durante 36 horas hasta una densidad de DO₆₀₀ = 14. Con esta densidad celular, se añadió IPTG 0,25 mM, y la inducción continuó durante 24 horas a 9°C, hasta una densidad óptica final de DO₆₀₀ = 16. Las células se recogieron por centrifugación (20 minutos, 3500 g, 4°C), y las suspensiones celulares concentradas se almacenaron en PBS a -8°C.

ES 2 326 850 T3

Purificación de proteínas

De forma rutinaria, 40-50 g de pasta celular congelada (el equivalente a 2-3 litros del lote de fermentación) fueron descongelados y resuspendidos en 300 mL de TBS, pH 7,2 (Tris 25 mM, NaCl 150 mM). Las células se lisaron pasándolas 3 veces a través de un homogeneizador (Rannie) y los residuos celulares fueron retirados por centrifugación (30 minutos, 20.000 g, 4°C). El sobrenadante clarificado fue filtrado a través de pre-filtros gruesos, y se añadió TBS, de pH 7,2, que contenía imidazol 500 mM, para obtener una concentración final de imidazol de 50 mM. Este lisado se cargó en una columna (3 x 8 cm) rellena con resina para quelación Sepharose [cargada con Ni⁺⁺] (Pharmacia), y se pre-equilibró con TBS, de pH 7,2, que contiene imidazol 50 mM. Después de lavar para obtener un valor de referencia de absorbancia, la columna se desarrolló con un gradiente lineal de imidazol de 50 a 500 mM en TBS, pH 7,2. Las fracciones de la columna se agruparon y se dializaron con TBS, pH 7,2, que contenía DTT 5 mM y EDTA 0,5 mM. Tras diálisis, la muestra fue concentrada usando Centri-prep 10K (Amicon) y sometida a exclusión de tamaño con una columna (3 x 90 cm) rellena con resina Sepharose S-75 (Pharmacia) pre-equilibrada con el mismo tampón.

15 *Biotinilación de dominio de unión de ligando de receptor retinoide X humano*

La biotinilación de RXR α LBD purificado se llevó a cabo de un modo similar al descrito para FXR LBD en el Ejemplo 2.

20 *Marcado de RXR α con CY5TM*

Se diluyó RXR α LBD purificado hasta aproximadamente 10 μ M en PBS, y se añadió aproximadamente un exceso molar de 5 a 1 de colorante reactivo monofuncional Cy5TM [éster de NHS] (Amersham Life Sciences) en un volumen mínimo de PBS. Esta disolución fue incubada a oscuras con mezclamiento durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). La reacción de modificación se detuvo mediante la adición de un exceso de Tris-HCl, pH 8. Se dializó RXR α LBD modificado con colorante fluorescente a 4°C, con una mínima exposición a la luz, frente a 4 cambios de tampón, cada uno de al menos 50 volúmenes, PBS que contenía DTT 5 mM, EDTA 2 mM y un 2% (p/v) de sacarosa. Se congelaron alícuotas en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

30 *Ejemplo 2*

Determinación de la unión de ligando a heterodímero Receptor Farnasoide X:Receptor Retinoide X utilizando fluorimetría resuelta en el tiempo

35 Este Ejemplo describe el uso de heterodimerización mediada por ligando para cuantificar la unión de ligando al receptor nuclear FXR, Receptor Farnasoide X.

El método mide la capacidad de ligandos putativos para mediar en la heterodimerización entre los dominios de unión de ligando (LBD) de FXR y RXR α expresados bacteriamente. La detección de los LBDs asociados se realiza mediante fluorimetría resuelta en el tiempo (TRF). El LBD de FXR purificado se marca con biotina y se mezcla a continuación con cantidades estequiométricas de estreptavidina marcada con europio (Wallac, Inc.). El LBD de RXR α purificado se marca con CY5TM. Se mezclan juntas cantidades equimolares de cada LBD modificado y se dejan equilibrar durante al menos 1 hora antes de la adición de concentraciones variables o constantes de la muestra para la que se quiere determinar la afinidad. Tras alcanzar el equilibrio, se cuantifica la señal fluorescente resuelta en el tiempo usando un lector de placas fluorescente. La afinidad del compuesto evaluado se estima a partir de una representación de la fluorescencia frente a la concentración del compuesto evaluado añadido.

En ausencia de ligando añadido se observa un nivel basal de formación de heterodímero FXR:RXR α . Los ligandos que promueven la formación de heterodímero inducen un aumento dependiente de la concentración en la señal fluorescente resuelta en el tiempo. Es de esperar que los compuestos que se unen igual de bien a FXR monomérico que al heterodímero FXR:RXR α no produzcan ningún cambio en la señal, mientras que cabría esperar que los ligandos que se unan preferencialmente al receptor monomérico indujeran un descenso dependiente de la concentración en la señal observada.

55 **Métodos y materiales**

Preparación de avance

Dominios de unión de ligando de Receptor Farnasoide X alfa

60 El dominio de unión de ligando de FXR α humano (FXR α LBD) se expresó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) como una proteína de fusión marcada con polihistidina amino-terminal. La expresión estuvo controlada por un promotor del T7 inducible por IPTG. El ADN que codifica esta proteína recombinante fue subclonado en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen). La secuencia de codificación de FXR α LBD humano procedió del número de acceso de GenBank U 68233 (aminoácidos 222 a 472).

Se cultivaron lotes de fermentación de diez litros en medios Rich P0₄ con 0,1 mg/mL de ampicilina a 25°C durante 12 horas, se enfrió a 9°C y se mantuvo a esa temperatura durante 36 horas hasta una densidad de DO₆₀₀ = 14. Con

ES 2 326 850 T3

esta densidad celular, se añadió IPTG 0,25 mM, y la inducción continuó durante 24 horas a 9°C, hasta una densidad óptica final de $DO_{600} = 16$. Las células se recogieron por centrifugación (20 minutos, 3500 g, 4°C), y las suspensiones celulares concentradas se almacenaron en PBS a -8°C.

5 *Purificación de dominio de unión de ligando de Receptor*

De forma rutinaria, 30-40 g de pasta celular (equivalente a 2-3 litros del lote de fermentación) se resuspendieron en 200-250 mL de TBS, pH 7,2 (Tris 25 mM, NaCl 150 mM). Las células se lisaron pasándolas 3 veces a través de una Prensa Francesa y los residuos celulares se retiraron por centrifugación (30 minutos, 20.000 g, 4°C). El sobrenadante clarificado fue filtrado a través de pre-filtros gruesos, y se añadió TBS, de pH 7,2, que contenía imidazol 500 mM, para obtener una concentración final de imidazol de 50 mM. Este lisado se cargó en una columna (6 x 8 cm) rellena con resina para quelación Sepharose [cargada con Ni^{++}] (Pharmacia), y se pre-equilibró con TBS, de pH 7,2, con imidazol 50 mM. Después de lavar para obtener un valor de referencia de absorbancia con tampón de equilibrio, la columna se lavó con aproximadamente un volumen de columna de TBS a pH 8,5 que contenía imidazol 90 mM. Se eluyó FXR α LBD directamente con imidazol 365 mM. Las fracciones de la columna se agruparon y se dializaron con TBS, pH 7,2, que contenía EDTA 0,5 mM y DTT 5 mM. La proteína dializada se concentró usando Centri-prep 10K (Amicon), y se sometió a exclusión por tamaño, usando una columna (3 x 90 cm) rellena con resina Sepharose S-75 (Pharmacia) pre-equilibrada con TBS, pH 7,2, que contenía EDTA 0,5 mM y DTT 5 mM.

20 *Biotinilación de FXR*

Se desaló/intercambió con tampón el FXR α LBD purificado usando columnas de filtración de gel PD-10 en PBS [NaFosfato 100 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM]. Se diluyó FXR α LBD hasta aproximadamente 10 μ M en PBS y se añadió un exceso molar de 5 a 1 de NHS-LC-Biotina (Pierce) en un volumen mínimo de PBS. Esta disolución se incubó con un mezclamiento suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción de modificación de biotinilación se detuvo mediante la adición de un exceso molar de 2000 veces de Tris-HCl, pH 8. El FXR α LBD modificado se dializó con 4 cambios de tampón, cada uno de al menos 50 volúmenes, PBS que contenía DTT 5 mM, EDTA 2 mM y sacarosa al 2%. El FXR α LBD biotinilado se sometió a un análisis espectrométrico de masas, para revelar el grado de modificación por el reactivo de biotinilación. En general, aproximadamente el 95% de la proteína tenía al menos una única posición de biotinilación; y la extensión global de la biotinilación siguió una distribución normal de posiciones múltiples, que variaron entre una y nueve.

RXR α LBD

35 Se preparó RXR α LBD y se marcó con CY5TM de acuerdo con los procedimientos fijados en el Ejemplo 1.

Preparación de complejo de CY5TM-RXR:estreptavidina-(quelato de europio)-FXR

Se incubaron concentraciones equimolares de FXR biotinilado y de quelato de europio conjugado con estreptavidina en tampón de ensayo que contenía DTT 10 mM durante al menos 10 minutos. A esta disolución se añadió una concentración equimolar de RXR α marcado con Cy5TM y se dejó equilibrar durante al menos 30 minutos. A continuación el receptor premezclado se añadió en una adición de una sola etapa a la placa de compuesto, utilizando por ejemplo un Titertek Multidrop 384.

45 *Materiales*

Tampón de Ensayo: KCl 50 mM KCl, 0,1 mg/mL de BSA, DTT 10 mM y Tris 50 mM (pH 8). El tampón de reserva se prepara disolviendo 2,853 g de base Tris, 4,167 g de hidrocloreuro de Tris, 3,73 g de KCl y 0,1 g de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos, en 1 L de agua desionizada. El pH se comprueba y se ajusta a 8,0, si es necesario, antes de ajustar el volumen final. Se añade 0,154 g de DTT sólido por cada 100 mL de tampón justo antes del inicio de un experimento.

BSA, libre de ácidos grasos

55 DTT

KCl

Estreptavidina marcada con europio: (Wallac CR28-1 00)

60

Hidrocloreuro de Tris

Placas de 96 pocillos: polipropileno para diluciones intermedias (Costar #3794) y placas de SPA blancas de fondo transparente (Costar #3632) o placas Polyfiltronics negras (UP350 PSB) para los ensayos.

65

Métodos

Detalles experimentales

5 Cada pocillo evaluado contenía una disolución preparada previamente de RXR α CY5TM y de FXR marcado con europio, y la concentración deseada de las muestras evaluadas o de los controles (volumen total de 100 μ L). En general, el volumen total se mantuvo constante variando la concentración y el volumen de los receptores premezclados, para compensar cualquier cambio de volumen de un conjunto concreto de muestras. Las placas fueron incubadas durante al menos 2 horas a temperatura ambiente y se determinó la señal fluorescente en un Lector de Fluorescencia Wallac Victor Multilabel.

