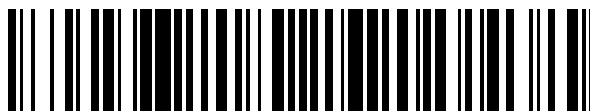


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 002**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C07J 71/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 18163622 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 3360881**

54 Título: **Derivados 11-hidroxil-6-sustituidos de ácidos biliares y conjugados de aminoácido de los mismos como moduladores del receptor X farnesoide**

30 Prioridad:

14.05.2013 US 201361823169 P

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

30.07.2021

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
10 Hudson Yards, 37th FL
New York, NY 10001, US**

72 Inventor/es:

PELLICCIARI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 847 002 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados 11-hidroxi-6-sustituídos de ácidos biliares y conjugados de aminoácido de los mismos como moduladores del receptor X farnesoide

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica la prioridad, y el beneficio, del documento U.S.S.N. 61/823.169, presentado el 14 de mayo de 2013.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

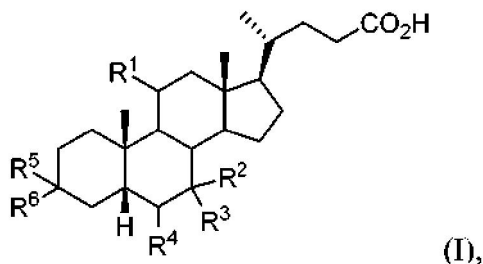
FXR es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando que incluye receptores para hormonas esteroides, retinoides, y tiroideas (D.J. Mangelsdorf, *et al.*, Cell 83:841-850 (1995)). Los análisis *in situ* y de Northern muestran que FXR se expresa con la mayor abundancia en hígado, intestino, riñón y glándulas suprarrenales (BM Forman, *et al.*, Cell 81:687-693 (1995) y W. Seol, *et al.*, Mol. Endocrinol. 9:72-85 (1995)). FXR se une al ADN como heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR). FXR de rata se activa a concentraciones micromolares de farnesoides tales como farnesol y hormona juvenil (B.M. Forman, *et al.*, Cell 81:687-693 (1995)). Sin embargo, estos compuestos no han logrado activar FXR de ratón y humano, poniendo en duda la naturaleza de los ligandos endógenos de FXR. Varios ácidos biliares de origen natural (por ejemplo, ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA), y conjugados de taurina y glicina de los mismos) sirven como ligandos de FXR y se unen a, y activan, FXR a concentraciones fisiológicas (documento WO 00/37077). PELLICCIARI R *et al.*: "Bile Acid Derivatives as Ligands of the Farnesoid X Receptor. Synthesis, Evaluation, and Structure-Activity Relationship of a Series of Body and Side Chain Modified Analogues of Chenodeoxycholic Acid", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 47, 23 de julio de 2004 (23-07-2004), páginas 4559-4569, y los documentos EP 1 568 706 A1 y WO 2004/007521 desvelan agonistas del receptor FXR que son útiles en el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas.

Los ácidos biliares son metabolitos del colesterol que se forman en el hígado y se secretan al duodeno del intestino, donde desempeñan un papel importante en la solubilización y absorción de lípidos y vitaminas de la dieta. La mayoría de los ácidos biliares (~95 %) se reabsorben posteriormente en el íleon y regresan al hígado a través del sistema circulatorio enterohepático. La conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado se produce mediante regulación por retroalimentación: los ácidos biliares regulan negativamente la transcripción del citocromo P450 7a (CYP7a), que codifica la enzima que cataliza la etapa limitante de velocidad en la biosíntesis de ácidos biliares. Se ha sugerido que FXR está implicado en la represión de la expresión de CYP7a por parte de ácidos biliares (D.W. Russell, Cell 97:539-542 (1999)). En el íleon, los ácidos biliares inducen la expresión de la proteína intestinal de unión a ácidos biliares (IBABP), que se une a los ácidos biliares con alta afinidad y puede estar implicada en su tráfico y captación celular. Se ha demostrado que los ácidos biliares median sus efectos en la expresión de IBABP a través de la activación de FXR, que se une a un elemento de respuesta de tipo IR-1 que está conservado en los promotores del gen IBABP humano, de rata, y de ratón. De ese modo, FXR está implicado tanto en la estimulación (IBABP) como en la represión (CYP7a) de genes diana implicados en la homeostasis de ácidos biliares y colesterol. Por consiguiente, existe la necesidad de moduladores de FXR adecuados para el desarrollo de fármacos. La presente invención aborda esta necesidad.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

La invención proporciona un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo, en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se describen en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad

hepática crónica seleccionada entre cirrosis biliar primaria (PBC), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC), colestasis asociada a crecimiento bacteriano excesivo o sepsis, hepatitis autoinmune, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de injerto contra hospedador asociada a trasplante de hígado, regeneración hepática de trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumores malignos intra o extrahepáticos, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis, y déficit de alfa-1-antitripsina.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se desvela un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad y afección, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la enfermedad o afección está mediada por FXR.

Además, se desvela la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección (por ejemplo, una enfermedad o afección mediada por FXR), en donde el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

Además, se desvela una composición para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección (por ejemplo, una enfermedad o afección mediada por FXR), en donde la composición comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En la memoria descriptiva, las formas en singular también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, posteriormente se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad de un compuesto de la invención y un compuesto de comparación en un ensayo de transactivación en células HEK293T.

La Figura 2 es una serie de gráficos que muestran la falta de actividad de TGR5 de un compuesto de la invención en células enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 a nivel fisiológico (A) y en células de ovario de hámster chino humano (CHO) que sobreexpresan TGR5 (B).

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la actividad de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en la regulación de la expresión de OST α (A), OST β (B), BSEP (C), MRP2 (D), CYP7A1 (E), SHP (F), FGF-19 (G), y UGT2B4 (H).

La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran la actividad de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en la regulación de PLTP implicada en el metabolismo de lípidos (A), SREBP-1C (B), APOCII (C), y PPAR γ (D).

La Figura 5 es un gráfico que muestra la regulación de un compuesto de la invención y otros compuestos de comparación en el gen PEPCK.

