

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 978 166**

(51) Int. Cl.:

A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 17000383 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3246070**

(54) Título: **Nuevos azoles moduladores de la unión y la actividad del FXR (NR1H4)**

(30) Prioridad:

13.07.2011 EP 11005722
13.07.2011 US 201161507153 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2024

(73) Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

(72) Inventor/es:

KINZEL, OLAF;
STEENECK, CHRISTOPH y
KREMOSER, CLAUS

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 978 166 T3

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

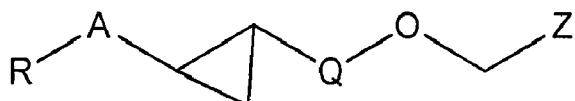
DESCRIPCIÓN

Nuevos azoles moduladores de la unión y la actividad del FXR (NR1H4)

- 5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones que comprenden compuestos que se unen al receptor NR1H4 (FXR) y actúan como agonistas o moduladores del FXR. La invención se refiere además a composiciones que comprenden los compuestos para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades y/o afecciones mediante la unión de dicho receptor nuclear por dichos compuestos.
- 10 [0002] Los organismos multicelulares dependen de mecanismos avanzados de transferencia de información entre células y compartimentos corporales. La información que se transmite puede ser muy compleja y dar lugar a la alteración de programas genéticos implicados en la diferenciación, proliferación o reproducción celular. Las señales, u hormonas, suelen ser moléculas de bajo peso molecular, como péptidos, ácidos grasos o derivados del colesterol.
- 15 [0003] Muchas de estas señales producen sus efectos cambiando en última instancia la transcripción de genes específicos. Un grupo bien estudiado de proteínas que median en la respuesta de una célula a una variedad de señales es la familia de factores de transcripción conocidos como receptores nucleares, en lo sucesivo denominados a menudo "NR". Los miembros de este grupo incluyen receptores para hormonas esteroideas, vitamina D, ecdisona, ácido retinoico cis y trans, hormona tiroidea, ácidos biliares, derivados del colesterol, ácidos grasos (y otros proliferadores peroxisomales),
20 así como los denominados receptores huérfanos, proteínas estructuralmente similares a otros miembros de este grupo, pero para los que no se conocen ligandos. Los receptores huérfanos pueden ser indicativos de vías de señalización desconocidas en la célula o pueden ser receptores nucleares que funcionan sin activación del ligando. La activación de la transcripción por algunos de estos receptores huérfanos puede producirse en ausencia de un ligando exógeno y/o a través de vías de transducción de señales originadas en la superficie celular (D. J. Mangelsdorf et al., Cell 1995, 83, 835; R. M. Evans, Mol. Endocrinol. 2005, 19, 1429).
- 25 [0004] En general, se han definido tres dominios funcionales en los NR. Se cree que un dominio aminoterminal tiene alguna función reguladora. Le sigue un dominio de unión al ADN, denominado en lo sucesivo "DBD", que suele estar formado por dos elementos zinc finger y reconoce un elemento específico de respuesta hormonal, denominado en lo sucesivo "HRE", dentro de los promotores de los genes sensibles. Se ha demostrado que determinados residuos de aminoácidos del "DBD" confieren especificidad de unión a la secuencia de ADN (M. Schena y K. R. Yamamoto, Science 1988, 241, 965). En la región carboxi-terminal de los NR conocidos se encuentra un dominio de unión a ligando denominado en lo sucesivo "LBD".
30 [0005] En ausencia de hormona, el LBD parece interferir con la interacción del DBD con su HRE. La unión hormonal parece provocar un cambio conformacional en el NR y, por tanto, abre esta interferencia (A. M. Brzozowski et al., Nature 1997, 389, 753). Un NR sin el LBD activa constitutivamente la transcripción, pero a un nivel bajo.
- 35 [0006] Se propone que los coactivadores o activadores transcripcionales sirvan de puente entre los factores de transcripción específicos de la secuencia, la maquinaria de transcripción basal y además influyan en la estructura de la cromatina de una célula diana. Varias proteínas como SRC-1, ACTR y Grip1 interactúan con los NR de forma potenciada por ligandos (D. M. Heery et al., Nature 1997, 387, 733; T. Heinzel et al., Nature 1997, 387, 43; K. W. Nettles and G. L. Greene, Annu. Rev. Physiol. 2005, 67, 309).
- 40 [0007] Los moduladores de receptores nucleares, como las hormonas esteroideas, afectan al crecimiento y la función de células específicas uniéndose a receptores intracelulares y formando complejos receptor nuclear-ligando. Los complejos receptor nuclear-hormona interactúan entonces con un HRE en la región de control de genes específicos y alteran la expresión génica específica (A. Aranda y A. Pascual, Physiol. Rev. 2001, 81, 1269).
- 45 [0008] El Receptor X Farnesoide alfa (en lo sucesivo también denominado NR1 H4 cuando nos referimos al receptor humano) es un receptor nuclear tipo 2 prototípico que activa genes al unirse a la región promotora de genes diana de forma heterodimérica con el Receptor X Retinoido (B. M. Forman et al., Cell 1995, 81, 687). Los ligandos fisiológicos relevantes de NR1H4 son los ácidos biliares (D. J. Parks et al., Science 1999, 284, 1365; M. Makishima et al., Science 1999, 284, 1362). El más potente es el ácido quenodesoxicólico (CDCA), que regula la expresión de varios genes que participan en la homeostasis de los ácidos biliares. Se ha descrito originalmente que el farnesol y sus derivados, denominados conjuntamente farnesoides, activan el ortólogo de rata a altas concentraciones, pero no activan el receptor humano ni el de ratón. El FXR se expresa en el hígado, en todo el tracto gastrointestinal, incluidos el esófago, el estómago, el duodeno, el intestino delgado, el colon, el ovario, la glándula suprarrenal y el riñón. Además de controlar la expresión génica intracelular, el FXR también parece estar implicado en la señalización paracrína y endocrina mediante la regulación de la expresión de la citocina Factor de Crecimiento de Fibroblastos 15 (roedores) o 19 (monos, humanos, J. A. Holt et al., Genes Dev. 2003, 17, 1581; T. Inagaki et al., Cell Metab. 2005, 2, 217).
- 50 [0009] Los compuestos de molécula pequeña que actúan como moduladores de FXR se han divulgado en las siguientes publicaciones: Documentos WO 2000/037077, WO 2003/015771, WO 2004/048349, WO 2007/076260, WO 2007/092751, WO 2007/140174, WO 2007/140183, WO 2008/051942, WO 2008/157270, WO 2009/005998, WO 2009/012125, WO 2008/025539 y WO 2008/025540. Recientemente se han revisado otros moduladores FXR de moléculas pequeñas (M. L.
55
- 60
- 65

Crawley, Expert Opin Ther. Pat. 2010, 20,1047; D. Merk et al., Future Med. Chem. 2012, 4, 1015).

[0010] En el documento WO 2011/020615 se divulgaron compuestos de ciclopropilideno quirales de la siguiente fórmula general



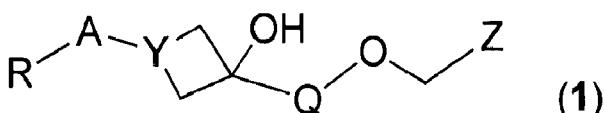
5

en el que las variables se definen de forma similar a la presente solicitud.

10

[0011] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende de 7 mg a 350 mg de un compuesto según la siguiente fórmula (1), un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15



20

donde

25

R se selecciona del grupo que consiste en COOR₆, CONR₇R₈, tetrazolilo, SO₂NR₇R₈, alquilo C₁₋₆, SO₂-alquilo C₁₋₆ y H, con R₆ seleccionado independientemente del grupo que consiste en H o alquilo C₁₋₆, y R₇ y R₈ seleccionados independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, alquieno C₁₋₆-R₉, SO₂-alquilo C₁₋₆, en el que R₉ se selecciona del grupo que consiste en COOH, OH y SO₃H;

30

A se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indolilo, tienilo, benzotienilo, indazolilo, benzisoxazolilo, benzofuranilo, benzotriazolilo, furanilo, benzotiazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo formado por OH, O-alquilo C₁₋₆, O-halo-alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y halógeno;

35

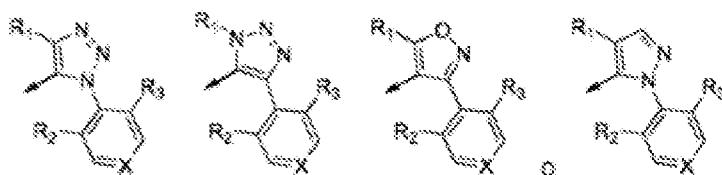
Q se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, tiazolilo, tiofenilo, pirimidilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, halógeno y CF₃;

40

Y se selecciona entre N o CH;

45

Z se selecciona de



50

donde

55

X = CH, N, NO;

60

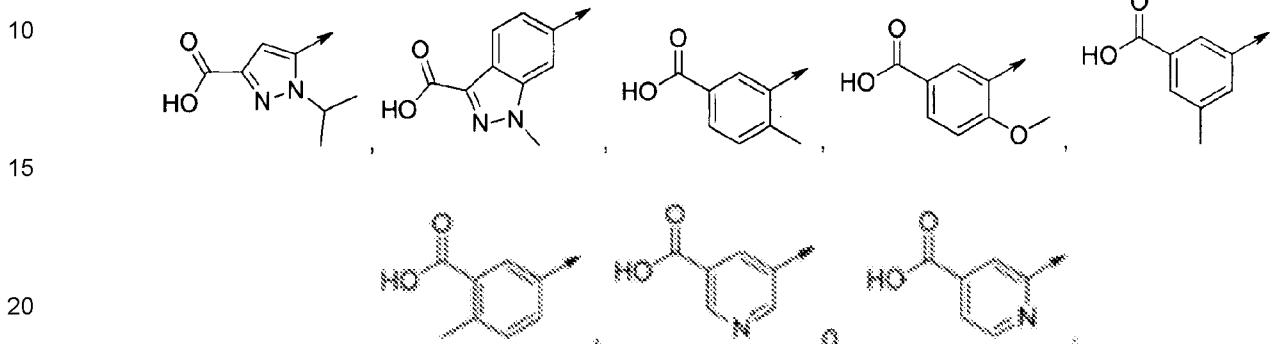
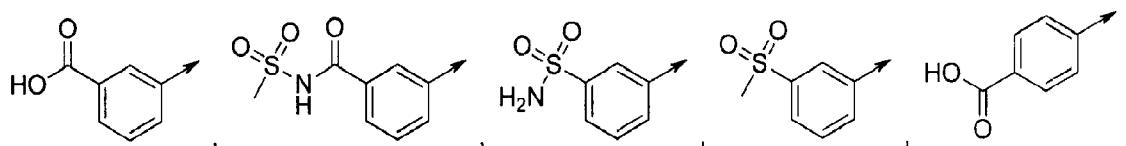
R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₃, cilcoalquilo C₃₋₆, alquilcicloalquilo C₄₋₅, en el que alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxi o alcoxi C₁₋₆;

65

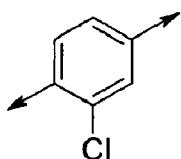
R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y halógeno

y un soporte farmacéuticamente aceptable, para su uso como dosis diaria total para un humano adulto de 70 kg.

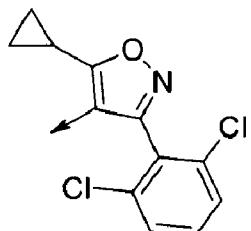
[0012] En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R-A en el compuesto según la Fórmula (1) se selecciona entre



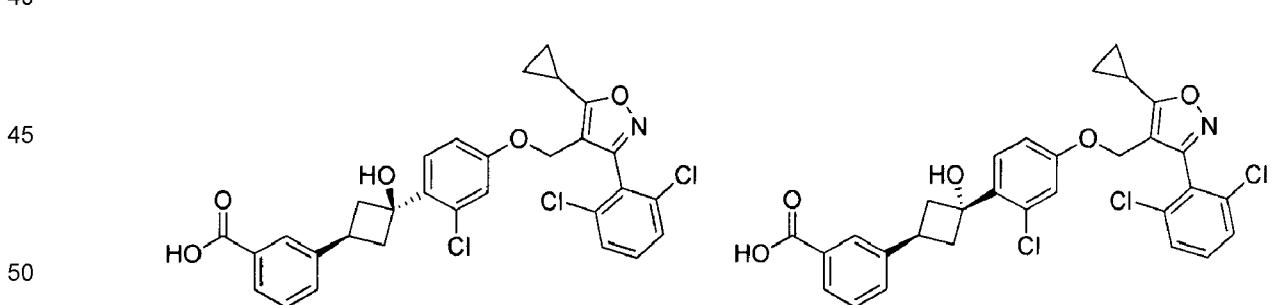
25 [0013] En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, Q en el compuesto según la Fórmula (1) es

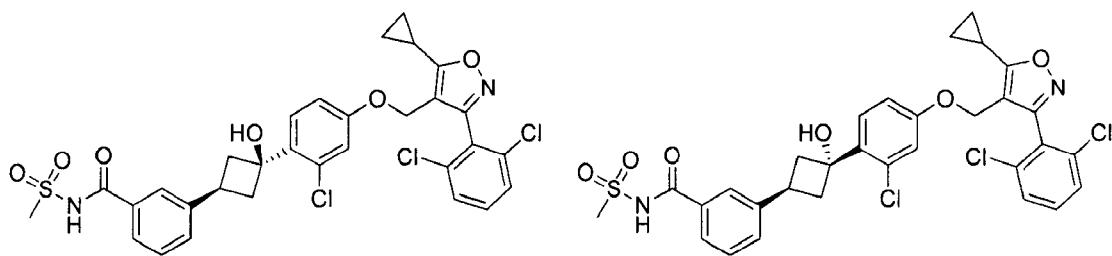


35 [0014] En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, Z en el compuesto según la Fórmula (1) es

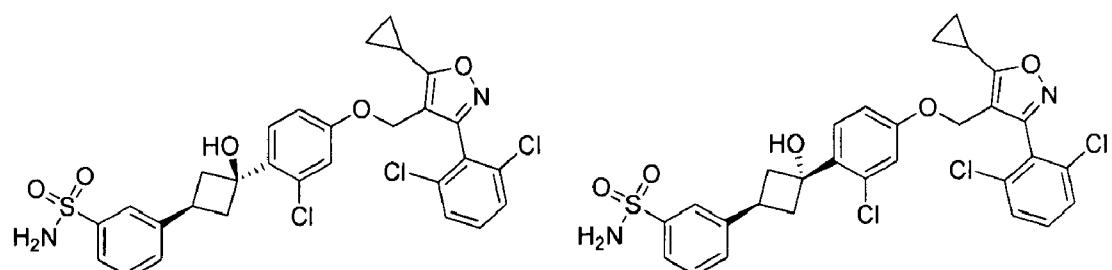


40 [0015] En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el compuesto según la Fórmula (1) se selecciona entre

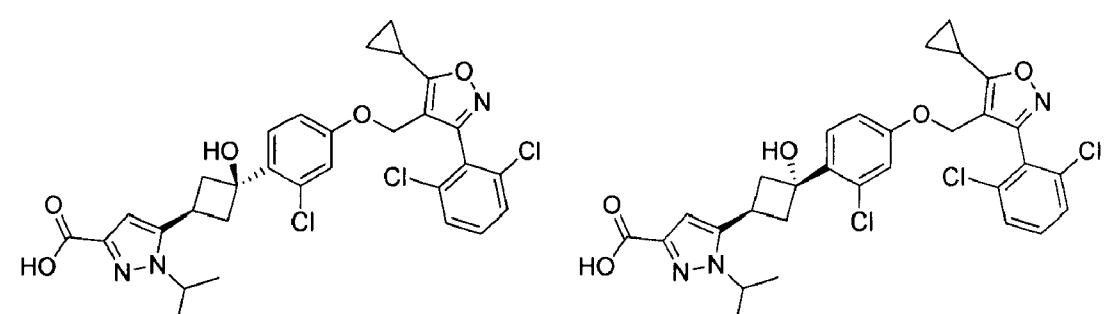
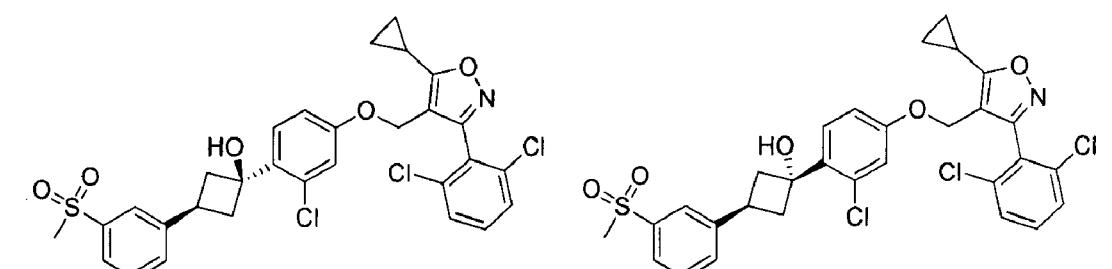