Reducción de Datos

15 Para los ensayos de concentración sencillos, los resultados de cada pocillo de ensayo se expresaron como % del control, C, calculado según la ecuación 1.

$$20 \quad C = 100 * \frac{F_{\text{muestra}} - F_{\text{basal}}}{F_{\text{std}} - F_{\text{basal}}} \quad (1)$$

25 en donde F_{muestra} es la señal observada en un pocillo de muestra concreto, F_{total} es la señal observada en presencia de inhibidor de control y F_{basal} es la tasa de conteo observada en ausencia de ligando. Los valores usados para F_{std} y F_{basal} fueron los promedios de los correspondientes pocillos de control incluidos en cada placa.

30 Para los ensayos dosis-respuesta, primero se normalizaron los datos a % de control usando la ecuación (1). Se hizo una representación de C_L , el % de control observado a la concentración de ligando L, frente a la concentración de ligando, L. Los datos se ajustaron a la ecuación (2) para obtener los parámetros del mejor ajuste para EC_{50} , F_{max} y F_{basal} .

$$35 \quad C_L = F_{\text{basal}} + \frac{F_{\text{max}} * L}{EC_{50} + L} \quad (2)$$

40 Nótese que F_{max} , la amplitud máxima observada a concentraciones de ligando de saturación, puede tener un valor positivo o negativo. El signo de este parámetro indica si un compuesto de ensayo particular favorece la unión al complejo FXR:RXR (F_{max} positivo) o si los receptores del componente están un estado no heterodimérico (F_{max} negativo). Además, tanto F_{max} como F_{basal} se expresan en unidades de % de un compuesto patrón.

Resultados

50 Tanto la magnitud como el signo de F_{max} (la máxima amplitud inducida por el ligando) deben ser considerados. Nótese que la definición de la máxima respuesta observada para CDCA = 100% es una asignación arbitraria. El propósito de la normalización es únicamente el de permitir la comparación de valores obtenidos para diferentes compuestos en días diferentes y/o el de usar diferentes lectores de placas de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 3

60 El FXR se expresa de forma abundante en tejidos del hígado, intestino, riñón y adrenales, a través de los cuales se produce un flujo de ácido biliar significativo. En base a estas observaciones y a los datos de FRET y de transactivación, el FXR representa una nueva ruta de señalización de hormonas y un factor de transcripción que induce la expresión de I-BABP por CDCA. Por tanto, la identificación de ligandos que se unen a FXR proporciona un método para lograr algunos de los efectos terapéuticos del CDCA a través de la regulación del flujo de ácido biliar, incluyendo la desaturación de bilis, la inhibición de la absorción intestinal de colesterol y la reducción de los triglicéridos.

65 En principio, la biología detrás de este método debe provocar un mayor transporte de ácido biliar a través del intestino de un mamífero, incluyendo el hombre. Por tanto, el receptor FXR es una diana para compuestos (tal como el ácido biliar u otros ligandos descubiertos) que se unan a él y regulen el transporte de ácido biliar.

Se incluyen los métodos relacionados con la inhibición de la unión de ligandos, tales como el ácido biliar y el GW4064, a FXR y la activación/inhibición de la expresión de proteína de unión de ácido biliar intestinal (I-BABP, proteína que es activada mediante la unión a ácido biliar-FXR y que está implicada en el transporte de ácido biliar a través de las membranas del intestino). Además, también se incluyen el aumento del transporte de ácidos biliares; la estimulación del organismo para convertir colesterol en ácido biliar; la reducción de los niveles de colesterol; la inhibición de la absorción intestinal de colesterol; la reducción de los niveles de triglicéridos; y el tratamiento de enfermedades tales como la aterosclerosis, la enfermedad de piedras en la vesícula y los trastornos de almacenamiento de lípidos.

El FXR es un receptor nuclear para el ácido quenodesoxicólico

Como se ha indicado antes, recientemente se ha identificado una proteína de unión citosólica denominada proteína de unión de ácido biliar intestinal (I-BABP) o proteína de unión de ácidos grasos 6 (FABP6) como componente del sistema de transporte de ácido biliar en el enterocito ileal. Kanda y col. demostraron que la expresión de I-BABP se ve inducida de forma drástica por la bilis humana, mostrando el ácido quenodesoxicólico (CDCA) un efecto de inducción significativamente mayor que otros ácidos biliares más hidrofílicos. En base a su actividad estructural, Kanda propuso que un receptor nuclear no identificado para CDCA era un regulador transcripcional de la expresión de I-BABP en el intestino. Ahora se ha descubierto que el CDCA se une a FXR y lo activa, un miembro huérfano de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas.

Para examinar si el CDCA media sus efectos transcripcionales a través de un miembro huérfano de la familia de receptores de hormona esteroidea/retinoidea/tiroidea (4), se usó un sistema receptor quimérico en el que se fusiona el dominio de unión de ligando putativo (LBD) del receptor huérfano humano con el dominio de unión de ADN del factor de transcripción de levadura GAL4. Se generaron plásmidos de expresión para las quimeras de receptor nuclear humano-GAL4 mediante amplificación del ADNc que codifica los LBDs putativos y se realizó la inserción en un vector de expresión pSG5 modificado (Stratagene) que contiene el dominio de unión de ADN GAL4 (aminoácidos 1 a 147) y la señal de localización nuclear SV40 Tag (5). En células CV-1, el CDCA activó selectivamente FXR [NR1H4] (Figura 1), un receptor nuclear huérfano expresado predominantemente en el hígado, riñón, intestino y tejidos adrenales (7, 8). Esta fuerte activación por CDCA fue algo inesperado ya que el FXR responde a altas concentraciones de farnesoides (7) y retinoides (9).

Para investigar con mayor profundidad la relación estructura-actividad de la activación de FXR, se evaluó una serie de metabolitos de colesterol naturales, que incluyen ácidos biliares (Figura 2A), oxisteroles y esteroides, para determinar su capacidad para activar FXR humano de longitud completa o FXR murino de longitud completa en células CV-1. El CDCA activó el FXR tanto humano como de ratón (Figura 2B). El análisis dosis-respuesta mostró que aunque se observó algo de activación a $3,3 \mu\text{M}$, se obtuvo una mayor activación a $100 \mu\text{M}$ de CDCA (Figura 2C). El FXR también fue activado por los ácidos biliares secundarios ácido litocólico (LCA) y ácido desoxicólico (DCA), aunque estos compuestos fueron menos eficaces que el CDCA (Figura 2B a 2E). Se observó un modelo de activación similar en varias líneas celulares, que incluyen células S2 derivadas de *Drosophila*, lo que indica que el CDCA, el LCA y el DCA no requieren ninguna conversión metabólica para activar FXR (11). El urso-DCA, el epímero 7β -hidroxido de CDCA, y el ácido cólico (CA), que difiere del CDCA únicamente en la adición de un grupo hidroxilo en la posición 12α , fueron inactivos con el FXR (Figura 2B). Adicionalmente, no se observó activación de FXR con el ácido α - ó β -muricólico (MCA), los conjugados de glicina o taurina de los ácidos biliares, los oxisteroles, el farnesol u otros productos derivados de la ruta del mevalonato (Figura 2B a 2F). Por tanto, la cadena principal del ácido 5β -colanoico y la estereoquímica de los grupos hidroxilo del CDCA son críticos para una activación óptima de FXR.

Normalmente, los ácidos biliares se encuentran conjugados a glicina o taurina, un derivado de la cisteína. Las células requieren de la presencia de un transportador ácido biliar activo para la captación de estos derivados conjugados (12). Para evaluar si los ácidos biliares conjugados también activarían FXR, se coexpresó el transportador de ácido biliar ileal (IBAT) con FXR en células CV-1 (13). El FXR se vio fuertemente activado por $3 \mu\text{M}$ de los conjugados de taurina o glicina de CDCA, LCA y DCA (Figura 2G). Con las formas conjugadas de CA se observó una activación más débil, y el tauro-MCA fue inactivo (Figura 2G). Estos datos indican que el FXR puede ser activado por ácidos biliares conjugados en tejidos que expresan transportadores de ácido biliar como el fleo terminal, el hígado y el riñón. La relación entre la estructura química de los ácidos biliares y la activación de FXR que producen es íntimamente relacionada con los efectos conocidos de los ácidos biliares sobre la inducción de expresión de I-BABP en células Caco-2 y sobre la inhibición de la expresión de CYP7a en hepatocitos (3,12).

Ejemplo 4

Se usó un ensayo de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) como se describe con más detalle más adelante, para evaluar si los ligandos putativos se unen al receptor nuclear FXR. El ensayo FRET se basa en el principio de que los ligandos inducen cambios conformacionales en los receptores nucleares que facilitan las interacciones con las proteínas coactivadoras del receptor nuclear requeridas para la activación transcripcional. El dominio de unión del ligando de FXR marcado con fluoróforo de aloficocianina (APC) fue incubado con un péptido que contiene el dominio de interacción de receptor nuclear del coactivador SRC-1 marcado con criptato de europio.

Los ensayos de transactivación y de unión de ligando usados normalmente para determinar la actividad de activadores de receptor nuclear putativos determinan el efecto de los ligandos evaluados sobre el receptor aislado. Sin

embargo, una gran proporción de receptores nucleares huérfanos conocidos interactúa con proteínas cofactores o coactivadoras como un complejo. Por lo tanto, la presente invención sugiere la posibilidad de que la unión de ligandos a receptores nucleares pueda ser modulada por la complejación del receptor con un cofactor peptídico. A continuación se usó la capacidad del ligando para inducir cambios en el grado de dicho complejo como base para un ensayo de la invención destinado al descubrimiento de ligandos de receptor nuclear. Puede que únicamente determinadas secuencias del cofactor sean requeridas para la interacción con el receptor nuclear. Se sintetizaron diversas secuencias de las dos proteínas cofactores SRC-1 y CBP y se evaluaron en HTRF y Biacore para determinar las mejores secuencias a usar. El péptido, CPSSHSSLTERHKILHRLQLQEGSPS-CONH₂ (SEQ ID NO.: 1), es decir, SRC-1 (LCD2, 676-700) fue usado en esfuerzos de escrutinio con FXR y esto forma un aspecto adicional de esta invención.

Las proteínas coactivadoras interactúan con receptores nucleares de un modo dependiente del ligando y aumentan la transcripción (9). Un dominio de hélice α anfipática que incluye la estructura de aminoácidos LXXLL (SEQ ID NO.: 6) (L es Leu y X es cualquier otro aminoácido) actúa como interfase de interacción entre estas moléculas coactivadoras y la función de activación dependiente de ligando (AF-2) localizada en el extremo COOH del LBD de receptor nuclear (10). Para evaluar si los ligandos inducirían una conformación de FXR que favoreciera la unión de coactivador, se estableció un ensayo de detección de ligando libre de células utilizando transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para monitorizar la interacción alostérica de un péptido basado en la secuencia del coactivador receptor esteroide 1 (SRC1) con el receptor. El uso de FRET para monitorizar la formación del complejo está bien establecido, particularmente para inmunoensayos (1), y dicha metodología de detección ha sido extendida recientemente para caracterizar la unión de ligando a receptores nucleares (12).