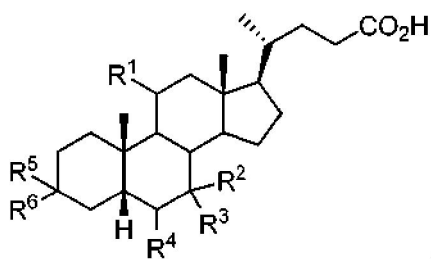
La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de ATP en células HepG2, tratadas con las concentraciones indicadas de un compuesto de la invención durante 4 h.

La Figura 7 es una serie de gráficos que muestran el efecto colerético del Compuesto 100 para administración id e iv (A), la secreción del Compuesto 100 a lo largo del tiempo para administración id y iv (B), y la concentración plasmática del Compuesto 100 a lo largo del tiempo (C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Compuestos de la invención

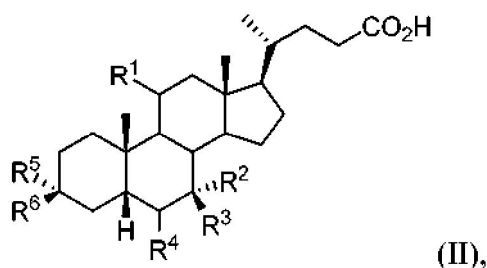
La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo, en donde:

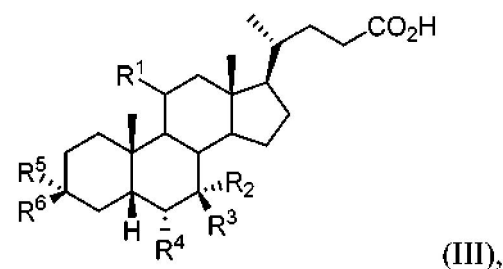
- 5 R¹ es hidroxilo;
 R² es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^a;
 R³ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^b;
 10 R⁴ es alquilo, alqueno, alquino, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^c;
 R^a, R^b, y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;
 R⁵ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno; y
 15 R⁶ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno;
 o R⁵ y R⁶ tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II:



- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

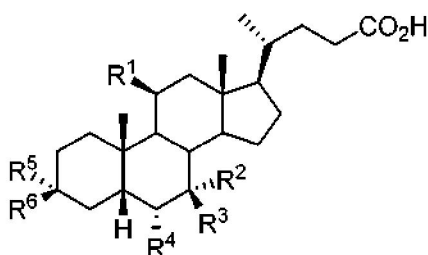
En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula III:



- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula IV:

30



(IV),

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto es el compuesto (por ejemplo, el compuesto nativo, o el compuesto en forma no salina, sin solvatar, y no conjugada).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto es la sal farmacéuticamente aceptable.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto es el conjugado de aminoácido. En un aspecto, el conjugado de aminoácido es un conjugado de glicina. En un aspecto, el conjugado de aminoácido es un conjugado de taurina.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en donde uno de R² o R³ es hidroxilo o halógeno y el otro R² o R³ es hidrógeno o alquilo sin sustituir. En un aspecto, uno de R² o R³ es hidroxilo y el otro R² o R³ es hidrógeno.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en donde uno de R⁵ o R⁶ es hidroxilo y el otro R⁵ o R⁶ es hidrógeno.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R² es hidroxilo o halógeno. En un aspecto, R² es hidroxilo. En otro aspecto, R² es halógeno.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R³ es hidrógeno o alquilo sin sustituir. En un aspecto, R³ es hidrógeno. En otro aspecto, R³ es metilo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R² es hidroxilo y R³ es hidrógeno.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R⁵ es hidroxilo.

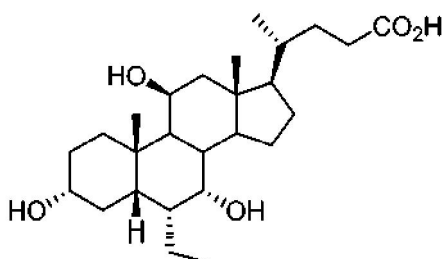
En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R⁶ es hidrógeno.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R² y R⁵ son cada uno hidroxilo y R³ y R⁶ son cada uno hidrógeno.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R⁴ es alquilo. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde R⁴ es alquilo sin sustituir. En un aspecto, R⁴ es metilo, etilo, propilo, o butilo. En un aspecto, R⁴ es metilo o etilo. En un aspecto, R⁴ es metilo. En un aspecto, R⁴ es etilo.

40

En un aspecto, la presente invención se refiere al compuesto



(100),

45

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto es un agonista de FXR. En un aspecto, el compuesto de la invención es un agonista de FXR altamente potente. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR a una concentración inferior a 1 μM , inferior a 0,8 μM , inferior a 0,6 μM , inferior a 0,4 μM , o inferior a 0,2 μM (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo AlphaScreen), en comparación con 15 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR a una concentración inferior a 0,2 μM (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo AlphaScreen). Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR con un valor de CE_{50} inferior a 1 μM , inferior a 0,8 μM , inferior a 0,6 μM , inferior a 0,4 μM , o inferior a 0,2 μM (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo AlphaScreen), en comparación con 8,9 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa FXR con un valor de CE_{50} inferior a 0,2 μM (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo AlphaScreen).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto no es activo frente a otros receptores nucleares. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto no activa TGR5 (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo HTR-FRET de TGR5, donde TGR5 se expresa a nivel fisiológico o se sobreexpresa).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto induce apoptosis.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto no muestra ningún efecto citotóxico en células hepáticas HepG2 humanas (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo de liberación de LDH o un ensayo de ATP intracelular).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto no inhibe una o más isoformas de CYP450 seleccionadas entre CYP1A2, CYP3A4 (sustrato verde), CYP3A4 (sustrato azul), CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, y CYP2E1. Por ejemplo, los compuestos de la invención tienen un valor de CI_{50} mayor de 10 μM según se mide mediante un ensayo de inhibición de CPY450.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, II, III, o IV, en donde el compuesto no inhibe el canal de potasio ERG humano.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para sintetizar un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un kit que contiene uno o más compuestos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, el kit contiene además un ingrediente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un problema técnico que se resuelve mediante la presente divulgación es la identificación de nuevos compuestos que son agonistas del receptor X nuclear hormonal farnesoide (FXR), lo que representa un objetivo atractivo para el tratamiento de enfermedades metabólicas y hepáticas crónicas. Se conoce bien que los ácidos biliares naturales modulan no solo varios receptores hormonales nucleares, sino que también son agonistas del receptor acoplado a proteína G (GPCR) TGR5. La selectividad puede ser un problema para los compuestos farmacológicos dirigidos a modular un receptor hormonal nuclear. Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto que sea un agonista específico de FXR, por ejemplo, un compuesto que no muestre ninguna actividad frente a otros receptores nucleares o un compuesto que no active el GPCR de ácidos biliares TGR5. Otros problemas en el desarrollo de un compuesto farmacológico incluyen un perfil farmacocinético inadecuado, problemas de seguridad tales como toxicidad (por ejemplo, hepática), e interacciones fármaco-fármaco indeseables. Por consiguiente, otros objetivos de la presente invención son proporcionar compuestos que no adolezcan de los problemas técnicos mencionados anteriormente, es decir, un compuesto que tenga un perfil farmacocinético adecuado, un compuesto que no ejerza ningún efecto citotóxico en las células, un compuesto que no inhiba las enzimas del citocromo P450, y/o un compuesto que no inhiba hERG.

