

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 159**

51 Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2007 E 07863446 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2079307**

54 Título: **Agonistas del receptor X farnesoide**

30 Prioridad:

24.10.2006 US 853886 P

30.10.2006 US 855337 P

16.04.2007 US 911954 P

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

06.11.2013

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
One Franklin Plaza 200 North 16th Street
Philadelphia, PA 19102, US

72 Inventor/es:

BASS, JONATHAN YORK III;
DEATON, DAVID NORMAN;
CARAVELLA, JUSTIN;
MCFADYEN, ROBERT BLOUNT;
NAVAS, FRANK III y
SPEARING, PAUL KENNETH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 159 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

Agonistas del receptor X farnesoide

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al receptor X farnesoide (FXR, NR1H4). Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos útiles como agonistas para FXR¹, a formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y a su uso terapéutico.

10 El FXR es un miembro de la clase de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligandos. Las concentraciones fisiológicas de los ácidos biliares se unen a los FXR y los activan [Parks, D.J., et al., 1999 *Science* 284:1365-1368; Makishima, M., et al., 1999 *Science* 284:1362-1365]. Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que forman micelas y emulsionan los lípidos de la dieta. Esta propiedad también hace citotóxicos a los ácidos biliares si se logran concentraciones suficientes y por lo tanto han evolucionado mecanismos para asegurar que las concentraciones de ácidos biliares estén estrictamente reguladas. El FXR desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares [Makishima, M. 2005 *J. Pharmacol. Sci.* 97:177-183; Kuipers, F., et al., 2004 *Rev. Endocrine Metab. Disorders* 5:319-326].

15 El FXR se expresa en el hígado, intestino, riñón y cápsulas suprarrenales [Kuipers, F., et al., 2004 *Rev. Endocrine Metab. Disorders* 5:319-326]. Los genes diana de FXR en hepatocitos incluyen una pareja de pequeños heterodímeros (SHP, NR0B2) que codifica un receptor nuclear atípico que reprime la transcripción de genes, tales como CYP7A1 (que codifica la colesterol 7 α -hidroxilasa), la etapa primera y limitativa de la velocidad en la conversión de colesterol en ácido biliar, CYP8B1 (que codifica la esterol 12 α -hidroxilasa) que controla la hidrofobicidad de la mezcla biliar y NTCP (que codifica el polipéptido co-transportador de sodio/taurocolato, SLC10A1) que importa ácidos biliares desde la circulación portal y sistémica al hepatocito [Goodwin, B., et al., 2000 *Mol. Cell* 6:517-526; del Castillo-Olivares, A., et al., 2001 *Nucleic Acids Res.* 29:4035-4042; Denson, L.A., et al., 2001 *Gastroenterology* 121(1):140-147]. Otros genes dianas de FXR que son inducidos en el hígado incluyen el transportador canalicular BSEP (que codifica la bomba de exportación de sales biliares, ABCB11) que transporta ácidos biliares desde los hepatocitos a la bilis, la glicoproteína P-3 con resistencia a múltiples fármacos (MDR3) (que codifica la flipasa canalicular de fosfolípidos, ABCB4) que transporta fosfolípidos desde el hepatocito a la bilis y MRP2 (que codifica la proteína-2 relacionada con la resistencia a múltiples fármacos, ABCC2) que transporta bilirrubina conjugada, glutatión y conjugados de glutatión a la bilis [Ananthanarayanan, M., et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:28857-28865; Huang, L. et al., 2003 *J. Biol. Chem.* 278:51085-51090; Kast, H.R., et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:2908-2915].

30 En el intestino, el FXR también induce la expresión de SHP que reprime la transcripción del gen transportador de ácidos biliares apicales dependientes de sodio (TBDS, SLC10A2) que codifica el transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio de alta afinidad que mueve los ácidos biliares desde el lumen intestinal al enterocito como parte del reciclado enterohepático de los ácidos biliares [Li, H., et al., 2005 *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G60-G66]. La expresión del gen de la proteína ileal de unión a ácidos biliares (IBABP) también es inducida por agonistas de FXR en el enterocito [Grober, J. et al., 1999 *J. Biol. Chem.* 274:29749-29754]. La función de esta proteína ileal de unión a ácidos biliares sigue siendo investigada.

40 La colestasis es un estado de flujo biliar reducido o detenido. La colestasis no resuelta conduce al daño del hígado, tal como la que se observa en la cirrosis biliar primaria (PBC) y en la colangitis esclerosante primaria (PSC), dos enfermedades colestásicas del hígado. Se ha demostrado que los agonistas de FXR protegen el hígado en modelos de roedores de la enfermedad colestásica del hígado [Liu, Y. et al., 2003 *J. Clin. Invest.* 112:1678-1687; Fiorucci, S., et al., 2005 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313:604-612; Pellicciari, R., et al., 2002 *J. Med. Chem.* 45:3569-3572].

45 El FXR también se expresa en células estrelladas hepáticas (HSC) que desempeñan un papel en la deposición de la matriz extracelular durante el proceso fibrótico. El tratamiento de las HSC cultivadas con el agonista de FXR, ácido 6-etil-quenodesoxicólico (6EtCDCA), da como resultado la disminución de la expresión de marcadores fibróticos, tales como α -actina de la musculatura lisa y α 1(I)colágeno. También se ha descrito que 6EtCDCA impide el desarrollo y promueve la resolución de fibrosis hepática en múltiples modelos de roedores con esta enfermedad [Fiorucci, S., et al., 2004 *Gastroenterology* 127:1497-1512; Fiorucci, S., et al., 2005 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314:584-595]. De acuerdo con Fiorucci et al., este efecto anti-fibrótico se debe a la inactivación de SHP de Jun y a la represión subsiguiente del inhibidor tisular de metaloproteínasa 1 (TIMP1) vía el sitio de unión de la proteína de activación 1 (AP1) en el promotor TIMP1.

55 Recientemente, S. Kliewer presentó datos en la *Digestive Disease Week (DDW) Conference (2005)* organizada por la *American Association for the study of Liver Disease (AASLD)* (Asociación Americana para el estudio de Enfermedades Hepáticas) que mostraron que la activación de FXR por el agonista GW4064 dio como resultado un aumento en la barrera mucosa y una disminución en el sobre-crecimiento bacteriano en un modelo de colestasis en ratón con el conducto biliar ligado y sobrecrecimiento bacteriano intestinal. El Dr. Kliewer presentó datos que indicaban una

¹ Salvo para la OMS = Organización Mundial de la Salud, todas las abreviaturas empleadas en el presente texto, corresponden a las expresiones en inglés, por ser las usadas internacionalmente.

disminución de la translocación de bacterias a nódulos linfáticos mesentéricos en ratones tratados con GW4064. Este efecto de GW4064 se perdía en ratones sin FXR [Inagaki, T., et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 103:3920-3925].

5 El agonista GW4064 de FXR, cuando se administró a ratones en una dieta litogénica, impidió la formación de cristales de colesterol en la bilis. Este efecto del compuesto se perdía en ratones sin FXR, Moschetta, A., et al., 2004 *Nat. Med.* 10:1352-1358.

10 Se sugirió que GW4064 podría mejorar la homeóstasis de lípidos y glucosa y la sensibilidad a la insulina en modelos de roedores diabéticos y resistentes a la insulina. Chen et al., [2006 *Diabetes* 55 suppl. 1: A200] demostraron que cuando se administra a ratones con dieta alta en grasas, el GW4064 disminuía el peso corporal y la masa de grasa corporal, la glucosa en suero, la insulina, los triglicéridos y el colesterol total. El GW4064 también corrigió la intolerancia a la glucosa en esos animales. Además, el GW4064 disminuyó la concentración de insulina en suero, mejoró la tolerancia a la glucosa y aumentó la sensibilidad a la insulina en ratones ob/ob [Cariou, B., et al., 2006 *J. Biol. Chem.* 281:11039-11049]. En otro estudio, se describió que GW4064 mejoró significativamente la hiperglicemia e hiperlipidemia en ratones diabéticos db/db [Zhang, Y., et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 103:1006-1011].

15 **Sumario de la invención**

Como un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de acuerdo con las reivindicaciones independientes 1, 2 y 3.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica según la reivindicación 4, 5 o 6.

20 En un tercer aspecto, los compuestos de la presente invención se pueden usar en un método para el tratamiento de un estado mediado por la disminución de la actividad de FXR, el tratamiento de la obesidad, el tratamiento de la diabetes mellitus, el tratamiento del síndrome metabólico, el tratamiento de la enfermedad colestásica del hígado y el tratamiento del órgano o la fibrosis hepática en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para preparar los compuestos de la invención de acuerdo con el Ejemplo 1 y opcionalmente formar una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en terapia. La presente invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento de un estado mediado por la disminución de la actividad de FXR en un sujeto; un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de la obesidad en un sujeto; un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto; un compuesto de la invención para uso en el tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto; un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de la enfermedad colestásica del hígado en un sujeto; un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de la fibrosis de órganos en un sujeto; y un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de la fibrosis hepática en un sujeto.