El FXR LBD humano se preparó y se marcó fluorescentemente como se ha descrito en el Ejemplo 2. El LBD de FXR humano se marcó con el fluoróforo aloficocianina y se incubó con un péptido derivado de la segunda estructura LXXLL (SEQ ID NO.: 6) de SRC1 (aminoácidos 676 a 700) que se marcó con quelato de europio. El ensayo FRET de detección de ligando se llevó a cabo incubando 10 nM del FXR LBD biotinilado que se marcó con aloficocianina conjugada con estreptavidina (Molecular Probes) y 10 nM del péptido SRC1 [aminoácidos 676 a 700, 5'-biotina-CPSSHSSLTERHKILHRLQLQEGSPS-CONH₂] (SynPEP) (SEQ ID NO.: 1) que se marcó con quelato de europio conjugado con estreptavidina (Wallac), en Tris 50 mM, pH 8, KCl 50 mM, 0,1 mg/mL de BSA, EDTA 1 mM y DTT 10 mM, en presencia del compuesto de ensayo durante 2 horas a 22°C. Los datos fueron adquiridos usando un lector de fluorescencia Wallac VictorTM en modo de tiempo resuelto. Se midió la fluorescencia relativa a 665 nm y la reducción de datos se hizo como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Preparación de complejo de estreptavidina-(quelato de europio)-SRC1:estreptavidina-(APC)-FXR

Se incubó el péptido SRC-1 (LDC2, 676-700) biotinilado y una cantidad correspondiente a 1/2 de la estequiometría de quelato de europio conjugado con estreptavidina en tampón de ensayo que contenía DTT 10 mM durante al menos 30 minutos. Se incubó una segunda disolución de cantidades estequiométricas de FXR biotinilado y APC conjugado con estreptavidina en tampón de ensayo que contenía DTT 10 mM durante al menos 30 minutos. A continuación, cada disolución fue bloqueada con un exceso molar de 5 a 1 de biotina, y se dejó equilibrar durante al menos 15 minutos. El receptor marcado y el péptido marcado fueron mezclados y se volvió a dejar equilibrar durante al menos 30 minutos, a continuación se añadieron a la placa del compuesto en una adición de una sola etapa utilizando, por ejemplo, un Titertek Multidrop 384.

Materiales

FXR estreptavidina marcada con APC y SRC-1 estreptavidina marcada con europio (LDC2, 676-700)

SRC-1 (LDC2, 676-700: (SynPEP)

FXR estreptavidina marcada con APC y estreptavidina marcada con europio

SRC1 (LCD2, 676-700)

LBD de receptor Farnasoide-X humano biotinilado:

SRC-1 biotinilado (LDC2, 676-700):Biotina-CPSSHSSL TERHKILHRLQLQEGSPS-CONH₂ (SynPEP)

(SEQ ID NO.: 1)

Tampón de Ensayo: KCl 50 mM, EDTA 2 mM, 0,1 mg/mL de BSA, DTT 10 mM y Tris 50 mM (pH 8). El tampón de reserva se prepara disolviendo 2,853 g de base Tris, 4,167 g de hidrócloruro de Tris, 3,73 g de KCl, 0,74 g de EDTA (sal disódica, dihidratada) y 0,1 g de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos, en 1 L de agua desionizada. El pH se comprueba y se ajusta a 8,0, si es necesario, antes de ajustar el volumen final. Se añade 0,154 g de DTT sólido por cada 100 mL de tampón justo antes del inicio de un experimento.

BSA, libre de ácidos grasos

DTT

EDTA, sal disódica dihidratada

KCl

Estreptavidina marcada con alofocianina: (Molecular Probes S-868)

Estreptavidina marcada con europio: (Wallac CR28-100)

Hidrocloruro de Tris

Placas de 96 pocillos: polipropileno para diluciones intermedias (Costar #3794) y placas de SPA blancas de fondo transparente (Costar #3632) o placas Polyfiltronics negras (UP350 PSB) para los ensayos.

Resultados

Los ligandos, en particular el CDCA y los correspondientes conjugados de glicina y taurina, aumentaron la interacción entre FXR y el péptido SRC1 según se determinó mediante FRET resuelta en el tiempo (Figura 3A). Los análisis de dosis-respuesta mostraron que el CDCA, el glico-CDCA y el tauro-CDCA aumentan la cantidad de péptido SRC1 ligado a FXR LBD. Se observó una curva de respuesta saturable típica característica de una interacción específica.

TABLA 1

Potencia de los ácidos biliares para unirse a FXR determinada a través del ensayo de detección de ligando libre de células. Los valores indicados para CDCA y sus conjugados son EC_{50} s derivadas de análisis dosis-respuesta tal como se describe en la Figura 3B. Los valores indicados para los otros ácidos biliares y sus conjugados son concentraciones de inhibidor IC_{50} s de la mitad del máximo derivadas del análisis de dosis-respuesta tal como se describe en la Figura 3C

Ácido biliar	ácido libre	conjugado de glicina	conjugado de taurina
CDCA	4,5 μ M	10 μ M	10 μ M
CA	>1000 μ M	>1000 μ M	>1000 μ M
LCA	3,8 μ M	4,7 μ M	3,8 μ M
DCA	100 μ M	$\geq$ 500 μ M	$\geq$ 500 μ M
MCA	>1000 μ M	No evaluado	$\geq$ 500 μ M

Aunque el LCA, el DCA y el ácido (*E*)-[(tetrahidrotetrametilnaftalenil)propenil]-benzoico (TTNPB) activan el FXR en el ensayo informador basado en células (Figura 2B), no promovieron interacciones entre el FXR LBD y el SRC1 en el ensayo de detección de ligando FRET (Figura 3A). Sin embargo, cuando estos compuestos son evaluados en presencia de CDCA 50 μ M, producen la rotura del complejo CDCA-FXR-SRC1 de un modo dependiente de la dosis (Figura 3C y Tabla 1). Por tanto, el CDCA, el LCA, el DCA y el TTNPB son ligandos de FXR. De forma similar, los conjugados de taurina y glicina del LCA disminuyen la señal de fluorescencia, lo que indica un desplazamiento de CDCA de FXR con valores IC_{50} de 3,8 y 4,7 μ M, respectivamente (Tabla 1). Las formas conjugadas del DCA y del MCA provocaron un pequeño descenso de la fluorescencia a la concentración más alta evaluada, y no se observó efecto alguno con las formas conjugadas del CA y del urso-DCA (Tabla 1).

Tal como se emplea en las reivindicaciones de este ensayo, “péptido coactivador receptor nuclear” significa un péptido cuya afinidad por el receptor cambia en presencia de ligando y que tiene una estructura LXXLL (SEQ ID NO.: 6). Los ejemplos de péptidos coactivadores útiles para la identificación de ligandos mediante este método que han demostrado interactuar con FXR incluyen el SRC-1 y los enumerados a continuación:

1. B-QEQLSPKKKENNALLRYLLDRDDPS-CONH₂ (SEQ ID NO.: 2), ACTR (734-758), RAC3 (724-748), SRC-3 (724-748), AIB1 (724-748), pCIP (716-740)

2. B-QEPVSPKKKENALLRYLLDKDDTKD-CONH₂ (SEQ ID NO.: 3), TIF2 (732-756)

3. B-GSTHGTSLKEKHILHRLQLDSSSPVD-CONH₂ (SEQ ID No.: 4), TIF2 (676-702)

4. B-SNMHGSLQLQEKHRLHKLQLQNGNSPAE-CONH₂ (SEQ ID NO.: 5), pCIP (664-690), RAC3 (671-697), ACTR (681-707), AIB1 (671-697)

ES 2 326 850 T3

Las secuencias de péptidos 1 a 4 aparecen en una serie de coactivadores, de ahí los nombres múltiples. La "B" de las secuencias representa biotinilada, que es una modificación que permite la unión del péptido durante el análisis.

Ejemplo 5

La presente invención proporciona el compuesto no esteroideo GW4064 como un ligando de FXR potente y selectivo.

Síntesis de GW4064

Se añadió una disolución de 2,6-diclorobenzaldehído (25 g, 0,14 mol) en etanol (200 mL) a una disolución de hidrócloruro de hidroxilamina (11 g, 0,16 mol) e hidróxido sódico (6,3 g, 0,16 mol) en agua (100 mL). La mezcla resultante se agitó a 90°C durante 24 horas. El volumen se redujo a vacío en aproximadamente 30 mL, lo que indujo un precipitado. A continuación se enfrió el matraz hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido blanco mediante filtración y se lavó con agua (2 x 100 mL). Rendimiento = 25,9 g (96%) de 2,6-diclorobenzaldehído oxima. Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 mL con una disolución de 2,6-diclorobenzaldehído oxima (13 g, 0,07 mol) en N,N-dimetilformamida (150 mL). Se colocó el matraz en un baño de agua a temperatura ambiente. A continuación se cargó el matraz con N-clorosuccinimida (9,2 g, 0,07 mol). En unos minutos de disolución se detectó una liberación de calor junto con un cambio significativo de color a amarillo oscuro. La reacción se agitó durante otra hora y entonces se vertió el contenido en agua (200 mL) y se extrajo el producto con dietil éter (300 mL). La capa de éter se lavó con agua (3 x 100 mL) y salmuera (50 mL), a continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de filtrar se eliminó el disolvente a vacío para dar lugar a 14,5 g de aceite amarillo (94%) de cloruro 2,6-diclorofenilhidroxímico que se usó sin purificación adicional. Se trató una disolución agitada de acetato de metilisobutirilo (2 g, 15,6 mmol) en tetrahidrofurano (15 mL) con una disolución de metóxido sódico (31,5 mL, 0,5 M en metanol) seguido de una disolución de cloruro 2,6-diclorofenilhidroxímico (3,5 g, 15,6 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL). Tras agitar a temperatura ambiente durante 16 horas se eliminó el disolvente a vacío. El residuo resultante se repartió entre dietil éter (100 mL) y agua (100 mL). La capa de éter se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se condensó hasta obtener un aceite. El producto se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 10% en hexano como fase móvil. Rendimiento = 3,1 g (62%) de 3-(2,6-diclorofenil)-4-carbometoxi-5-isopropilisoxazol.

Se enfrió una disolución de 3-(2,6-diclorofenil)-4-carbometoxi-5-isopropil-isoxazol (8,4 g, 27 mmol) en tetrahidrofurano (60 mL) hasta 0°C en atmósfera de nitrógeno a la vez que se añadía gota a gota una disolución de hidruro de diisobutilaluminio (38 mL, 1,5 M en tolueno). Se dejó que la reacción se calentara lentamente hasta temperatura ambiente a lo largo de varias horas y se agitó a temperatura ambiente durante un total de 16 h. Se volvió a enfriar de nuevo el matraz hasta 0°C y se añadió con cuidado metanol (2 mL) a lo largo de un periodo de 10 minutos. Se añadió gota a gota agua (20 mL) y se formó una mezcla gelatinosa. Se añadió hidróxido sódico (30 mL, 2 N) y se filtró el material a través de un pistón de celite. Después de que los sólidos estuvieran casi secos, fueron extraídos con acetato de etilo (4 x 50 mL) y los filtrados fueron combinados. La capa orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se condensó hasta obtener un sólido cristalino blanco. Rendimiento = 7,1 g (93%) de 3-(2,6-diclorofenil)-4-hidroximetil-5-isopropilisoxazol.