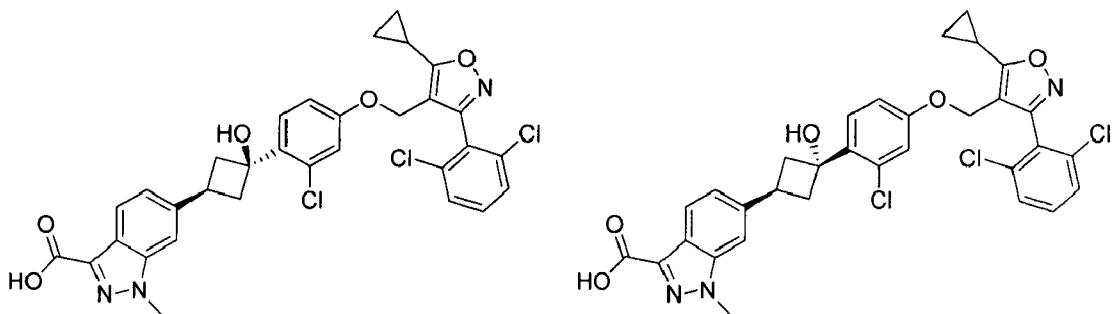
10



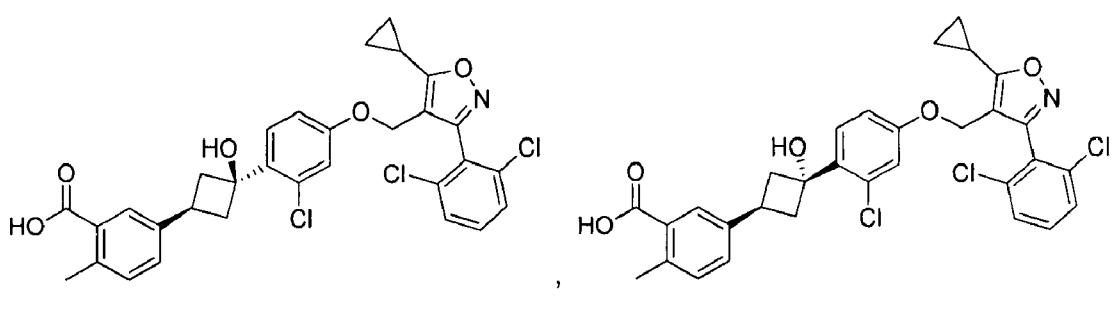
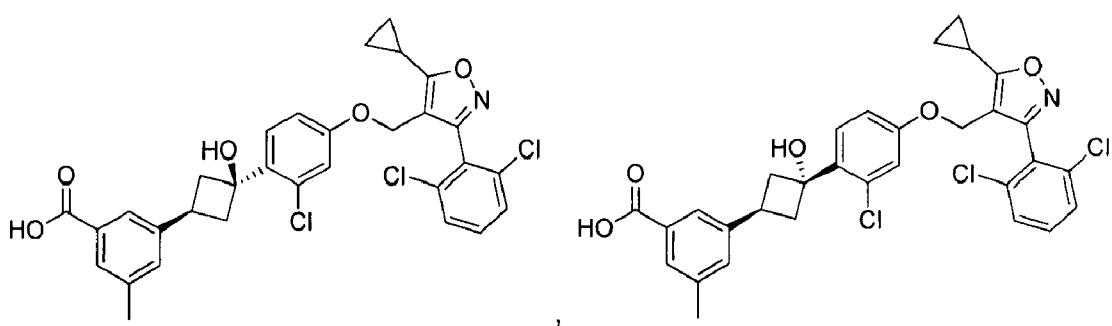
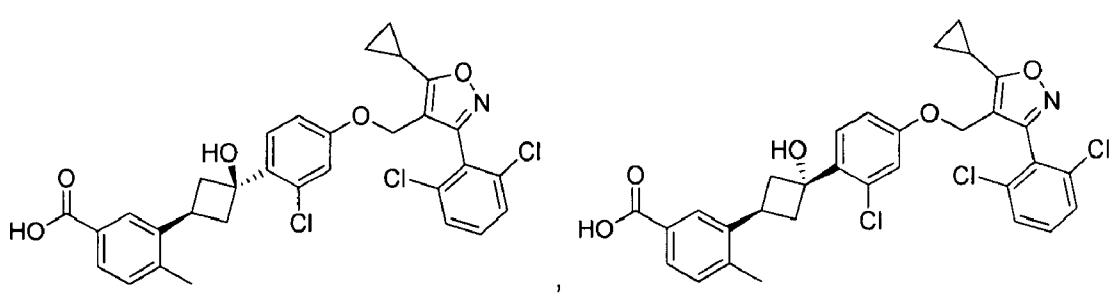
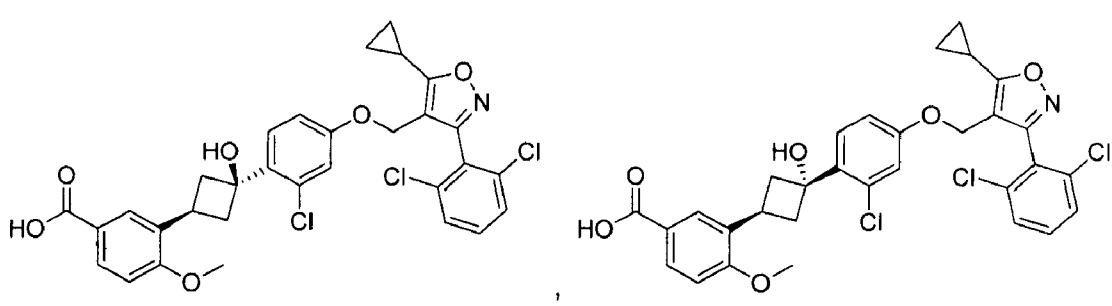
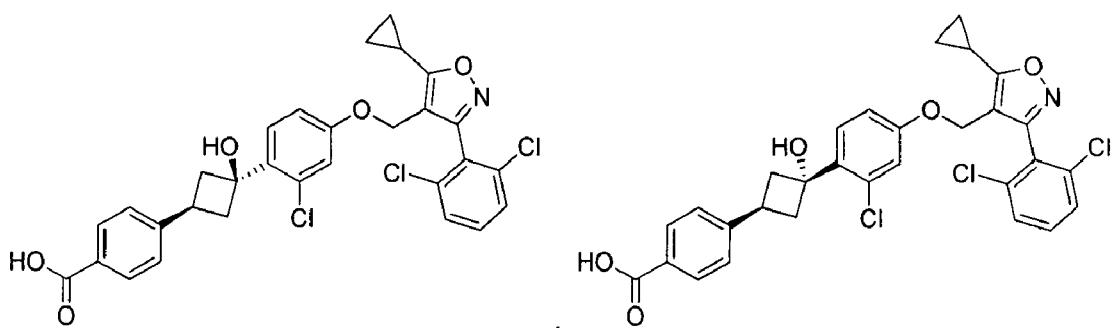
20

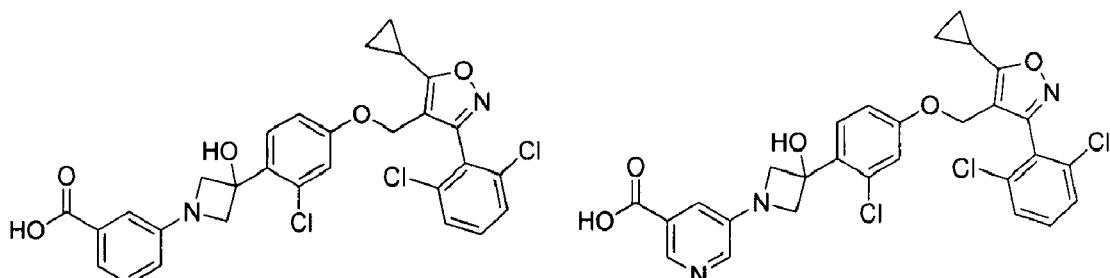


45

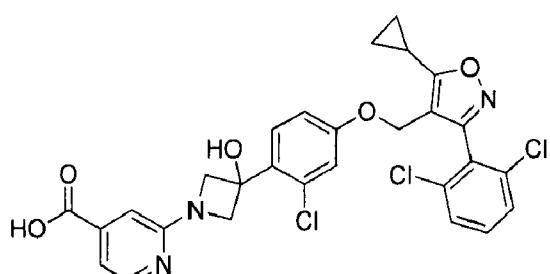


60

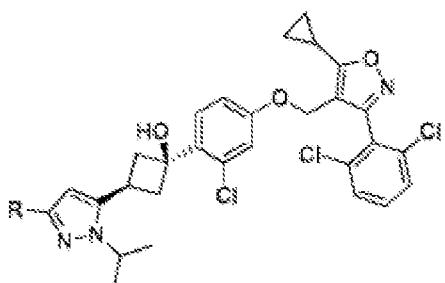




15
y



30 [0016] En otra realización en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el compuesto según la Fórmula (1) es



45 en el que R se selecciona del grupo formado por CO₂H, CONHSO₂Me, y tetrazolilo.

[0017] También se describe un compuesto según la Fórmula (1) para su uso como medicamento.

50 [0018] También se describe un compuesto según la Fórmula (1) para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

[0019] También se describe el uso de un compuesto según la Fórmula (1) para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades mediadas por FXR.

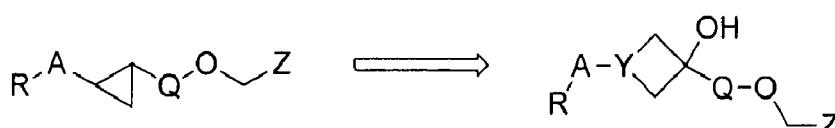
55 [0020] En un ejemplo, la enfermedad se selecciona entre afecciones colestásicas intrahepáticas crónicas o algunas formas de afecciones colestásicas extrahepáticas; fibrosis hepática; trastornos inflamatorios obstrutivos o crónicos del hígado; cirrosis hepática; esteatosis hepática y síndromes asociados, efectos colestásicos o fibróticos que se asocian con la cirrosis inducida por el alcohol o con formas de hepatitis de transmisión vírica; insuficiencia hepática o isquemia hepática tras una resección hepática mayor; esteatohepatitis asociada a la quimioterapia (CASH); insuficiencia hepática aguda; y/o Enfermedades Inflamatorias Intestinales.

60 [0021] En otro ejemplo, la enfermedad se selecciona entre trastornos de lípidos y lipoproteínas; Diabetes Tipo II y complicaciones clínicas de la Diabetes Tipo I y Tipo II, incluyendo nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y otros efectos observados de la Diabetes a largo plazo clínicamente manifiesta; Afecciones y enfermedades que resultan de la degeneración grasa y fibrótica crónica de órganos debido a la acumulación forzada de lípidos y, específicamente, de triglicéridos, y la subsiguiente activación de vías profibróticas, como la enfermedad del hígado graso

no alcohólico (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH); la obesidad o el síndrome metabólico (condiciones combinadas de dislipidemia, diabetes o índice de masa corporal anormalmente elevado); y/o el infarto de miocardio, el ictus agudo o la trombosis que se producen como punto final de la aterosclerosis obstructiva crónica.

- 5 [0022] En otro ejemplo, la enfermedad se selecciona entre trastornos hiperproliferativos no malignos y trastornos hiperproliferativos malignos, específicamente de carcinoma hepatocelular, adenoma y poliposis de colon, adenocarcinoma de colon, cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas, esófago de Barrett u otras formas de enfermedades neoplásicas del tracto gastrointestinal y del hígado.
- 10 [0023] Las propiedades fisicoquímicas mejoradas se han conseguido mediante la introducción de un grupo hidroxilo polar en un grupo 1,3-ciclobutilideno o 1,3-azetidinilideno que sustituye al anterior anillo 1,2-ciclopropilideno.

15



20

[0024] Sorprendentemente, los compuestos resultantes mantuvieron su actividad sobre el receptor FXR pero demostraron propiedades fisicoquímicas mejoradas, como una mayor solubilidad acuosa y/o permeabilidad de membrana.

[0025] Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención comparten una estructura química común según la Fórmula (1) de la reivindicación 1.

25

[0026] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la presente invención se dirige a un enantiómero, diastereómero o sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto según la Fórmula (1).

30

[0027] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R en la Fórmula (1) se selecciona del grupo que consiste en COOR₆, CONR₇R₈, SO₂NR₇R₈, y SO₂-alquiloC₁₋₆.

[0028] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₆ en la Fórmula (1) es H.

35

[0029] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₇ y R₈ en la Fórmula (1) se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en H y SO₂-alquiloC₁₋₆.

40

[0030] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₇ en la Fórmula (1) es H.

[0031] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₈ en la Fórmula (1) es SO₂-alquiloC₁₋₆.

45

[0032] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, A se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indazolilo y oxadiazolilo.

50

[0033] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, A está sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₆, más preferiblemente alquilo C₁₋₃. En otra realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, A no está sustituido.

[0034] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, Q es fenilo.

55

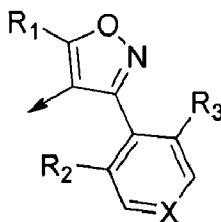
[0035] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, Q está sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de halógeno, más preferiblemente un grupo seleccionado de halógeno, en particular Cl.

[0036] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, Z es

60

65

5



10 [0037] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, X = CH.

[0038] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₁ es cicloalquilo C₃₋₆, en particular ciclopropilo.

15 [0039] En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de halógeno, en particular Cl.

20 [0040] Cuando puede producirse tautomería, como por ejemplo tautomería ceto-enol, de compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención o sus profármacos, las formas individuales, como por ejemplo la forma ceto y enol, están cada una dentro del alcance de la invención, así como sus mezclas en cualquier proporción. Lo mismo se aplica a los estereoisómeros, como por ejemplo enantiómeros, isómeros cis/trans, conformadores y similares.

25 [0041] Si se desea, los isómeros pueden separarse por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante cromatografía líquida. Lo mismo ocurre con los enantiómeros utilizando, por ejemplo, fases estacionarias quirales. Además, los enantiómeros pueden aislarse convirtiéndolos en diastereómeros, es decir, acoplándolos con un compuesto auxiliar enantioméricamente puro, separando posteriormente los diastereómeros resultantes y escindiendo el residuo auxiliar. Alternativamente, cualquier enantiómero de un compuesto utilizado en las composiciones de la presente invención puede obtenerse a partir de síntesis estereoselectiva utilizando materiales de partida ópticamente puros. Otra forma de obtener enantiómeros puros a partir de mezclas racémicas sería utilizar la cristalización enantioselectiva con 30 contraiones quirales.

35 [0042] Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases o ácidos inorgánicos y bases o ácidos orgánicos. En caso de que los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus correspondientes sales farmacéutica o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Así, los compuestos utilizados en las 40 composiciones de la presente invención que contienen grupos ácidos pueden estar presentes en estos grupos y pueden utilizarse según la invención, por ejemplo, como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o sales de amonio. Ejemplos más precisos de tales sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoníaco o aminas orgánicas como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que pueden protonarse, pueden estar presentes y pueden utilizarse según la invención en forma 45 de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido piválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido 50 isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos por los expertos en la materia. Si los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betaínas (zwitteriones). Las sales respectivas pueden obtenerse por métodos habituales conocidos por el experto en la materia como, por ejemplo, poniéndolas en contacto con un ácido o una base orgánicos o inorgánicos en un disolvente o dispersante, o por intercambio aniónico o catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales 55 de los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención que, debido a su baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en productos farmacéuticos, pero que pueden utilizarse, por ejemplo, como intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

60 [0043] Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

65 [0044] Por "composición farmacéutica" se entiende uno o más principios activos y uno o más principios inertes que constituyen el soporte, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más de los principios, o de la disociación de uno o más de los principios, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los principios. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la

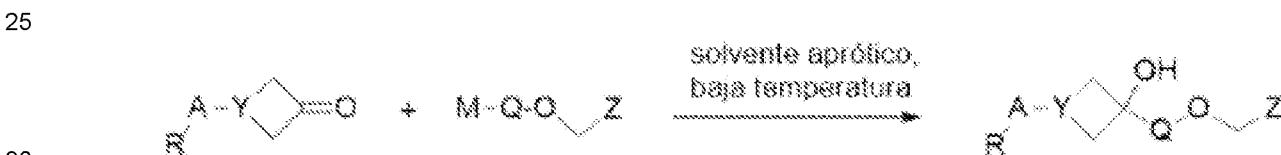
presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando al menos un compuesto descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 [0045] La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más compuestos como ingredientes activos, como un compuesto profármaco u otros moduladores de receptores nucleares.

10 [0046] Las composiciones son adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada 15 dependrá de la naturaleza y gravedad de las afecciones tratadas y de la naturaleza del principio activo. Pueden presentarse convenientemente en forma de administración unitaria y prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia.

20 [0047] Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención pueden prepararse mediante una combinación de los métodos descritos en los Esquemas I a III. Como se representa en el Esquema I, una cetona cíclica de 4 miembros, sustituida con el sustituyente A en la posición 3, puede reaccionar con un anillo aromático o heteroaromático metalizado $M-Q-O-CH_2Z$ (M = metal, p. ej. Li) en disolventes apróticos y preferentemente a bajas temperaturas para producir un anillo de 4 miembros sustituido con hidroxilo que lleva los sustituyentes A y Q. En el caso en que Y es CH, se pueden formar dos isómeros (A y Q transanulares cis o trans entre sí). En condiciones optimizadas puede conseguirse la formación de uno de los dos isómeros principalmente. Los dos isómeros pueden separarse mediante 25 métodos apropiados conocidos en la técnica, como por ejemplo la cromatografía en gel de sílice o la RP-HPLC preparativa.

25 **Esquema I**



35 [0048] En el Esquema II se resumen los métodos utilizados para preparar las cetonas cíclicas de 4 miembros necesarias para la síntesis de los compuestos utilizados en las composiciones de esta invención. En la opción a) un intermedio portador de vinilo, por ejemplo preparado por vinilación de un material de partida correspondiente que contenga halógeno R-A-X (X = halógeno) puede reaccionar con α,α -dcloro ceteno formado in situ para formar una 2,2-diclorociclobutanona. Tras la deshalogenación, por ejemplo con Zn en ácido acético a reflugo, se obtienen las ciclobutanonas 3-sustituidas deseadas. Alternativamente, los vinilintermediarios pueden reaccionar con el ceteno no sustituido generado in situ para obtener en una sola etapa los intermediarios de ciclobutanona deseados. En la opción b) se utiliza 3-metilenciclobutanocarbonitrilo como material de partida. Los heterociclos sustituidos pueden construirse a partir del grupo 40 ciano en varias etapas por métodos conocidos por los expertos en la materia. Las ciclobutanonas deseadas pueden obtenerse por escisión oxidativa del doble enlace exocíclico utilizando condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante el uso de OsO_4 , ozono o $RhCl_3/NaIO_4$ como oxidantes. La opción c) muestra los métodos utilizados para preparar las azetidinonas sustituidas. El acoplamiento cruzado C-N catalizado por Cu o Pd entre la 3-hidroxi-azetidina y anillos halo-aromáticos o halo-heteroaromáticos da lugar a las correspondientes 3-hidroxi-azetidinas 45 N-sustituidas que pueden transformarse en las azetidinonas deseadas mediante oxidación.

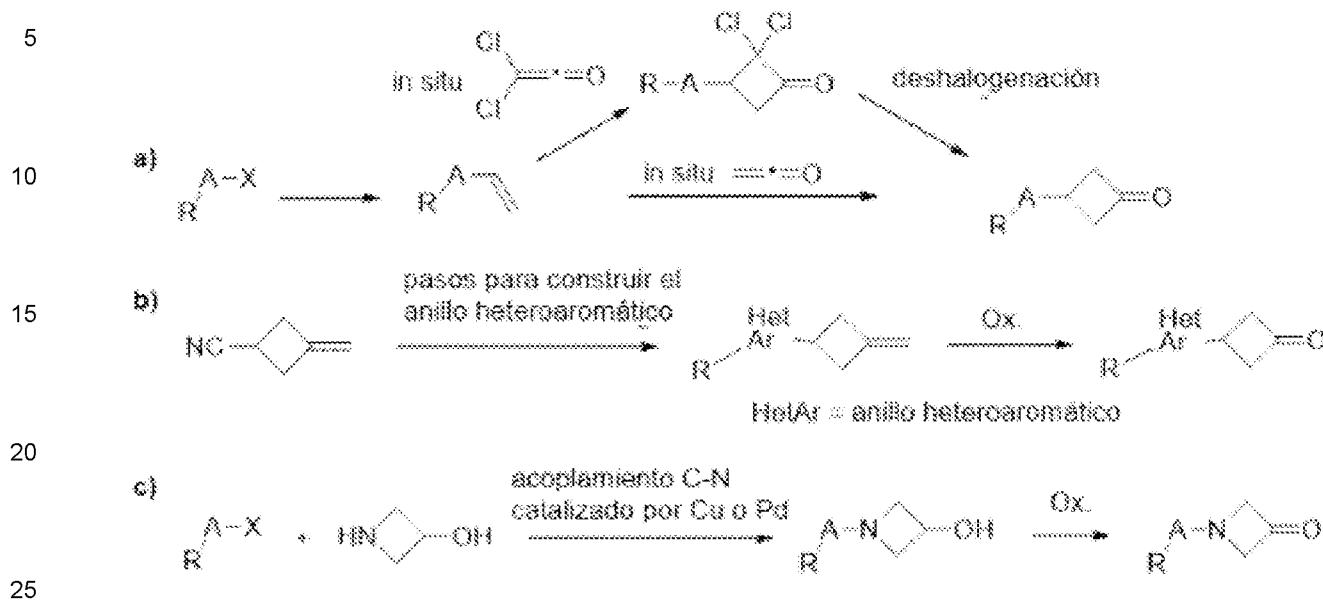
50

55

60

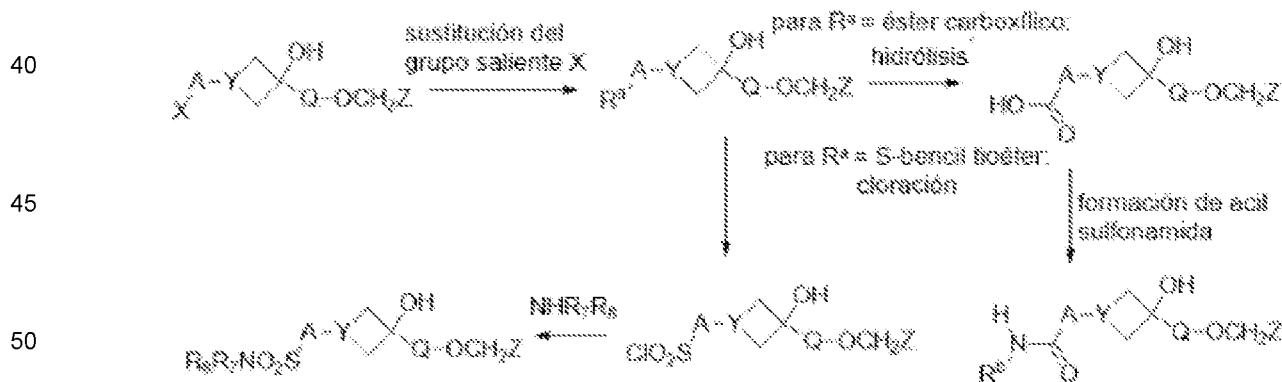
65

Esquema N



[0049] El esquema III ilustra algunas posibilidades de realizar modificaciones de los sustituyentes en el grupo A tras la formación de los anillos de 4 miembros portadores de hidroxi. Por ejemplo, un grupo saliente X (p. ej., bromuro) puede sustituirse por un grupo ciano, un éster carboxílico, metilsulfonilo o tioéter mediante reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metales de transición. Los derivados obtenidos pueden transformarse posteriormente en otros derivados por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el grupo ciano y el grupo éster pueden hidrolizarse en condiciones básicas para obtener un ácido carboxílico que, a su vez, puede transformarse en acil-sulfonamidas. Un tioéter bencílico puede clorarse para obtener el intermediario clorosulfonilo que reacciona con amoníaco para obtener las sulfonamidas correspondientes.