La bibliografía de patentes y científica a la que se hace referencia en el presente documento establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia. En caso de inconsistencias, prevalecerá la presente divulgación.

Para los fines de la presente invención, se usarán las siguientes definiciones (salvo que se indique expresamente de otro modo).

Los términos químicos generales usados en el presente documento tienen sus significados habituales. Por ejemplo,

el término alquilo se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o sin ramificar. El término "*n*-alquilo" se refiere a un grupo alquilo sin ramificar. La expresión "alquilo C_x-C_y" se refiere a un grupo alquilo que tiene entre x e y átomos de carbono, inclusive, en el grupo hidrocarburo ramificado o sin ramificar. A modo de ilustración, pero sin limitación, la expresión "alquilo C₁-C₈" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 átomos de carbono. "C₁-C₆" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. "Alquilo C₁-C₄" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono, incluyendo metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, y *terc*-butilo. La expresión "*n*-alquilo C₁-C₄" se refiere a restos de hidrocarburo de cadena lineal que tienen 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono incluyendo metilo, etilo, *n*-propilo, y *n*-butilo. La expresión "cicloalquilo C₃-C₆" se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo. La expresión "cicloalquilo C₃-C₇" incluye también cicloheptilo. La expresión "cicloalquilo C₃-C₈" incluye también ciclooctilo. Cicloalquilalquilo se refiere a restos de cicloalquilo unidos a través de una cadena conectora de alquilo, como por ejemplo, pero sin limitación, ciclopropilmetilo, ciclopropiletilo, ciclopropilpropilo, ciclopropilbutilo, ciclobutilmetilo, ciclobutiletilo, ciclobutilpropilo, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclopentilpropilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, y ciclohexilpropilo. Cada grupo alquilo, cicloalquilo, y cicloalquilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se especifica en el presente documento.

La expresión "cicloalqueno C₄-C₈" se refiere a anillos de ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno, y cicloocteno que tienen uno o más sitios de insaturación, por ejemplo, uno o más dobles enlaces.

El término "halógeno" se refiere a fluro, cloro, bromo, o yodo.

El término "hidroxilo" significa OH.

Se ha de entender que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución sea de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no experimente espontáneamente ninguna transformación tal como por transposición, ciclación, eliminación, etc. Como se usa en el presente documento, se contempla que el término "sustituido" incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos a menos que se indique de otro modo. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y sin ramificar, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos, de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más, e iguales o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de la presente invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de los compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. La presente invención no pretende quedar limitada en modo alguno por los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos.

El término "farmacéutico" o la expresión "farmacéuticamente aceptable", cuando se usan en el presente documento como adjetivo, significan sustancialmente no tóxico y sustancialmente no perjudicial para el receptor.

Además, "formulación farmacéutica" pretende indicar que el vehículo, disolvente, excipiente, y sal debe ser compatible con el ingrediente activo de la formulación (por ejemplo, un compuesto de la invención). El experto habitual en esta materia entenderá que las expresiones "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" son generalmente intercambiables, y se usan de ese modo para los fines de la presente solicitud.

El experto en la materia determinará fácilmente las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención e incluirán, por ejemplo, sales básicas tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, y cinc o sales orgánicas preparadas a partir de N,N'-dibenciletilendiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), y procaína. También se pueden usar sales con aminos farmacéuticamente aceptables tales como lisina, arginina, trometamina, trietilamina y similares. Tales sales de los compuestos de la invención pueden prepararse usando técnicas convencionales, a partir del compuesto de la invención, haciendo reaccionar, por ejemplo, la base apropiada con el compuesto de la invención.

Cuando se usan en medicina, las sales de un compuesto de la invención deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse convenientemente sales farmacéuticamente inaceptables para preparar la base libre correspondiente o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