Se trató una disolución de 2-cloro-4-hidroxibenzaldehído (0,5 g, 3,2 mmol) y 3-(2,6-diclorofenil)-4-hidroximetil-5-isopropilisoxazol (0,9 g, 3,2 mmol) y trifenilfosfina (0,84 g, 3,2 mmol) en diclorometano (10 mL) con azodicarboxilato de diisopropilo (0,63 mL, 3,2 mmol) gota a gota. Se observó una breve reacción exotérmica y se agitó la reacción a temperatura ambiente 4 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice usando diclorometano como fase móvil. Rendimiento = 0,86 g, (63%) de 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-cloro-4'-formilfenoxi)-metil-5-isopropilisoxazol.

Se agitó metil-3-bromometilbenzoato (14 g, 61 mmol) en trietilfosfito (12 mL, 70 mmol) a 185°C durante 4 horas. Se eliminó el exceso de trietilfosfito mediante destilación a vacío (20 Pa, 145°C) y el aceite resultante se usó sin ninguna purificación adicional. Rendimiento = 17,5 g, (100%) de (3-metoxycarbonil)benzilfosfonato de dietilo.

Se trató una disolución de (3-metoxycarbonil)benzilfosfonato de dietilo (0,68 g, 2,4 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL) con hidruro de sodio (0,1 g, 2,5 mmol, dispersión al 60% en aceite). Se observó un desprendimiento vigoroso de gas. Una vez que finalizó el burbujeo, se añadió gota a gota 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-cloro-4'-formilfenoxi)-metil-5-isopropilisoxazol (0,85 g, 2 mmol) en forma de disolución en tetrahidrofurano (3 mL) y se agitó la reacción 5 horas a temperatura ambiente. Se diluyó el volumen a 70 mL con acetato de etilo y la mezcla se lavó con agua (50 mL), bisulfato sódico saturado (20 mL) y salmuera (50 mL). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se condensó hasta obtener un aceite. Este material se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice usando diclorometano como fase móvil. Rendimiento = 0,95 g, (86%) de 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-carbometoxi-2-cloroetilben-4-il)oximetil-5-isopropilisoxazol.

Se trató una disolución de (6,3 g, 11,3 mmol) en tetrahidrofurano (25 mL) con hidróxido de litio (25 mL, 1 M en agua) y se agitó la mezcla vigorosamente a temperatura ambiente 24 horas. Se eliminó el tetrahidrofurano a vacío y el residuo resultante se partió entre acetato de etilo (300 mL), agua (100 mL) y bisulfato sódico saturado (5 mL). La fase orgánica se lavó con agua (50 mL), salmuera (50 mL), a continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se condensó para producir un residuo amarillo. El producto se purificó mediante cromatografía

flash sobre gel de sílice usando acetato de etilo como fase móvil. Rendimiento = 6,0 g, (98%) de 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-carboxi-2-cloroestilben-4-il)oximetil-5-isopropil-isoxazol.

El GW4064 activa FXR de roedor con una concentración efectiva mitad del máximo (EC_{50}) de aproximadamente 300 nM en ensayos de informador basados en células. Se han examinado tejidos de ratas tratadas con vehículo o con GW4064 para determinar los genes que se expresan de forma diferenciada. Los genes diana de FXR se han identificado en el hígado y en el intestino, dos tejidos en los que el FXR se expresa de forma abundante. Nuestros datos proporcionan evidencias de un amplio papel del FXR en la homeostasis y digestión de lípidos. Además, nuestros datos indican utilidades para los ligandos de FXR en el tratamiento de enfermedades asociadas a una homeostasis y a una digestión de lípidos afectada/alterada.

Se trataron ratas Fischer solamente con vehículo o con 30 mg/Kg del ligando selectivo de FXR GW4064 durante 7 días. Al final del estudio se determinaron los niveles de lípido en suero. Los niveles de triglicéridos en suero disminuyeron en un 26% en los animales tratados con GW4064. De forma similar, los ácidos biliares naturales, que actúan como ligandos de FXR, disminuyeron los niveles de triglicéridos cuando se administraron a roedores o al hombre (Iser y Sali, 1981). Nuestros datos con el ligando de FXR no esteroideo GW4064 demuestran que el FXR media en los efectos reductores de triglicéridos de los ácidos biliares.

Se extrajeron los hígados y los intestinos delgados de ratas Fischer tratadas con GW4064 y con vehículo y se preparó ADNc. Se empleó tecnología Curagen GeneCall para identificar los genes que se vieron regulados de forma diferencial por efecto de GW4064 en dichos tejidos.

Intestino

Se identificaron unos veinte genes en el intestino que eran regulados por GW4064 en >1,5 veces (Tabla 2). La expresión de aproximadamente la mitad de dichos genes disminuyó con el tratamiento con GW4064. Cabe destacar que todos estos genes regulados a la baja están implicados en la absorción de lípidos o en la proteólisis de lípidos. Entre los genes implicados en la absorción de lípidos hay tres lipasas (lipasa, lipasa pancreática y fosfolipasa pancreática A2), una colipasa y la proteína intestinal de unión de ácidos grasos. Las proteasas carboxipeptidasa A1, carboxipeptidasa A2, carboxipeptidasa B, tripsina pancreática I, tripsinógeno catiónico, tripsinógeno pancreático II, elastasa I y elastasa II se vieron todas reguladas a la baja en ≥ 2 veces. Finalmente, la amilasa pancreática, que hidroliza almidones y glicógeno, fue regulada a la baja en >8 veces. En conjunto, estos datos proporcionan evidencias de que el FXR desempeña un papel importante en la regulación coordinada de la digestión en el intestino delgado, que incluye el metabolismo de los ácidos grasos, las proteínas y los carbohidratos. Además, estos datos sugieren que los ácidos biliares, como ligandos naturales de FXR, tienen un papel en la regulación de la digestión en el intestino delgado más importante de lo apreciado previamente.

Entre los genes cuya expresión aumentó por el GW4064 en el intestino, se encontraba el gen establecido previamente como diana de FXR, el IBABP. La expresión de sintetasa de escualeno hepática, una enzima esencial para la biosíntesis de colesterol, y de compañero heterodimerizante corto 1 (SHP-1) de receptor nuclear huérfano también se vieron incrementadas en el intestino. El SHP-1 puede estar implicado en la regulación a la baja coordinada de genes modulados por receptores nucleares, tal como se discute más adelante.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

A. Genes regulados a la baja en el hígado

apolipoproteína B-2,7

plasma proteinasa inhibidor alfa-1-inhibidor III grupo 3 (m22360) -2,7

L-gulono-gamma-lactona oxidasa (d12754) -2,2

Peroxisomal enoil-CoA:hidrotasa-3-hidroxiacil-CoA bifuncional
enzima (k03249) -2,0

proteína hepática de unión de ácidos grasos (L-FABP, m13501) -2,0

CYP4A2 (m57719) -1,9

CYP3A23 (x96721) -1,8

CYP3A1 (x64401) -1,6

B. Genes regulados al alza en el hígado

Homólogo de compañero de heterodímero pequeño (d86580) +6,6

proteína de respuesta al crecimiento inducido por insulina, CL-6 (l13619) +5,9

factor de elongación 2, EF-2 (y07504) +4,3

cornichon de ratón +4,0

receptor de proteína quinasa C (u03390) +3,1

mitocondrial citocromo c oxidasa (m27315) +2,7

cistationa gamma-liasa (x53460, d17370) +2,3

carboxiquinasa de fosfoenolpiruvato citosólico (k03243) +2,1

histidasa (m58308) +2,1

S-adenosilmetionina sintetasa (x60822) +2,0

lanosterol 14-alfa-demetilasa (u17697)+1,9

purinoreceptor P2U acoplado a proteína G (l46865) +1,9

sintetasa hepática de escualeno (m95591) +1,5

Hígado

Al contrario que con el intestino, la mayoría de los genes hepáticos cuya expresión se vio afectada por GW4064 fueron regulados al alza (Tabla 3). La expresión del gen que codifica el receptor nuclear huérfano SHP-1 fue la que más aumento, casi 7 veces su valor inicial. El SHP-1 se clonó originalmente en un ensayo de dos híbridos de levadura basado en su interacción con el receptor nuclear huérfano CAR (Seol y col., 1996). Al contrario que la mayoría de los receptores nucleares, el SHP-1 carece de un dominio de unión de ADN. Además de con el CAR, el SHP-1 interacciona con otros receptores nucleares que incluyen receptor de hormona tiroidea, receptor de ácido retinoico, RXR, receptor de estrógeno α , receptor de estrógeno β , receptor α activado por peroxisoma proliferador, y receptor nuclear de hepatocite 4 α . En los ensayos basados en células, el SHP-1 inhibe de forma significativa la transactivación por los miembros de la familia con los que interacciona (Johansson y col., 1999; Masuda y col., 1997; Seol y col., 1996). Por tanto, la inducción de expresión de gen SHP-1 por acción de ligandos de FXR puede, a su vez, dar como resultado un descenso de la expresión de genes regulados por receptores nucleares. Probablemente este mecanismo tiene importantes implicaciones en la regulación de la expresión de gen CYP7a por ácidos biliares (ver más adelante).

TABLA 3

Genes que tienen una expresión alterada en el intestino:

5	lipasa (x61925) -9,5
	lipasa pancreática (d88534) -4,4
10	colipasa (m58370) -10,2
	fosfolipasa pancreática A-2 (d00036) -7,4
	amilasa pancreática (m24962) -8,1
15	Carboxipeptidasa A1 (m23986) -6,1
	Carboxipeptidasa A2 (m23721) -5,4
	Carboxipeptidasa B (m23959) -4,2
20	tripsina pancreática I (j00778) -6,8
	tripsinógeno catiónico pancreático (m16624)
25	tripsinógeno pancreático II (v01274) -3,6
	elastasa I (v01234, 100112) -2,0
	elastasa II (I00118, I00124) -4,6
30	I-BABP (I22788) +2,3
	proteína intestinal de unión de ácidos grasos (FABP, k01180) -1,8
	sintetasa hepática de escualeno (m95591) +1,9
35	receptor de proteína quinasa C (u03390) +1,6
	factor de elongación 2, EF-2 (y07504) +2,4
40	Homólogo de compañero de heterodímero pequeño (d86580) +2,2

El tratamiento con GW4064 indujo la expresión de dos enzimas requeridas para la biosíntesis de colesterol desde cero, lanosterol 14-alfa demetilasa y escualeno sintetasa.