Ejemplo 10



55 [0050] En consecuencia, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden compuestos según la Fórmula general(1) que se unen a FXR y actúan como agonistas o moduladores de FXR.

[0051] La invención se refiere además al uso de composiciones que comprenden dichos compuestos para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades y/o afecciones a través de la unión de dicho receptor nuclear por dichos compuestos. Más allá la revelación presente relaciona al uso de compuestos dichos para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prophylaxis de enfermedades y/o condiciones a través de atar de receptor nuclear dicho por compuestos dichos. Específicamente, la presente divulgación se refiere al uso de compuestos según la Fórmula (1) en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de afecciones colestásicas intrahepáticas crónicas o algunas formas de afecciones colestásicas extrahepáticas, de fibrosis hepática, de afecciones colestásicas intrahepáticas agudas, de trastornos inflamatorios obstructivos o crónicos que surgen de una composición biliar inadecuada, de afecciones gastrointestinales con una absorción reducida de grasas alimentarias y vitaminas dietéticas liposolubles, de enfermedades inflamatorias intestinales, de trastornos de lípidos y lipoproteínas, de diabetes de tipo II y complicaciones clínicas de

diabetes de tipo I y II, de afecciones y enfermedades que resultan de la degeneración grasa y fibrótica crónica de órganos debido a la acumulación forzada de lípidos y, específicamente, de triglicéridos y la subsiguiente activación de vías profibróticas, de la obesidad y el síndrome metabólico (condiciones combinadas de dislipidemia, diabetes e índice de masa corporal anormalmente elevado), del infarto agudo de miocardio, del ictus agudo, de la trombosis que se produce como punto final de la aterosclerosis obstructiva crónica, de las infecciones persistentes por bacterias intracelulares o protozoos parásitos, de los trastornos hiperproliferativos no malignos, de los trastornos hiperproliferativos malignos, del adenocarcinoma de colon y el carcinoma hepatocelular en particular, de la esteatosis hepática y los síndromes asociados, de la insuficiencia hepática o el mal funcionamiento del hígado como resultado de enfermedades hepáticas crónicas o de la resección quirúrgica del hígado, de la infección por Hepatitis B, de la infección por Hepatitis C y/o de los efectos colestásicos y fibróticos que se asocian con la cirrosis inducida por el alcohol o con formas de hepatitis de transmisión vírica.

[0052] Los medicamentos a los que se hace referencia en el presente documento pueden prepararse mediante procesos convencionales, incluida la combinación de un compuesto descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0053] Se ha propuesto que FXR es un sensor nuclear de ácidos biliares. En consecuencia, modula tanto la producción sintética de ácidos biliares en el hígado como su reciclaje en el intestino (mediante la regulación de las proteínas de unión a los ácidos biliares). Pero más allá de la fisiología de los ácidos biliares, el FXR parece estar implicado en la regulación de muchos procesos fisiológicos diversos que son relevantes en la etiología y para el tratamiento de enfermedades tan diversas como los cálculos biliares de colesterol, los trastornos metabólicos como la diabetes de tipo II, las dislipidemias o la obesidad, las enfermedades inflamatorias crónicas como las enfermedades inflamatorias intestinales o las formas intrahepáticas crónicas de colestasis y muchas otras enfermedades (T. Claudel et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 2020; Y. D. Wang et al., *Cell Res.* 2008, 18, 1087).

[0054] El FXR regula un complejo patrón de genes de respuesta en el hígado y en el tracto gastrointestinal. Los productos génicos influyen en diversos procesos fisiológicos. En el curso del análisis funcional del FXR, la primera red reguladora que se analizó fue la regulación de la síntesis de ácidos biliares. Mientras que los LXR inducen la enzima clave de la conversión del colesterol en ácidos biliares, Cyp7A1, a través de la inducción del receptor nuclear regulador LRH-1, el FXR reprime la inducción de Cyp7A1 a través de la regulación al alza del ARNm que codifica SHP, otro receptor nuclear que es represor dominante sobre LRH-1. Dado que el FXR se une a los productos finales de esta vía, ácidos biliares primarios como el ácido cólico (CA) o el CDCA, esto puede considerarse un ejemplo de inhibición por retroalimentación a nivel de expresión génica (B. Goodwin et al., *Mol. Cell* 2000, 6, 517; T. T. Lu et al., *Mol. Cell* 2000, 6, 507). Paralelamente a la represión de la síntesis de ácidos biliares a través del SHP, el FXR induce una serie de transportadores denominados ABC (por ATP-binding cassette) que son responsables de la exportación de ácidos biliares tóxicos desde el citosol del hepatocito a los canalículos, las pequeñas ramificaciones de los conductos biliares donde se origina la bilis. Esta función hepatoprotectora del FXR se puso de manifiesto por primera vez con el análisis de ratones knockout FXR (C. J. Sinal et al., *Cell* 2000, 102, 731), donde se demostró la infra o sobreexpresión de varios transportadores ABC en el hígado. Un análisis más detallado reveló que la principal bomba excretora de sales biliares BSEP o ABCB11 (M. Ananthanarayanan et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28857; J. R. Plass et al., *Hepatology* 2002, 35, 589), así como la enzima clave que media en la transferencia de lípidos de las lipoproteínas a los fosfolípidos, la PLTP (N. L. Uriar et al., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 39313), y los dos transportadores de membrana canalicular clave para los fosfolípidos, MRP-2 (ABCC4) (H. R. Kast et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 2908) and MDR-3 (ABCB4); L. Huang et al., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51085) son dianas directas de la activación transcripcional dirigida por ligando por parte del FXR (resumido en: M. Miyata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 312, 759; G. Rizzo et al., *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol.* 2005, 5, 289).

[0055] El hecho de que FXR parece ser el principal sensor y regulador de metabolitos para la síntesis, exportación y recirculación de ácidos biliares sugirió el uso de ligandos de FXR para inducir el flujo biliar y cambiar la composición de ácidos biliares hacia una composición más hidrofílica. Con el desarrollo del primer ligando sintético de FXR GW4064 (P. R. Maloney et al., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 2971; T. M. Willson et al., *Med. Res. Rev.* 2001, 21, 513) como compuesto herramienta y del ligando semisintético artificial de ácidos biliares 6-alfa-etil-CDCA, se pudieron analizar los efectos de la superestimulación del FXR por agonistas potentes. Se demostró que ambos ligandos inducen el flujo biliar en animales con conductos biliares ligados. Por otra parte, además de los efectos coleréticos, también se han podido demostrar efectos hepatoprotectores (R. Pellicciari et al., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3569; Y. Liu et al., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1678). Este efecto hepatoprotector se redujo aún más a un efecto antifibrótico que resulta de la represión de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz, TIMP-1 y 2, la inducción de la metaloproteinasa de matriz resolutora de depósitos de colágeno 2 en las células estrelladas hepáticas y la posterior reducción del ARNm del colágeno alfa y del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), ambos factores profibróticos, por los agonistas del FXR (S. Fiorucci et al., *Gastroenterology* 2004, 127, 1497; S. Fiorucci et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 314, 584). Además, se demostró su actividad anticolestásica en modelos animales ligados a conductos biliares, así como en modelos animales de colestasis inducida por estrógenos (S. Fiorucci et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 313, 604).

[0056] Los estudios genéticos demuestran que en las formas hereditarias de colestasis (Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva = PFIC, Tipos I - IV) se reduce la localización nuclear del propio FXR como consecuencia de una mutación en el gen FIC1 (en la PFIC Tipo I, también llamada Enfermedad de Byler) (F. Chen et al., *Gastroenterology* 2004, 126, 756; L. Alvarez et al., *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 2451) o se reducen los niveles del gen diana del FXR que codifica la bomba

de exportación de fosfolípidos MDR-3 (en la PFIC de tipo III). En conjunto, cada vez hay más pruebas de que los compuestos de unión al FXR serán de gran utilidad clínica en el régimen terapéutico de enfermedades colestásicas crónicas como la cirrosis biliar primaria (PBC) o la colangitis esclerosante primaria (PSC) (revisado en: G. Rizzo et al., Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 2005, 5, 289; G. Zollner et al., Mol. Pharm. 2006, 3, 231; S. Y. Cai et al., Expert Opin. Ther. Targets 2006, 10, 409).

[0057] El profundo impacto que la activación del FXR tiene sobre el metabolismo y la excreción de los ácidos biliares no sólo es relevante para los síndromes colestásicos, sino incluso más directamente para una terapia contra la formación de cálculos biliares. Los cálculos biliares de colesterol se forman debido a la baja solubilidad del colesterol que se bombea activamente fuera de la célula hepática hacia el lumen de los canalículos. Es el porcentaje relativo de contenido de los tres componentes principales, ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol libre, lo que determina la formación de micelas mixtas y, por tanto, la solubilidad aparente del colesterol libre en la bilis. Los polimorfismos del FXR se mapean como loci de rasgos cuantitativos como un factor que contribuye a la enfermedad de cálculos biliares (H. Wittenburg, Gastroenterology 2003, 125, 868). Utilizando el compuesto sintético herramienta FXR GW4064 se pudo demostrar que la activación de FXR conduce a una mejora del Índice de Saturación de Colesterol (CSI) y directamente a una abolición de la formación de cálculos biliares en ratones C57L susceptibles a cálculos biliares, mientras que el tratamiento farmacológico en ratones knockout FXR no muestra ningún efecto sobre la formación de cálculos biliares (A. Moschetta et al., Nature Medicine 2004, 10, 1352).

[0058] Estos resultados califican al FXR como una buena diana para el desarrollo de agonistas de moléculas pequeñas que pueden utilizarse para prevenir la formación de cálculos biliares de colesterol o para prevenir la re-formación de cálculos biliares después de la extirpación quirúrgica o la litotricia por ondas de choque (discutido en: S. A. Doggrell, Curr. Opin. Investig. Drugs, 2006, 7, 344).

[0059] También se describe el compuesto según la Fórmula (1) y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho compuesto para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos inflamatorios obstrutivos o crónicos que surgen de una composición biliar inadecuada, como la colelitiasis también conocida como cálculos biliares de colesterol.

[0060] Más allá de sus fuertes efectos hepatoprotectores y coleréticos, así como antifibróticos, que el FXR muestra tras la activación estimulada por pequeñas moléculas en el hígado, el FXR parece tener un papel en la protección del intestino frente a la transformación neoplásica y frente al desarrollo de pólipos y su transición a adenocarcinoma en el intestino (S. Modica et al., Cancer Res. 2008, 68, 9589 and R. R. Maran et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 328, 469). De forma similar a la situación en el intestino, la ausencia de FXR conduce a un elevado incremento en la formación de Cárcinoma Hepatocelular (HCC), la forma más prominente de cáncer de hígado (I. Kim et al., Carcinogenesis 2007, 28, 940 y F. Yang et al., Cancer Res. 2007, 67, 863). Mientras que un FXR funcional previene la formación de adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular, la activación del FXR induce la regeneración del hígado tras una hepatectomía (W. Huang et al., Science 2006, 312, 233).

[0061] Los efectos combinados hepatoprotectores, antineoplásicos y regenerativos hepáticos asociados con la activación de FXR pueden explotarse terapéuticamente para el uso de agonistas de FXR en el tratamiento de enfermedades hepáticas graves. En una realización, los compuestos aquí descritos y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos se utilizan en el tratamiento de enfermedades hepáticas como el HCC, la estimulación del recrecimiento del hígado y la mejora de los efectos secundarios asociados a la resección hepática mayor, la cirrosis hepática independientemente de la etiología y la prevención o el tratamiento de la isquemia hepática en el curso de un trasplante de hígado o de una cirugía hepática mayor.

[0062] Desde el descubrimiento del primer agonista sintético del FXR y su administración a roedores se hizo evidente que el FXR es un regulador clave de los triglicéridos séricos (P. Maloney et al., J. Med. Chem. 2000, 43, 2971; T. Willson et al., Med. Res. Rev. 2001, 21, 513). En los últimos seis años se han publicado pruebas acumulativas de que la activación del FXR mediante agonistas sintéticos conduce a una reducción significativa de los triglicéridos séricos, principalmente en forma de reducción de VLDL, pero también a una reducción del colesterol sérico total (H. R. Kast et al., Mol. Endocrinol. 2001, 15, 1720; N. L. Urizar et al., Science 2002, 296, 1703; G. Lambert et al., J. Biol. Chem. 2003, 278, 2563; M. Watanabe et al., J. Clin. Invest. 2004, 113, 1408; A. Figge et al., J. Biol. Chem. 2004, 279, 2790; S. Bilz et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006, 290, E716).

[0063] Pero la reducción de los triglicéridos séricos no es un efecto aislado. El tratamiento de ratones db/db u ob/ob con el agonista sintético del FXR GW4064 produjo una reducción marcada y combinada de los triglicéridos séricos, el colesterol total, los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos como el 3-OH butirato. Por otra parte, la activación del FXR interactúa con la vía de señalización intracelular de la insulina en los hepatocitos, lo que provoca una reducción de la producción de glucosa a partir de la gluconeogénesis hepática y un aumento concomitante del glucógeno hepático. La sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa se vieron afectadas positivamente por el tratamiento con FXR. (K. R. Stayrook et al., Endocrinology 2005, 146, 984; Y. Zhang et al., PNAS 2006, 103, 1006; B. Cariou et al., J. Biol. Chem. 2006, 281, 11039; K. Ma et al., J. Clin. Invest. 2006, 116, 1102; D. Duran-Sandoval et al., Biochimie 2005, 87, 93). También se ha observado recientemente un efecto de reducción del peso corporal en ratones sobrealmimentados con una dieta rica en lípidos (C. Lihong et al., American Diabetes Association (ADA) 66th annual scientific sessions, junio de 2006, Abstract Number 856-P). Este efecto de pérdida de peso podría deberse a la inducción por el FXR del FGF-19, un factor de

crecimiento de fibroblastos que se sabe que conduce a la pérdida de peso y al fenotipo atlético (J. Holt et al., Genes Dev. 2003, 17, 1581; E. Tomlinson et al., Endocrinology 2002, 143, 1741). En recientes solicitudes de patente, se demostró el efecto del agonista FXR en la reducción del peso corporal (documentos WO 2004/087076 ; WO 2003/080803).

- 5 [0064] En conjunto, estos efectos farmacológicos de los agonistas de FXR pueden explotarse de diferentes maneras terapéuticas: Los compuestos de unión a FXR se consideran buenos candidatos para el tratamiento de la diabetes de tipo II por sus efectos de sensibilización a la insulina, glucogénicos y de reducción de lípidos.
- 10 [0065] También se describen los compuestos y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de la diabetes de tipo II, que puede superarse mediante la regulación ascendente mediada por FXR de la sensibilidad sistémica a la insulina y la señalización intracelular de insulina en el hígado, el aumento de la captación y metabolización periférica de glucosa, el aumento del almacenamiento de glucógeno en el hígado, la disminución de la salida de glucosa al suero a partir de la gluconeogénesis hepática.
- 15 [0066] En otro ejemplo, dichos compuestos y composiciones farmacéuticas se utilizan en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades intrahepáticas crónicas, como la PBC, la PSC, la colestasis familiar progresiva (PFIC), la cirrosis inducida por el alcohol y la colestasis asociada, y algunas formas de enfermedades colestásicas extrahepáticas, o la fibrosis hepática.
- 20 [0067] También se describe un compuesto de Fórmula (1) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones gastrointestinales con una absorción reducida de grasa dietética y vitaminas dietéticas liposolubles que puede superarse mediante el aumento de los niveles intestinales de ácidos biliares y fosfolípidos.
- 25 [0068] También se describe dicho compuesto o composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos de lípidos y lipoproteínas tales como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y aterosclerosis como afección clínicamente manifiesta que puede mejorarse mediante el efecto beneficioso de FXR en la reducción del colesterol plasmático total, la reducción de los triglicéridos séricos, el aumento de la conversión del colesterol hepático en ácidos biliares y el aumento del aclaramiento y la conversión metabólica de VLDL y otras lipoproteínas en el hígado.
- 30 [0069] También se describe dicho compuesto y composición farmacéutica para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades en las que pueden aprovecharse los efectos combinados de reducción de lípidos, anticoagulantes y antifibróticos de los medicamentos dirigidos a FXR para el tratamiento de la esteatosis hepática y síndromes asociados como la NASH, o para el tratamiento de los efectos colestáticos y fibróticos que se asocian con la cirrosis inducida por el alcohol, o con formas de hepatitis transmitidas por virus.
- 35 [0070] Junto con los efectos hipolipídicos también se demostró que la pérdida de FXR funcional conduce a un aumento de la aterosclerosis en ratones *knockout ApoE* (E. A. Hanniman et al., J. Lipid Res. 2005, 46, 2595). Por lo tanto, los agonistas del FXR podrían tener utilidad clínica como fármacos antiateroscleróticos y cardioprotectores. La regulación a la baja de la endotelina-1 en las células musculares lisas vasculares también podría contribuir a estos efectos terapéuticos beneficiosos (F. He et al., Circ. Res. 2006, 98, 192).
- 40 [0071] También se describe un compuesto según la Fórmula (1) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para su uso en el tratamiento preventivo y postraumático de trastornos cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio, el accidente cerebrovascular agudo o la trombosis que se producen como punto final de la aterosclerosis obstructiva crónica.
- 45 [0072] Además de controlar la formación de pólipos intestinales y colónicos, el FXR parece expresarse en el tejido y las líneas celulares del cáncer de mama, pero no en el tejido mamario sano, y parece interactuar con el Receptor de Estrógeno en las células de cáncer de mama ER positivas (K. E. Swales et al., Cancer Res. 2006, 66, 10120 y F. Journe et al., Breast Cancer Res. Trata. 2009, 115, 523).
- 50 [0073] Esto permitiría considerar el FXR también como una diana potencial para el tratamiento de enfermedades proliferativas, especialmente formas de cáncer metastásico que expresan una forma de FXR sensible a moléculas pequeñas.
- 55 [0074] También se describen dichos compuestos y composiciones farmacéuticas para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos hiperproliferativos malignos tales como diferentes formas de cáncer, específicamente ciertas formas de cáncer de mama, hígado o colon donde la interferencia con un ligando FXR tendrá un impacto beneficioso.
- 60 [0075] Por último, el FXR también parece estar implicado en el control de la defensa antibacteriana en el intestino (T. Inagaki et al., PNAS. 2006, 103, 3920), aunque no se proporciona un mecanismo exacto. Sin embargo, a partir de estos datos publicados, se puede concluir que el tratamiento con agonistas de FXR podría tener un impacto beneficioso en la terapia de los Trastornos Inflamatorios Intestinales (EI), en particular aquellas formas en las que se ve afectada la parte superior (ileal) del intestino (por ejemplo, la enfermedad de Crohn ileal) porque éste parece ser el lugar de acción del

control de FXR sobre el crecimiento bacteriano. En la IBD, la desensibilización de la respuesta inmunitaria adaptativa está de algún modo alterada en el sistema inmunitario intestinal. El sobrecrecimiento bacteriano podría ser el desencadenante de una respuesta inflamatoria crónica. Por lo tanto, la amortiguación del crecimiento bacteriano mediante mecanismos basados en FXR podría ser un mecanismo clave para prevenir los episodios inflamatorios agudos.