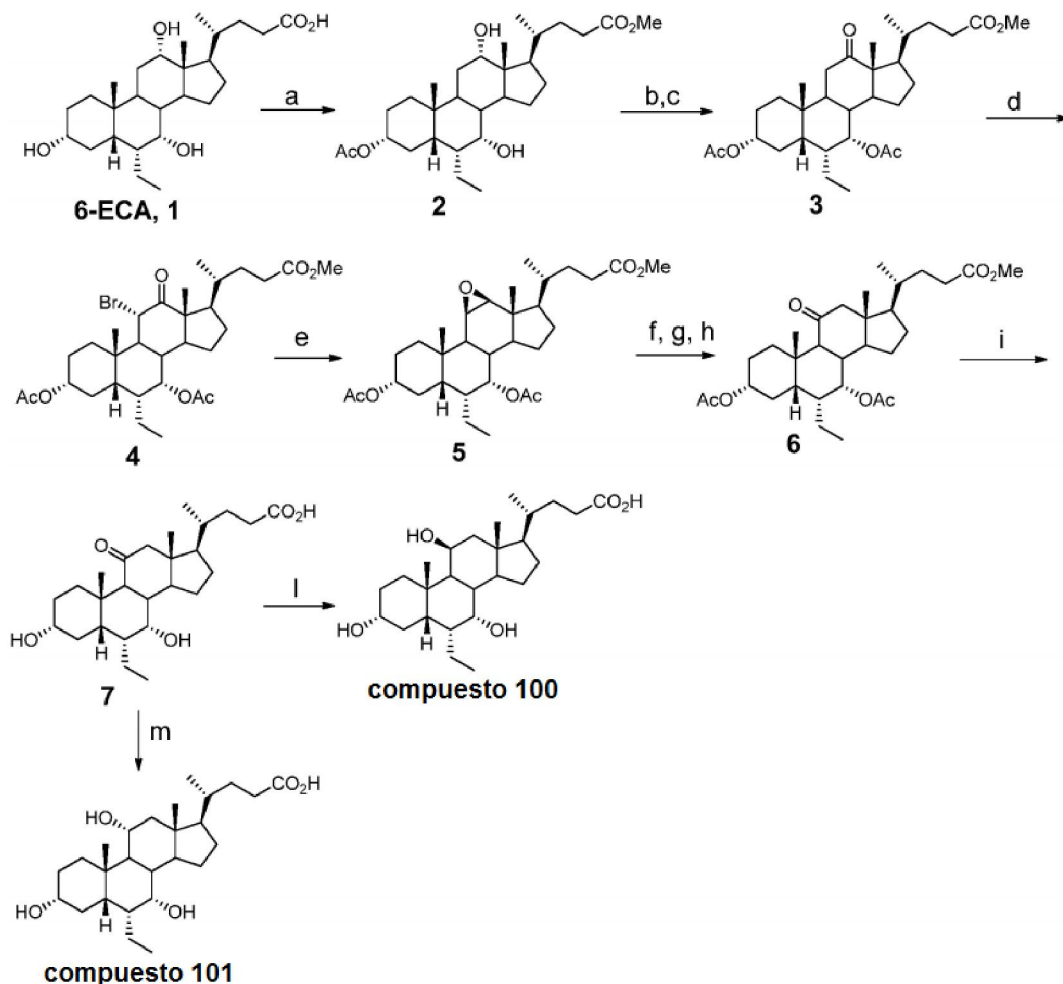
Como se usa en el presente documento, la expresión "conjugado de aminoácido" se refiere a un conjugado de un compuesto de la invención con cualquier aminoácido adecuado. En un aspecto, dicho conjugado de aminoácido adecuado de un compuesto de la invención tendrá la ventaja adicional de mejorar la integridad en la bilis o los fluidos intestinales. La presente invención incluye conjugados de glicina y taurina de cualquier compuesto de la invención. Por ejemplo, los conjugados de glicina y taurina de un compuesto de fórmula I tienen la siguiente fórmula:

la presente invención.

Todas las abreviaturas usadas en la presente solicitud se encuentran en "Protective Groups in Organic Synthesis" de John Wiley & Sons, Inc, o MERCK INDEX de MERCK & Co., Inc, u otros libros de química o catálogos químicos de

5

Esquema 1



- 10 Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, *p*-TSA, ultrasonidos, 3 h, cuantitativo; 2) Ac₂O, NaHCO₃, THF, reflujo 12 h, 85 %; b) PCC, CH₂Cl₂, 6 h, 62 %; c) Ac₂O, Bi(OTf)₃, CH₂Cl₂, 1 h, 91 %; d) Br₂, Benceno, 30 °C durante una noche, 74 %; e) NaBH₄, NaOAc, Pyr, t.a. 2 días, 80 %; f) HI 57 %, AcOH, t.a. 30 min; g) CrO₃, AcOH, t.a. 45 min; h) Zn en polvo, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2 M, MeOH, t.a. durante una noche, 65 % a partir del compuesto 5; l) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70 %; m) Na(s), *sec*-BuOH, 50 °C, 70 %.

15

La síntesis se basa en el uso del ácido 6 α -etil-cólico (6-ECA, 1) como material de partida, que se preparó usando métodos conocidos en la técnica. 6-ECA (1) se trató con *p*-TSA en MeOH con irradiación ultrasónica para dar el correspondiente éster de metilo, que se protegió selectivamente en la posición C3 por reflujo con Ac₂O en presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. El tratamiento del compuesto 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente seguido de tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el compuesto intermedio 3 α ,7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; aproximadamente 48 % a partir del compuesto 2).

20

- 25 El tratamiento de compuesto 3 con Br₂ en benceno durante, por ejemplo, 12 h proporcionó el compuesto 4. La reacción del compuesto 4 con NaBH₄ y NaOAc en piridina recién destilada dio el correspondiente 11 β -12 β epóxido (compuesto 5), con aproximadamente un 59 % de rendimiento después de purificación sobre gel de sílice. La reacción del compuesto 5 con HI en AcOH a temperatura ambiente proporcionó la halohidrina intermedia que a continuación se oxidó en la posición C11 con CrO₃ en AcOH para generar el compuesto 6. La reacción del compuesto 6 con Zn en polvo en AcOH en ebullición e hidrólisis alcalina (NaOH/MeOH) proporcionó ácido

3 α ,7 α -hidroxi-12-ceto-5 β -colan-24-oico (compuesto 7; aproximadamente 65 % de rendimiento partir del compuesto 5).

5 El compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el carbonilo C11 usando NaBH₄ en una mezcla de THF/H₂O = (4:1, v/v) para dar ácido 3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (Compuesto 100; aproximadamente 27 % a partir del compuesto 3), después de purificación cromatográfica para proporcionar el Compuesto 100. Alternativamente, el compuesto 7 se redujo con sodio en *sec*-BuOH a 50 °C para dar el Compuesto 101 (aproximadamente 70 % de rendimiento), después de purificación.

10 "Solvato" significa una forma de adición de disolvente que contiene cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen tendencia a atrapar una proporción molar fija de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando de ese modo un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato; cuando el disolvente es un alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman por combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en donde el agua retiene su estado molecular como H₂O, pudiendo formar dicha combinación uno o más hidratos.

La expresión "disolvente adecuado" se refiere a cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, inerte para la reacción en curso que solubiliza lo suficiente los reactivos para proporcionar un medio en el que efectuar la reacción deseada.