El tratamiento con GW4064 aumentó la expresión de una serie de genes cuyos productos tienen unas funciones bien establecidas en varios procesos celulares que incluyen el metabolismo de aminoácidos (cistationasa, histidasa, S-adenosilmetionina), la biosíntesis de glucosa (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), la traducción de proteínas (factor de elongación 2) y el transporte electrónico (citocromo c oxidasa mitocondrial). El tratamiento con GW4064 también aumentó la expresión de la proteína de unión de proteína quinasa C activada RACK1, el receptor P2U ATP, cornichon y proteína de respuesta al crecimiento inducido por insulina CL-6. El último gen es interesante por expresarse abundantemente en hepatocitos en proliferación durante el desarrollo y la regeneración.

Consistentemente con la regulación a la baja observada para los genes implicados en la absorción de ácidos grasos en el intestino, el tratamiento con GW4064 disminuyó la expresión de genes implicados en el metabolismo hepático de ácidos grasos, que incluye la oxidación de ácidos grasos (proteína bifuncional peroxisomal, CYP4A2), su transporte (proteína de unión de ácidos grasos) y su secreción (apolipoproteína B). Por tanto, el FXR parece tener un papel coordinado en la regulación de la homeostasis de ácidos grasos en el intestino y en el hígado. El tratamiento con GW4064 también disminuyó la expresión de genes implicados en el metabolismo de esteroides y xenobióticos (CYP3A23), en la biosíntesis de vitamina C (L-gulono-gamma-lactona oxidasa) y en la respuesta inflamatoria (inhibidor de plasma proteinasa alfa-1-inhibidor grupo III).

Resultados

Nuestros resultados implican al FXR, y por extensión a sus ligandos de ácido biliar, en la regulación coordinada de genes implicados en la absorción y la digestión de lípidos en el intestino delgado y en la homeostasis de lípidos en el hígado. Además, nuestros resultados sugieren varios mecanismos mediante los cuales el FXR puede regular la expresión de CYP7a en el hígado.

Absorción y digestión de lípidos

Nuestros datos indican que el FXR regula un programa de genes implicados en procesos digestivos en el intestino delgado. Así, se ha esbozado un modelo para los efectos del FXR en el intestino delgado. La ingestión de ácidos grasos de la dieta da como resultado la liberación de colecistoquinina (CCK) desde células endocrinas especializadas del intestino delgado. La CCK, a su vez, produce la liberación de proteasas requeridas para la digestión y la contracción de la vesícula, lo que libera ácidos biliares en el duodeno. Los ácidos biliares liberados pueden activar FXR y producir descensos de la expresión de lipasas, una colipasa y proteasas en el intestino delgado. Por tanto, el FXR puede actuar como un regulador central de la regulación por retroalimentación de la digestión, detectando los ácidos biliares liberados durante el curso de la digestión y reduciendo la expresión de los genes implicados en la digestión y en la absorción de ácidos y grasos y proteínas. Es bien sabido que un aumento de los ácidos biliares reduce los niveles de triglicéridos en los mamíferos (Iser y Sali, 1981). El presente modelo sugiere que dicha reducción de los niveles de triglicéridos se deben en parte a una menor absorción de los ácidos grasos en el intestino delgado.

Los presentes datos también indican que el FXR tiene efectos coordinados sobre la regulación del metabolismo de ácidos grasos en el hígado. En consistencia con la absorción reducida de lípidos en el intestino, los niveles de expresión de los genes implicados en la oxidación hepática de ácidos grasos, en su transporte (proteína hepática de unión de ácidos grasos) y en su secreción (apopB) se ven reducidos por efecto de un ligando de FXR.

Implicaciones de FXR en la regulación de CYP7a

Por tanto se pueden deducir dos posibles mecanismos para la retroalimentación de los ácidos biliares y para regular la expresión de CYP7a. En primer lugar, la expresión del receptor huérfano SHP-1 se vio drásticamente reducida en los hígados de ratas tratadas con GW4064. El SHP-1 es conocido por heterodimerizarse con una serie de receptores nucleares y suprimir su actividad, que incluyen el receptor de hormona tiroidea y el receptor nuclear de hepatocito 4 α , implicados ambos en la regulación de la expresión de CYP7a (Johansson y col., 1999; Masuda y col., 1997; Seol y col., 1996). La presente invención proporciona que la expresión de SHP-1 también se vio aumentada en el intestino delgado de las ratas tratadas con GW4064. Los aumentos mediados por FXR de la expresión génica de SHP-1 pueden responder en parte por la regulación a la baja de la expresión génica que se observa en el hígado y en el intestino de ratas tratadas con GW4064. Un extensión interesante es que los compuestos que se unen a SHP-1 y bloquean su actividad para antagonizar otros receptores nucleares pueden tener una utilidad terapéutica en la regulación al alza de la expresión de CYP7a y en el aumento del metabolismo de colesterol a ácidos biliares.

El tratamiento con GW4064 también produjo aumentos en la expresión de RACK1, que se une a proteína quinasa C activada. El RACK1 es una proteína lanzadera que traslada a la proteína quinasa C activada entre posiciones intracelulares (Rodríguez y col., 1999). De forma interesante, se ha demostrado que la activación de proteína quinasa C reprime la expresión de CYP7a en cultivos primarios de hepatocitos de rata y que inhibe el flujo biliar en el modelo de hígado de rata perfusionado (Bouscarel y col., 1999). Por tanto, los efectos mediados por FXR sobre los mecanismos de señalización de la proteína quinasa C pueden afectar a la expresión de CYP7a y quizás de otros genes.

Los compuestos de Fórmula (I) ó (II) pueden sintetizarse usando técnicas estándares de química orgánica. Se puede emplear una estrategia convergente en la que se preparan de forma independiente un hidroxiestilbeno y un hidroximetilisoxazol y a continuación se condensan usando un acoplamiento de Mitsunobu para generar un enlace éter. Los compuestos con enlaces anilino pueden prepararse convirtiendo el residuo hidroxilo de un hidroximetilisoxazol en un grupo saliente, tal como bromuro o mesilato, seguido de una reacción con un aminoetilbeno.

Los hidroximetilisoxazoles se pueden preparar mediante la condensación de enolatos de β -ceto éster con un ácido hidroxímico α -halo-sustituido. Los ésteres resultantes pueden reducirse a un alcohol con un agente reductor de hidruro metálico tal como DIBAL.

Los hidroxiestilbenos pueden prepararse mediante acoplamiento de Horner-Wadsworth-Emmons de un aldehído de arilo y un éster de fosfonato de arilmetileno, o mediante acoplamiento de Heck de un estireno con un arilbromuro, yoduro o triflato en presencia de un catalizador de paladio. Usando métodos químicos estándares, se puede incorporar tritio o iodo 125 a los compuestos de fórmula (I) y (II).

Los compuestos de Fórmula (I) ó (II) y sus derivados farmacéuticamente aceptables se administran de modo conveniente en forma de composiciones farmacéuticas. Así, en otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) ó (II) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo adaptado para uso en seres humanos o en medicina veterinaria. De modo conveniente, dichas composiciones se pueden presentar para su uso de manera convencional en mezcla con uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables.

Los compuestos de Fórmula (I) ó (II) y sus derivados farmacéuticamente aceptables se pueden formular para su administración en cualquier manera adecuada. Se pueden formular, por ejemplo, para administración tópica o administración por inhalación o bien, más preferiblemente, para administración oral, transdérmica o parenteral. La composición farmacéutica puede estar en una forma tal que pueda efectuar la liberación controlada de los compuestos de la Fórmula (I) y (II) y sus derivados farmacéuticamente aceptables. Un método de administración particularmente preferido, y la correspondiente formulación, es la administración oral.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede administrarse en forma de, por ejemplo, comprimidos (que incluyen comprimidos sublinguales) y cápsulas (que incluyen formulaciones de liberación controlada y de liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tintes, emulsiones, disoluciones, jarabes o suspensiones, preparados empleando métodos convencionales con excipientes aceptables.

5 Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente del fármaco activo se puede combinar con un vehículo oral, inerte, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico triturado de manera similar tal como un carbohidrato comestible, como por ejemplo, almidón
10 o manitol. También pueden estar presentes agentes aromatizantes, conservantes, dispersantes y colorantes.

Las cápsulas pueden fabricarse preparando una mezcla en polvo como se ha descrito anteriormente, y rellenando envoltorios de gelatina con forma. A la mezcla de polvo se le pueden añadir deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido antes de la operación de llenado.
15 También se puede añadir un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

Además, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico, y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, goma agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo,
20 granulando o aplastando la mezcla, añadiendo un lubricante y disgregante y prensando para obtener comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, convenientemente triturado, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un agente para retardar la disolución tal como parafina, un acelerador de la resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo se
30 puede granular mediante humectación con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de goma arábiga o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y haciéndola pasar a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo se puede procesar a través de la máquina de comprimir siendo el resultado bloques formados imperfectamente que se rompen formando gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para prevenir la adherencia a las matrices que forman los comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime luego en comprimidos. Los compuestos de la presente invención
35 también pueden combinarse con un vehículo fluido inerte y comprimirse en comprimidos directamente sin pasar a través de las etapas de granulación o aplastamiento. Puede proporcionarse un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento sellante de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento pulido de cera. A estos recubrimientos se les pueden añadir colorantes para distinguir diferentes unidades de dosificación.
40

Los fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria de manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa convenientemente aromatizada, mientras que los elixires se
45 preparan por medio del uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También pueden usarse solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietileno sorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta o sacarina, y similares.

50 Cuando sea apropiado, se pueden microencapsular las formulaciones de dosificación unitaria para administración por vía oral. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación, por ejemplo recubriendo el material en forma de partículas con polímeros, ceras o similares, o incluyéndolo en los mismos.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas monolaminares pequeñas, vesículas monolaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de liberación de emulsión de liposomas, tales como vesículas monolaminares pequeñas, vesículas monolaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.
60

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse por medio del uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles, en calidad de vehículos dirigibles de fármacos. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímeros de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol, o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituido con restos palmitoílo. Además, los compues-
65

tos de la presente invención se pueden combinar con una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo poli(ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona), poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que contienen de 0,1 a 99,5%, más particularmente de 0,5 a 90%, de un compuesto de la fórmula (II) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De igual forma, la composición también puede administrarse en forma de administración nasal, oftálmica, ótica, rectal, tópica, intravenosa (tanto en embolada como de infusión), intraperitoneal, intraarticular, subcutánea o intramuscular, inhalación o insuflación, usando formas bien conocidas para los especialistas habituales en las técnicas farmacéuticas.

Para la administración transdérmica, la composición farmacéutica puede ser administrada en forma de un parche transdérmico, tal como un parche transdérmico iontoforético.

Para la administración parenteral, la composición farmacéutica se puede administrar como una inyección o una perfusión continua (por ejemplo por vía intravenosa, por vía intravascular o por vía subcutánea). Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Para la administración por inyección pueden tomar la forma de una presentación de dosis unitaria o como una presentación de dosis múltiple preferiblemente con un conservante añadido. Alternativamente, para la administración parenteral el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para ser reconstituido con un vehículo adecuado.