5

[0076] También se describe un compuesto según la Fórmula (1) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con las Enfermedades Inflamatorias Intestinales como la enfermedad de Crohn o la Colitis ulcerosa. Se cree que la restauración de la función de barrera intestinal mediada por FXR y la reducción de la carga bacteriana no comensal ayudan a reducir la exposición de antígenos bacterianos al sistema inmunitario intestinal y, por tanto, pueden reducir las respuestas inflamatorias.

10

[0077] También se describe un compuesto o composición farmacéutica para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de la obesidad y trastornos asociados como el síndrome metabólico (condiciones combinadas de dislipidemias, diabetes e índice de masa corporal anormalmente alto) que puede superarse mediante la reducción mediada por FXR de los triglicéridos séricos, la glucosa en sangre y el aumento de la sensibilidad a la insulina y la pérdida de peso mediada por FXR.

15

[0078] Los compuestos o composiciones farmacéuticas aquí descritos son útiles para prevenir y/o tratar complicaciones clínicas de la Diabetes Tipo I y Tipo II. Ejemplos de estas complicaciones son la nefropatía diabética, la retinopatía diabética, las neuropatías diabéticas o la Enfermedad Oclusiva Arterial Periférica (PAOD). La presente invención también abarca otras complicaciones clínicas de la diabetes.

20

[0079] Además, las afecciones y enfermedades que resultan de la degeneración grasa y fibrótica crónica de órganos debido a la acumulación forzada de lípidos y, específicamente, de triglicéridos y la subsiguiente activación de vías profibróticas también pueden prevenirse y/o tratarse mediante la aplicación de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento. Tales afecciones y enfermedades abarcan NASH y los estados colestásicos crónicos en el hígado, la glomeruloesclerosis y la nefropatía diabética en el riñón, la degeneración de la mácula y la retinopatía diabética en el ojo y las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer en el cerebro o las neuropatías diabéticas en el sistema nervioso periférico.

25

[0080] En el uso práctico, los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención pueden combinarse como el ingrediente activo en mezcla íntima con un portador farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica. El portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, p. ej., oral o parenteral (incluida la intravenosa). En la preparación de las composiciones para administración oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcohol, agentes aromatizantes, conservantes, colorantes y similares en el caso de preparaciones orales líquidas, como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o portadores como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparados orales sólidos como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose los preparados orales sólidos a los líquidos.

30

[0081] Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar. Dichas composiciones y preparados deben contener al menos un 0,1 por ciento de compuesto activo. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones puede, por supuesto, ser variado y puede ser convenientemente entre aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 60 por ciento del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis eficaz. Los compuestos activos también pueden administrarse por vía intranasal como, por ejemplo, gotas líquidas o aerosoles.

45

[0082] Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes como fosfato dicálcico; un agente desintegrador como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante como estearato de magnesio; y un agente edulcorante como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma de unidad de administración es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido como un aceite graso.

50

[0083] Otros materiales diversos pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de administración. Por ejemplo, las pastillas pueden estar recubiertas de goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante como el sabor a cereza o naranja.

60

[0084] Puesto que los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención representan en su mayoría ácidos carboxílicos o isósteros aniónicos similares de los mismos, y puesto que es bien sabido que las formas de sal de los compuestos farmacológicos iónicos pueden afectar sustancialmente a la biodisponibilidad de los compuestos farmacológicos, los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse como sales con varias contracciones para obtener una formulación disponible por vía oral. Dichos cationes farmacéuticamente

aceptables pueden ser, entre otros, iones mono o bivalentes como el amonio, los metales alcalinos sodio o potasio o los metales alcalinotérreos magnesio o calcio, ciertas aminas farmacéuticamente aceptables como el tris(hidroximetil)aminometano, la etilendiamina, la dietilamina, la piperazina u otros, o ciertos aminoácidos catiónicos como la lisina o la arginina.

5

[0085] Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención también pueden administrarse por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de estos compuestos activos pueden prepararse en agua convenientemente mezclada con un tensioactivo como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar la proliferación de microorganismos.

10

[0086] Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto de que se pueda jeringar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, p. ej., agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

15

[0087] Puede emplearse cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un mamífero, especialmente a un ser humano, una dosis eficaz de un compuesto utilizado en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse por vía oral, rectal, tópica, parenteral, ocular, pulmonar, nasal y similares. Las formas de administración incluyen comprimidos, troqueles, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, pomadas, aerosoles y similares. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención se administran por vía oral.

20

[0088] La dosis efectiva del ingrediente activo empleado puede variar dependiendo del compuesto particular empleado, el modo de administración, la condición a tratar y la severidad de la condición a tratar. Una persona experta en la materia puede determinar fácilmente dicha administración.

25

[0089] En el caso de un ser humano adulto de 70 kg, la dosis diaria total será de 7 miligramos a 350 miligramos. La pauta posológica puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

30

[0090] Los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos de los siguientes Esquemas y Ejemplos, utilizando materiales apropiados y se ejemplifican además con los siguientes ejemplos específicos. Además, mediante la utilización de los procedimientos descritos en el presente documento, en conjunción con las habilidades ordinarias en el arte, compuestos adicionales utilizados en las composiciones de la presente invención reivindicada en el presente documento se pueden preparar fácilmente. Sin embargo, no debe interpretarse que los compuestos ilustrados en los ejemplos forman el único género considerado como invención. Los ejemplos ilustran además detalles para la preparación de los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención. Los expertos en la materia comprenderán fácilmente que para preparar estos compuestos pueden utilizarse variaciones conocidas de las condiciones y procesos de los siguientes procedimientos de preparación. Los compuestos instantáneos se aislan generalmente en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, como las descritas anteriormente.

35

[0091] Las bases libres de amina correspondientes a las sales aisladas pueden generarse por neutralización con una base adecuada, como hidrogenocarbonato de sodio acuoso, carbonato de sodio, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, y extracción de la base libre de amina liberada en un disolvente orgánico, seguida de evaporación. La base libre de amina, aislada de esta manera, puede convertirse en otra sal farmacéuticamente aceptable mediante disolución en un disolvente orgánico, seguida de la adición del ácido apropiado y la posterior evaporación, precipitación o cristalización. Los ácidos libres carboxílicos correspondientes a las sales aisladas pueden generarse por neutralización con un ácido adecuado, como ácido clorhídrico acuoso, sulfato ácido de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, y extracción del ácido libre carboxílico liberado en un disolvente orgánico, seguida de evaporación. El ácido carboxílico, aislado de esta manera, puede convertirse en otra sal farmacéuticamente aceptable mediante disolución en un disolvente orgánico, seguida de la adición de la base apropiada y la posterior evaporación, precipitación o cristalización.

40

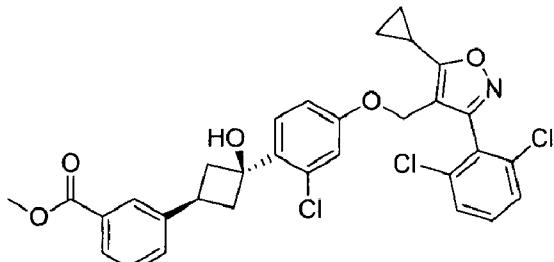
[0092] A continuación se muestra una ilustración de la preparación de los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención. Salvo que se indique lo contrario en los esquemas, las variables tienen el mismo significado descrito anteriormente. Los ejemplos que se presentan a continuación pretenden ilustrar realizaciones particulares de los compuestos utilizados en las composiciones de la invención. Los materiales de partida adecuados, los componentes básicos y los reactivos empleados en la síntesis descrita a continuación están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich o Acros Organics, por ejemplo, o pueden prepararse rutinariamente mediante procedimientos descritos en la bibliografía, por ejemplo en "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure", 5^a edición; John Wiley & Sons o T. Eicher, S. Hauptmann "The Chemistry of Heterocycles; Structures, Reactions, Synthesis and Application", 2^a edición, Wiley-VCH 2003; Fieser et al. "Fiesers' Reagents for organic Synthesis" John Wiley & Sons 2000.

Ejemplos

Ejemplo 1: 3-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoato de metilo (**1**)

[0093]

5



15

Etapa 1: 4-((4-Bromo-3-clorofenoxy)metil)-5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)-isoxazol (1a)

[0094] A una solución de (5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metanol (13 g, 45,8 mmol) en CH₂Cl₂ (DCM) (200 mL) se añadió SOCl₂ gota a gota (40 mL, 336 mmol). La mezcla resultante se agitó a rt durante 2 h y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (200 mL) y a esta solución se añadieron 4-bromo-3-clorofenol (9,7 g, 47 mmol), K₂CO₃ (40 g, 290 mmol) y NaI (12 g, 80 mmol). La mezcla se agitó a 60°C durante la noche, se enfrió a rt, se diluyó con agua (1000 mL) y se extrajo con acetato de etilo (EA) (500 mL × 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 mL × 3), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (CC) para dar el compuesto base **1a** (19 g, 88%) como sólido blanco.

Etapa 1: 3-(2,2-dicloro-3-oxociclobutil)benzoato de metilo (1b)

[0095] En un matraz de fondo redondo de 3 bocas, bajo atmósfera de nitrógeno, provisto de condensador, agitador superior y embudo de goteo de presión igualada, se disolvió 3-vinilbenzoato de metilo (5 g, 31 mmol) en Et₂O seco (150 mL). A este matraz se añadió polvo de cinc (6 g, 3 eq) y la reacción se sonicó durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadió gota a gota una disolución de tricloroacetylcloruro (8,7 mL, 2,5 eq) en Et₂O seco (50mL) mientras continuaba la sonicación durante los 30 min siguientes. Durante el proceso, la mezcla de reacción se calentó a 35°C. La sonicación continuó durante 2,5 h a refljo y la reacción pareció completarse mediante análisis ¹H NMR. La reacción se dejó enfriar a rt y se extinguíó con agua (~50 mL). Esto se hizo gota a gota intercalando varias veces algunos minutos, ya que se producía una reacción exotérmica retardada. Tras 20 min de agitación en agua, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celita y se enjuagó con Et₂O. La capa orgánica se lavó con porciones de agua (2 × 250 mL), bicarbonato sódico saturado (2 × 250 mL) y salmuera (1 × 250 mL), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto **1b** como un aceite espeso amarillo oscuro (crudo 8,7 g).

Etapa 2: 3-(3-oxociclobutil)benzoato de metilo (1c)

[0096] El compuesto bruto **1b** (8,7 g) se disolvió en ácido acético glacial (55 mL) en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de nitrógeno. A este matraz se añadió polvo de cinc (4,6 g, 2,2 eq) y la reacción se agitó y calentó a 120°C durante 3 h. Tras enfriar a rt, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de celita y se lavó con porciones de EA. La solución combinada se concentró a presión reducida antes de disolverla en EA (500 mL), lavarla con salmuera (150 mL × 2) y secarla sobre sulfato sódico, filtrarla y concentrarla de nuevo. La mezcla bruta se agitó durante 5 min en cloroformo (250 mL) y se filtró a través de un embudo sinterizado. El filtrado se concentró para obtener el producto bruto en forma de aceite amarillo pálido. El producto bruto se purificó por CC en (PE/EA = 9:1, PE = éter de petróleo) para dar el producto deseado **1c** (2,5 g, 38% en 2 etapas) como aceite amarillo pálido.

Etapa 3: 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benzoato de metilo (1)

[0097] A una solución agitada del compuesto **1a** (1,67 g, 3,5 mmol) en THF seco (30 mL) se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexano, 1,2 eq, 1,69 mL) gota a gota durante 10 min a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó durante 1 h a esta temperatura antes de añadir una solución del compuesto **1c** (0,72 g, 1 eq) en THF seco (10 mL) gota a gota y se agitó durante 1 h a esta temperatura. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta rt y se dejó agitando toda la noche. La reacción se extinguíó con una solución de cloruro amónico saturado (50 mL) y EA (250 mL).

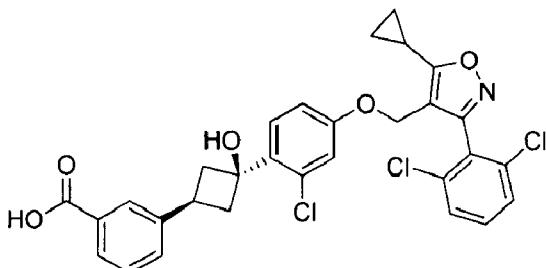
[0098] La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó con EA (2 × 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para obtener el producto bruto en forma de aceite marrón. El producto se aisló tras CC con PE/EA (19:1 a 3:1). La reacción y la purificación se repitieron dos veces a la misma escala y el producto combinado (3,13 g) se volvió a purificar en las mismas condiciones para obtener el producto final **1** (1,7 g, 19%). ¹H NMR (CDCl₃): 7,93 (m, 1H), 7,90-7,85 (m, 1H), 7,50-7,30 (m, 5H), 6,88 (s, 1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,20-3,10 (m, 1H), 3,00-2,91 (m, 2H), 2,60-2,49 (m, 2H), 2,15-2,08 (m, 1H), 1,30-1,25 (m, 2H), 1,15-

1,10 (m, 2H).

Ejemplo 2: Ácido hidroxiciclobutilbenzoico (**2**)

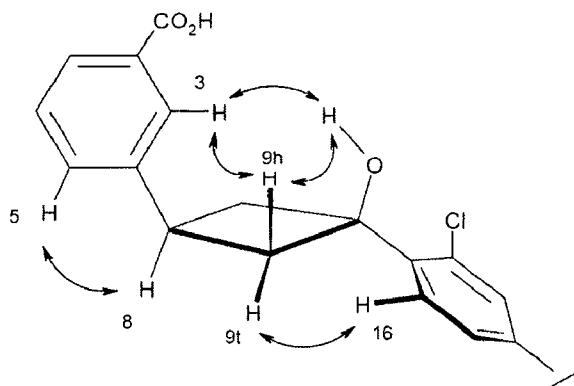
5

[0098]



[0099] El compuesto **1** (1,7 g, 2,84 mmol) se disolvió en THF (100 mL) a rt. Se añadió una solución de LiOH (285 mg, 4,2 eq) en agua (20 mL) y la solución se agitó y calentó a 35°C durante tres días. Transcurrido este tiempo, se eliminó el THF a presión reducida. La solución acuosa restante se diluyó con agua (25 mL) y se lavó con Et₂O (2 x 50 mL). A continuación, la capa acuosa se transfirió a un matraz de fondo redondo y se acidificó a pH 6 con HCl 1 N. El precipitado blanco formado se filtró y se secó a presión reducida a 50°C para dar el compuesto base **2** (1,3 g, 78%, isómero único por ¹H-NMR y LC-MS) como sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7,98 (s, 1H), 7,86 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,58-7,46 (m, 5H), 7,41 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,80 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,29-3,25 (m, 2H), 2,96 (m, 1H), 2,55-2,49 (m, 2H), 2,37 (m, 1H), 1,24-1,22 (m, 4H). MS (ESI⁺) m/z: 584 (582) [M-1].

[0100] Los NOE intensivos relevantes (obtenidos a partir de los espectros ROESY; flechas más abajo) indican que las dos moléculas aromáticas están orientadas 1,3-trans en el Ejemplo **2**.



45 Vía alternativa al Ejemplo 2

Etapa 1: 3-(3-Bromofenil)ciclobutanona (**2a**)

[0101] La *N,N*-dimetilacetamida (9,0 g, 103 mmol) se disolvió en 1,2-dicloroetano (200 mL). La solución se enfrió a 0°C antes de añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (63 g, 223 mmol). La reacción se agitó durante 60 min más a 0°C. A continuación se añadieron 1-bromo-3-vinilbenceno (15 g, 81,9 mmol) y 2,4,6-colidina (10,5 g, 86,6 mmol). La reacción se calentó a refluo durante una noche, se extinguío añadiendo agua (300 mL) y se agitó durante 2 h a rt. La mezcla se extrajo con DCM (300 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. La purificación por CC (EA/PE = 1:20) dio el compuesto base **2a** (5,0 g, 27%) como sólido amarillo pálido.

55

Etapa 2: 3-(3-Bromofenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (**2b**)

[0102] A una solución del compuesto **1a** (14 g, 29,6 mmol) en THF seco (500 mL) a -78°C se añadió gota a gota n-BuLi (18,5 mL, 1,6 M en hexano, 29,6 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h más a -78°C y se añadió gota a gota una solución del compuesto **2a** (6,5 g, 28,9 mmol) en THF seco (50 mL). La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 h, se calentó hasta rt y se extinguío con solución NH₄Cl acuosa saturada (500 mL). La mezcla se extrajo con EA (500 mL × 2), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por CC (EA/PE = 1:5) para dar el compuesto base **2b** (6,5 g, 37%) como sólido blanco.

65

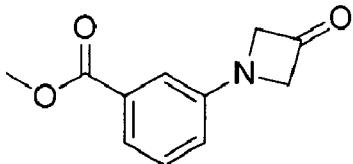
Etapa 3: 3-(3-cianofenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (**2c**)

[0103] A una solución del compuesto **2b** (3,1 g, 5 mmol) en DMF (50 mL) se añadieron bajo atmósfera de argón Zn(CN)₂ (500 mg, 4,3 mmol), Pd₂(dba)₃ (300 mg, 0,33 mmol) y Xantphos (150 mg, 0,31 mmol). La mezcla se agitó durante 10 h a 115°C bajo irradiación de microondas. Tras enfriar a rt, la mezcla de reacción se diluyó con agua (250 mL) y se extrajo con EA (250 mL × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL × 3) y se secaron sobre Na₂SO₄.

5 El residuo se purificó por CC (EA/PE) para dar el compuesto base **2c** (1,2 g, 42%) como sólido amarillo pálido.

Etapa 4: Ácido 3-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutilbenzoico (**2**)

10 **[0104]** A una solución del compuesto **2c** (15 g, 24,2 mmol) en EtOH (750 mL) se añadió NaOH aq. (40 g en 100 mL de agua). La mezcla resultante se calentó a refluro durante una noche y después se enfrió a rt. La reacción se concentró al vacío para eliminar el disolvente volátil, se diluyó con agua (1000 mL) y el pH se ajustó a 2 con solución acuosa diluida. HCl (1 N). El precipitado formado se recogió por filtración para dar el producto bruto como sólido amarillo (13,8 g). La purificación por HPLC preparativa en fase preversa (RP-HPLC) permitió obtener el compuesto base **2** (8,0 g, 56%, isómero único por ¹H-NMR) como sólido blanco.