20 Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Se conoce bien en la técnica la preparación de formas ópticamente activas, tal como por resolución de formas racémicas o síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. También pueden estar presentes numerosos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N y similares en los compuestos descritos en el presente documento, y se contempla la totalidad de tales isómeros estables en la presente invención. Se describen isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isómeras separadas. Se pretenden todas las formas isómeras quirales, diastereoméricas, racémicas y geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente una forma estereoquímica o isómera específica. Se considera que todos los procesos usados para preparar los compuestos de la presente invención y los compuestos intermedios elaborados en los mismos forman parte de la presente divulgación. También se considera que todos los tautómeros de los compuestos mostrados o descritos son parte de la presente invención. Además, la divulgación también incluye los metabolitos de los compuestos descritos en el presente documento.

35 La invención también comprende compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los enumerados en las fórmulas de la invención, pero en los que uno o más átomos se han reemplazado por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o el número másico que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza. Algunos ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, flúor, tales como ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ²H, y ¹⁸F.

40 Los compuestos de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables, solvatos o conjugados de aminoácido de los mismos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del ámbito de la presente invención. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H y ¹⁴C, son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y de carbono-14, es decir, ¹⁴C, son particularmente preferentes por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos de ¹¹C y ¹⁸F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones). PET es útil en la formación de imágenes cerebrales. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo aumento de semivida *in vivo* o reducción de requisitos de dosificación, e incluso pueden ser preferentes en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención pueden prepararse generalmente mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como llevando a cabo los procedimientos desvelados en los Esquemas y/o en los Ejemplos posteriores, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. En una realización, los compuestos de la invención, sales, hidratos, solvatos, o conjugados de aminoácido de los mismos, no están marcados isotópicamente.

60 Cuando cualquier variable (por ejemplo, R^x) aparece más de una vez en cualquier constituyente o fórmula de un compuesto, su definición en cada caso es independiente de su definición en cualquier otro caso. De ese modo, por ejemplo, si se muestra que un grupo está sustituido con uno o más restos R^x, entonces R^x se selecciona en cada caso independientemente entre la definición de R^x. Además, son permisibles combinaciones de sustituyentes y/o variables, pero solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables con una valencia normal del átomo indicado.

65 Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratando", o "tratamiento" indican la disminución de síntomas, marcadores, y/o cualquier efecto negativo de una afección en cualquier grado apreciable en un sujeto que en ese momento padece la afección. En algunas realizaciones, se puede administrar un tratamiento a un sujeto que

exhibe solo síntomas tempranos de la afección con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

5 Como se usa en el presente documento, el término "prevenir", "prevención", o "previniendo" se refiere a cualquier método para prevenir o retrasar parcial o completamente la aparición de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno, y o afección. Se puede administrar prevención a un sujeto que no exhibe síntomas de una enfermedad o afección.

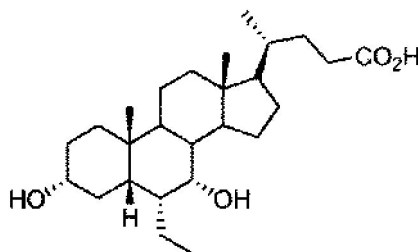
10 Como se usa en el presente documento, "sujeto" significa un ser humano o animal (en el caso de un animal, más habitualmente un mamífero). En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Puede considerarse que tal sujeto tiene la necesidad de tratamiento con un agonista de FXR.

15 Como se usa en el presente documento, "insaturado" se refiere a compuestos o estructuras que tienen al menos un grado de insaturación (por ejemplo, al menos un doble o triple enlace).

Como se usa en el presente documento, la expresión "un compuesto de la invención" incluye un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, II, III, IV, o cualquier compuesto desvelado explícitamente en el presente documento y que entre dentro de la presente fórmula (I).

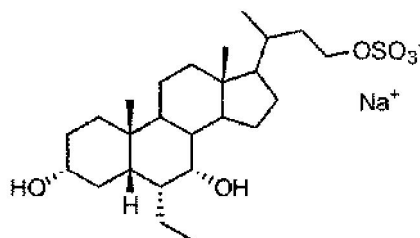
20 Como se usa en el presente documento, receptor X farnesoide o FXR se refiere a todas las formas mamíferas de tal receptor incluyendo, por ejemplo, isoformas alternativas de corte y empalme e isoformas de origen natural (véase, por ejemplo, Huber *et al.*, Gene 290:35-43 (2002)). Las especies representativas de FXR incluyen, sin limitación, FXR de rata (N.º de acceso a GenBank NM_021745), FXR de ratón (N.º de acceso a GenBank NM_009108), y FXR humano (N.º de acceso a GenBank NM_005123).

25 Como se usa en el presente documento, el Compuesto A es



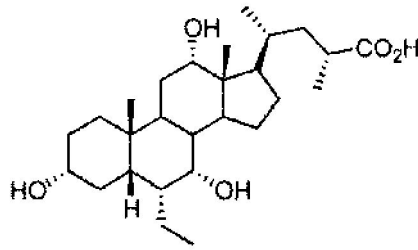
30 que también se conoce como ácido obeticólico, INT-747, 6ECDCA, ácido 6-alfa-etil quenodesoxicólico, o ácido 6α-etil-3α,7α-dihidroxi-5β-colan-24-oico.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto B es



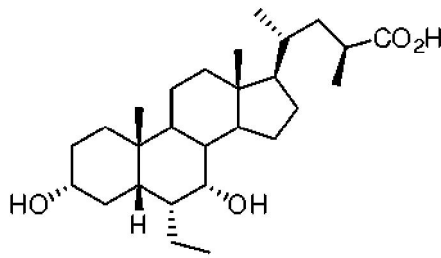
35 que también se conoce como INT-767 o sal sódica de 6α-etil-3α,7α,23-trihidroxi-24-nor-5β-colan-23-sulfato.

40 Como se usa en el presente documento, el Compuesto C es



que también se conoce como INT-777 o ácido 6 α -etil-23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico.

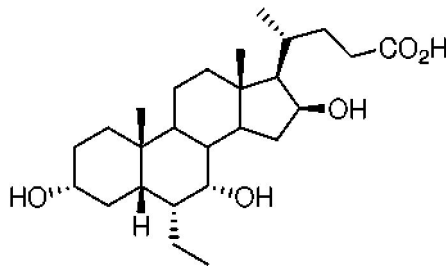
5 Como se usa en el presente documento, el Compuesto D es



que también se conoce como ácido 6 α -etil-23(R)-metil quenodesoxicólico, y S-EMCDCA.