35 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Como se usa en la presente memoria, "un compuesto de la invención" significa un compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a cadenas hidrocarbonadas saturadas lineales o ramificadas y alifáticas que contienen 1-8 átomos de carbono. Ejemplos de grupos "alquilo" como se usan en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, hexilo, octilo y similares.

45 El término "fluoroalquilo" como se usa en la presente memoria, se refiere a un alquilo, como se ha definido antes, sustituido con uno o más flúor. En una realización particular, fluoroalquilo se refiere a un alquilo sustituido con dos o más flúor. El término "di(fluoroalquilo)" se refiere a dos alquilo, como se ha definido antes, cada uno sustituido con uno o más flúor. Por ejemplo, el término "di(fluorometilo)" se refiere a $-(CH_2F)_2$.

El término "alquilenilo" se refiere a un puente de alquilo lineal o ramificado, es decir, el grupo -alquilo-, en el que alquilo es como se ha definido antes.

Como se usa en la presente memoria, el término "halo" se refiere a cualquier átomo de halógeno, es decir, flúor, cloro, bromo o yodo.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "alquenilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada insaturada lineal o ramificada y alifática que contiene 2-8 átomos de carbono y al menos uno y hasta tres enlaces dobles carbono-carbono. Ejemplos de grupos "alquenilo" como se usan en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, etenilo y propenilo.

El término "alquenileno" se refiere a un puente de alquenilo lineal o ramificado, es decir, el grupo -alquenilo-, en el que alquenilo es como se ha definido antes.

Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico monocíclico no aromático que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (a menos que se especifique un número diferente de átomos) y enlaces dobles no carbono-carbono. "Cicloalquilo" incluye a modo de ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Grupos cicloalquilo particulares incluyen cicloalquilo de C₃₋₆.

Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalqueno" se refiere a un anillo carbocíclico monocíclico no aromático que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (a menos que se especifique un número diferente de átomos) y de 1 a 3 enlaces dobles carbono-carbono. "Cicloalqueno" incluye a modo de ejemplo ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno y cicloocteno. Grupos cicloalqueno particulares incluyen cicloalqueno de C₃₋₆.

Como se usa en la presente memoria, el término "opcionalmente" significa que el(los) evento(s) descrito(s) subsidiariamente puede(n) o no ocurrir, e incluye tanto evento(s) que ocurre(n) como eventos que no ocurren.

Un ejemplo específico de un compuesto particular de la presente invención es:

Ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico;

y sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, el ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables está en forma cristalina. En una realización preferida, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico (es decir, la forma del ácido).

Los compuestos de la invención pueden existir en formas estereoisómeras (por ejemplo, pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos). Los estereoisómeros individuales (enantiómeros y diaestereoisómeros) y sus mezclas están incluidos dentro del alcance de la presente invención. La presente invención también abarca los isómeros individuales de los compuestos representados por la invención como sus mezclas con sus isómeros en los que están invertidos uno o más centros quirales.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de acuerdo con la presente invención serán determinadas fácilmente por un experto en la técnica e incluirán, por ejemplo, sales preparadas a partir de bases inorgánicas, tales como hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidruro de litio, hidruro de sodio, hidruro de potasio, carbonato de litio, hidrogenocarbonato de litio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de potasio, hidrogenocarbonato de potasio, así como terc-butóxido de potasio y bases orgánicas, tales como dietilamina, lisina, arginina, colina, tris(hidroximetil)aminometano (trometamina), trietanolamina, dietanolamina y etanolamina. En una realización, los compuestos de la invención están en forma de la sal potásica.

Cuando se usan en medicina, las sales de un compuesto de la invención deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales farmacéuticamente no aceptables pueden usarse convenientemente para preparar la base libre correspondiente o sus sales farmacéuticamente aceptables. Un ejemplo específico de una sal de un compuesto de la invención es la sal potásica del ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico.

Los procesos para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención son convencionales en la técnica. Véase, por ejemplo, *Burger's Medicinal Chemistry And Drug Discovery* 5th Edition, Vol 1: *Principles And Practice*.

Como será evidente para los expertos en la técnica, en los procesos descritos más adelante para la preparación de los compuestos de la invención, ciertos compuestos intermedios pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto. Los términos como se aplican para cualquier compuesto intermedio empleado en el proceso de preparar compuestos de la invención tienen los mismos significados antes mencionados con respecto a los compuestos de la invención. Los procesos para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos intermedios son conocidos en la técnica y son análogos al proceso para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención.

En una realización, los compuestos de la invención son agonistas de FXR. Como se usa en la presente memoria, el término "agonista de FXR" se refiere a compuestos que presentan un pEC₅₀ mayor que 4 en el Ensayo de reclutamiento del cofactor FXR descrito más adelante. Más particularmente, los agonistas de FXR son compuestos que presentan un pEC₅₀ mayor que 5 en el Ensayo de reclutamiento del cofactor FXR descrito más adelante.

Los compuestos de la invención son útiles en terapia en sujetos como mamíferos y particularmente seres humanos. En particular, los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de un estado mediado por una disminución en la actividad de FXR en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. Como se usa en la pre-

sente memoria, el término “tratamiento” incluye la prevención de aparición de síntomas del estado o enfermedad en el sujeto, la prevención de reproducción de síntomas del estado o enfermedad en el sujeto, el retraso de la reproducción de síntomas del estado o enfermedad en el sujeto, la disminución en la gravedad o frecuencia de síntomas externos del estado o enfermedad en el sujeto, la ralentización o eliminación del avance del estado y la eliminación parcial o total de los síntomas de la enfermedad o estado del sujeto.

Los estados que se han descrito como mediados por una disminución en la actividad de FXR incluyen, aunque sin limitación, dislipidemia (Sinal, C., et al., 2000 *Cell* 102:731-744; Zhang, Y., et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 103:1006-1011); enfermedades cardiovasculares, tal como aterosclerosis (Hanniman, E.A., et al., *J. Lipid Res.* 2005, 46:2595-2604); obesidad (Chen, L., et al., 2006 *Diabetes* 55 suppl. 1:A200; Cariou, B., et al., 2006 *J. Biol. Chem.* 281:11039-11049; Rizzo, G., et al., 2006 *Mol. Pharmacol.* 70:1164-1173); diabetes mellitus (Duran-Sandoval, D., et al., 2004 *Diabetes* 53:890-898; Bilz, S., et al., 2006 *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290:E716-E722; Nozawa, H., 2005 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336:754-761; Duran-Sandoval, D., et al., 2005 *Biochimie* 87:93-98; Claudel, T., et al., 2005 *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:2020-2030; Duran-Sandoval, D., et al., 2005 *J. Biol. Chem.* 280:29971-29979; Savkur, R. S., et al., 2005 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329:391-396; Cariou, B., et al., 2006 *J. Biol. Chem.* 281:11039-11049; Ma, K., et al., 2006 *J. Clin. Invest.* 116:1102-1109; Zhang, Y., et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1006-1011); síndrome metabólico (Chen, L., et al., 2006 *Diabetes* 55 suppl. 1:A200); trastornos del hígado, tales como la enfermedad colestásica del hígado (Liu, Y. et al., 2003 *J. Clin. Invest.* 112:1678-1687) y la enfermedad de cálculos biliares de colesterol (Moschetta, A., et al., 2004 *Nat. Med.* 10:1352-1358); fibrosis de órganos (Fiorucci, S., et al., 2004 *Gastroenterology* 127:1497-1512 y Fiorucci, S., et al., 2005 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314:584-595) incluyendo fibrosis de hígado (Fiorucci, S., et al., 2004 *Gastroenterology* 127:1497-1512); enfermedad inflamatoria intestinal (Inagaki, T., et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.* 103:3920-3925); y regeneración de hígado (Huang, W., et al., 2006 *Science* 312:233-236).

Se cree que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de dislipidemia en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. Actualmente se cree que los compuestos de la presente invención aumentan el flujo de los ácidos biliares. El aumento en el flujo de los ácidos biliares mejora el flujo de los ácidos biliares desde el hígado al intestino. Los ratones sin FXR demuestran que el FXR no sólo desempeña un papel en la homeostasis de los ácidos biliares, sino que también desempeña un papel en la homeostasis de lípidos en virtud de la regulación de enzimas y transportadores que están implicados en el catabolismo y excreción de lípidos.

También se cree que los compuestos de la invención son útiles para disminuir los triglicéridos en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. Como se usa en la presente memoria “disminuir los triglicéridos” significa disminuir los triglicéridos, en un sujeto que lo necesite, por debajo del nivel inicial de triglicéridos en ese sujeto antes de la administración de un compuesto de la invención. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden disminuir los triglicéridos disminuyendo la absorción de grasas, disminuyendo la producción de triglicéridos hepáticos o disminuyendo la secreción de triglicéridos hepáticos. Los compuestos de la invención también pueden disminuir triglicéridos en suero y hepáticos.

Al tratar la dislipidemia, se cree que los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular relacionada con la hipertrigliceridemia e hipercolesteronemia, tal como aterosclerosis en un sujeto tal como un mamífero, particularmente un ser humano. También se cree que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano (Chen, L., et al., 2006 *Diabetes* 55 suppl. 1:A200; Watanabe, M., et al., 2004 *J. Clin. Invest.*, 113:1408-1418).