Ejemplo Preparativo 3**[0105]**Etapa 1: 3-(3-hidroxiazetidin-1-il)benzoato de metilo (**3a**)

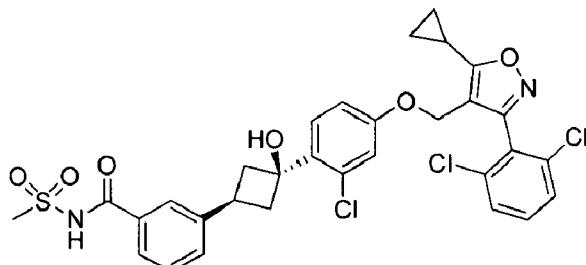
30 **[0106]** A una solución de 3-yodobenzoato de metilo (4,5 g, 17,2 mmol) en DMSO (30 mL) se añadió sal de cloruro de hidrógeno de 3-azetidin-3-ol (1,3 g, 11,8 mmol), Cs₂CO₃ (9,5 g, 29,2 mmol), CuI (446 mg, 2,3 mmol) y L-prolina (540 mg, 4,7 mmol) y después la mezcla se calentó a 90°C durante 18 h bajo atmósfera de argón. La solución se diluyó con EA y agua y la capa orgánica se lavó con salmuera tres veces, se concentró a presión reducida y se purificó por CC (PE/EA = 2:1) para dar el compuesto **3a** (1,6 g, 66%) como sólido amarillo.

35

Etapa 2: 3-(3-oxoazetidin-1-il)benzoato de metilo (**3**)

40 **[0107]** A una solución del compuesto **3a** (1,60 g, 7,7 mmol) en DCM seco (30 mL) se añadió Dess-Martin periodinano (6,5 g, 15,4 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó a rt durante 2 h bajo atmósfera de N₂. La mezcla se extinguíó con solución saturada de bicarbonato sódico y se diluyó con EA. La porción orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó por CC (PE/EA = 4:1) para dar el compuesto **3** (1,2 g, 75%) como un sólido blanco.

45

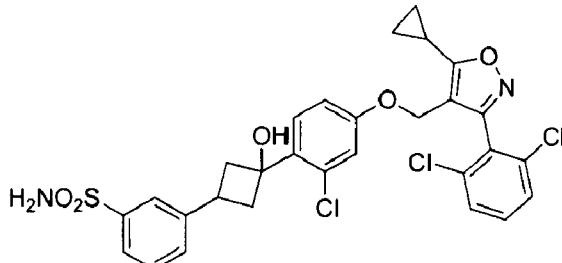
Ejemplo 4: 3-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-N-(metilsulfonil)benzamida (**4**)**[0108]**

50

55 **[0109]** A la solución del compuesto **2** (100 mg, 0,17 mmol) en DCM (5 mL) se añadieron EDCI-HCl (100 mg, 0,52 mmol), DMAP (100 mg, 0,81 mmol) y MeSO₂NH₂ (40 mg, 0,42 mmol). La mezcla se agitó a 30°C durante la noche y después se diluyó con EA y se lavó con H₂O, salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. La concentración in vacuo y la purificación mediante TLC prep. dieron el compuesto diana crudo como un sólido amarillo claro. La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto base **4** (38 mg, 33%) como sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7,87 (s, 1H), 7,74 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,61-7,53 (m, 4H), 7,50-7,46 (m, 2H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,80 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,30-3,26 (m, 2H), 3,01 (m, 1H), 2,57-2,51 (m, 2H), 2,37 (m, 1H), 1,25-1,23 (m, 4H). MS (ESI⁺) m/z: 659 [M-1].

Ejemplo 5: 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)bencenosulfonamida (**5**)

5 [0110]



Etapa 1: 3-(3-(benciltio)fenil)-1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)ciclobutanol (**5a**)

20 [0111] A una solución del compuesto **2b** (619 mg, 1 mmol) en tolueno (20 mL) bajo atmósfera de argón se añadieron K₂CO₃ (276 mg, 2 mmol), fenilmetanol (125 mg, 1 mmol), Pd₂(dba)₃ (200 mg, 0,22 mmol) y Xantphos (75 mg, 0,16 mmol). A continuación, la mezcla se agitó a 115°C durante 4 h. Tras enfriar a rt, la reacción se diluyó con agua (100 mL) y se extrajo con EA (100 mL × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL × 2), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron hasta sequedad. La purificación por CC dio el compuesto **5a** (200 mg; 30%) como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,36-7,32 (m, 3H), 7,28-7,07 (m, 9H), 7,01 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,66 (dd, J = 8,8, 2,0 Hz, 1H), 4,75 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,06-3,00 (m, 2H), 2,84-2,78 (m, 2H), 2,44-2,38 (m, 2H), 2,75 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,06-3,00 (m, 2H), 2,84-2,78 (m, 2H), 2,44-2,38 (m, 3H), 2,09 (m, 1H), 1,24-1,18 (m, 2H), 1,11-1,08 (m, 2H). MS (ESI⁺) m/z: 662 [M+1]⁺.

25 Etapa 2: Cloruro de 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)benceno-30 1-sulfonilo (**5b**)

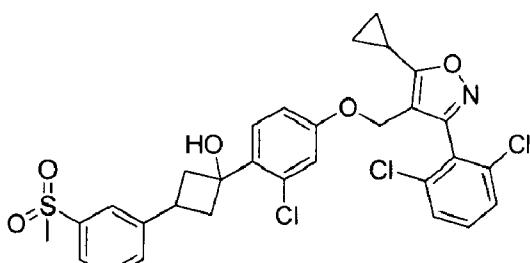
35 [0112] A una solución del compuesto **5a** (34 mg, 0,05 mmol) en CH₃CN/HOAc/H₂O (1 mL/37 μL/25 μL) se añadió 2,4-dicloro-5,5-dimetilhidanción (20 mg, 0,1 mmol). La mezcla se agitó a 0-5°C durante 2 h. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de NaHCO₃ al 5%, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. Concentrado hasta sequedad, se obtuvo el producto bruto **5b** (30 mg) en forma de aceite incoloro, que se utilizó directamente en la etapa siguiente.

Etapa 3: 3-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)bencenosulfonamida (**5**)

40 [0113] A la solución del compuesto **5b** (30 mg) en CH₃CN (2 mL) se añadió NH₄OH (0,3 mL). La mezcla se agitó a rt durante 1 h. Concentración hasta sequedad y purificación por RP-HPLC prep. dio el compuesto base **5** (3,5 mg, 10% en dos etapas) como sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,85 (s, 1H), 7,77 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,54-7,41 (m, 5H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H), 4,77 (s, amplio, 2H), 3,20 (t, J = 10,4 Hz, 2H), 3,04 (m, 1H), 2,58 (t, J = 10,6 Hz, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,31-1,30 (m, 2H), 1,20-1,16 (m, 2H). MS (ESI⁺) m/z: 617 [M-1].

45 Ejemplo 6: 1-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-(3-(metilsulfonil)fenil)ciclobutanol (**6**)

50 [0114]

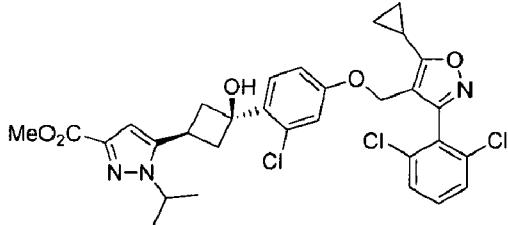


55 [0115] A la solución del compuesto **2b** (200 mg, 0,32 mmol) en DMSO, se añadió metanosulfonato sódico (50 mg, 0,46 mmol), Cul (20 mg, 0,1 mmol), L-prolina (37 mg, 0,32 mmol) y diisopropiletilamina (DIEA) (41 mg, 0,32 mmol). La mezcla se agitó a 95°C durante la noche y después se diluyó con agua y se extrajo con EA. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y se secaron sobre Na₂SO₄. Concentración a sequedad a presión reducida y purificación por prep. RP-HPLC dio el compuesto base **6** como un sólido blanco (35 mg, 21%, isómero único por ¹H NMR y LC-MS). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,84 (s, 1H), 7,79 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,53 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,44-7,41 (m,

3H), 7,34 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,75 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H), 3,24-3,19 (m, 2H), 3,08-3,04 (m, 4H), 2,62-2,56 (m, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,31-1,29 (m, 2H), 1,20-1,16 (m, 2H). MS (ESI+) m/z: 618 (620) [M+1]⁺, 600 (602) [M-H₂O+1]⁺.

5 **Ejemplo 7: 5-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7)**

[0116]



Etapa 1: 1-isopropil-5-vinil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7a)

[0117] Una suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (2,69 g, 7,52 mmol) en THF seco (40 mL) se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota *n*-butilitio (solución 1,6 M en hexano, 3,7 mL, 5,91 mmol). La suspensión de color amarillo anaranjado se agitó a -78 °C durante 50 min y, a continuación, se añadió gota a gota una solución de 5-formil-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (preparada como se describe en el documento WO 2011/020615, 1,05 g, 5,37 mmol) en THF seco (10 mL). La mezcla se agitó a -78°C durante 1,75 h, se retiró el baño refrigerante y la mezcla (suspensión blanquecina) se agitó a rt durante 1 h. A continuación, la mezcla se dividió entre solución aq. de NaHCO₃ (150 mL) y EA (150 mL). La capa acuosa se extrajo dos veces con EA (50 mL cada una) y la capa orgánica combinada se lavó dos veces con agua (50 mL cada una) y se concentró sin secar para dar 2,74 g de un aceite amarillo que cristalizó lentamente. El producto bruto se purificó por CC (preadsorción con CH₂Cl₂, hexano/EA 4:1) para dar el alqueno 7a (590 mg, 57%) como un aceite incoloro. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7,02 (s, 1H), 6,87 (dd, J = 17,3, 11,2 Hz, 1H), 5,94 (dd, J = 17,3, 1,3 Hz, 1H), 5,45 (dd, J = 11,2, 1,3 Hz, 1H), 4,80 (sept, J = 6,6 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 1,38 (d, J = 6,6 Hz, 6H). C₁₀H₁₄N₂O₂ (194,23). LC-MS (ESI): 195 [M+H]⁺.

Etapa 2: 1-isopropil-5-(3-oxociclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7b)

[0118] La reacción se realizó en dos tubos secos sellados (dos lotes de igual cantidad). Los lotes se combinaron para su elaboración y purificación. Procedimiento de lote único: A una solución de *N,N*-dimetilacetamida (0,22 mL, 2,34 mmol) en 1,2-dicloroetano (12 mL) bajo nitrógeno a - 15 a -20°C se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (0,43 mL, 2,57 mmol), formando una suspensión opaca. La mezcla se agitó a -15°C durante 10 min, y se añadió gota a gota una disolución de alqueno 7a (151 mg, 0,78 mmol) y sim-colidina (0,42 mL, 3,12 mmol) en 1,2-dicloroetano (3 mL) (se formó una disolución amarilla). Una vez completada la adición, se retiró el baño refrigerante, se dejó que la mezcla se calentara hasta rt (solución turbia anaranjada) y se selló el tubo. A continuación, la mezcla se agitó a 90°C durante 15 h (mezclas marrones). Se añadió agua (5 mL) a rt y las mezclas se agitaron a 100°C durante 2 h (soluciones bifásicas turbias). Tras enfriar hasta rt, se combinaron las mezclas y se repartieron entre solución acuosa diluida y solución acuosa diluida. NaHCO₃ y CH₂Cl₂ y la capa acuosa se extrajo tres veces con CH₂Cl₂ (30 mL cada una). La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar un aceite marrón (2,2 g). La purificación por CC (6×13 cm, preadsorción con CH₂Cl₂, tolueno/EA 3:1) dio la ciclobutanona 7b (115,5 mg, 31%) como un aceite amarillo. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 6,81 (s, 1H), 4,58 (sept, J = 6,5 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,85-3,73 (m, 1H), 3,59-3,45 (m, 2H), 3,37-3,24 (m, 2H, parcialmente solapado por señal de agua), 1,39 (d, J = 6,6 Hz, 6H). C₁₂H₁₆N₂O₃ (236,27). LC-MS (ESI): 237 [M+H]⁺.

Etapa 3: 5-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (7)

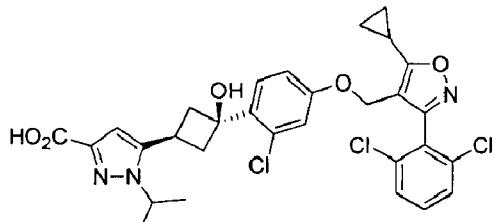
[0119] Una disolución de bromuro 1a (368 mg, 0,78 mmol) en THF seco (6 mL) se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota una disolución de *n*-butilitio 1,6M en hexanos (0,48 mL, 0,76 mmol). La mezcla se agitó a -78°C durante 20 min y se añadió gota a gota una solución de ciclobutanona 7b (164 mg, 0,69 mmol) en THF seco (4 mL). La mezcla se agitó a -78°C durante 2,5 h y se mezcló con agua saturada. Se añadió gota a gota solución de NH₄Cl (1 mL) a esta temperatura. Se retiró el baño refrigerante y la mezcla se dejó calentar hasta rt y se agitó a rt durante 0,5 h. A continuación, la mezcla se añadió a una solución aq. diluida de NH₄Cl y se extrajo tres veces con EA. La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar 516 mg de un aceite casi incoloro. La purificación por CC (4,5×23 cm, preadsorción con CH₂Cl₂, eluyente hexano/acetona = 2:1) permitió recuperar la ciclobutanona 7b (31,3 mg, 19%, aceite ligeramente amarillo) y el producto impuro (333 mg). La repurificación por CC (4×22 cm, hexano/EA = 1:1) o TLC prep. dio el producto puro 7 (210 mg, 48%) como espuma blanca. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7,65 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,59-7,48 (m, 2H), 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 8,6, 2,6 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,92 (s, 2H), 4,42 (m, J = 6,5 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,24-3,11 (m, 2H, parcialmente solapado por señal de agua), 3,04-2,90 (m, 1H), 2,54-2,33 (m, 3H, parcialmente solapado por señal de DMSO), 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 6H), 1,26-1,08 (m, 4H).

C₃₁H₃₀Cl₃N₃O₅ (630.95). LC-MS (ESI): 630, 632 [M+H]⁺.

Ejemplo 8: Ácido 5-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxílico (**8**)

5

[0120]



10

15

[0121] El éster **7** (98,3 mg, 0,156 mmol) se disolvió en una mezcla de THF (7,5 mL), MeOH (2,5 mL) y agua (2,5 mL) y se añadió LiOH·H₂O (65 mg, 1,56 mmol) a rt. La mezcla se agitó a RT durante 18 h. La mezcla se partió entre solución de NH₄Cl aq. diluido y EA y la capa orgánica se lavó una vez con agua. La capa acuosa combinada se extrajo dos veces con EA. La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar 103 mg de un sólido casi blanco. El producto se purificó por CC (3×3,5 cm, EA/EtOH = 10:1 a 1:4) para obtener **8** (94,8 mg, 99%) como sólido blanco. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7,66-7,60 (m, 1 H), 7,62 (s, 1 H), 7,59-7,49 (m, 2 H), 6,91 (d, J = 2,5 Hz, 1 H), 6,76 (dd, J = 8,6, 2,4 Hz, 1 H), 6,38 (s, 1 H), 5,51 (s, 1 H, intercambiable con D₂O), 4,92 (s, 2H), 4,31 (m, J = 6,5 Hz, 1 H), 3,25-3,08 (m, 2H, parcialmente solapado por señal de agua), 2,93-2,77 (m, 1H), 2,57-2,43 (m, 1H, oculto por señal de DMSO), 2,43-2,29 (m, 2H, parcialmente solapado por señal de DMSO), 1,29 (d, J = 6,5 Hz, 6H), 1,26-1,08 (m, 4H). La señal CO₂H no aparece en el espectro. C₃₀H₂₈Cl₃N₃O₅ (616.92). LC-MS (ESI): 616, 618 [M+H]⁺.

20

25

Vía alternativa al Ejemplo 8

30

Etapa 1: 1-(3-metilenciclobutil)etanona (**8a**)

35

40

45

50

[0122] Se disolvió metilen ciclobutano carbonitrilo (5,0 g, 53,7 mmol) en dietileter seco (25 mL), se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota MeMgBr (26,8 mL, 80,5 mmol, 3 M en éter). La mezcla se dejó agitando toda la noche a rt, se enfrió a 0°C, se extinguío cuidadosamente con solución acuosa de NaHSO₄ al 15%. (100 mL). La mezcla se agitó a rt durante 30 min. y se separaron las capas. La fase acuosa se extrajo con pentano (50 mL) y dietileter (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. Los disolventes se eliminaron al vacío a rt y el producto bruto se obtuvo como un líquido amarillento.

Etapa 2: 4-(3-metilenciclobutil)-2,4-dioxobutanoato de etilo (**8b**)

40

[0123] Se disolvió sodio (1,15 g, 49,9 mmol) en EtOH seco (30 mL, desnaturizado con 5% de dietileter). El compuesto **8a** (5,5 g, 49,9 mmol, crudo) se disolvió en EtOH seco (45 mL) y se añadió la solución de etoxido sódico preparada anteriormente. Esta mezcla se agitó a rt durante 15 min y después se añadió gota a gota oxalato de dietilo (6,8 mL, 49,9 mmol). La mezcla de reacción se colocó en un baño de aceite precalentado (a 67°C) y se agitó a esta temperatura durante 4,5 h. La mezcla se dejó a rt durante la noche. Se eliminó el disolvente, se añadieron EA (100 mL) y HCl 1 M (70 mL) y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se reextractó con EA (50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anh. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó sobre sílice utilizando hexanos/MTBE 9:1 como eluyente dando el producto puro **8b**. Rendimiento: 6,29 g, 56% en dos etapas. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 6,36 (s, 1H), 4,85-4,80 (m, 2H), 4,34 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 3,35-3,25 (m, 1H), 3,05-2,85 (m, 4H), 1,36 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

Etapa 3: 1-isopropil-5-(3-metilenciclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (**8c**)

55

60

[0124] El compuesto **8b** (6,29 g, 29,9 mmol) se disolvió en EtOH seco (65 mL, desnaturizado con un 5% de MeOH) y se añadió clorhidrato de isopropilhidrazina (3,97 g, 35,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a rt. Se eliminó el disolvente y al residuo aceitoso se le añadieron EA (100 mL), agua (50 mL) y NaHCO₃ sat. (50 mL) secuencialmente. Las capas se separaron y la fase acuosa se reextractó con EA (50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (70 mL) y se secaron sobre Na₂SO₄ anh. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se secó a presión reducida. Rendimiento: 7,23 g (contiene 3,4% de EtOAc por NMR, rendimiento puro recalculado: 6,98 g, 94%). El producto bruto **8c** tiene una pureza del 98% por HPLC y NMR. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 6,62 (s, 1H), 4,88-4,82 (m, 2H), 4,42-4,32 (m, 3H), 3,56-3,45 (m, 1H), 3,17-3,07 (m, 2H), 2,88-2,79 (m, 2H), 1,49 (d, J = 8,0 Hz, 6H), 1,37 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

Etapa 4: 1-isopropil-5-(3-oxociclobutil)-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (**8d**)

65

[0125] El compuesto **8c** (6,45 g, 26,0 mmol) se disolvió en una mezcla de MeCN (77 mL) y agua (13 mL) y se enfrió en un baño de hielo. A esta solución se añadió RuCl₃·H₂O (0,19 g, 0,86 mmol), seguido de la adición por porciones de NaIO₄

(19,35 g, 90,9 mmol). Se observó una exotermia durante esta adición. La suspensión espesa obtenida se agitó a rt durante 45 min. La mezcla de reacción se diluyó con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aq. sol. (10%, 260 mL), agua (50 mL) y DCM (100 mL). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2×70 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aq. sol. (10%, 50 mL), agua (100 mL), salmuera (100 mL) y secado sobre anh. Na_2SO_4 anh. El producto bruto (6,5 g) se purificó sobre sílice, eluyendo con hexanos/MTBE para dar el producto puro como un aceite que se solidificó al almacenarlo a -20°C. Rendimiento: 5,8 g (78% en dos etapas). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6), δ (ppm): 6,78 (s, 1 H), 4,57 (h, $J = 8,0$ Hz, 1 H), 4,26 (q, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,85-3,75 (m, 1 H), 3,58-3,45 (m, 2H), 3,35-3,25 (m, 2H), 1,39 (d, $J = 8,0$ Hz, 6H), 1,28 (t, $J = 8,0$ Hz, 3H).