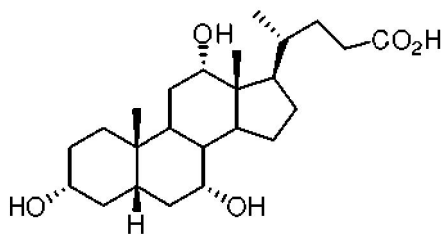
10

Como se usa en el presente documento, el Compuesto E es



15

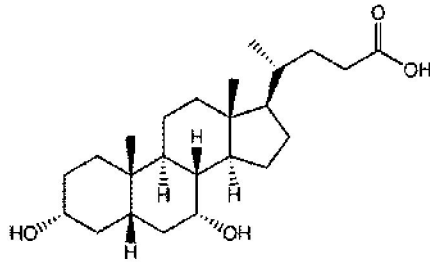
Como se usa en el presente documento, ácido cólico es



20

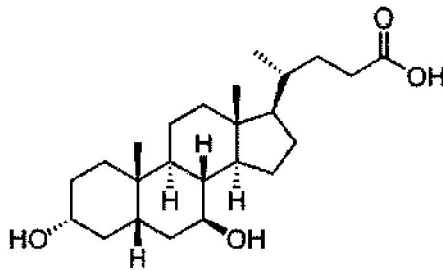
que también se conoce como CA.

Como se usa en el presente documento, ácido quenodesoxicólico es



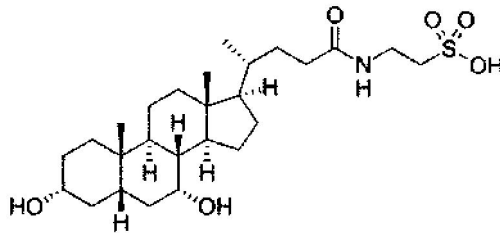
que también se conoce como CDCA.

5 Como se usa en el presente documento, ácido ursodesoxicólico es



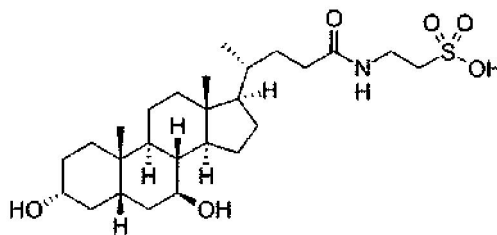
que también se conoce como UDCA.

10 Como se usa en el presente documento, ácido tauroquenodesoxicólico es



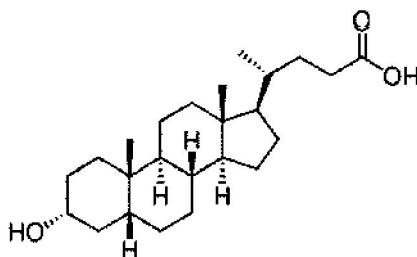
15 que también se conoce como TCDCA.

Como se usa en el presente documento, ácido tauroursodesoxicólico es



20 que también se conoce como TUDCA.

Como se usa en el presente documento, ácido litocólico es



que también se conoce como LCA.

5 La invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad hepática crónica como se define en la reivindicación 1. Los compuestos de la invención también son
 útiles en terapia en sujetos tales como mamíferos, incluyendo seres humanos. En particular, los compuestos de la
 invención son útiles en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto que comprende
 10 administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal
 farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la enfermedad o
 afección está mediada por FXR (por ejemplo, FXR desempeña un papel en el inicio o progreso de la enfermedad o
 afección). En un aspecto, la enfermedad o afección está mediada por una disminución de actividad de FXR. En un
 aspecto, la enfermedad o afección se selecciona entre enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática crónica,
 15 trastorno lipídico, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad metabólica, cáncer, y enfermedad
 neurológica.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular en un
 sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o
 una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación
 20 se refiere a un método para tratar una enfermedad cardiovascular. En un aspecto, la divulgación se refiere a un
 método para prevenir una enfermedad cardiovascular. En un aspecto, la enfermedad cardiovascular se selecciona
 entre aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, e
 hipertrigliceridemia.

25 El término "hiperlipidemia" se refiere a la presencia de un nivel anormalmente elevado de lípidos en la sangre. La
 hiperlipidemia puede presentarse en al menos tres formas: (1) hipercolesterolemia, es decir, un nivel elevado de
 colesterol; (2) hipertrigliceridemia, es decir, un nivel elevado de triglicéridos; y (3) hiperlipidemia combinada, es decir,
 una combinación de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

30 El término "dislipidemia" se refiere a niveles anormales de lipoproteínas en plasma sanguíneo, incluyendo niveles
 reducidos y/o elevados de lipoproteínas (por ejemplo, niveles elevados de LDL, VLDL y niveles reducidos de HDL).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método seleccionado entre reducir los niveles de colesterol o modular el
 35 metabolismo y catabolismo del colesterol, la absorción de colesterol de la dieta, y el transporte inverso de colesterol
 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la
 invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad que afecta a los niveles
 40 de colesterol, triglicéridos, o ácidos biliares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una
 cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de
 aminoácido del mismo.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para disminuir triglicéridos en un sujeto, que comprende
 45 administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal
 farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una patología asociada a un nivel de
 colesterol elevado en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un
 compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

50 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una patología asociada a un nivel de colesterol
 elevado en un sujeto. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una patología asociada con
 un nivel de colesterol elevado en un sujeto. En un aspecto, la patología se selecciona entre enfermedad arterial
 coronaria, angina de pecho, enfermedad de la arteria carótida, apoplejías, arteriosclerosis cerebral, y xantoma.

55 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno lipídico en un sujeto, que
 comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal
 farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se

refiere a un método para tratar un trastorno lipídico. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir un trastorno lipídico.