Los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de la obesidad en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano.

Los compuestos de la invención también son útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. Por ejemplo, los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Los efectos de un agonista GW4064 de FXR, sobre el peso corporal, la tolerancia a la glucosa, la glucosa en suero, la insulina en suero, los triglicéridos en suero y el contenido de triglicéridos hepáticos por medio de administración oral se han observado en un modelo de ratón obeso, intolerante a la glucosa y con resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasas (Chen, L., et al., 2006 *Diabetes* 55 suppl. 1:A200). Ratones C57BL machos con un peso de 20 a 25 g (Charles River, Indianapolis, IN) se alojaron a 22,22°C (72°F) y 50% de humedad relativa con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad y alimentados con comida estándar para roedores (Purina 5001, Harlan Teklad, Indianapolis, IN) o una dieta alta en grasas (TD93075, Harlan Teklad, Indianapolis, IN) durante siete semanas. Después de dos semanas, los ratones con dieta alta en grasas se seleccionaron de forma aleatoria en grupos de vehículo o de tratamiento. No hubo diferencia significativa en el peso corporal, masa de grasa corporal, glucosa e insulina en suero y el área bajo la curva (AUC) para glucosa en el ensayo de tolerancia a la glucosa (GTT) entre el grupo de vehículo y el grupo de tratamiento. A partir de la cuarta semana, a los ratones se les dio vehículo o GW4064 (100 mg/kg) dos veces al día por vía oral. A los ratones con comida estándar para roedores también se les dio vehículo como control. Al final de la tercera semana de tratamiento con el compuesto, se llevó a cabo un GTT y se midió la composición corporal usando el método de resonancia magnética cuantitativa (QMR). Al final del estudio (cuarta semana de tratamiento con el compuesto) se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior y se recogieron muestras de tejido para análisis posterior. La glucosa en sangre durante el GTT se midió

usando el Glucometer Elite® XL de Bayer. Los niveles de química de suero se midieron usando el analizador de química clínica de Instrumentation Laboratory Ilab600TM (Instrumentation Laboratory, Boston, MA). El contenido de triglicéridos hepáticos se midió usando el método de saponificación metanólica-KOH y un kit de ensayo de triglicéridos (GPO-TRINDER, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Los resultados indicaron que el GW4064 disminuyó la ganancia de peso corporal inducida por la dieta alta en grasas. Se cree que el resultado puede deberse a una disminución de la masa de grasa. El GW4064 también parecía mejorar la tolerancia a la glucosa, disminuir la glucosa, la insulina y los triglicéridos en suero y disminuir el contenido de triglicéridos en el hígado. Además, Cariou et al., trataron ratones machos ob/ob con GW4064 (30 mg/kg) intraperitonealmente (2006 *J. Biol. Chem.* 281:11039-11049). El tratamiento con GW4064 no alteró el peso corporal, así como la ingesta de comida. Aunque el GW4064 no tuvo efecto sobre la glucosa en sangre en ayunas en ratones ob/ob, disminuyó la concentración de insulina en el grupo tratado. Los ratones ob/ob tratados con GW4064 también mostraron un aumento en la tolerancia a la glucosa y mejor sensibilidad a la insulina en comparación con los controles. En otro estudio, se describió que GW4064 mejoró significativamente la hiperglicemia e hiperlipidemia en ratones db/db diabéticos (Zhang, Y., et al, 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1006-1011). El tratamiento oral con GW4064 (30 mg/kg, dos veces al día) disminuyó la glucosa en sangre, el β -hidroxibutirato, los triglicéridos, NEFA y el colesterol total en suero en ratones db/db. También se demostró que el tratamiento con GW4064 aumentó la señalización de insulina y almacenamiento de glucógeno en el hígado de ratones db/db. Estos datos sugieren que los agonistas de FXR, incluyendo los compuestos de la invención, se pueden usar para el tratamiento de la obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, enfermedad del hígado graso y el síndrome metabólico.

Los compuestos de la invención también son útiles para el tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Incluyen obesidad abdominal (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen), dislipidemia aterogénica (triglicéridos altos, bajo colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y alto colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL)), tensión arterial elevada, resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, estado protrombótico y estado proinflamatorio. La gente con síndrome metabólico tienen un alto riesgo de enfermedades coronarias del corazón y enfermedades relacionadas con la aterosclerosis (por ejemplo, ictus y enfermedad vascular periférica) y diabetes mellitus tipo 2. Existen varios criterios clínicos para los síndromes metabólicos incluyendo los de ATP III (*Adult Treatment Panel III*), OMS y AACE (*American Association of Clinical Endocrinologists*) (véanse las tablas, para revisión véase Grundy, S. M., et al., 2004 *Circulation* 109:433-438). La presente invención proporciona un método para el tratamiento del síndrome metabólico, caracterizado por obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica y resistencia a la insulina con o sin intolerancia a la glucosa, y pueden beneficiar a otros componentes del síndrome metabólico en un sujeto.

TABLA 1. Identificación clínica por el ATP III del síndrome metabólico

Factor de riesgo	Nivel de definición
Obesidad abdominal, expresada como la circunferencia de la cintura* [†]	
Hombres	>102 cm (> 40 pulgadas)
Mujeres	> 88 cm (> 35 pulgadas)
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL	
Hombres	<40 mg/dL
Mujeres	<50 mg /dL
Tensión arterial	≥ 130/≥ 85 mm de Hg
Glucosa en ayunas	≥ 110 mg/dL [‡]
* El sobrepeso y la obesidad se asocian con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. Sin embargo, la presencia de obesidad abdominal está más altamente correlacionada con los factores de riesgo metabólico que es un índice de masa corporal (BMI) elevado. Por lo tanto, se recomienda la simple medida de la circunferencia de la cintura para identificar el componente de peso corporal del síndrome metabólico.	
[†] Algunos pacientes varones pueden desarrollar múltiples factores de riesgo metabólicos cuando la circunferencia de la cintura aumenta sólo ligeramente, por ejemplo, de 94 a 102 cm (37 a 39 pulgadas). Estos pacientes pueden tener una fuerte contribución genética a la resistencia a la insulina. Dichos pacientes deben beneficiarse de cambios en los hábitos de vida, al igual que los varones con aumentos acusados en su circunferencia de cintura.	
[‡] La Asociación Americana de Diabetes ha establecido recientemente un punto de corte de ≥100 mg/dL, por encima del cual las personas tienen prediabetes (glucosa en ayunas deteriorada) o diabetes. Este nuevo punto de corte debe ser aplicable para identificar el límite inferior para definir una glucosa elevada como uno de los criterios para el síndrome metabólico.	

TABLA 2. Criterios clínicos de la OMS para el síndrome metabólico

Resistencia a la insulina, identificada por 1 de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes tipo 2 • Glucosa en ayunas deteriorada • Tolerancia a la glucosa deteriorada • o para los que tienen niveles normales de glucosa en ayunas (<110 mg/dL), la captación de glucosa por debajo del cuartil más bajo de la población de referencia objeto de la investigación bajo estados normoglucémicos hiperinsulinémicos.
Más 2 cualquiera de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Los medicamentos antihipertensores y/o la tensión arterial alta (≥ 140 mm de Hg sistólica o ≥ 90 mm de Hg diastólica) • Triglicéridos en plasma ≥ 150 mg/dL ($\geq 1,7$ mmol/L) • Colesterol HDL < 35 mg/dL ($< 0,9$ mmol/L) en hombres o < 39 mg/dL (1,0 mmol/L) en mujeres • BMI > 30 kg/m² y/o relación cintura:cadera $> 0,9$ en hombres, $> 0,85$ en mujeres. • Tasa de excreción de albúmina en orina ≥ 20 μg/min o relación albúmina:creatinina ≥ 30 mg/g.

5

TABLA 3. Criterios clínicos de la Asociación americana de endocrinólogos clínicos para el diagnóstico del síndrome de resistencia a la insulina*

Componentes de factores de riesgo	Puntos de corte para anormalidad
Sobrepeso/obesidad	BMI ≥ 25 kg/m ²
Triglicéridos elevados, colesterol HDL bajo	≥ 150 mg/dL (1,69 mmol/L)
Hombres	< 40 mg/dL (1,04 mmol/L)
Mujeres	< 50 mg/dL (1,29 mmol/L)
Tensión arterial elevada	$\geq 130/85$ mm de Hg
Desafío postglucosa 2 horas	> 140 mg/dL
Glucosa en ayunas	Entre 110 y 126 mg/dL
Otros factores de riesgo	Historial familiar de diabetes tipo 2, hipertensión o enfermedades cardiovasculares Síndrome de ovario poliquístico Estilo de vida sedentario Edad avanzada Grupos étnicos que tienen alto riesgo de diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares

* El diagnóstico depende del juicio clínico basado en los factores de riesgo.