10 Etapa 5: 4-((4-Bromo-3-clorofenoxy)metil)-5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol (8e)

[0126] Se mezcló 3-cloro-4-bromofenol (3,8 g, 18,3 mmol) con (5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metanol (3,47 g, 12,2 mmol) y trifenilfosfina (6,41 g, 24,4 mmol) en tolueno (150 mL). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota DIAD (4,8 mL, 24,4 mmol) como solución en tolueno (10 mL). La reacción se agitó a rt durante 21 h y los disolventes se eliminaron con un rotavapor dejando un residuo aceitoso amarillo. Se disolvió en DCM (200 mL), se añadió sílice (~20 g) y la mezcla se evaporó hasta sequedad. Este material se cargó en la parte superior de una columna de sílice y se purificó eluyendo con hexanos/MTBE 9:1. Las fracciones que contenían producto se agruparon y el disolvente se eliminó a presión reducida, dejando el producto puro **8e** como un aceite incoloro que cristalizó al secarse al vacío durante la noche. Rendimiento: 5,07 g (88%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7,45-7,30 (m, 4H), 6,90 (s, 1H), 6,60-6,55 (m, 1H), 2,15-2,07 (m, 1H), 1,32-1,25 (m, 2H), 1,20-1,11 (m, 2H).

15 Etapa 6: 5-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (8f)

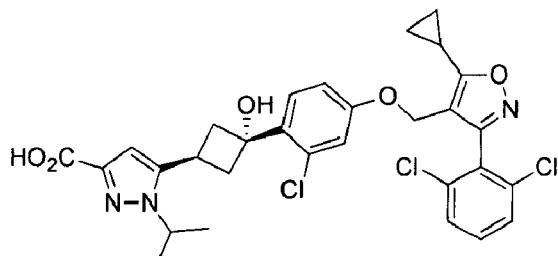
20 [0127] Se disolvió LiCl (0,684 g, 16,15 mmol) en THF (20 mL) a rt y se añadió $i\text{PrMgCl}$ (2,0 M en THF, 8,1 mL, 16,15 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a rt, se enfrió en un baño de hielo y se añadió una solución del compuesto **8e** (2,55 g, 5,38 mmol) en THF (20 mL) durante 5 min. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó a rt durante 4 h. La mezcla se enfrió a -10°C y se añadió rápidamente una solución del compuesto **8d** (1,48 g, 5,92 mmol) en THF (16 mL). La mezcla se agitó a rt durante 90 min. y, a continuación, se agitó 0,5 M NaHSO_4 aq. (35 mL) y EA (50 mL). La mezcla resultante se agitó durante 10 min, se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EA (30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO_3 aq. (50 mL), salmuera (50 mL) y secado sobre Na_2SO_4 anh. El producto bruto (3,79 g) se obtuvo tras la eliminación del disolvente como una espuma blanca. Se purificaron 3,6 g de este crudo en columna de sílice, eluyendo con hexanos/EA 3:2 para dar el producto puro **8f** como una espuma sólida. Rendimiento: 1,62 g (49%). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6), δ (ppm): 7,65-7,47 (m, 4H), 6,93-6,91 (m, 1H), 6,79-6,72 (m, 1H), 6,65 (s, 1H), 5,48 (s, 1 H), 4,92 (s, 2H), 4,42 (h, $J = 8,0$ Hz, 1 H), 4,26 (q, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 3,32 (s, 2 H), 3,22-3,14 (m, 2H), 3,05-2,90 (m, 1 H), 2,45-2,35 (m, 2 H), 1,35-1,10 (m, 14 H).

25 Etapa 7: Ácido 5-((1s,3s)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxílico (8)

30 [0128] El compuesto **8f** (1,60 g, 2,48 mmol) se disolvió en THF (100 mL), después se añadieron secuencialmente MeOH (50 mL), agua (50 mL) y $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ (1,04 g, 24,8 mmol). La mezcla se agitó durante 4,5 h a rt y después se concentró a presión reducida para eliminar el MeOH y el THF. La solución acuosa restante se acidificó añadiendo HCl 1 M acuoso. (24 mL) para alcanzar un pH de 4,05 (control del electrodo de pH). Aproximadamente a pH 7 se empezó a formar un precipitado. El sólido formado se filtró, se lavó en el filtro con agua y se secó al vacío a rt para dar el producto 8 como polvo blanco. Rendimiento: 1,40 g (92%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7,44-7,32 (m, 4H), 6,91 (d, $J = 4,0$ Hz, 1 H), 6,78 (s, 1 H), 6,75 (dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1 H), 4,83 (s, 2H), 4,35-4,20 (m, 1 H), 3,25-3,14 (m, 2H), 3,04-2,90 (m, 1H), 2,62-2,54 (m, 2H), 2,21-2,11 (m, 1H), 1,46 (d, $J = 8,0$ Hz, 6H), 1,34-1,28 (m, 2H), 1,20-1,14 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 172,7, 164,8, 159,2, 158,4, 147,2, 141,3, 135,8, 134,1, 132,8, 131,3, 128,1, 127,6, 127,3, 117,7, 113,3, 110,0, 106,3, 73,1, 59,8, 51,1, 41,7, 22,6, 22,0, 8,5, 7,8. MS (ESI⁺) m/z: 616,4 [M+1]⁺.

35 Ejemplo 8A: 5-((1r,3r)-3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-isopropil-1H-pirazol-3-carboxilato (8A)

40 [0129]



5 [0130] El ejemplo **8A** puede prepararse sometiendo el producto bruto **8f** a la hidrólisis de éster como se ha descrito para **8** y aislando del producto bruto **8** como isómero menor por RP-HPLC preparativa. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7,42-7,30 (m, 2H), 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,75-6,65 (m, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,79 (s, 2H), 4,50-4,41 (m, 1H), 3,96-3,85 (m, 1H), 2,98-2,90 (m, 2H), 2,67-2,57 (m, 2H), 2,20-2,09 (m, 1H), 1,51 (d, J = 8,0 Hz, 6H), 1,32-1,14 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 172,6, 166,2, 159,2, 158,4, 147,4, 141,2, 135,7, 134,6, 132,8, 131,3, 128,1, 127,7, 127,5, 116,8, 113,5, 110,0, 105,8, 75,1, 59,8, 51,2, 41,8, 25,4, 22,6, 8,5, 7,8. MS (ESI $^+$) m/z : 616,3 [M+1] $^+$.

10 [0131] La configuración transanular del isómero mayor (compuesto **8**) y del isómero menor (compuesto **8A**) se confirmó mediante experimentos NOE. Los NOEs indicativos detectados entre protones se indican en las siguientes imágenes mediante flechas dobles:

15

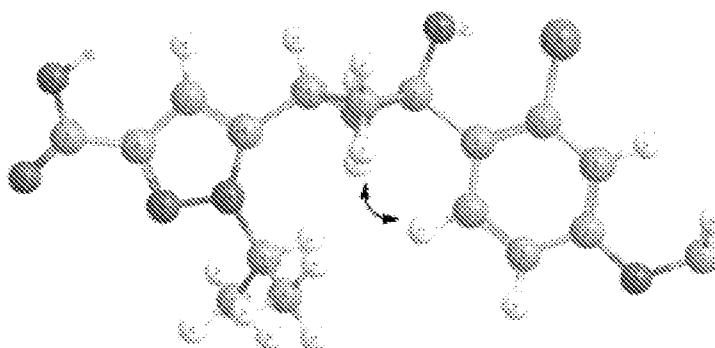


20

25

30 NOEs detectados por ejemplo **8** con configuración transanular 1,3-trans de los elementos aromáticos

35



40

45

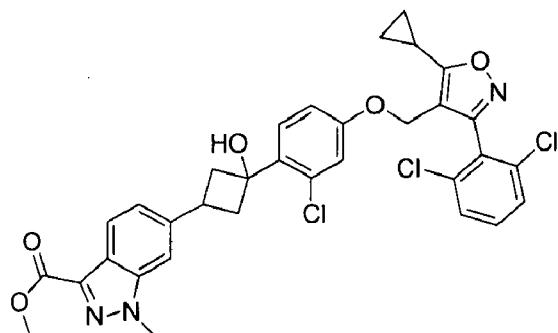
NOEs detectados por ejemplo **8A** con configuración transanular 1,3-cis de los elementos aromáticos

50 **Ejemplo 9:** 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1*H*-indazol-3-carboxilato de metilo (**9**)

55 [0132]

60

65



Etapa 1: 1-metil-6-vinil-1*H*-indazol-3-carboxilato de metilo (**9a**)

[0133] A la solución de 6-bromo-1-metil-1*H*-indazol-3-carboxilato de metilo (60 mg, 0,22 mmol) en DMF (10 mL), se añadió tributil(vinil)estaño (99 μ L, 0,34 mmol), Pd(Ph_3)₄ (11 mg, 9 μ mol). Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a 90°C durante 4 h bajo Ar. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida. La purificación por CC proporcionó el compuesto **9a** (52 mg, 88%).

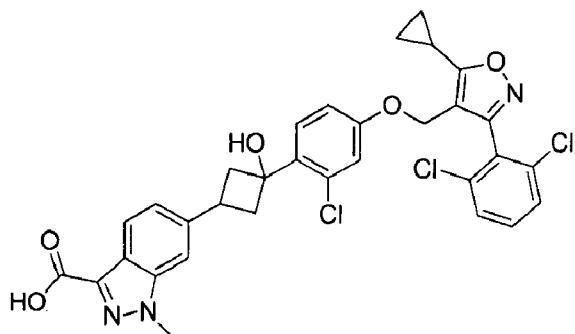
Etapa 2: 1-metil-6-(3-oxociclobutil)-1*H*-indazol-3-carboxilato de metilo (**9b**)

[0134] Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7/Etapa 2, se obtuvo el compuesto **9b** a partir de **9a** con un rendimiento del 57%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,14 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,23 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,13 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 3,87-3,79 (m, 1H), 3,58-3,51 (m, 2H), 3,33-3,26 (m, 2H). m/z: 259 [M+1]⁺.

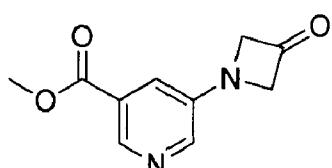
Etapa 3: 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1*H*-indazol-3-carboxilato de metilo (**9**)

[0135] Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7/Etapa 3, se obtuvo el compuesto **9** a partir de **9b** con un rendimiento del 40%.

Ejemplo 10: Ácido 6-(3-(2-cloro-4-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)fenil)-3-hidroxiciclobutil)-1-metil-1*H*-indazol-3-carboxílico (**10**)

[0136]

[0137] Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, se obtuvo el compuesto **10** a partir del compuesto **9** en un 45% de rendimiento como sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,14 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,43-7,32 (m, 4H), 7,29 (m, 1H), 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 7,2 Hz, 2,4 Hz, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,18 (s, 3H), 3,45-3,40 (m, 1H), 3,28-3,23 (m, 2H), 3,19-3,10 (m, 1H), 2,68-2,63 (m, 2H), 2,21-2,14 (m, 1H), 1,33-1,29 (m, 2H), 1,20-1,15 (m, 2H). m/z: 638 [M+1]⁺.

Ejemplo Preparativo 11**[0138]**Etapa 1: 5-(3-hidroxiazetidin-1-il)nicotinato de metilo (**11a**)

[0139] Una mezcla de 5-bromonicotinato de metilo (2,00 g, 9,26 mmol), azetidin-3-ol (1,01 g, 9,26 mmol), Cs_2CO_3 (9,06 g, 27,8 mmol), BINAP (1,15 g, 1,85 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,44 g, 1,85 mmol) en dioxano seco (115 mL) se calentó durante la noche a 85°C bajo atmósfera de N_2 . La mezcla resultante se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC prep. para dar el compuesto **11a** (250 mg, 13%) como un sólido amarillo.

Etapa 2: 5-(3-oxoazetidin-1-il)nicotinato de metilo (11)

[0140] A una solución del compuesto **11a** (250 mg, 1,20 mmol) en DCM seco (15 mL) se añadió Dess-Martin periodinano (1,014 g, 2,40 mmol) a 0°C bajo atmósfera de N₂ y la solución se agitó a rt durante 2 h. La solución resultante se extinguío con solución saturada de bicarbonato sódico y se diluyó con EA. La porción orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó por CC (DCM/MeOH = 150:1) para dar el compuesto **11** (140 mg, 57%) como un sólido amarillo.

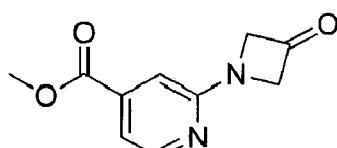
5

Ejemplo Preparativo 12

[0141] Usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo Preparativo **11** se ha preparado el siguiente compuesto:

10

15

**12**

20

Ejemplo 13/1 a 13/9

[0142] La siguiente tabla enumera otros ejemplos preparados de acuerdo con los ejemplos preparativos y ejemplos mencionados anteriormente. Todos los compuestos enumerados se prepararon como isómeros simples.

25

	n. ^a	Estructura	Datos analíticos
30	13/1		RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,15-1,25 (m, 4H), 2,35-2,50 (m, 5H, parcialmente bajo la señal del disolvente), 2,80-2,91 (m, 1H), 3,11-3,20 (m, 2H), 4,93 (s, 2H), 6,72-6,81 (m, 1H), 6,93 (s, 1H), 7,40-7,51 (m, 2H), 7,52-7,60 (m, 2H), 7,62-7,66 (m, 2H), 7,85-7,90 (m, 2H). MS Calculado: 583; MS Encontrado: 584 [M+H] ⁺ .
35	13/2		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,05-1,12 (m, 4H), 2,18-2,34 (m, 9H), 2,62-2,71 (m, 1H), 2,69-3,09 (m, 2H), 4,76 (s, 2H), 6,60-6,64 (m, 1H), 6,72-6,78 (m, 1H), 6,85 (s, 2H), 7,30-7,42 (m, 4H). MS Calculado: 611; MS Encontrado: 612 [M+H] ⁺ .
40	13/3		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,10-1,23 (m, 4H), 2,36-2,49 (m, 3H), 3,00-3,12 (m, 1H), 3,15-3,25 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 4,95 (s, 2H), 6,72-6,80 (m, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,90-7,00 (m, 1H), 7,42-7,60 (m, 4H), 7,89-7,93 (m, 1H), 7,98 (s, 1H). MS Calculado: 613; MS Encontrado: 612 [M-H] ⁻ .
45	13/4		RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,20-1,30 (m, 4H), 2,27 (s, 3H), 2,30-2,55 (m, 3H), 2,98-3,10 (m, 1H), 3,25-3,40 (m, 2H, parcialmente bajo la señal del disolvente), 4,95 (s, 2H), 6,76-6,84 (m, 1H), 6,91 (s, 1H), 7,20-7,25 (m, 1H), 7,43-7,63 (m, 4H), 7,75-7,82 (m, 1H), 8,03 (s, 1H). MS Calculado: 597; MS Encontrado: 596 [M-H] ⁻ .
50			
55			
60			

65

(continuación)

n. ^o	Estructura	Datos analíticos
5		
10	13/5 	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,20-1,25 (m, 4H), 2,33-2,43 (m, 4H), 2,46-2,56 (m, 2H), 2,89-2,97 (m, 1H), 3,22-3,30 (m, 2H), 4,94 (s, 2H), 6,78-6,82 (m, 1H), 6,90 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,43-7,60 (m, 4H), 7,69 (s, 1H), 7,78 (s, 1H); MS Calculado: 597; MS Encontrado: 596 [M-H] ⁺ .
15	13/6 	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,17-1,23 (m, 4H), 2,31-2,40 (m, 4H), 2,42-2,56 (m, 2H), 2,83-2,92 (m, 1H), 3,19-3,26 (m, 2H), 4,82 (s, 2H), 6,74-6,80 (m, 1H), 6,88 (s, 1H), 7,18-7,22 (m, 1H), 7,43-7,57 (m, 4H), 7,83 (s, 1H); MS Calculado: 597; MS Encontrado: 596 [M+H] ⁺ .
20	13/7 	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ: 1,09-1,11 (m, 4H), 2,19-2,26 (m, 1H), 4,08-4,10 (m, 2H), 4,19-4,21 (m, 2H), 4,80 (s, 2H), 6,64-6,67 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,28-7,39 (m, 6H); MS Calculado: 594; MS Encontrado: 595 (M+1).
25	13/8 	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) δ: 1,11 (m, 2H), 1,24 (m, 2H), 2,11 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 4,46 (m, 2H), 4,78 (s, 2H), 6,67 (dd, J = 1,2 Hz, 8,4 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,28-7,35 (m, 3H), 7,56 (s, J = 1,2 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 8,56 (d, J = 3,6 Hz, 1H); MS Calculado: 585; MS Encontrado: 586 (M+1).
30	13/9 	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,13-1,23 (m, 4H), 2,50 (m, 1H), 4,23 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,51 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,96 (s, 2H), 6,24 (s, 1H), 6,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,58-7,66 (m, 3H), 8,25 (s, 1H); MS Calculado: 585; MS Encontrado: 586 (M+1).
35		
40		
45		
50	Ejemplo 14/1 a 14/3	

[0143] Utilizando un procedimiento similar al descrito en los Ejemplos 1 a 13 y Esquemas anteriores, se obtuvieron los siguientes compuestos utilizando los bloques de construcción apropiados.

n. ^o	Estructura	Datos analíticos
55		
60	14/1 	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,13-1,23 (m, 4H), 1,33 (d, J = 8,4 Hz, 6H), 2,37-2,47 (m, 3H), 2,90-2,95 (m, 1H), 3,14-3,19 (t, J = 8,8 Hz, 2H), 3,57 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,92 (s, 2H), 5,51 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 6,76 (dd, J = 2,4 Hz, J = 8,4 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,51-7,58 (m, 2H), 7,62-7,66 (m, 2H), 7,69 (s, 1H); MS Calculado: 672; MS Encontrado: 673 (M+H) ⁺ .
65		

(continuación)

n.º	Estructura	Datos analíticos
5		
10		RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,13-1,20 (m, 4H), 1,31 (d, J = 8,0 Hz, 6H), 2,36-2,47 (m, 3H), 2,59-2,83 (m, 2H), 2,89-2,93 (m, 1H), 3,17-3,19 (m, 2H), 3,47-3,52 (m, 2H), 4,33-4,39 (m, 1H), 4,82 (s, 2H), 5,51 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 6,76 (dd, J = 2,4 Hz, J = 6,4 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,51-7,58 (m, 2H), 7,62-7,65 (m, 2H), 8,18-8,20 (m, 1H); MS Calculado: 744; MS Encontrado: 721 [M-Na] ⁺ .
15		
20		RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,10-1,25 (m, 4H), 1,34 (d, J = 8,4 Hz, 6H), 3,03-3,05 (m, 1H), 3,50-3,50 (m, 3H), 3,20-3,10 (m, 2H), 4,50-4,35 (m, 1H), 4,92 (s, 2H), 5,5 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,78-6,70 (m, 2H), 7,70-7,49 (m, 4H), 11,44 (s, 1H); MS Calculado: 694; MS Encontrado: 695 [M+H] ⁺ .
25		
30		
35		

[0144] El siguiente compuesto puede prepararse de la misma manera utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente:

Ensayos

Ensayo de actividad FRET

[0145] La determinación de una interacción péptido cofactor mediada por ligando para cuantificar la unión de ligando al receptor nuclear FXR se realizó como sigue. Preparación del dominio de unión al ligando del FXR alfa humano: El LBD del FXRalfa humano se expresó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* como una proteína de fusión marcada N-terminalmente con GST. El ADN que codifica el dominio de unión al ligando FXR se clonó en el vector pDEST15 (Invitrogen). La expresión estaba bajo el control de un promotor T7 inducible por IPTG. Los límites aminoacídicos del dominio de unión al ligando fueron los aminoácidos 187-472 de la entrada de la base de datos NM_005123 (RefSeq). Expresión y purificación del FXR-LBD: Un precultivo de una noche de una cepa de *E. coli* transformada se diluyó 1:20 en medio LB-Ampicilina y se cultivó a 30 °C hasta una densidad óptica de OD₆₀₀=0,4-0,6. A continuación, se indujo la expresión génica mediante la adición de 0,5 mM de IPTG. Las células se incubaron 6 h más a 30 °C y 180 rpm. Las células se recogieron por centrifugación (7000 x g, 7 min, rt). Por litro de cultivo celular original, las células se resuspendieron en 10 mL de tampón de lisis (50 mM de glucosa, 50 mM de Tris pH 7,9, 1 mM de EDTA y 4 mg/mL de lisozima) y se dejaron en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a sonicación y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (22000 x g, 30 min, 4°C). Por cada 10 mL de sobrenadante se añadieron 0,5 mL de suspensión de sefarosa Glutatión 4B prelavada (Qiagen) y la suspensión se mantuvo rotando lentamente durante 1 h a 4°C. Las perlas de sefarosa de glutatión 4B se separaron por centrifugación (2000 x g, 15 seg, 4°C) y se lavaron dos veces en tampón de lavado (25 mM Tris, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ y 1 M NaCl). El precipitado se resuspendió en 3 ml de tampón de elución por litro de cultivo original (tampón de elución: 20 mM Tris, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 80 mM glutatión añadidos inmediatamente antes de su uso como polvo). La suspensión se dejó en rotación durante 15 minutos a 4 °C, las microesferas se precipitaron y se eluyeron de nuevo con la mitad de volumen de tampón de elución que la primera vez. Los eluidos se agruparon y dializaron durante la noche en tampón Hepes 20 mM (pH 7,5) que contenía 60 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ así como 1 mM de ditioreitol y 10% (v/v) de glicerol. La proteína se analizó mediante SDS-PAGE.