Los compuestos de la invención también se pueden formular como una preparación de depósito. Estas formulaciones de actuación prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Alternativamente, la composición puede formularse para aplicación tópica, por ejemplo en forma de pomadas, cremas, lociones, pomadas oculares, gotas oculares, gotas para el oído, enjuagues bucales, recubrimientos y suturas y aerosoles impregnados, y puede contener aditivos convencionales apropiados que incluyen, por ejemplo, conservantes, disolventes para facilitar la penetración del fármaco, y emolientes para pomadas y cremas. Dichas formulaciones tópicas también pueden contener vehículos convencionales compatibles, por ejemplo, bases de crema o pomada, y etanol o alcohol olefílico para lociones. Dichos vehículos pueden constituir de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 98% en peso de la formulación; más a menudo constituirán hasta aproximadamente el 80% en peso de la formulación.

Para administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, tetrafluoroetano, heptafluoropropano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas generalmente se administran en una cantidad efectiva para el tratamiento o profilaxis de una afección o afecciones específicas. La dosificación inicial en humanos va acompañada de una monitorización clínica de los síntomas de la afección seleccionada. En general, las composiciones se administran en una cantidad de agente activo de al menos aproximadamente 100 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal. En la mayoría de los casos se administrarán en una o más dosis en una cantidad que no esté en exceso de aproximadamente 20 mg/Kg de peso corporal al día. Preferiblemente, en la mayoría de los casos, la dosis va de aproximadamente 100 $\mu\text{g/Kg}$ a aproximadamente 5 mg/Kg de peso corporal diarios. Para la administración particular a mamíferos, y particularmente a humanos, se espera que el nivel de dosis diaria del agente activo esté entre 0,1 mg/Kg y 10 mg/Kg, y típicamente alrededor de 1 mg/Kg. Debe apreciarse que la dosis óptima se determinará mediante métodos estandarizados para cada modalidad de tratamiento e indicación, teniendo en cuenta la indicación, la gravedad, la ruta de administración, condiciones de complicación y similares. El médico determinará en cada caso la dosis real que será más adecuada para un individuo y variará con la edad, el peso y la respuesta de cada individuo particular. La eficacia de una dosis real seleccionada puede determinarse fácilmente, por ejemplo, midiendo síntomas clínicos o indicios anti-inflamatorios estándares después de la administración de la dosis seleccionada. Las anteriores dosis son ejemplos del caso promedio. Por supuesto, puede haber ejemplos individuales en los que se necesiten intervalos de dosis mayores o menores, y quedan contemplados dentro del alcance de esta invención. Para afecciones o estados de enfermedad como los tratados por la presente invención, el mantenimiento de niveles diarios consistentes en un sujeto a lo largo de un periodo de tiempo extendido, por ejemplo con un régimen sostenido, puede ser particularmente beneficioso.

ES 2 326 850 T3

Por “cantidad terapéuticamente efectiva” se pretende indicar una cantidad de un compuesto que alivie un síntoma o que reduzca un síntoma, una cantidad que reduzca el colesterol, una cantidad que bloquee la absorción de ácidos grasos, una cantidad que bloquee la digestión de proteínas y/o carbohidratos, y/o una cantidad que bloquee la biosíntesis de colesterol desde cero. Dichas cantidades pueden determinarse fácilmente empleando métodos estándares, tales como midiendo los niveles de colesterol u observando una mejora de los síntomas clínicos. Por ejemplo, el responsable clínico puede monitorizar puntuaciones de medidas aceptadas para los tratamientos de dichas enfermedades, trastornos y afecciones.

Las abreviaturas usadas en los ejemplos se muestran a continuación.

ACTR	Activador de los Receptores Retinoides y de Hormona Tiroidea
AIB1	Amplificado en Cáncer de Mama
APC	Aloficocianina
APMSF	p-Amidinofenilmetilsulfonilfluoruro, HCl
Bestatina	[(2S,3R)-3-Amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil]-Leucina
BSA	albúmina de suero bovino
CHAPS	(3-[3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CPM	cuentas por minuto
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FXR	Receptor Farnasoide X
IBTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LBD	dominio de unión de ligando
LXR	Receptor X hepático
DO ₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
PBS	disolución salina tamponada con fosfato [NaFosfato 100 mM, pH 7,2, NaCl 50 mM]
pCIP	Proteína Co-Integradora
RAC	Cofactor Activado de Receptor
RPM	revoluciones por minuto
RXR	Receptor Retinoide X
SA-APC	Aloficocianina Reticulada con Estreptavidina
SPA	Ensayo de Proximidad por Centelleo
SRC	Cofactor de Receptor Esteroideo
TIF	Factor Intermediario Transcripcional
Tris	tris-(Hidroximetil)aminometano

Se anotan las siguientes referencias y la descripción completa de cada una de ellas es incorporada a la presente memoria a modo de referencia:

1. **Apfel., R.H., Benbrook; D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G. y Pfahl, M.** "A novel orphan receptor specific for a subset of TREs and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor superfamily" *Mol. Cell. Biol.* 14, 7025-7035 (1994).
2. **Willy PJ. Umesono K. Ong ES. Evans RM. Heyman RA. Mangelsdorf DJ.** "LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway" *Genes & Development.* 9: 1033-45 (1995).
3. **Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A. y Schmidt, A.** "NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor" *Gene* 147, 273-276 (1994).
4. **Janowski BA. Willy PJ. Devi TR. Falck JR. Mangelsdorf DJ.** "An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha" *Nature.* 383: 728-31, (1996).
5. **Lehmann JM. Kliewer SA. Moore LB. Smith-Oliver TA. Oliver BB. Su JL. Sundseth SS. Winegar DA. Blanchard DE. Spencer TA. Willson TM.** "Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway" *Journal of Biological Chemistry.* 272: 3137-40 (1997).
6. **Mangelsdorf, D.J. y Evans, R.M.** "The RXR Heterodimers and Orphan Receptors" *Cell* 83: 841-850 (1995).
7. **Mukherjee R, Davies, P.J., Crombie, D.L., Bischoff, E.D., Cesario, R.M., Jow, L., Hamann, L.G., Boehm, M.F., Mondon, C.E., Nadzan, A.M., Paterniti Jr., J.R. y Heyman R.A.** Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386: 407-410 (1997).
8. **Forman BM. Goode E. Chen J. Oro AE. Bradley DJ. Perlmann T. Noonan DJ. Burka LT. McMorris T. Lamph WW. y col.** "Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites" *Cell* 81: 687-693 (1995).
9. **C. K. Glass, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld,** Curr. Opin. *Cell Biol.* 9, 222 (1997); **D. Moras y H. Gronemeyer,** Curr. Opin. *Cell Biol.* 10, 384 (1998).
10. **B. Le Douarin y col.,** EMBO J. 15, 6701 (1996); **D. M. Heery, E. Kalkhoven, S. Hoare, M. G. Parker,** Nature 387, 733 (1997); **G. Krey y col.,** *Mol. Endocrinol.* 11, 779 (1997).
11. **E. Soini, I. Hemmila, P. Dahlen,** *Ann. Biol. Clin.* 48, 567 (1990); **E. F. Gudgin Dickson, A. Pollak, E. P. Diamandis,** *J. Photochem. Photobiol.* 27, 3 (1995).
12. **G. Zhou y col.,** *Mol. Endocrinol.* 12, 1594 (1998); **L. Paige y col.,** *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96, 3999 (1999).
13. **Bouscarel, B., Kroll, S. D. y Fromm, H.** (1999). Signal transduction and hepatocellular bile acid transport: cross talk between bile acids and second messengers. *Gastroenterology* 117, 433-452.
14. **Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S. J., Kliewer, S. A., Willson, T. M., Ono, T. y Besnard, P.** (1999). Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 29749-29754.
15. **Iser, J. H. y Sali, H.** (1981). Chenodeoxycholic acid: a review of its pharmacologic properties and therapeutic use. *Drugs* 21, 90-119.
16. **Johansson, L., Thomsen, J. S., Damdimopoulos, A. E., Spyrou, G., Gustafsson, J.-A. y Treuter, E.** (1999). The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ER α and ER β . *J. Biol. Chem.* 274, 345-353.
17. **Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J. y Shan, B.** (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-1365.
18. **Masuda, N., Yasumo, H., Tamura, T., Hashiguchi, N., Furusawa, T., Tsukamoto, T., Sadano, H. y Osumi, T.** (1997). An orphan nuclear receptor lacking a zinc-finger DNA-binding domain: interaction with several nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1350, 27-32.
19. **Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D. y Lehmann, J. M.** (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365-1368.

20. **Rodriguez, M. M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C. H. y Mochly-Rosen, D. (1999).** RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains *in vitro*. *Biochemistry* 38, 13787-13794.

21. **Russell, D. W. (1999).** Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell* 97, 539-542.

22. **Seol, W., Choi, H.-S. y Moore, D. (1995).** Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* 9, 72-85.

23. **Seol, W., Choi, H.-S. y Moore, D. D. (1996).** An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heeterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336-1339.

24. **Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C. y Forman, B. M. (1999).** Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BXR. *Mol. Cell* 3, 543-553.

25. **Goldstein, J.L. y Brown, M.S.,** *Nature* 343: 425-430 (1990).

26. **Lehmann, J. M. y col. J. Biol. Chem.** 270: 12953 (1995).

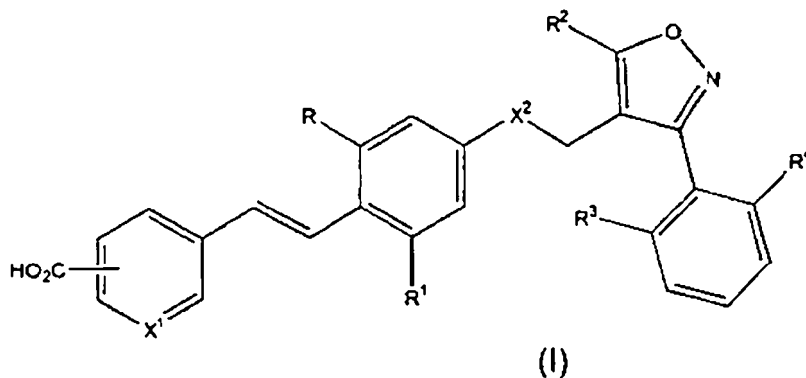
27. **Zavacki, A.-M. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 7909 (1997).

28. **Fujita, M. y col. Eur. J. Biochem.** 233: 406-413 (1995).

29. **Mathis, G. (1993) Clin. Chem.** 39,1953-1959.