10

Se cree que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de la enfermedad colestásica del hígado. Por ejemplo, se cree que los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria. Por lo tanto, FXR es una diana para el tratamiento de numerosas enfermedades colestásicas del hígado y la esteatohepatitis no alcohólica. También se cree que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de cálculos biliares. Por ejemplo, se cree que los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de la enfermedad de cálculos biliares de colesterol. También se cree que los compuestos de la invención son útiles para disminuir la acumulación de lípidos en el hígado.

15

También se cree que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de fibrosis de órganos. Los trastornos fibróticos pueden caracterizarse como agudos o crónicos, pero comparten la característica común de excesiva acumulación de colágeno y una pérdida de función asociada a medida que los tejidos normales son reemplazados o desplazados por tejidos fibróticos. Las formas agudas de fibrosis incluyen respuesta a traumatismo, infecciones, cirugía, quemaduras, radiación y quimioterapia. Las formas crónicas de fibrosis pueden deberse a infecciones virales, diabetes mellitus, obesidad, hígado graso, hipertensión, escleroderma y otros estados crónicos que inducen fibrosis.

20

Los órganos que son más comúnmente afectados por fibrosis incluyen hígado, riñones y pulmones. La fibrosis de un órgano puede causar la pérdida progresiva de funciones del órgano. La fibrosis retroperitoneal (incluyendo fibrosis retroperitoneal idiopática) puede no originarse en ningún órgano principal, pero puede implicar y afectar adversamente a la función de órganos, tales como los riñones.

25

Por consiguiente, como se usa en la presente memoria, el término fibrosis se refiere a todos los trastornos fibróticos reconocidos, incluyendo fibrosis debida a estados patológicos o enfermedades, fibrosis debida a traumatismo físico

("fibrosis traumática"), fibrosis debida a daño por radiación y fibrosis debida a la exposición a quimioterapia. Como se usa en la presente memoria, el término "fibrosis de órgano" incluye, aunque sin limitación, fibrosis de hígado, fibrosis de los riñones, fibrosis de pulmón y fibrosis del intestino. La "fibrosis traumática" incluye, aunque sin limitación, fibrosis secundaria a cirugía (cicatrización quirúrgica), traumatismo físico accidental, quemaduras y cicatrización hipertrófica.

En una realización, los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de fibrosis de hígado en un sujeto, particularmente un mamífero, tal como un ser humano, que necesite tratamiento. Como se usa en la presente memoria, "fibrosis de hígado" incluye fibrosis de hígado debida a cualquier causa, incluyendo, aunque sin limitación, fibrosis de hígado inducida viralmente, tal como la debida al virus de la hepatitis B o C; exposición al alcohol (enfermedad hepática alcohólica), a ciertos compuestos farmacéuticos incluyendo, aunque sin limitación, metotrexato, algunos agentes quimioterapéuticos e ingestión crónica de arsenicales o vitamina A en megadosis, estrés oxidante, radioterapia de cáncer o a ciertos productos químicos industriales, incluyendo, aunque sin limitación, tetracloruro de carbono y dimetilnitrosamina; y enfermedades tales como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hígado graso, obesidad, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística, hemocromatosis, hepatitis autoinmunitaria y esteatohepatitis. La terapia actual en la fibrosis de hígado está dirigida principalmente a retirar el agente causante, por ejemplo, retirar el exceso de hierro (por ejemplo, en el caso de hemocromatosis), disminuir la carga viral (por ejemplo, en el caso de hepatitis viral crónica) o eliminar o disminuir la exposición a toxinas (por ejemplo, en el caso de enfermedad hepática alcohólica). Los fármacos anti-inflamatorios, tales como los corticosteroides y la colquicina, son conocidos para uso en el tratamiento de la inflamación que puede conducir a fibrosis de hígado. Otras estrategias para tratar la fibrosis de hígado están en desarrollo (véase, por ejemplo, Murphy, F., et al., 2002 *Expert Opin. Invest. Drugs* 11:1575-1585; Bataller, R. and Brenner, D. A., 2001 *Sem. Liver Dis.* 21:437-451). Por lo tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de fibrosis de hígado en un sujeto, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención en combinación con otro agente terapéutico útil para el tratamiento de síntomas asociados con fibrosis de hígado. Ejemplos de agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de síntomas asociados con fibrosis de hígado incluyen corticosteroides y colquicina.

La respuesta del hígado al daño hepatocelular, similar a la curación de heridas en otros tejidos, incluye inflamación y remodelación de tejidos, con los cambios asociados en la cantidad y calidad de la matriz extracelular. La acumulación progresiva de las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo tipos de colágeno I y III, finalmente distorsiona la arquitectura del hígado formando cicatrices fibrosas, que dan como resultado un flujo de sangre interrumpido y un eventual deterioro en la función hepática (Bissell, D. M. and Maher, J. J., "*Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*" Ed. Zakim, D. and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 395-416, Hanauske-Abel, H. M., "*Fibrosis of the Liver: Representative Molecular Elements and Their Emerging Role As Anti-Fibrotic Targets*", Ed. Zakim, D., and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 347-394). Las células estelares hepáticas (HSC) se han identificado como mediadores importantes del proceso fibrótico en el hígado y se cree que son principalmente responsables de la síntesis de la matriz extracelular en exceso observada en la enfermedad de hígado. La lesión al hígado puede dar como resultado HSC quiescentes que se convierten en células similares a miofibroblastos activados que proliferan, migran, reclutan células inflamatorias y sintetizan colágenos y otras proteínas de la matriz extracelular (Bissell, D. M. and Maher, J. J., "*Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*", Ed. Zakim, D. and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 395-416, Hanauske-Abel, H. M., "*Fibrosis of the Liver: Representative Molecular Elements and Their Emerging Role As Anti-Fibrotic Targets*", Ed. Zakim, D., and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 347-394). Se ha descrito que diversas citoquinas activan las HSC, incluyendo el factor de crecimiento transformante β (TGF β). Tras la lesión al hígado, las HSC sintetizan la α -actina de la musculatura lisa (α -SMA) como parte de la respuesta de migración, consecuentemente puede verse una acumulación marcada de α -SMA en zonas de fibrogénesis activa del hígado (Bissell, D. M. and Maher, J. J., "*Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*", Ed. Zakim, D. and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 395-416, Hanauske-Abel, H. M., "*Fibrosis of the Liver: Representative Molecular Elements and Their Emerging Role As Anti-Fibrotic Targets*", Ed. Zakim, D., and Thomas, D. B., 4 ed. 2 vols. Philadelphia: Saunders, 2003, 347-394). El desequilibrio de la interacción epitelial/mesenquimatoso normal, caracterizada por daño/proliferación de colangiocitos, también puede conducir a una fibrogenesis progresiva y productora de matriz extracelular [Pinzani, M., et al., 2004 *Digest. Liver Dis.* 36:231-242].

Como se conoce en la técnica, la fibrosis de hígado puede clasificarse clínicamente en cinco grados de gravedad (S0 a S4), normalmente basándose en el examen histológico de una muestra de biopsia. S0 indica sin fibrosis, mientras que S4 indica cirrosis. Aunque existen varios criterios para definir las etapas de gravedad de la fibrosis de hígado, en general las etapas tempranas de fibrosis se identifican por zonas discretas, localizadas de cicatrización en un portal (zona) del hígado, mientras que grados más tardíos de fibrosis son identificados por fibrosis de puenteo (cicatrización que cruza zonas del hígado).

Los compuestos de la invención también son útiles para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se define como un grupo de trastornos inflamatorios idiopáticos, con recaída, del intestino – el intestino grueso o delgado. La patogénesis de IBD sigue siendo incierta y puede implicar factores genéticos, ambientales e inmunológicos [Drossman, D. A. 1999 *Aliment Pharmacol. Ther.* 13(s2):3-14; Danese, S., et al., 2004 *Autoimmunity Reviews* 3: 394-400; Stokkers, P.C.F. and Hommes, D.W. 2004 *Cytokine* 28:167-173]. Los tipos más comunes de enfermedades inflama-

torias intestinales son colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

También se cree que los compuestos de la invención son útiles para aumentar la regeneración de hígado en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano. Por ejemplo, se considera que los compuestos de la invención son útiles para aumentar la regeneración del hígado para el trasplante de hígado.

5 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de un estado mediado por una disminución de la actividad de FXR, particularmente un estado en el que un agonista de FXR puede ser útil, en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado mediado por una disminución de la actividad de FXR, particularmente un estado en el que puede ser útil un agonista de FXR, en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite.

10 La presente invención también proporciona un método para disminuir los triglicéridos en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para disminuir los triglicéridos en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de la obesidad en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de diabetes mellitus en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 La presente invención proporciona un método para el tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad colestásica del hígado en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad colestásica del hígado en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de fibrosis de órganos en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de fibrosis de órganos en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de fibrosis de hígado en un sujeto, tal como un mamífero, particularmente un ser humano, que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hígado en un sujeto. En una realización, el compuesto de la invención es ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolin-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 Todos los métodos de la presente invención comprenden la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que es suficiente para lograr el efecto establecido en el sujeto al que se administra. Por consiguiente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención empleada en el método para el tratamiento de un estado mediado por la disminución de la actividad de FXR en un ser humano será una cantidad suficiente para el tratamiento de un estado mediado por una disminución de la actividad de FXR en un ser humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención para uso en el método para el tratamiento de diabetes mellitus en un ser humano será una cantidad suficiente para el tratamiento de diabetes mellitus en un ser humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención para uso en el método para el tratamiento del síndrome metabólico en un ser humano será una cantidad suficiente para el tratamiento del síndrome metabólico en un ser

humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención para uso en el método para el tratamiento de fibrosis de órganos (por ejemplo, hígado) en un ser humano será una cantidad suficiente para el tratamiento de fibrosis de órganos en un ser humano.