[0146] El método mide la capacidad de los ligandos putativos para modular la interacción entre el dominio de unión a ligando (LBD) de FXR purificado expresado bacterialmente y un péptido sintético biotinilado basado en los residuos 676-700 de SRC-1 (LCD2, 676-700). La secuencia del péptido utilizado fue B-CPSSHSSLTERHKILHRLQQEGSPS-COOH, donde el N-terminal estaba biotinilado (B). El dominio de unión al ligando (LBD) del FXR se expresó como proteína de

fusión con GST en células BL-21 utilizando el vector pDEST15. Las células se lisaron por sonicación y las proteínas de fusión se purificaron sobre glutatión sefarosa (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el cribado de compuestos en busca de su influencia en la interacción FXR-péptido, se aplicó la tecnología LANCE de Perkin Elmer. Este método se basa en la transferencia de energía dependiente de la unión de un fluoróforo donante a un aceptor unido a la pareja de unión de interés. Para facilitar la manipulación y reducir el fondo de fluorescencia de los compuestos, la tecnología LANCE utiliza etiquetas fluoróforas genéricas y detección resuelta en el tiempo. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 25 μ L en una placa de 384 pocillos, en un tampón a base de Tris (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂; 35 ng/ μ L BSA), con 20-60 ng/pocillo de FXR-LBD expresado recombinantemente y fusionado a GST, 200-600 nM de péptido N-terminal biotinilado, que representa los aminoácidos 676-700 de SRC1, 200 ng/pocillo de conjugado de estreptavidina-xIAPC (Prozyme) y 6-10 ng/pocillo de Eu W1024 - antiGST (Perkin Elmer). El contenido de DMSO de las muestras se mantuvo en el 1%. Tras generar la mezcla del ensayo y diluir los ligandos potencialmente moduladores del FXR, el ensayo se equilibró durante 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente en placas FIA negras de 384 pocillos (Greiner). La señal LANCE se detectó con un contador multilabel VICTOR2VTM de Perkin Elmer. Los resultados se visualizaron trazando la relación entre la luz emitida a 665 y 615 nm. Se observa un nivel basal de formación de péptidos FXR en ausencia de ligando añadido. Los ligandos que promueven la formación del complejo inducen un aumento dependiente de la concentración de la señal fluorescente resuelta en el tiempo. Se espera que los compuestos que se unen por igual al FXR monomérico y al complejo FXR-péptido no produzcan ningún cambio en la señal, mientras que se espera que los ligandos que se unen preferentemente al receptor monomérico induzcan una disminución dependiente de la concentración en la señal observada.

[0147] Para evaluar el potencial inhibidor de los compuestos, se determinaron los valores EC₅₀ para los compuestos de ejemplo que se enumeran a continuación en la Tabla 1 (AA = EC₅₀ < 25 nM; B = 25 ≤ EC₅₀ < 100 nM; C = EC₅₀ ≥ 100 nM).

Tabla 1

Grupo	Ejemplo n. ^o
A	4, 8, 10, 13/8, 13/9, 14/1, 14/2
B	1, 2, 5, 6, 8A, 13/1, 13/3, 13/4, 13/5, 13/7
C	13/2, 13/8

Ensayo del híbrido mamífero uno (M1)

[0148] La determinación de una transactivación impulsada por el promotor Gal4 mediada por ligando para cuantificar la activación de FXR mediada por unión a ligando se realizó como sigue. La parte de ADNc que codifica el dominio de unión al ligando FXR se clonó en el vector pCMV-BD (Stratagene) como una fusión con el dominio de unión al ADN GAL4 de levadura bajo el control del promotor CMV. Los límites aminoacídicos del dominio de unión al ligando fueron los aminoácidos 187-472 de la entrada de la base de datos NM_005123 (RefSeq). Como plásmido indicador se utilizó el plásmido pFR-Luc (Stratagene), que contiene un promotor sintético con cinco repeticiones en tandem de los sitios de unión a GAL4 de la levadura, que impulsa la expresión del gen de la luciferasa de Photinus pyralis (luciérnaga americana) como gen indicador. Para mejorar la precisión experimental se cotransfectó el plásmido pRL-CMV (Promega). pRL-CMV contiene el promotor constitutivo CMV, que controla la expresión de la luciferasa Renilla reniformis. Todos los ensayos del gen indicador Gal4 se realizaron en células HEK293 (obtenidas de DSMZ, Braunschweig, Alemania) cultivadas en MEM con L-Glutamina y BSS de Earle suplementado con 10% de suero bovino fetal, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico y 100 unidades de Penicilina/Estreptavidina por mL a 37 °C en 5% de CO₂. El medio y los suplementos se obtuvieron de Invitrogen. Para el ensayo, se sembraron 5 × 10⁵ células por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μ L por pocillo de MEM sin rojo de fenol ni L-glutamina y con BSS de Earle suplementado con un 10% de FBS tratado con carbón/dextrano (HyClone, South Logan, Utah), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato sódico y 100 unidades de penicilina/estreptavidina por mL, incubadas a 37 °C en un 5% de CO₂. Al día siguiente, las células tenían una confluencia superior al 90%. Se eliminó el medio y las células se transfecaron transitoriamente utilizando 20 μ L por pocillo de un reactivo de transfección basado en OptiMEM - polietilenimina (OptiMEM, Invitrogen; polietilenimina, Aldrich Cat No. 40,827-7) que incluía los tres plásmidos descritos anteriormente. Se añadió MEM con la misma composición que la utilizada para el cultivo de células 2-4 h después de añadir la mezcla de transfección. A continuación, se añadieron stocks de compuestos, prediluidos en MEM (concentración final del vehículo no superior al 0,1%). Las células se incubaron durante 16 h más antes de medir secuencialmente las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla en el mismo extracto celular utilizando un sistema de ensayo de luciferasa de doble luz (Dyer et al., Anal. Biochem. 2000, 282, 158-161). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

[0149] Para evaluar la potencia agonística FXR de los compuestos de ejemplo, se determinaron rangos de potencia en el ensayo M 1 H como se indica a continuación en la Tabla 2 (A = EC₅₀ < 25 nM; B = 25 ≤ EC₅₀ < 100 nM; C = EC₅₀ ≥ 100 nM).

Tabla 2

Grupo	Ejemplo n. ^o
A	13/4, 13/5, 13/6
B	2, 8, 8A, 10, 13/1, 13/3, 13/7
C	1, 4, 5, 6, 13/2, 13/8, 13/9

10 **Ensayo de solubilidad acuosa**

5 [0150] La solubilidad acuosa en PBS, pH 7,4 se determinó de la siguiente manera. Se añadió una solución madre de compuesto 10 mM en DMSO a PBS (pH 7,4) para alcanzar una concentración final teórica de 200 µM. La solución/suspensión resultante se agitó a 1.250 rpm durante 1 h y, a continuación, se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 23 h. En este momento, cualquier precipitado se separa de la solución mediante centrifugación a 3900 rpm durante 30 min. La solubilidad acuosa se determinó comparando el área del pico principal en un patrón de calibración (200 µM) en un disolvente orgánico (metanolagua 60:40, v/v) con el área del pico correspondiente en la muestra tampón. Como método de detección se utilizó HPLC-UV/VIS a 230 nm.

15 20 **Ensayo Paralelo de Permeabilización de Membranas Artificiales (PAMPA)**

25 [0151] Para el PAMPA, se prepararon soluciones madre de 5 mM de los elementos de prueba en DMSO. Se prepararon soluciones madre de 5 mM de elementos de referencia en EtOH (carbamazepina, guanabenz) o en EtOH:H₂O 1:1 (v/v) (ceftriaxona), respectivamente. Los compuestos se diluyeron en PBS (pH 7,4) para obtener las soluciones de partida que contenían un 5% del disolvente orgánico respectivo y 250 µM de compuestos de referencia o 10 µM de elementos de ensayo, respectivamente. Para el ensayo, se utilizó un procedimiento modificado del PAMPA descrito por Kansy et al. Kansy et al. (J. Med. Chem. 1998, 41, 1007). Los compuestos de referencia para permeabilidad baja (ceftriaxona), media (guanabenz) y alta (carbamazepina) se incluyeron como controles internos.

30 [0152] Los experimentos de permeación se llevaron a cabo en una bandeja Multiscreen de 96 pocillos (donante) cubierta por un Multiscreen Immobilon de 96 pocillos (aceptor). El material filtrante hidrófobo de la placa Immobilon se humedeció previamente con etanol al 70% y se trató con una solución de lípidos (lecitina disuelta en dodecano). La placa donante se llenó con los compuestos de ensayo y de referencia y ambas placas se insertaron una dentro de la otra y se colocaron en un agitador orbital durante 15 min a 100 rpm. El estudio de transporte se inició aplicando 150 µl de tampón PBS que contenía los compuestos de prueba y de referencia a la placa donante. Tras 15-16 h de difusión a temperatura ambiente, se recogió el contenido de las placas aceptora y donante y se cuantificó mediante detección LC/MS (elementos de prueba) o mediante espectroscopia UV con un Spectramax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices) (elementos de referencia). Los máximos de absorción de los productos de referencia ceftriaxona, guanabenz y carbamazepina fueron de 240 nm, 270 nm y 286 nm, respectivamente. Las muestras de recuperación se prepararon como se describe para las muestras del ensayo de permeación y se incubaron en viales representativos durante el periodo de permeación en las mismas condiciones.

35 40 [0153] Para el análisis LC/MS de los elementos de prueba, se extrajeron 100 µL de incubado del compartimento acceptor y donador y se procesaron para precipitación con acetonitrilo (ACN) como se describe a continuación. Además, se extrajeron muestras de la capa lipídica enjuagando cada pocillo dos veces con 150 µl de EA. Las soluciones se recogieron en tubos de reacción de 1,5 mL y se evaporó el disolvente. Los residuos secos se resuspendieron en una mezcla de PBS/DMSO/ACN que reflejaba la composición de las muestras acceptoras y donantes (es decir, 100 µl de tampón suplementado con un 5% de DMSO, 200 µl de ACN+ISTD). El contenido final de disolvente de cada muestra fue del 66% de ACN.

45 50 [0154] Las muestras de los compartimentos donador y acceptor y los estándares de calibración se precipitaron añadiendo 200 µL ACN/ISTD o 400 µL ACN/ISTD, respectivamente. Tras agitación energética (10 segundos) y centrifugación (5 min a 4800 x g, rt), los sobrenadantes libres de partículas se sometieron a LC-MS/MS. Los compartimentos de membrana se extrajeron como se ha descrito anteriormente. Tras la reconstitución, las muestras se agitaron energicamente (10 segundos) y se centrifugaron (5 min a 4800 x g, rt). Los sobrenadantes libres de partículas se sometieron a LC-MS/MS.

55 60 [0155] Para el análisis de los compuestos utilizados en las composiciones de la presente invención, el sistema HPLC consistió en una bomba Accela U-HPLC y un muestreador automático Accela (Thermo Fisher Scientific, USA). La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas Exactive (tecnología orbitrap con masa precisa) equipado con una interfaz de electrospray calentado (H-ESI2) (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) conectado a un PC que ejecutaba el software estándar Xcalibur 2.1.

65 [0156] La LC se realizó en el modo de gradiente (Tabla 3) usando ACN/0,1 % de ácido fórmico como fase orgánica (A) y formiato de amonio 10 mM/0,1 % de ácido fórmico como fase acuosa (B); y el caudal de la bomba se fijó en 500 µl/min. La separación se realizó en una columna analítica Gemini C6-Phenyl, 3 µm, 50x2,0 mm (Phenomenex, Alemania) con una precolumna (Gemini C6-Phenyl, 3 µm, 4x2,0 mm).

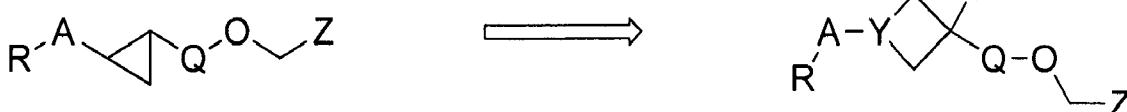
Tabla 3: Gradientes HPLC

Fase móvil	0 min	0,1 min	1,2 min	2,8 min	2,7 min	3,5 min
A (%)	5	5	97	97	5	5
B (%)	95	95	3	3	95	95

10 [0157] Como archivo de sintonía MS se utilizó un archivo de sintonía genérico para todos los analitos aplicando el modo iónico positivo o negativo. Como masa de bloqueo para la calibración de masa interna se utilizó el ion $[M+H]^+$ del ftalato de diisoctilo (m/z 391,28429), presente de forma ubicua en el sistema disolvente.

15 [0158] El analito se adquirió escaneando ± 1 Thomson alrededor de la masa esperada del ion monoisotópico $[M+H]^+$ o $[M-H]$. La resolución de masa del Orbitrap se fijó en 50.000. Para la integración de los picos se utilizó la masa exacta de cada analito. Otros ajustes de los instrumentos fueron los siguientes: HCD-Gas desactivado, AGC de alto rango dinámico, tiempo máx. de inyección de la trampa 100 ms, gas de cubierta 30, gas auxiliar 8, gas de barrido 2, tensión de pulverización 4 kV, temperatura capilar 250°C, temperatura del calentador ESI 2 250°C.

20 [0159] El objetivo de la presente invención era generar agonistas de FXR con propiedades fisicoquímicas mejoradas en comparación con los compuestos reivindicados en el documento WO 2011/020615. Esto se consiguió mediante la introducción de un grupo hidroxilo polar en un grupo 1,3-ciclobutilideno o 1,3-azetidinilideno en sustitución del anterior anillo 1,2-ciclopropilideno.



25 [0160] Sorprendentemente, los compuestos resultantes mantuvieron su actividad sobre el receptor FXR pero demostraron propiedades fisicoquímicas mejoradas, como una mayor solubilidad acuosa y/o permeabilidad de membrana. En la Tabla 4 se ofrece una comparación directa de los compuestos correspondientes de las dos series.

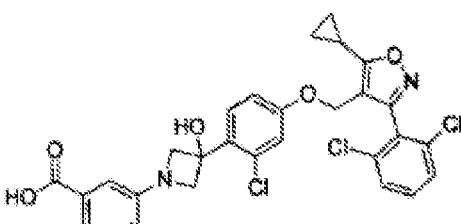
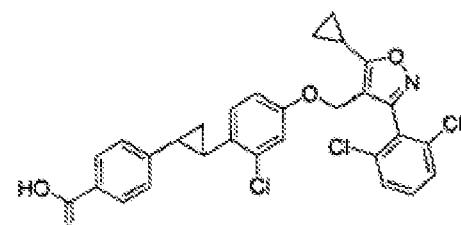
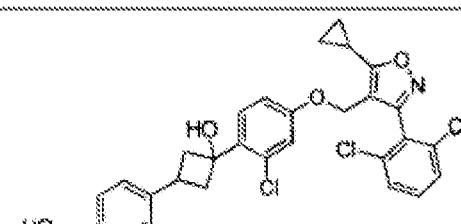
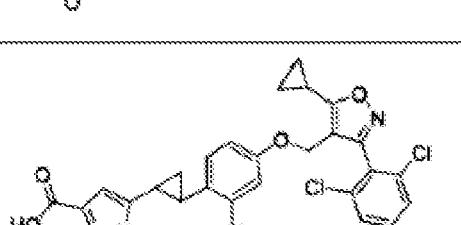
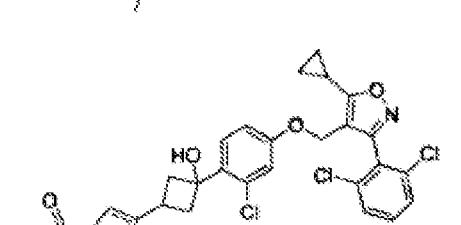
Tabla 4

	Estructura	Solubilidad en medio acuoso (PBS, pH 7,4)	PAMPA, Permeabilidad de membrana en % de Flujo *	clogD (software ChemAxon)
40		20 μM	13,6	5,1
45		192 μM	24,0	4,4

60

65

(continuación)

	Estructura	Solubilidad en medio eucoso (PBS, pH 7,4)	PAMPA, Permeabilidad de membrana en % de Flujo *	clogD (software ChemAxon)
5				
10		195 µM	n.d.**	4,4
15				
20		72 µM	20,7	5,2
25				
30		192 µM	21,1	4,5
35				
40		158 µM	28,9	4,2
45				
50		171 µM	46,1	3,5
55				

* Flujo (%) = (c poctilo acceptor) / sum (c poctilo dador + c poctilo acceptor) × 100 × 2

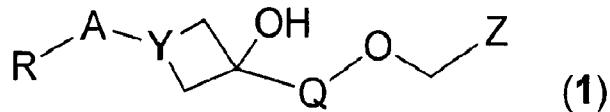
** n.d. = no determinado

5 [0161] En cada caso, la solubilidad acuosa o la permeabilidad de la membrana PAMPA, o ambas, mejoran significativamente con la introducción de la fracción hidroxi-ciclobutilo o hidroxi-azetidilo. Como la mayoría de las moléculas activas de los receptores nucleares, los agonistas del FXR suelen ser muy lipofílicos (M. L. Crawley, Expert Opin. Ther. Patents 2010, 20, 1047). Por lo tanto, se supone que una mejor solubilidad acuosa y permeabilidad de membrana se traduce en una mayor biodisponibilidad oral y, en general, en una mejor idoneidad para el desarrollo clínico de esos compuestos como fármacos (L. Huang, J. Dong, S. Karki en Evaluation of drug candidates for preclinical development (Eds. C. Han, C. B. Davis, B. Wang), Wiley & Sons, Hoboken 2010, 187-217).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende de 7 mg a 350 mg de un compuesto según la siguiente fórmula (1), un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5



10

donde

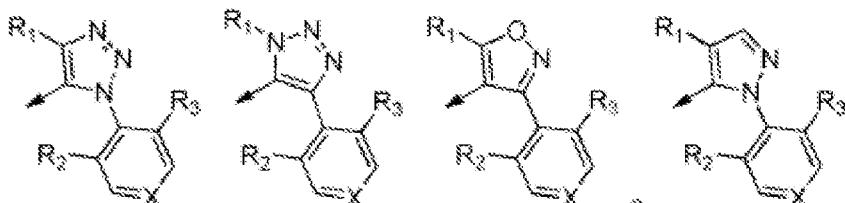
R se selecciona del grupo que consiste en COOR₆, CONR₇R₈, tetrazolilo, SO₂NR₇R₈, alquilo C₁₋₆, SO₂-alquilo C₁₋₆ y H, con R₆ seleccionado independientemente del grupo que consiste en H o alquilo C₁₋₆, y R₇ y R₈ seleccionados independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, alquieno C₁₋₆-R₉, SO₂-alquilo C₁₋₆, en el que R₉ se selecciona del grupo que consiste en COOH, OH y SO₃H;

A se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazolilo, indolilo, tienilo, benzotienilo, indazolilo, benzisoxazolilo, benzofuranilo, benzotriazolilo, furanilo, benzotiazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo formado por OH, O-alquilo C₁₋₆, O-halo-alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y halógeno;

20 Q se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, tiazolilo, tiofenilo, pirimidilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, halo-alquilo C₁₋₆, halógeno y CF₃;

25 Y se selecciona entre N o CH;

Z se selecciona de



30

donde

X = CH, N, NO;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₃, cilcoalquilo C₃₋₆, alquilcicloalquilo C₄₋₅, en el que alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxi o alcoxi C₁₋₆;

40 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y halógeno,

y un soporte farmacéuticamente aceptable, para su uso como dosis diaria total para un humano adulto de 70 Kg.