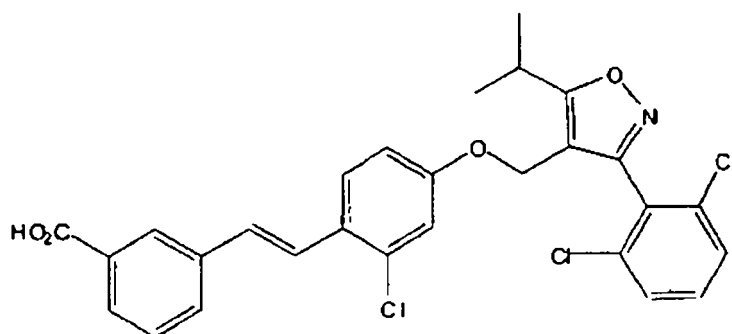
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



en la que X^1 es CH, N; X^2 es O ó NH; R y R^1 son de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno ó CF_3 ; R^2 es alquilo inferior; R^3 y R^4 son de forma independiente H, alquilo inferior, halógeno, CF_3 , OH, O-alquilo ó O-polihaloalquilo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula:



3. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene una marca detectable.

4. Un compuesto de fórmula (I) para uso en la regulación del sistema de transporte biliar en un mamífero, que comprende la activación del Receptor Farnesoide X.

5. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de un mamífero con una enfermedad que se ve afectada por los niveles de colesterol, triglicéridos o ácidos biliares.

6. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el bloqueo de la absorción de ácidos grasos en el intestino de un mamífero que necesite dicho bloqueo.

7. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de dislipidemia, obesidad o aterosclerosis.

8. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el bloqueo de la digestión de proteínas y carbohidratos en el intestino de un mamífero que necesite dicho bloqueo.

9. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de obesidad.

10. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el bloqueo de la síntesis desde cero de colesterol en el hígado de un mamífero que necesite dicho bloqueo.

11. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el bloqueo de la inducción de la expresión de SHP-1 en un mamífero que necesite dicho bloqueo.

12. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el bloqueo de la represión de CYP7A mediada por SHP-1 en un mamífero que necesite dicho bloqueo.

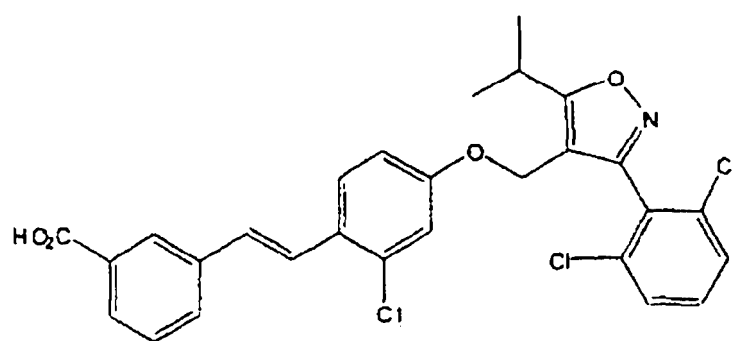
13. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12 para uso en la reducción de los niveles de colesterol en suero en un mamífero.

14. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso en el tratamiento de aterosclerosis o de piedras en la vesícula.

15. Un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno modulado por FXR.

16. Un compuesto de fórmula (I) para uso en la modulación de un gen cuya expresión está regulada por FXR en un mamífero.

17. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-16, en las que el compuesto es el siguiente compuesto (Fórmula (II)):



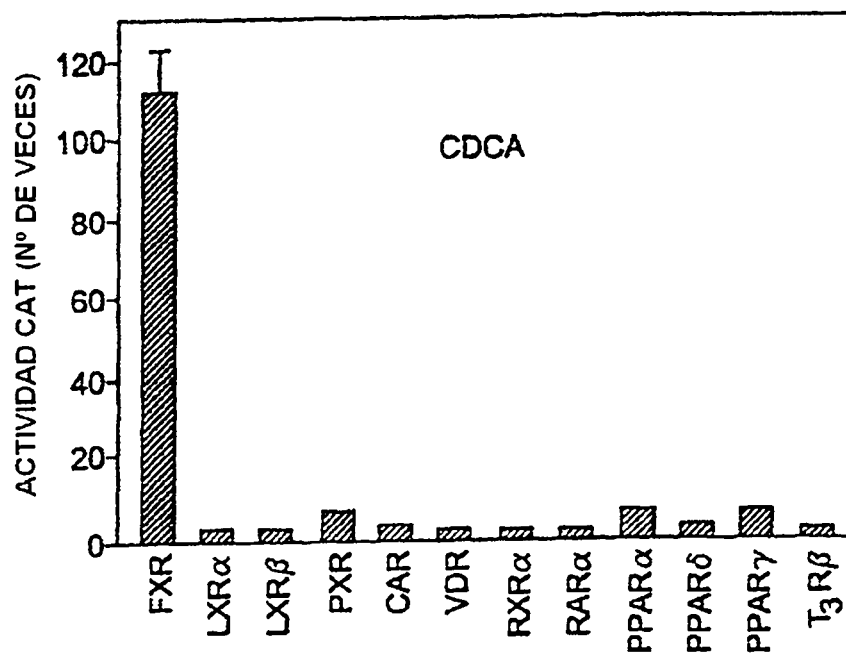


FIGURA 1

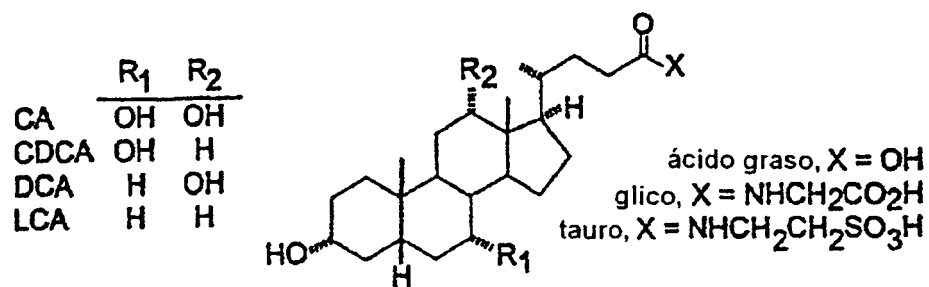


FIGURA 2A

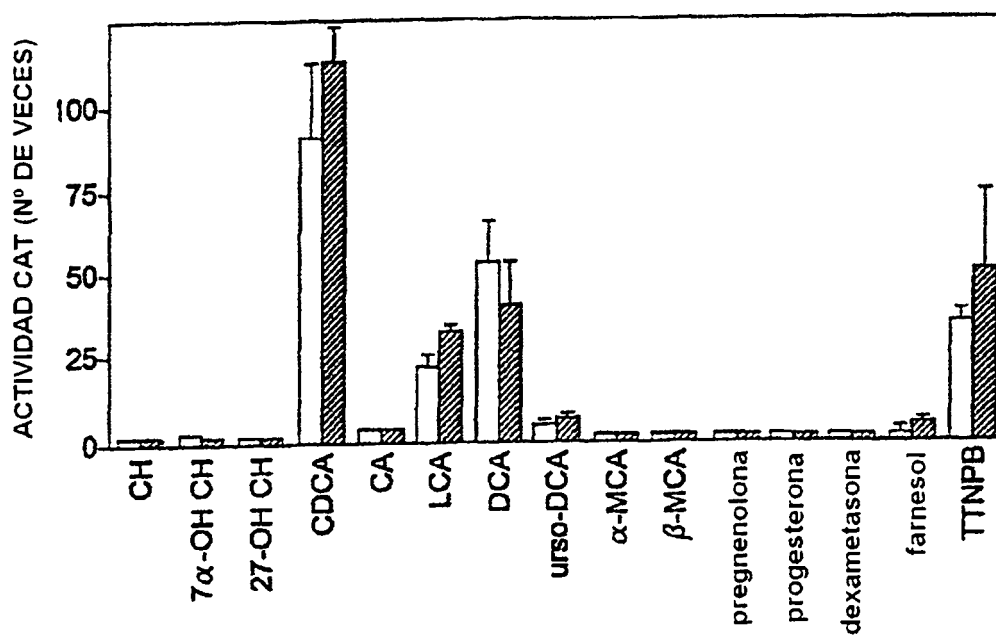


FIGURA 2B

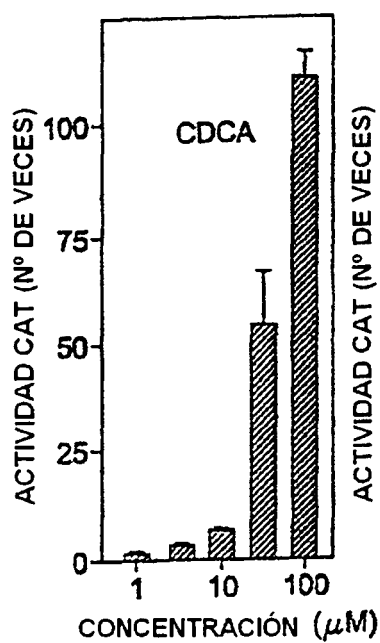


FIG. 2C.

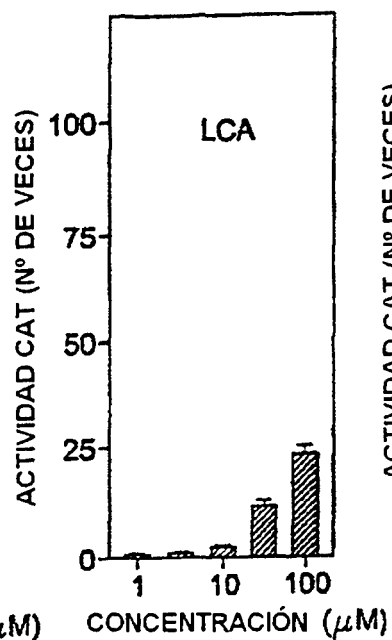


FIG. 2D.

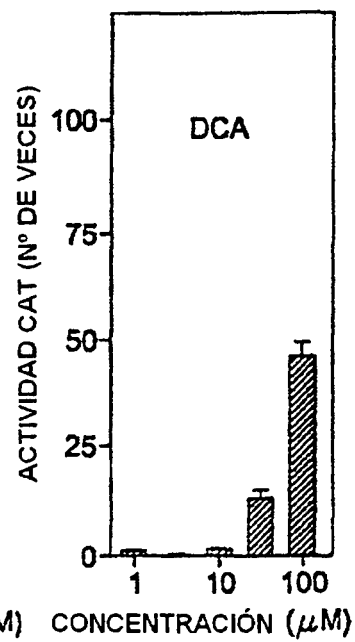
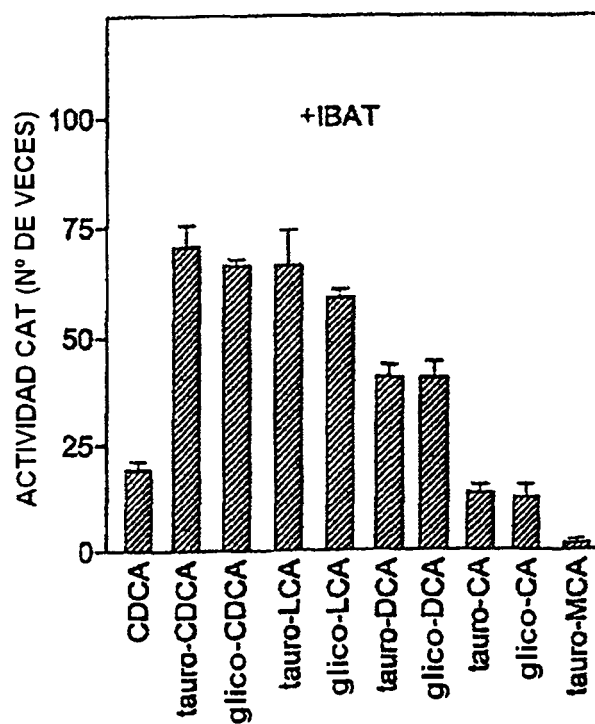
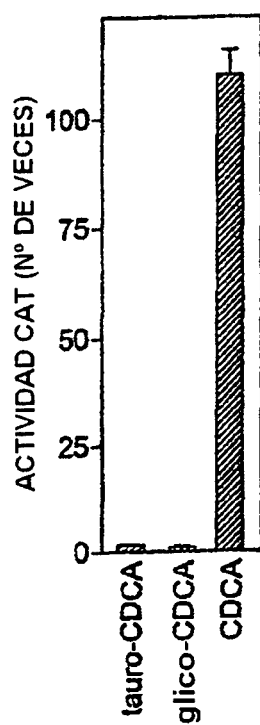


FIG. 2E.