5 La cantidad de un compuesto de la invención que se requiere para obtener el efecto terapéutico o biológico deseado dependerá de un número de factores, tales como el uso para el que se pretende, el medio de administración, el receptor y el tipo y gravedad del estado o enfermedad que se tratan y será finalmente a discreción del médico o veterinario que atiende el caso. En general, una dosis diaria típica para el tratamiento de una enfermedad o estado mediado por la disminución de la actividad de FXR en un ser humano, por ejemplo, puede esperarse que oscile en el intervalo de alrededor de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg para un ser humano de 70 kg. Esta dosis puede administrarse como una sola dosis unitaria o como varias dosis unitarias separadas o como infusión continua. Serían aplicables dosis similares para el tratamiento de otras enfermedades, estados y terapias incluyendo diabetes mellitus y obesidad en seres humanos.

15 Aunque es posible que, para uso en terapia, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención pueda ser administrada como un producto químico en bruto, típicamente se presenta como un ingrediente activo de una composición o formulación farmacéutica. Por consiguiente, la invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la invención. La composición farmacéutica también puede comprender uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. El(los) vehículo(s) y/o diluyente(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y no nocivos para el receptor. En una realización particular, el compuesto está en forma cristalina. La invención también contempla específicamente las composiciones que comprenden la sal potásica del compuesto antes mencionado. De conformidad con otro aspecto de la invención también se proporciona un proceso para la preparación de una formulación farmacéutica, que incluye mezclar un compuesto de la invención con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma de dosis unitaria que contiene una cantidad predefinida de ingrediente activo por dosis unitaria. Dicha unidad puede contener una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una fracción de una dosis terapéuticamente eficaz de tal modo que formas de dosis unitarias múltiples puedan ser administradas en un momento determinado para lograr la dosis terapéuticamente eficaz deseada. Las formulaciones de dosis unitarias preferidas son las que contienen una dosis o sub-dosis diaria, como se han descrito en la presente memoria, o una fracción adecuada, de un ingrediente activo. Además, dichas formulaciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

35 Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas formulaciones pueden ser preparadas por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo asociando el ingrediente activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o agua en aceite.

40 Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente activo puede combinarse con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico, para vía oral tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico igualmente pulverizado, tal como un carbohidrato comestible, como por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente saborizante, conservante, dispersante y colorante.

45 Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla de polvo como se ha descrito antes y rellenando las envolturas de gelatina formadas. A la mezcla de polvo antes de la operación de rellenado se pueden añadir deslizantes y lubricantes, tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido. Un agente disgregante o solubilizante, tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, también se puede añadir para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiera la cápsula.

50 Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetil-celulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar-agar, bentonita, goma xantán y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o apisonando, añadiendo un lubricante y disgregante y comprimiendo en comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, triturado adecuadamente, con un diluyente o base como se ha descrito antes, y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina,

o polivinilpirrolidona, un retardante de solución como parafina, un acelerador de resorción, tal como una sal cuaternaria, y/o un agente de absorción, tal como bentonita, caolín o fosfato de dicálcico. La mezcla de polvo puede ser granulada humectando con un aglutinante, tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o polímeros y forzándolos a través de una malla. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo puede hacerse circular a través de la máquina de comprimidos y el resultado son trozos apisonados de formas imperfectas rotos en gránulos. Los gránulos pueden ser lubricados para evitar que se peguen a las matrices formadoras de comprimidos por medios de adición de ácido esteárico, una sal estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime después en comprimidos. Los compuestos de la presente invención también pueden ser combinados con un vehículo inerte de flujo libre y comprimirse en comprimidos directamente sin ser sometidos a las etapas de granulación o apisonamiento. Pueden proporcionarse un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en una capa selladora de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polímero y una capa de pulido de cera. A estos recubrimientos se le pueden añadir colorantes para distinguir las diferentes dosis unitarias.

Los fluidos orales, tales como soluciones, jarabes y elixires se, pueden preparar en forma de dosis unitaria para que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada de ingrediente activo. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa aromatizada de forma adecuada, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxitilensorbitol, conservantes, aditivos de sabor, tales como aceite de menta, o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando resulte apropiado, las formulaciones de dosis unitaria para administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación, como por ejemplo, revistiendo o incrustando material en partículas en polímeros, cera o similares.

Un compuesto de la invención también se puede administrar en forma de sistemas de suministro por liposomas, tal como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Un compuesto de la invención también se puede administrar mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos también se pueden acoplar a polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilón-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros reticulados o de bloques anfipáticos de hidrogeles.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica se pueden presentar como parches individuales destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede suministrar desde el parche por iontoforesis, como se describe generalmente en 1986 *Pharmaceutical Research* 3:318.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites.

Para tratamientos de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el ingrediente activo se puede emplear ya sea con una base parafínica o una base de pomada miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas a los ojos incluyen gotas para los ojos en las que el ingrediente activo está disuelto o en suspensión en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen, grageas, pastillas y colutorios.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal se pueden presentar como supositorios o como enemas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal, en la que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 500 micrómetros, que se administra por esnifado, es decir por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas, que se pueden generar por medio de varios tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados de dosis medidas.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal se pueden presentar como óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que contienen anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de puesta en suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes para dosis unitarias o múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

15 Se debe entender que además de los ingredientes particularmente antes mencionados, las composiciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica de acuerdo con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

20 En los métodos de tratamiento y usos antes descritos, los compuestos de la invención se pueden emplear solos, en combinación con uno o más compuestos de la invención o en combinación con otros agentes terapéuticos. Por lo tanto, la presente invención también comprende composiciones farmacéuticas que comprenden además uno o más agentes terapéuticos. En una realización, las composiciones farmacéuticas también comprenden uno o más agentes que alteran los lípidos. Ejemplos de agentes que alteran los lípidos incluyen, aunque sin limitación, agonistas del receptor X del hígado (LXR) descritos en la publicación PCT N° WO02/24632 de GlaxoSmithKline. Ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, inhibidores de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-reductasa, tales como estatinas (atorvastatina, fluvastatina, pravastatina, lovastatina, cerivastatina y nisvastatina); inhibidores de escualeno-epoxidasa, inhibidores de escualeno-sintetasa, inhibidores del transporte de ácidos biliares (BATi), agonistas del receptor y activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) humano como rosiglitazona, troglitazona y pioglitazona y tiazolidindionas; agonistas de PPAR- α , tales como clofibrato y gemfibrozilo; agonistas α /y duales de PPAR; inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), tales como rofecoxib y celecoxib; inhibidores de trombina; acil-coenzima A; inhibidores de colesterol-aciltransferasa (ACAT) que incluyen inhibidores de ACAT selectivos; inhibidores de proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (MTP); probucol, niacina; inhibidores de la absorción del colesterol; secuestrantes de ácidos biliares; inductores de receptores LDL; inhibidores de la agregación plaquetaria, tales como antagonistas de los receptores de glicoproteína IIb/IIIa fibrinógeno y aspirina; vitamina B6 y sus sales farmacéuticamente aceptables; vitamina B12; ácido fólico o una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptable; vitaminas antioxidantes, tales como C y E y beta-caroteno; bloqueadores beta; antagonistas de angiotensina II, tales como losartán; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinas, tales como enalapril y captopril; bloqueadores de canales de calcio, tales como nifedipino y diltiazam; antagonistas de endotelio; agentes distintos de ligandos LXR que mejoran la expresión del gen transportador-A1 del casete de unión a ATP; y compuestos de bisfosfonato, tales como alendronato sódico.

40 Los métodos y usos que emplean estas combinaciones pueden comprender la administración de los compuestos de la invención y otro agente terapéutico ya sea secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente en composiciones farmacéuticas separadas o combinadas. Cuando se combinan en la misma composición, se apreciará que los compuestos deben ser estables y compatibles entre sí y los otros componentes de la composición y se pueden formular para administración. Cuando se formulan por separado, se pueden proporcionar en cualquier formulación conveniente, del modo que es conocido en la técnica para dichos compuestos.

45 Cuando un compuesto de la invención se usa en combinación con otro agente terapéutico, la dosis de cada compuesto puede diferir de la que se usa con el compuesto solo. Las dosis apropiadas serán fácilmente evidentes por los expertos en la técnica. La dosis adecuada del(de los) compuesto(s) de la invención y el(los) otro(s) agente(s) terapéuticamente activo(s) y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para lograr el efecto terapéutico combinado deseado, y están dentro de la experiencia y discreción del médico que atiende el caso.