Los trastornos lipídicos son la expresión para anomalías de colesterol y triglicéridos. Las anomalías lipídicas están asociadas a un mayor riesgo de enfermedad vascular, y especialmente infartos y apoplejías. Las anomalías en trastornos lipídicos son una combinación de predisposición genética así como de la naturaleza de la ingesta dietética. Numerosos trastornos lipídicos están asociados al sobrepeso. Los trastornos lipídicos también pueden estar asociados a otras enfermedades tales como diabetes, síndrome metabólico (a veces denominado síndrome de resistencia a la insulina), tiroides hipoactiva o ser el resultado de ciertos medicamentos (tales como los usados para regímenes antirrechazo en personas que se han sometido a trasplantes).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad que afecta al metabolismo lipídico (es decir, lipodistrofia) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar uno o más síntomas de una enfermedad que afecta al metabolismo lipídico. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir uno o más síntomas de una enfermedad que afecta al metabolismo lipídico.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para disminuir la acumulación lipídica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad hepática crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad hepática crónica. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad hepática crónica. En un aspecto, la enfermedad hepática crónica se selecciona entre cirrosis biliar primaria (PBC), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC), colestasis asociada a crecimiento bacteriano excesivo o sepsis, hepatitis autoinmune, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de injerto contra hospedador asociada a trasplante de hígado, regeneración hepática de trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumores malignos intra o extrahepáticos, síndrome de Sjogren, Sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis, y déficit de alfa-1-antitripsina.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir uno o más síntomas de colestasis, incluyendo complicaciones de colestasis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar uno o más síntomas de colestasis. En un aspecto, la divulgación se refiere a la prevención de uno o más síntomas de colestasis.

La colestasis está causada generalmente por factores internos al hígado (intrahepáticos) o externos al hígado (extrahepáticos) y conduce a la acumulación de sales biliares, bilirrubina, pigmento biliar, y lípidos en el torrente sanguíneo en lugar de eliminarse normalmente. La colestasis intrahepática se caracteriza por un bloqueo generalizado de los conductos menores o por trastornos, tales como hepatitis, que perjudican la capacidad del cuerpo para eliminar la bilis. La colestasis intrahepática también puede estar causada por enfermedad hepática alcohólica, cirrosis biliar primaria, cáncer que se ha extendido (metastatizado) desde otra parte del cuerpo, colangitis esclerosante primaria, cálculos biliares, cólico biliar, y colecistitis aguda. También puede producirse como complicación de cirugía, lesión grave, fibrosis quística, infección, o alimentación intravenosa, o inducirse por fármacos. La colestasis también puede producirse como una complicación del embarazo y a menudo se desarrolla durante el segundo y tercer trimestres.

La colestasis extrahepática está causada en la mayoría de los casos por coledocolitiasis (cálculos del conducto biliar), estenosis biliares benignas (estrechamiento no canceroso del conducto común), colangiocarcinoma (carcinoma ductal) y carcinoma pancreático. La colestasis extrahepática puede producirse como efecto secundario de numerosos medicamentos.

Un compuesto de la invención puede usarse para tratar o prevenir uno o más síntomas de colestasis intrahepática o extrahepática, incluyendo, sin limitación, artesis biliar, colestasis obstétrica, colestasis neonatal, colestasis inducida por fármacos, colestasis producida por infección por hepatitis C, enfermedad hepática colestásica crónica tal como cirrosis biliar primaria (CBP), y colangitis esclerosante primaria (PSC).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para potenciar la regeneración hepática en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, el método es

potenciar la regeneración hepática para trasplante de hígado.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir fibrosis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar fibrosis. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir fibrosis.

Por consiguiente, como se usa en el presente documento, el término fibrosis se refiere a todos los trastornos fibróticos reconocidos, incluyendo fibrosis debida a patologías o enfermedades, fibrosis debida a traumatismos físicos ("fibrosis traumática"), fibrosis debida a daños por radiación y fibrosis debida a exposición a compuestos quimioterapéuticos. Como se usa en el presente documento, la expresión "fibrosis orgánica" incluye, pero sin limitación, fibrosis hepática, fibrosis de los riñones, fibrosis de pulmón, y fibrosis del intestino. "Fibrosis traumática" incluye, pero sin limitación, fibrosis secundaria a cirugía (cicatrización quirúrgica), traumatismo físico accidental, quemaduras y cicatrización hipertrófica.

Como se usa en el presente documento, "fibrosis hepática" incluye fibrosis hepática debida a cualquier causa, incluyendo, pero sin limitación, fibrosis hepática inducida por virus tal como la debida a los virus de la hepatitis B o C; exposición a alcohol (enfermedad hepática alcohólica), ciertos compuestos farmacéuticos incluyendo, pero sin limitación, metotrexato, ciertos agentes quimioterapéuticos, e ingestión crónica de compuestos de arsénico o vitamina A en dosis masivas, estrés oxidativo, radioterapia contra el cáncer o ciertos compuestos químicos industriales incluyendo, pero 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 autoinmune, y esteatohepatitis. La terapia actual en fibrosis hepática se dirige principalmente a retirar el agente causal, 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). También se conocen fármacos antiinflamatorios tales como corticosteroides y colchicina para uso en tratamiento de inflamación que pueden conducir a fibrosis hepática.

Como se conoce en la técnica, la fibrosis hepática puede clasificarse clínicamente en cinco estadios de gravedad (S0, S1, S2, S3, y S4), basándose generalmente en examen histológico de una muestra de biopsia. S0 indica que no hay fibrosis, mientras que S4 indica cirrosis. Aunque existen diversos criterios para estadificar la gravedad de la fibrosis hepática, en general, las primeras etapas de la fibrosis se identifican por áreas discretas y localizadas de cicatrización en un portal (zona) del hígado, mientras que las etapas posteriores de fibrosis se identifican por puentes de fibrosis (cicatrización que cruza zonas del hígado).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir fibrosis orgánica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la fibrosis es fibrosis hepática.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad gastrointestinal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad gastrointestinal. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad gastrointestinal. En un aspecto, la enfermedad gastrointestinal se selecciona entre enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), crecimiento bacteriano excesivo, malabsorción, colitis posterior a radiación, y colitis microscópica. En un aspecto, la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad renal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad renal. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad renal se selecciona entre nefropatía diabética, glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica, y enfermedad renal poliquística.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad metabólica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad renal. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad metabólica se selecciona entre resistencia a la insulina, hiperglicemia, diabetes mellitus, diabetes, y obesidad. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes de tipo I. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes de tipo II.

La diabetes mellitus, denominada habitualmente diabetes, se refiere a una enfermedad o afección que se caracteriza generalmente por defectos metabólicos en la producción y utilización de la glucosa que dan como resultado la imposibilidad de mantener niveles adecuados de azúcar en sangre en el cuerpo.