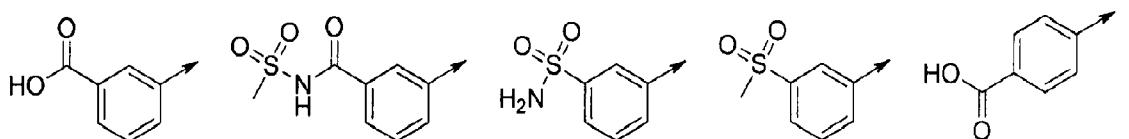
45

2. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto es un compuesto de Fórmula (1) como se define en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

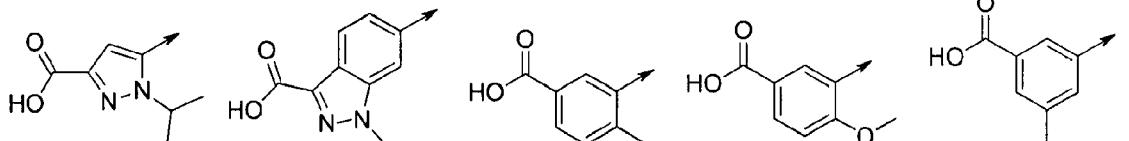
50

3. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que R-A se selecciona entre

55

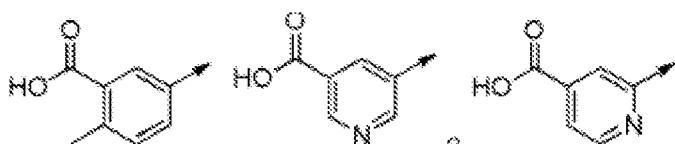


60



65

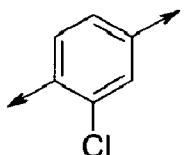
5



10

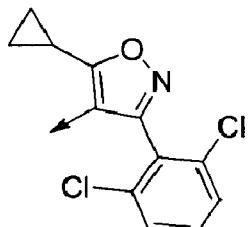
4. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 En la que Q es

15



- 20 5. Una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que Z es

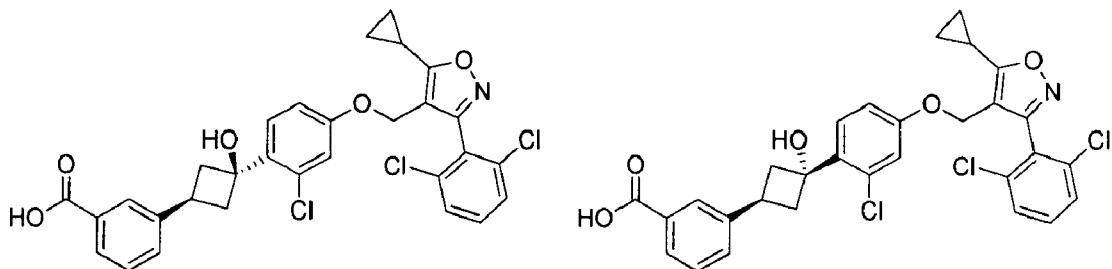
25



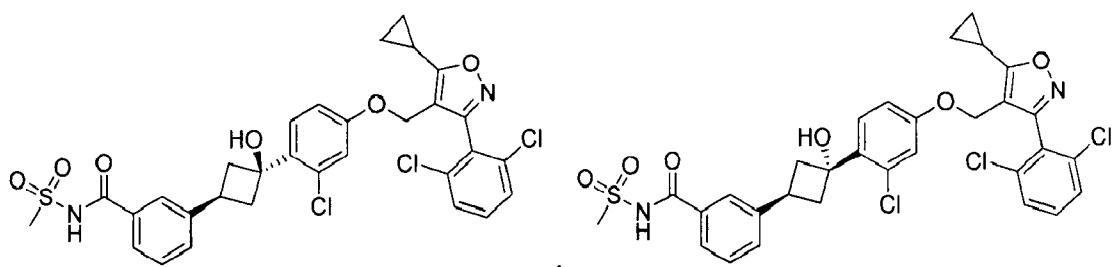
30

6. Una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el compuesto de fórmula (1) se selecciona entre

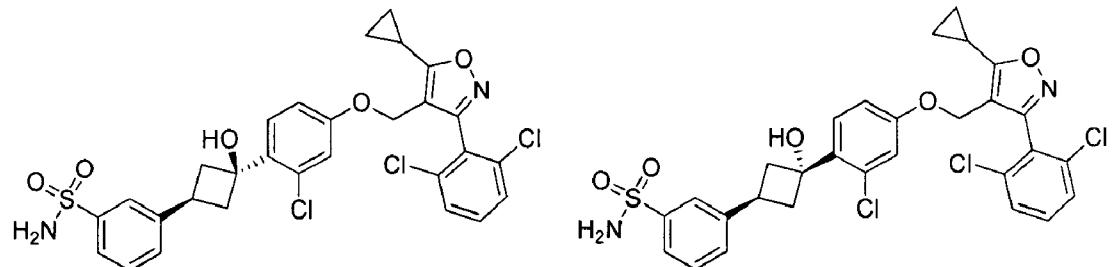
35

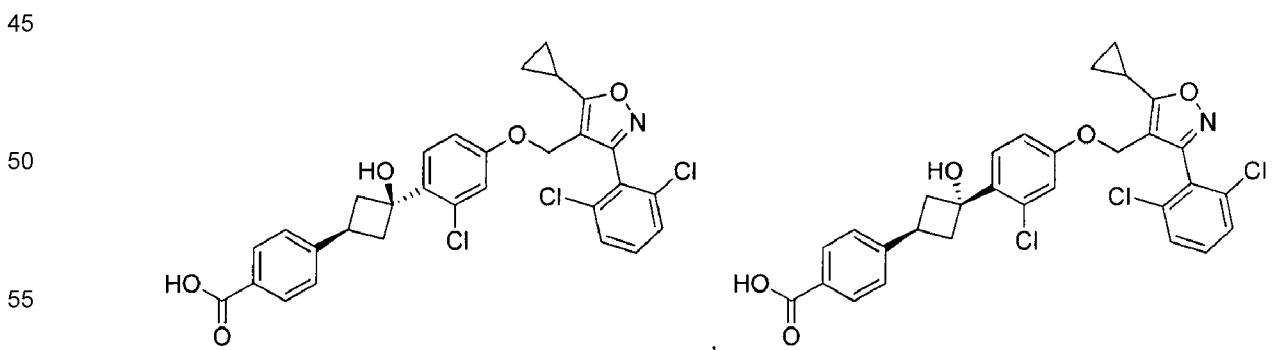
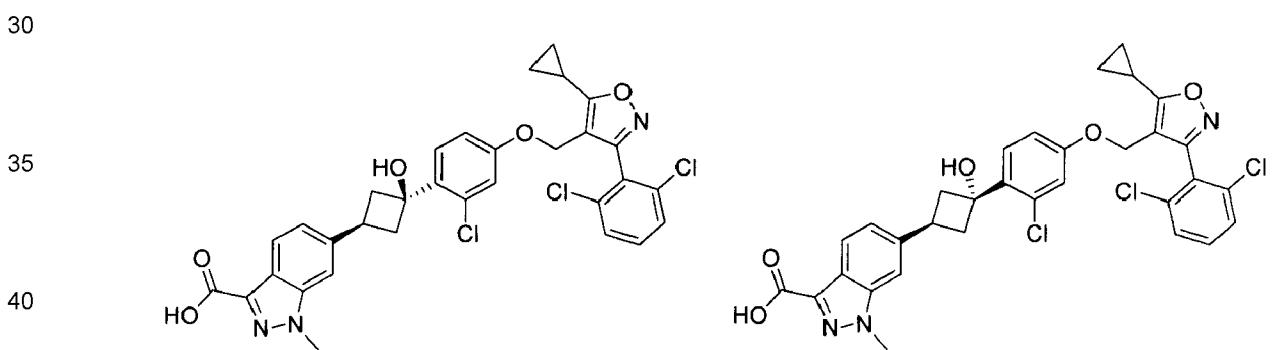
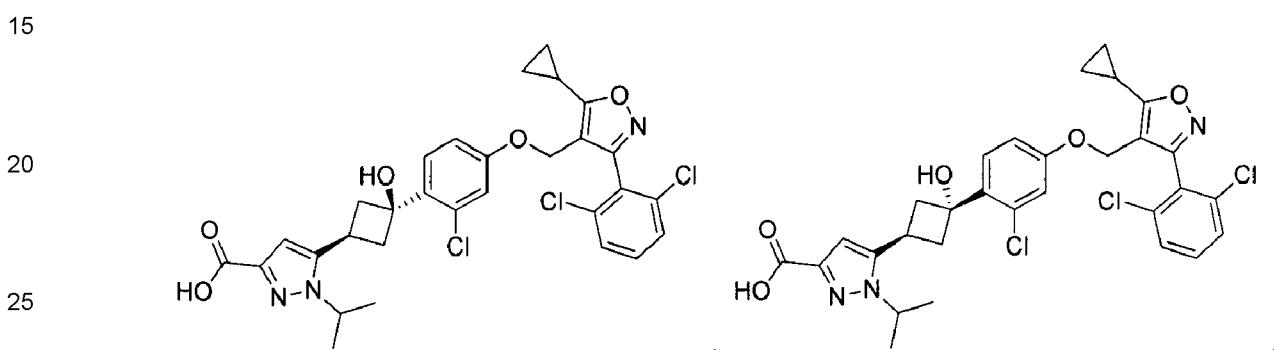
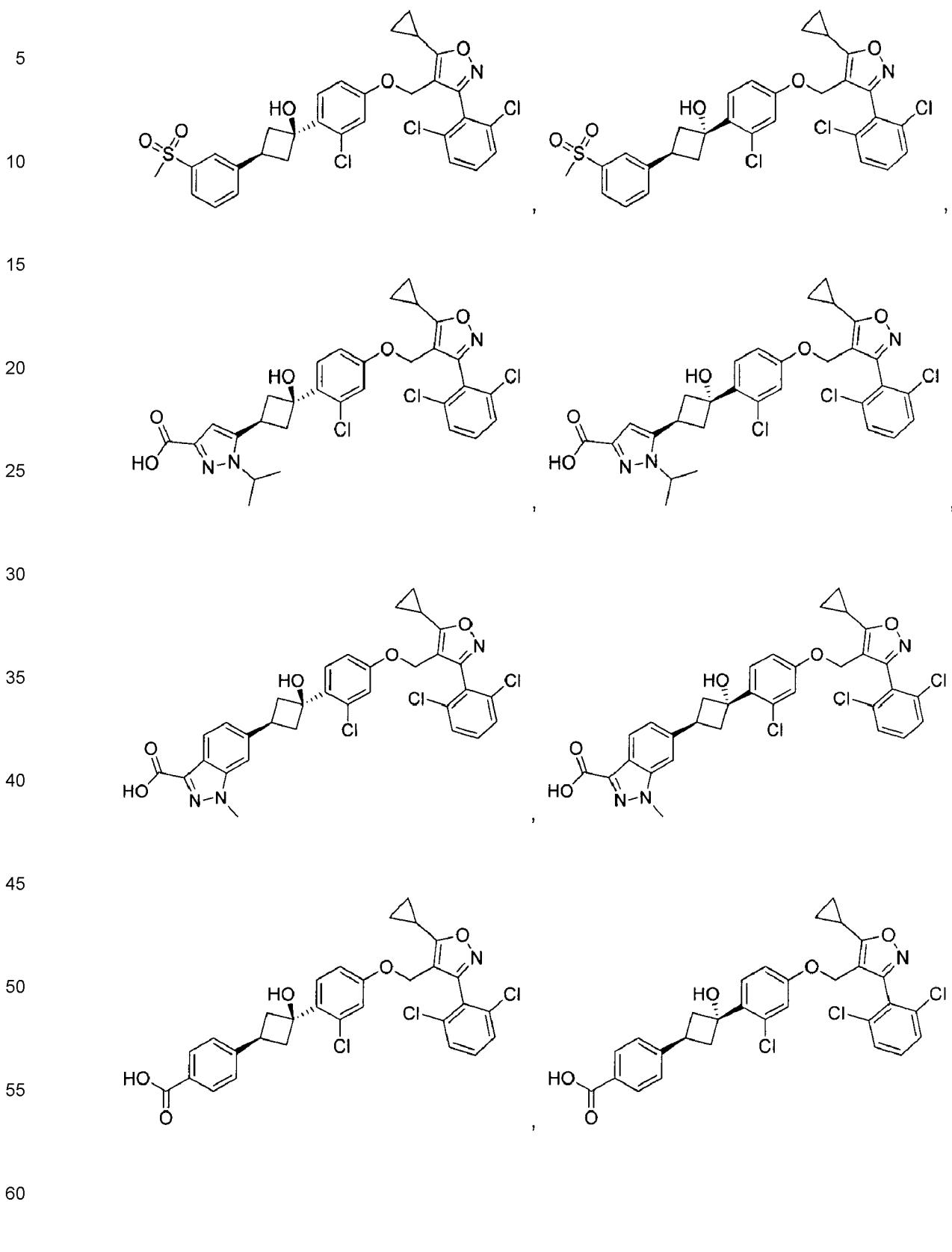


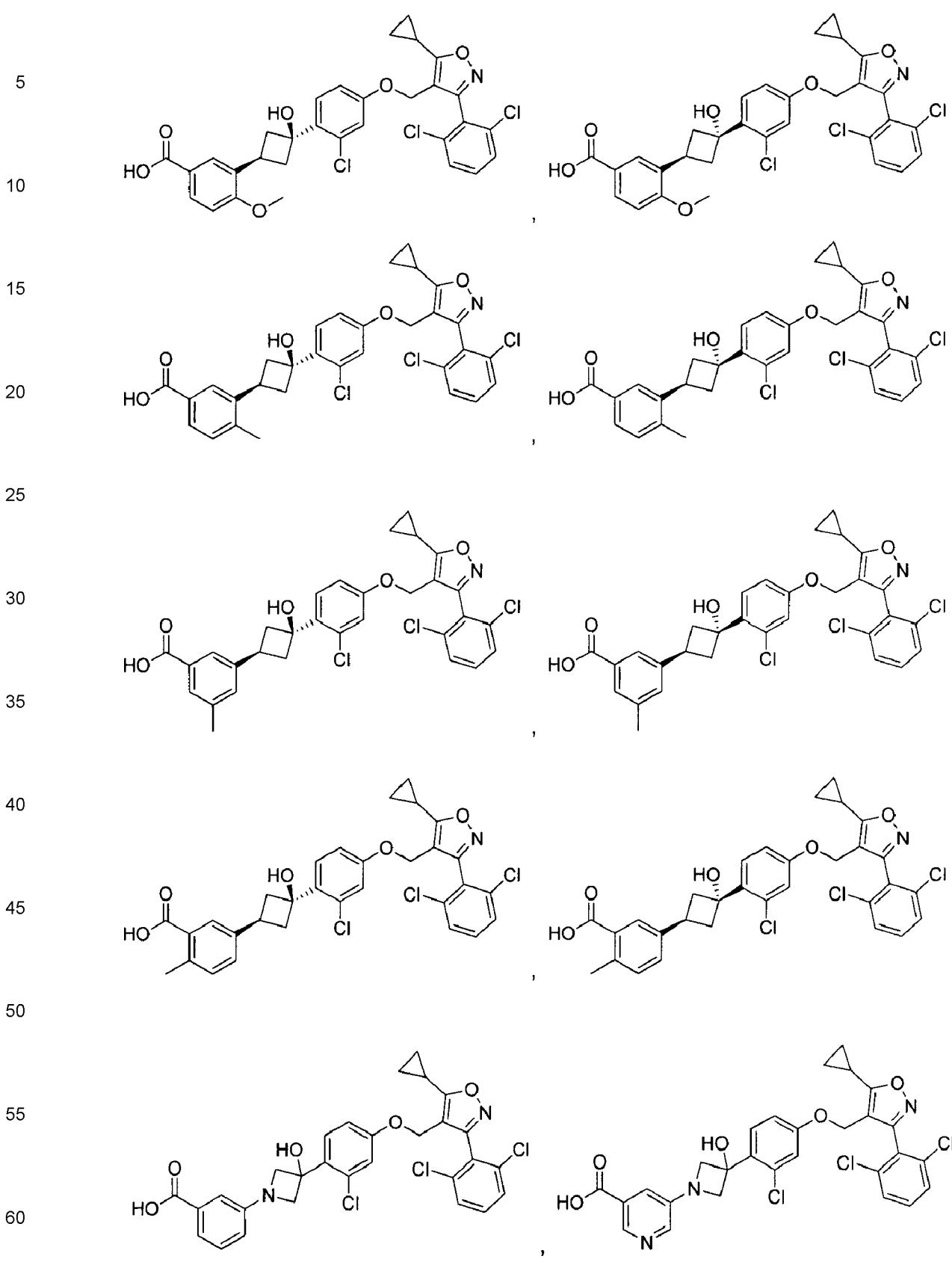
45



55

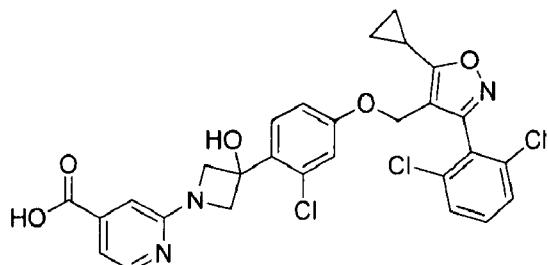






Y

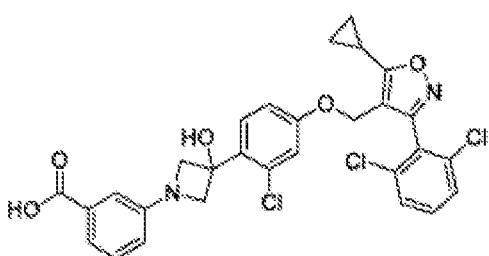
5



10

15 7. Una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el compuesto tiene la siguiente estructura

20



25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

8. Una composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 formulada para administración oral, rectal, tópica, parenteral, ocular, pulmonar o nasal.

35

9. Una composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición farmacéutica se formula como comprimido, trozo, dispersión, suspensión, solución, cápsula, crema, pomada o aerosol.

40

10. Una composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 formulada para administración oral.

45

11. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica está formulada en forma de comprimido o cápsula.

12. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica está formulada en forma de comprimido.