50 Los compuestos de la invención se pueden preparar de conformidad con cualquier método adecuado de química orgánica. Como será evidente para los expertos en la técnica y se muestra en los esquemas siguientes, el orden de las etapas en cada reacción no es crítico para la práctica de los procesos de la presente invención. Las etapas de reacción representadas en cada esquema se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado basado en el conocimiento de los expertos en la técnica. Además, será evidente para los expertos en la técnica que ciertas etapas de reacción se pueden llevar a cabo de forma más eficaz instalando grupos protectores antes de la reacción, que son retirados subsiguientemente. La elección de grupos protectores así como las técnicas generales para su instalación y eliminación son bien conocidos por los expertos en la técnica.

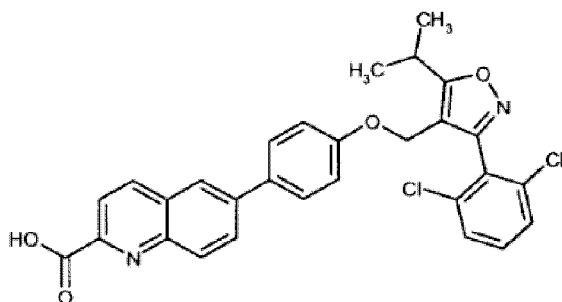
Un compuesto de la invención, preparado por cualquier procedimiento adecuado, se puede convertir en una de sus sales farmacéuticamente aceptables o se puede convertir en un compuesto diferente de la invención o en una de

sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables usando técnicas descritas en este documento a continuación y las convencionales en la técnica.

En el ejemplo, los siguientes términos tienen el significado designado:

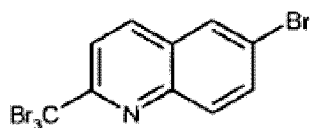
- 5 Å = angstroms;
 g = gramos;
 mg = miligramos;
 mol = mol;
 mmol = milimoles;
 M = molar;
 10 N = normal;
 L = litros;
 mL = mililitros;
 µL = microlitros;
 h = horas;
 15 min = minutos;
 ac = acuoso;
 % en peso = (porcentaje en peso)
 CH₂Cl₂ = diclorometano;
 DMF = N, N-dimetilformamida;
 20 DMSO = dimetilsulfóxido;
 DTT = ditioneitol
 EtOAc = acetato de etilo;
 EtOH = etanol
 HCl = cloruro de hidrógeno;
 25 H₂O = agua;
 K₂CO₃ = carbonato de potasio;
 K₃PO₄ = fosfato de potasio
 MeOH = metanol
 MgSO₄ = sulfato de magnesio;
 30 N₂ = nitrógeno;
 Na₂CO₃ = carbonato de sodio;
 NaF = fluoruro de sodio
 NaHCO₃ = hidrogenocarbonato de sodio;
 NaOH = hidróxido de sodio;
 35 Na₂SO₄ = sulfato de sodio;
 P₂O₅ = pentóxido de fósforo;
 SiO₂ = dióxido de silicio;
 TEA = trietilamina
 THF = tetrahidrofurano;
 40 NMR = resonancia magnética nuclear;
 H = hidrógeno;
 Hz = hercios;
 MHz = megahercios;
 OD = densidad óptica;
 45 HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución;
 APCI-LCMS = ionización química a presión atmosférica - cromatografía de líquidos y espectrometría de masas;
 ESI-LCMS = ionización por electropulverización - cromatografía de líquidos y espectrometría de masas;
 HRMS = espectrometría de masas de alta resolución.

Ejemplo 1: Ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico



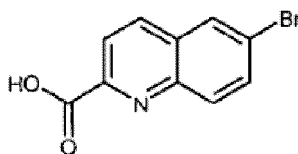
50

1a) 6-Bromo-2-(tribromometil)quinolina



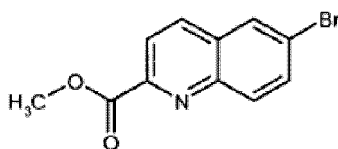
Una suspensión de 6-bromo-2-metilquinolina (175 g, 0,79 mol) y acetato de sodio (350 g, 4,3 mol) en ácido acético (1,5 L) se agitó y calentó en un baño a 75°C hasta que se formó una solución. Una solución de bromo (132 mL, 2,6 mol) en ácido acético (350 mL) se añadió durante 15 min tiempo durante el cual la temperatura de reacción aumentó hasta 86°C. La suspensión resultante se calentó a 120°C durante 1 hora. La suspensión se enfrió hasta 80°C y se añadió a hielo-agua (6 L) con agitación. El sólido blanco resultante se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 1 L) y se secó al aire obteniéndose 6-bromo-2-(tribromometil)quinolina (350 g, 95%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,54 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,40 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,31 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,00 (m, 2H). ES-LCMS *m/z* 459 (M+H)⁺.

10 1b) Ácido 6-bromo-2-quinolincarboxílico



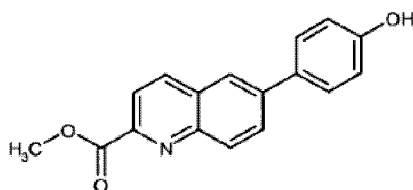
Se añadió ácido sulfúrico concentrado (0,75 L) durante 15 min a una suspensión agitada de 6-bromo-2-(tribromometil)quinolina (350 g, 0,76 mol) en agua (1,75 L). La suspensión resultante se calentó a 150°C (temperatura del baño) durante 5 horas. La mezcla se enfrió y el precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó obteniéndose ácido 6-bromo-2-quinolincarboxílico en forma de un sólido (127,6 g). El filtrado se diluyó con agua (3 L) y se obtuvo una segunda cosecha del producto (55,7 g, rendimiento combinado 183,3 g, 96%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,50 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,38 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,96 (m, 1H). ES-LCMS *m/z* 253 (M+H)⁺.

1c) 6-bromo-2-quinolincarboxilato de metilo



Una mezcla de ácido 6-bromo-2-quinolincarboxílico (331 g, de múltiples lotes, 1,31 mol) y ácido metanosulfónico (22 mL, 33 g, 0,34 mol) en metanol (2 L) se sometió a reflujo durante 6 horas. La mezcla se trató con una solución de hidrogenocarbonato de sodio (29 g, 0,34 mol) en agua (350 mL) y la suspensión resultante se enfrió lentamente hasta 20°C y se agitó durante la noche. La suspensión se filtró y la torta se lavó con agua (1 L). El sólido se secó en un horno a vacío a 50°C durante 3 días obteniéndose 6-bromo-2-quinolincarboxilato de metilo (294 g, 85%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,52 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,40 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,97 (m, 1H), 3,93 (s, 3H). ES-LCMS *m/z* 267 (M+H)⁺.

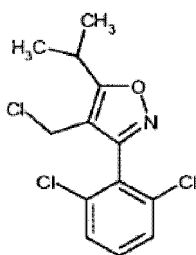
1d) 6-(4-Hidroxifenil)-2-quinolincarboxilato de metilo



Una mezcla agitada de 6-bromo-2-quinolincarboxilato de metilo (297 g, de múltiples lotes, 1,11 mol), ácido 4-hidroxibencenoborónico (184 g, 1,33 mol), K₃PO₄ 2 M (1,8 L) y tetrakis(trifenil)fosfina-paladio(0) (51,3 g, 0,04 mol) en 1,2-dimetoxietano (1,8 L) se calentó hasta 79°C. Se formó una solución y con esto se completó la reacción. La mez-

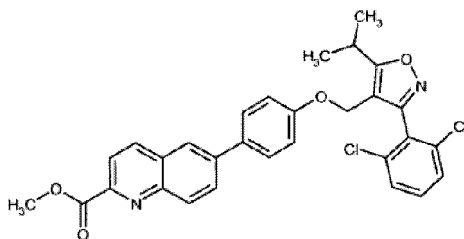
cla se enfrió hasta 45°C, se diluyó con agua (1,8 L), se enfrió hasta 15°C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos y luego se filtró. La torta de filtración se lavó con metanol (4 x 2 L) obteniéndose 6-(4-hidroxifenil)-2-quinolincaboxilato de metilo (83 g). El análisis por HPLC mostró que gran parte del éster estaba hidrolizado. La mezcla se acidificó a un pH 3 añadiendo HCl 6 N y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó a 45°C en un horno a vacío obteniéndose principalmente ácido 6-(4-hidroxifenil)-2-quinolincaboxílico (116,3 g). El líquido de lavado metanólico se concentró, se sometió a destilación azeotrópica con tolueno y se secó a vacío obteniéndose el fenol ácido (178,5 g). Este material se re-esterificó sometiendo a reflujo con ácido metanosulfónico (71 mL, 105,7 g, 1,1 mol) en metanol (1,8 L) durante 22 horas. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua (5 L) y se alcalinizó hasta pH 8 añadiendo solución de NaHCO₃. La suspensión resultante se filtró y la torta de filtración se secó a 50°C en un horno a vacío obteniéndose 6-(4-hidroxifenil)-2-quinolincaboxilato de metilo (222,3 g, rendimiento combinado 305 g, 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,75 (s ancho, 1H), 8,53 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,11 (m, 3H), 7,69 (d, J = 9 Hz, 2H), 6,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 3,93 (s, 3H). ES-LCMS *m/z* 280 (M+H)⁺.