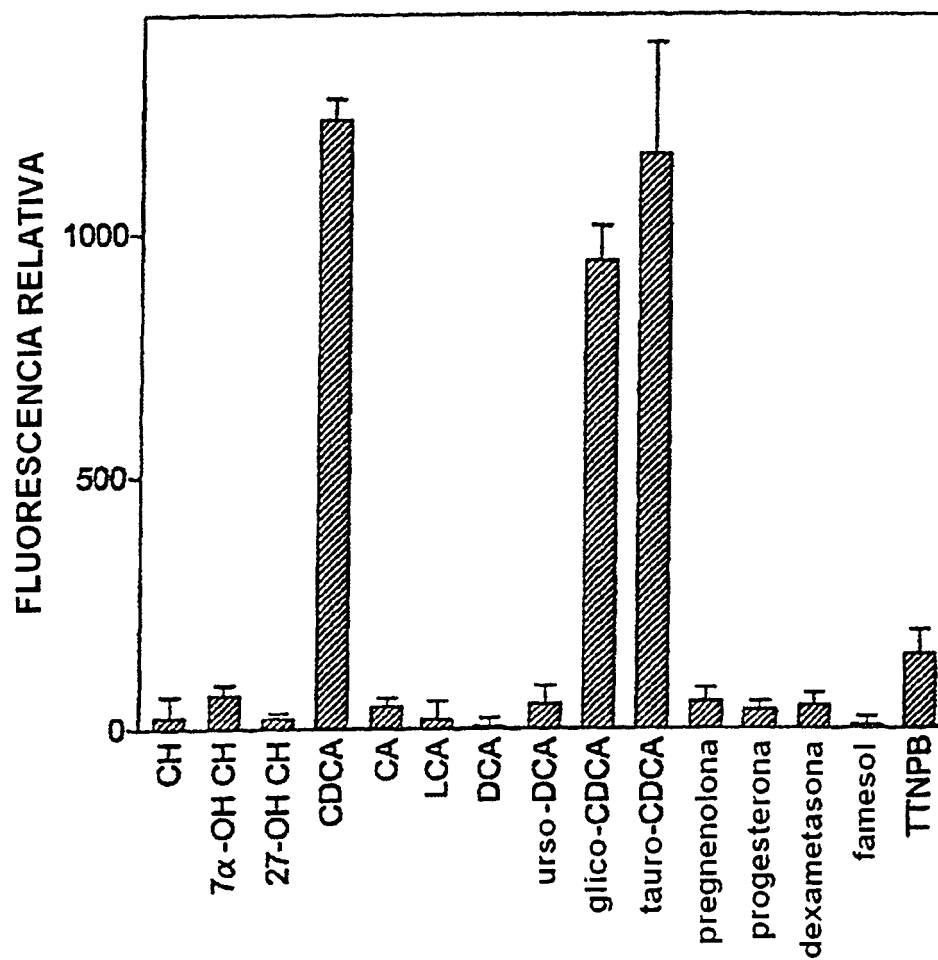


FIGURA 3A

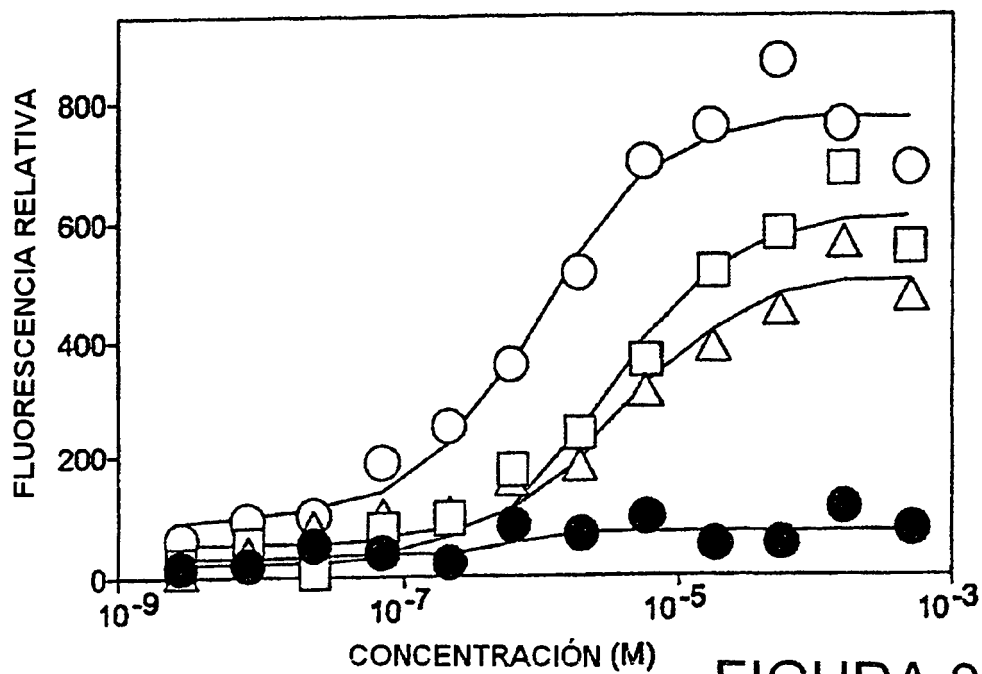


FIGURA 3B

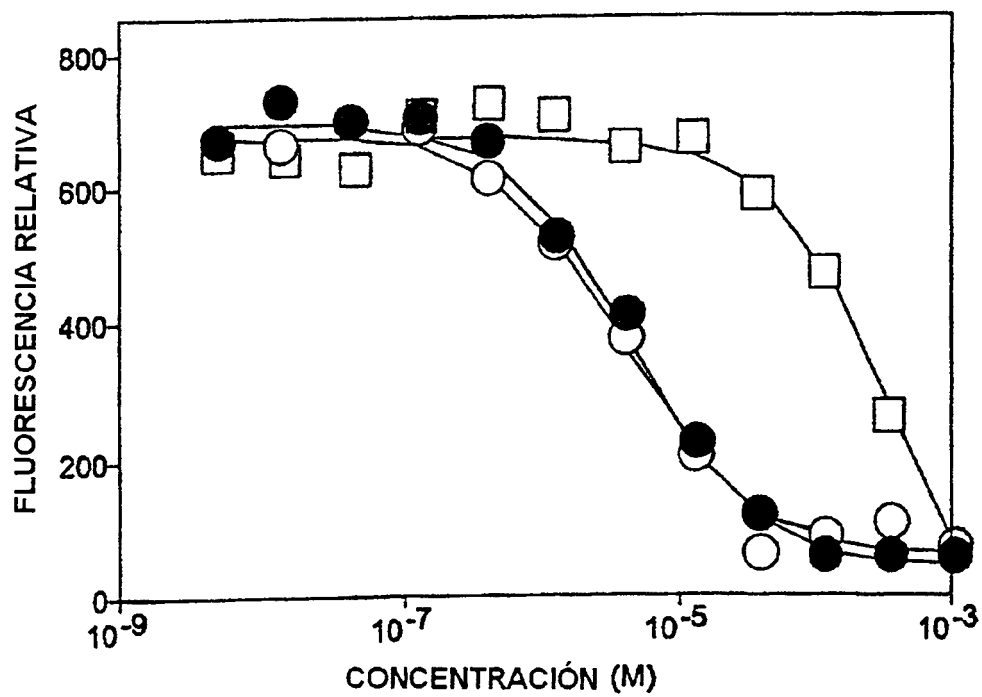


FIGURA 3C

FIGURA 4A

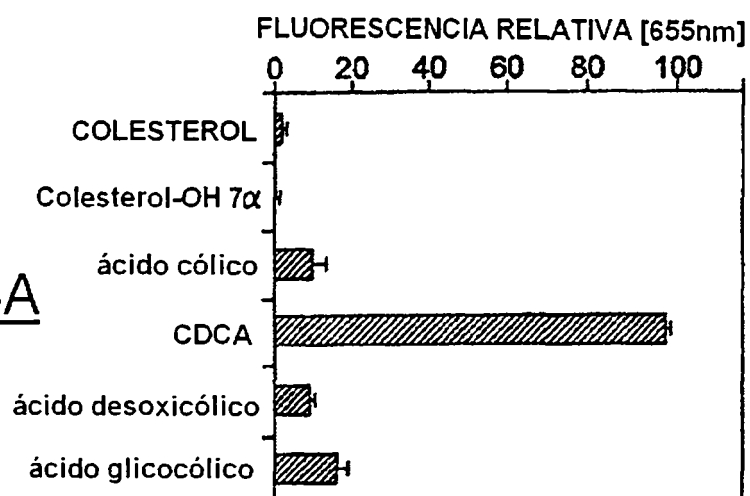


FIGURA 4B

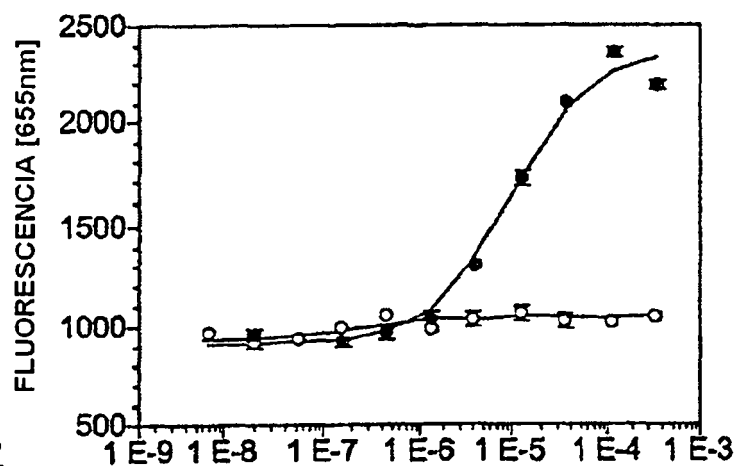


FIGURA 4C