1e) 4-(Clorometil)-3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)isoxazol



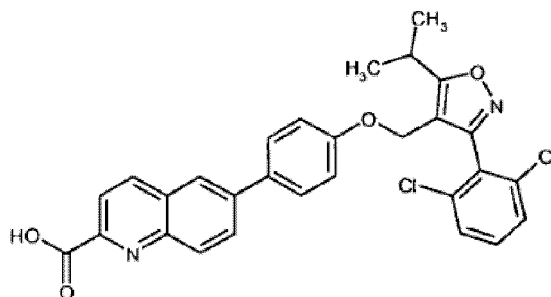
Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (123 mL, 202 g, 1,7 mol) durante 30 minutos a una suspensión agitada de benzotriazol (202 g, 1,7 mol) en diclorometano (550 mL) a temperatura ambiente bajo N₂. La solución amarilla resultante se transfirió a un embudo de adición y se añadió gota a gota durante 1 hora a una solución agitada de [3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metanol (372 g, 1,3 mol, Maloney, P.R., et al., 2000 *J. Med. Chem.* 43:2971-2974) en diclorometano (975 mL). La temperatura de reacción aumentó gradualmente hasta un máximo de 28°C. Después de 1 hora la suspensión resultante se filtró para retirar el hidrocloreuro de benzotriazol. El material filtrado se lavó con agua (2 x 1 L), con NaOH 1 N (1 L), con agua (1 L), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose 4-(clorometil)-3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)isoxazol en forma de un aceite amarillo pálido (413 g, 80%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,64 (m, 3H), 4,47 (s, 2H), 3,45 (m, 1H), 1,31 (d, J = 7 Hz, 6H). ES-LCMS *m/z* 305 (M+H)⁺.

1f) 6-[4-([3-(2,6-Diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil)oxi]fenil]-2-quinolincaboxilato de metilo



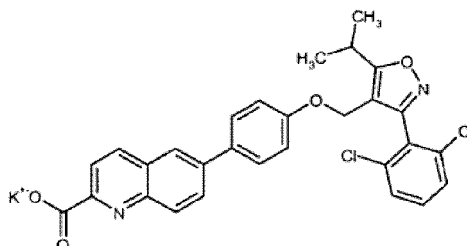
Una mezcla de 6-(4-hidroxifenil)-2-quinolincaboxilato de metilo (222 g, 0,8 mol), 4-(clorometil)-3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)isoxazol (292 g, 0,96 mol) y carbonato de cesio (312 g, 0,96 mol) en DMF (1,5 L) se calentó a 65°C durante 28 horas. Se añadió 4-(clorometil)-3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)isoxazol adicional (105 g, 0,34 mol) disuelto en DMF (150 mL). La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua (5 L) con agitación. El caramelo resultante se separó del líquido sobrenadante y se agitó con acetato de etilo (2,5 L) durante 3 horas a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y la torta de filtración se secó obteniéndose 6-[4-([3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil)oxi]fenil]-2-quinolincaboxilato de metilo en forma de un sólido (245 g, 56%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,54 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,28 (d, J = 1 Hz, 1H), 8,11 (m, 3H), 7,72 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,53 (m, 1H), 6,93 (d, J = 9 Hz, 2H), 4,88 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,47 (m, 1H), 1,33 (d, J = 7 Hz, 6H). ES-LCMS *m/z* 547 (M+H)⁺.

1g) Ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico



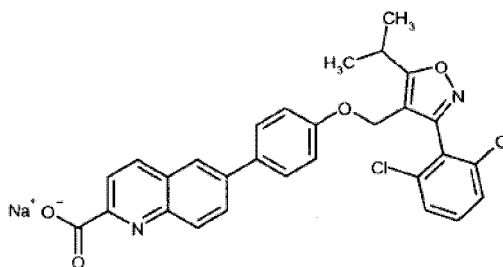
Una mezcla agitada de 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxilato de metilo (245 g, 0,45 mol), NaOH (36 g, 0,90 mol) disuelto en agua (225 mL), metanol (0,5 L) y THF (1,2 L) se calentó a 65°C durante 90 minutos. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se trató con HCl 6 N (150 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 1 L) y se secó durante la noche a 45°C en un horno a vacío obteniéndose ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico (162 g, 68%). Se obtuvo similarmente una segunda cosecha (27,2 g, 11%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,48 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,24 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,53 (m, 1H), 6,92 (d, J = 9 Hz, 2H), 4,88 (s, 2H), 3,46 (m, 1H), 1,32 (d, J = 7 Hz, 6H). ES-LCMS *m/z* 533 (M+H)⁺.

1h) Sal potásica del ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico



Una suspensión agitada de ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico (179 g, 0,335 mol) en etanol (2,6 L) se trató con *tert*-butóxido de potasio 1 N en alcohol *tert*-butílico (350 mL) y se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 1 hora. La mezcla se calentó a un ligero reflujo durante 2 horas y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, luego la torta de filtración se lavó con hexano, se reunió con 5 g de material preparado similarmente y se secó a 60°C en un horno a vacío durante la noche obteniéndose la sal potásica del ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico en forma de un sólido de color beige (181 g, 84%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,25 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,18 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,94 (dd, J = 2, 9 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,53 (dd, J = 7, 9 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 4,86 (s, 2H), 3,46 (m, 1H), 1,32 (d, J = 7 Hz, 6H). ES-LCMS *m/z* 533 (M+H)⁺. Análisis calculado para C₂₉H₂₁Cl₂KN₂O₄·0,25 KCl: C, 59,02; H, 3,59; Cl, 13,52; N, 4,75. Encontrado: C, 58,94; H, 3,62; Cl, 13,28; N, 4,74.

25 1i) 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxilato de sodio



A una suspensión agitada de ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico (4,12 g, 7,73 mmol) en metanol (100 mL) se añadió hidróxido de sodio 1 N (7,73 mL, 7,73 mmol).

La mezcla se agitó durante aproximadamente 1 hora y luego se concentró. Se añadió éter y un poco de agua. Después de agitar el sólido se volvió una pasta. El disolvente se decantó y la pasta se trituró con éter y luego se secó en un rotavapor a 35°C bajo vacío durante aproximadamente 1,5 horas obteniéndose 6-[4-([3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil)oxi]fenil]-2-quinolincarboxilato de sodio (4,24 g, 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,28-8,22 (m, 2H), 8,09-7,96 (m, 3H), 7,68 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,63-7,51 (m, 3H), 6,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 4,87 (s, 2H), 3,46 (septete, J = 7 Hz, 1H), 1,33 (d, J = 7 Hz, 6H). LRMS (APCI) C₂₉H₂₁Cl₂N₂O₄Na, calculado: 533 (M+H)⁺, encontrado: 533 (M+H)⁺.

Ejemplo biológico 2- Ensayo de unión del cofactor FXR

Determinación de una interacción del péptido cofactor mediada por ligando para cuantificar la unión del ligando al receptor nuclear, el receptor X farnesoide (FXR). El método mide la capacidad de supuestos ligandos para modular la interacción entre el dominio de unión al ligando (LBD) FXR α expresado en bacterias purificado y un péptido biotinilado sintético basada en los residuos 676-700 del coactivador receptor de esteroides-1 (SRC-1) (dominio-2 que contiene LXXLL en el que L es el aminoácido leucina y X indica cualquier otro aminoácido (LCD2), 676-700). La secuencia del péptido SRC-1 utilizada es como se publicó en Iannone, M.A., et al., 2001 *Cytometry* 44:326-337, en donde el extremo N estaba biotinilado (B) y el extremo C estaba amidado. La detección del complejo asociado se midió por fluorescencia en tiempo resuelto (TRF). El LBD purificado de FXR se marcó con biotina y luego se mezcló con cantidades estequiométricas de estreptavidina marcada con alofocianina (APC) (Molecular Probes). El péptido biotinilado se mezcló después con media cantidad estequiométrica de estreptavidina marcada con europio (Wallac Inc). Después cada uno se bloqueó con un exceso 5 veces de biotina y se dejó equilibrar durante 15 minutos. Cantidades equimolares de receptor y péptido se mezclaron y se dejaron equilibrar durante al menos 30 minutos antes de la adición a concentraciones variables o constantes de la muestra para la que se iba a determinar la afinidad. Después del equilibrio, se cuantificó la señal fluorescente en tiempo resuelto usando un lector de placas fluorescentes. Se estimó la afinidad del compuesto de ensayo a partir de un gráfico de fluorescencia frente a la concentración del compuesto de ensayo añadido.

Un nivel basal de FXR: se observa la formación de péptido en ausencia de ligando añadido. Los ligandos que promueven la formación de complejos inducen un aumento dependiente de la concentración en la señal fluorescente en tiempo resuelto. Se esperarían compuestos que se unan igualmente bien tanto al FXR monómero como al complejo FXR:péptido para no obtener cambios en la señal, mientras que se esperaría que los ligandos que se unen preferencialmente al receptor monómero induzcan una disminución dependiente de la concentración en la señal observada.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación por adelantado: Dominio de unión al ligando del receptor X farnesoide α humano

Se expresó el dominio de unión al ligando FXR α humano (FXR α LBD) en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) como una proteína de fusión marcada con una cola de polihistidina amino-terminal. La expresión estaba bajo el control de un promotor de T7 inducible de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El ADN que codifica esta proteína recombinante se subclona en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen). La secuencia codificadora de FXR α LBD humano se obtuvo de Genbank número de acceso U 68233 (aminoácidos 237 a 472).

Se cultivaron lotes de fermentación de diez litros en medios Rich PO₄ con 0,1 mg/mL de ampicilina a 25°C durante 12 horas, se enfrió a 9°C y se mantuvo a esa temperatura durante 36 horas a una densidad de OD₆₀₀ = 14. A esta densidad celular se añade IPTG 0,25 mM y la inducción prosiguió durante 24 horas a 9°C hasta una OD₆₀₀ final = 16. Las células se cosecharon por centrifugación (20 minutos, 3500 x g, 4°C) y las suspensiones de células concentradas se conservaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a -8°C.

Purificación del dominio de unión al ligando del receptor

Rutinariamente, se volvieron a poner en suspensión 30-40 g de pasta celular (equivalente a 2-3 litros del lote de fermentación) en 200-250 mL de solución salina tamponada con Tris (TBS), pH 7,2 (Tris-hidroximetilaminometano (Tris) 25 mM, cloruro de sodio 150 mM). Las células se lisaron haciéndolas pasar 3 veces a través de una prensa francesa y los residuos celulares se separaron por centrifugación (30 minutos, 20.000 x g, 4°C). El líquido sobrenadante clarificado se filtró por pre-filtros y se añadió TBS, pH 7,2, imidazol 500 mM obteniéndose una concentración de imidazol final de 50 mM. Este material lisado se cargó en una columna (6 x 8 cm) rellena de la resina de quelación Sepharose [cargada con Ni⁺⁺] (Pharmacia) y se pre-equilibró con TBS, pH 7,2/imidazol 50 mM. Después de lavar hasta la absorbancia de la línea base con tampón de equilibrado, la columna se lavó con un volumen de columna de TBS, pH 7,2 que contenía imidazol 90 mM. El FXR α LBD se eluyó directamente con imidazol 365 mM. Se agruparon las fracciones de la columna y se dializaron frente a TBS, pH 7,2, que contenía EDTA 0,5 mM y DTT 5 mM. La muestra de proteína dializada se concentró usando Centri-prep 10 K (Amicon) y se sometió a exclusión por tamaños, usando una columna (3 x 90 cm) rellena de resina Sepharose S-75 (Pharmacia) pre-equilibrada con TBS, pH 7,2, que contenía de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM y ditiotreitól (DTT) 5 mM.

Biotinilación de FXR

El FXR α LBD purificado se desalificó/intercambió con tampón usando columnas de filtración por gel PD-10 en PBS [Na₂PO₄ 100 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM]. El FXR α LBD se diluyó hasta aproximadamente 60 μ M en PBS y se añadió un exceso cinco veces molar de NHS-LC-biotina (Pierce) en un volumen mínimo de PBS. Esta solución se incubó con mezclamiento suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción de modificación por biotinilación se detuvo por la adición de un exceso molar de 2000 veces de Tris-HCl, pH 8. El FXR α LBD modificado se dializó frente a 4 cambios, cada uno de al menos 50 volúmenes, de tampón PBS que contenía DTT 5 mM, EDTA 2 mM y sacarosa al 2%. El FXR α LBD biotinilado se sometió luego a análisis por espectrometría de masas para revelar el grado de modificación por el reactivo de biotinilación. En general, aproximadamente 95% de la proteína tenía al menos un solo sitio de biotinilación; y el grado global de biotinilación seguido de una distribución normal de sitios múltiples que variaba de cero a cuatro.

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

El péptido SRC-1 (LCD2, 676-700) biotinilado y la mitad de la cantidad estequiométrica del quelato de europio conjugado con estreptavidina se incubaron en un tampón de ensayo que contenía DTT 10 mM durante al menos 30 minutos. Una segunda solución de cantidades estequiométricas de FXR biotinilado y APC conjugada por estreptavidina se incubó en tampón de ensayo que contenía DTT 10 mM durante al menos 30 minutos. Cada solución se bloqueó luego con un exceso 5 veces molar de biotina y se dejó equilibrar durante al menos 30 minutos. El receptor marcado y el cofactor se mezclaron y de nuevo se dejaron equilibrar durante al menos 30 minutos, se añadieron a la placa del compuesto, utilizando por ejemplo, un Titertek Multidrop 384.

Materiales:

Tampón de ensayo: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 50 mM, pH 7,5, NaF 50 mM, 3-[(3-colamidopropil)-desmetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 50 μ M, 0,1 mg/ml de la fracción 5 de seroalbúmina bovina (BSA) exenta de ácidos grasos, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM. Se añadió DTT sólido al tampón de ensayo hasta una concentración final de 10 mM justo antes de usarse en el ensayo.

BSA, exenta de ácidos grasos

DTT

NaF

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

Placas de 384 pocillos

Métodos:

Detalles experimentales:

Se añadieron a una placa de 384 pocillos los compuestos de ensayo y los controles diluidos en serie en DMSO y 0,1 μ L a la concentración deseada.

En cada pocillo de ensayo se añadió una solución previamente preparada de FXR-APC y SRC-1 marcada con europio a 0,1 μ L del compuesto de ensayo y de los controles para un volumen de ensayo final de 10 μ L.

Las placas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y la señal fluorescente se determinó en un lector de fluorescencia en un modo de tiempo resuelto usando, por ejemplo, un dispositivo de imágenes Wallac Viewlux o un contador Wallac Victor Multilabel.

Reducción de datos:

Para cada concentración de compuesto de ensayo, los resultados de cada pocillo de ensayo se expresaron como % del control, C, calculado de acuerdo con la ecuación (1).

$$C = 100 \cdot \frac{F_{\text{muestra}} - F_{\text{basal}}}{F_{\text{estándar}} - F_{\text{basal}}} \quad (1)$$

donde F_{muestra} es la señal observada en un pocillo de muestra particular, F_{total} es la señal observada en presencia de un inhibidor de control y F_{basal} es el índice de recuento observado en sin presencia de ligando. Los valores usados para $F_{\text{estándar}}$ y F_{basal} son valores medios de los pocillos de control correspondientes incluidos en cada placa. Los resultados se recogen en la Tabla 1 siguiente. En la Tabla 1, + indica un pEC₅₀ de 5 - 5,99; ++ indica un pEC₅₀ de 6 - 6,99 y +++ indica un pEC₅₀ mayor que 7.

Tabla 1

Ejemplo	Actividad (pEC ₅₀)	Ejemplo	Actividad (pEC ₅₀)
1g	++	21	++
1h	++	22	++
1i	++	23	++

Ejemplo 3. Los efectos de los agonistas de FXR sobre ratones obesos inducidos por la dieta

5 Métodos: Ratones C57BL (Charles River, Indianapolis, IN), machos de 20 a 25 g, se alojaron a 22,22°C (72°F) y con una humedad relativa del 50% con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad y se alimentaron con comida estándar para roedores (Purina 5001, Harlan Teklad, Indianapolis, IN) o con una dieta alta en grasas (TD93075, Harlan Teklad, Indianapolis, IN) durante ocho semanas. Después de tres semanas, los ratones con dieta alta en grasas se dividieron de forma aleatoria en grupos de tratamiento o con vehículo basándose en el nivel de glucosa en ayunas y el peso corporal. A partir de la quinta semana, los ratones recibieron vehículo o el compuesto del Ejemplo 1 (10, 30 y 100 mg/kg) dos veces al día por vía oral. A los ratones que se alimentaron con comida estándar para roedores también se les dio vehículo como control. La composición corporal se midió usando el método de resonancia magnética cuantitativa (QMR) antes y al final del tratamiento con el compuesto. Al final del estudio (cuarta semana de tratamiento con el compuesto) se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior y se recogieron muestras de tejido para otros análisis. Los niveles de compuestos químicos en suero se midieron usando el analizador de química clínica de Instrumentation Laboratory Ilab600TM (Instrumentation Laboratory, Boston, MA).

Resultados: El compuesto del Ejemplo 1 disminuyó la masa de grasa corporal, la glucosa en suero, la insulina, el colesterol, los triglicéridos, NEFA y el glicerol en ratones obesos alimentados con dieta alta en grasas.

REIVINDICACIONES

1. Ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 5 2. Ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico.
3. Sal potásica del ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Una composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico.
6. Una composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende la sal potásica del ácido 6-[4-({[3-(2,6-diclorofenil)-5-(1-metiletil)-4-isoxazolil]metil}oxi)fenil]-2-quinolincarboxílico.
- 20 7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en terapia.