5 En el caso de la diabetes de tipo II, la enfermedad se caracteriza por resistencia a la insulina, en donde la insulina pierde la capacidad de ejercer sus efectos biológicos en un amplio intervalo de concentraciones. Esta resistencia a la capacidad de respuesta de la insulina da como resultado activación insuficiente de insulina para captación, oxidación y almacenamiento muscular de glucosa y represión inadecuada de insulina en la lipólisis en el tejido adiposo y la producción y secreción de glucosa en el hígado. La afección resultante es aumento de glucosa en sangre, que se denomina "hiperglucemia". La hiperglucemia incontrolada está asociada a mortalidad incrementada y prematura debido a un mayor riesgo de enfermedades microvasculares y macrovasculares, incluyendo retinopatía (deterioro o pérdida de la visión debido al daño de los vasos sanguíneos en los ojos); neuropatía (daño de los nervios y problemas en los pies debido al daño de los vasos sanguíneos en el sistema nervioso); y nefropatía (enfermedad renal debido al daño de los vasos sanguíneos en los riñones), hipertensión, enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria. Por lo tanto, el control de la homeostasis de la glucosa es un enfoque de importancia crítica para el tratamiento de la diabetes.

20 Se ha planteado la hipótesis de que la resistencia a la insulina unifica la agrupación de hipertensión, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de los niveles de triglicéridos y disminución del colesterol HDL, y obesidad central y general. La asociación de la resistencia a la insulina con la intolerancia a la glucosa, aumento de triglicéridos plasmáticos y disminución de las concentraciones de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, hipertensión, hiperuricemia, partículas de lipoproteínas de baja densidad más pequeñas y densas, y niveles en circulación más elevados del inhibidor-1 del activador de plasminógeno, se ha denominado "Síndrome X". Por consiguiente, se desvelan métodos para tratar o prevenir cualquier trastorno relacionado con resistencia a la insulina, incluyendo la agrupación de patologías, afecciones o trastornos que componen el "Síndrome X". En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir síndrome metabólico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar síndrome metabólico. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir síndrome metabólico.

35 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar cáncer. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir cáncer. En un aspecto, el cáncer es cáncer colorrectal.

40 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir cálculos biliares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar cálculos biliares. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir cálculos biliares.

45 Un cálculo biliar es una concreción cristalina formada dentro de la vesícula biliar por acreción de componentes biliares. Estos cálculos se forman en la vesícula biliar pero pueden pasar distalmente a otras partes del tracto biliar, tal como el conducto cístico, conducto biliar común, conducto pancreático o ampolla de Vater. En raras ocasiones, en casos de inflamación grave, los cálculos biliares pueden provocar una erosión a través de la vesícula biliar y el intestino adherente causando potencialmente una obstrucción denominada íleo biliar. La presencia de cálculos biliares en la vesícula biliar puede conducir a colecistitis aguda, una afección inflamatoria caracterizada por retención de bilis en la vesícula biliar y a menudo infección secundaria por microorganismos intestinales, principalmente especies de *Escherichia coli* y *Bacteroides*. La presencia de cálculos biliares en otras partes del tracto biliar puede causar obstrucción de los conductos biliares, que puede conducir a afecciones graves tales como colangitis ascendente o pancreatitis.

55 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad de cálculos biliares de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad de cálculos biliares de colesterol. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad de cálculos biliares de colesterol.

60 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad neurológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad neurológica. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad neurológica. En un aspecto, la enfermedad neurológica es apoplejía.

65

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método como se describe en el presente documento y además en donde el compuesto se administra por una vía seleccionada entre oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalatoria, ocular, vaginal, rectal, e intracerebroventricular. En un aspecto, la vía es oral.

5 En un aspecto, el compuesto utilizado en uno o más de los métodos descritos en el presente documento es un agonista de FXR. En un aspecto, el compuesto es un agonista selectivo de FXR. En un aspecto, el compuesto no activa TGR5. En un aspecto, el compuesto no activa otros receptores nucleares implicados en rutas metabólicas (por ejemplo, según se mide mediante un ensayo AlphaScreen). En un aspecto, tales otros receptores nucleares implicados en rutas metabólicas se seleccionan entre LXR β , PXR, CAR, PPAR α , PPAR δ , RAR α , VDR, TR, PR, RXR, GR, y ER. En un aspecto, el compuesto induce apoptosis.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para regular el nivel de expresión de uno o más genes implicados en la homeostasis de ácidos biliares.

15 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para regular negativamente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre CYP7 α 1 y SREBP-1C en una célula por administración a la célula de un compuesto de la invención. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para regular positivamente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre OST α , OST β , BSEP, SHP, UGT2B4, MRP2, FGF-19, PPAR γ , PLTP, APOCII, y PEPCCK en una célula por administración a la célula de un compuesto de la invención.

20 La divulgación también se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o afección (por ejemplo, una enfermedad o afección mediada por FXR), en donde el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en el presente documento, en donde el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

25 La divulgación también se refiere a una composición para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección (por ejemplo, una enfermedad o afección mediada por FXR), en donde la composición comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo. En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición para uso en un método para tratar o prevenir una cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en el presente documento, en donde la composición comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

Formulaciones

30 Los métodos de la divulgación comprenden la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que es suficiente para conseguir el efecto indicado. Por consiguiente, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención usada en un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por FXR será una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad o afección mediada por FXR.

35 De forma análoga, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad hepática colestática o el aumento de flujo biliar será una cantidad suficiente para aumentar el flujo biliar al intestino.

40 La cantidad del compuesto de la invención que se requiere para conseguir el efecto biológico deseado dependerá de una diversidad de factores tales como el uso para el que se destina, los medios de administración, y el receptor y, en última instancia, quedará a discreción del médico o veterinario al cargo. En general, una dosis diaria habitual para el tratamiento de una enfermedad y afección mediada por FXR, por ejemplo, puede esperarse que se encuentre en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Esta dosis puede administrarse como una dosis unitaria individual o como varias dosis unitarias distintas o como una infusión continua. Serían aplicables dosificaciones similares para el tratamiento de otras enfermedades, afecciones y terapias, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades hepáticas colestáticas.

45 De ese modo, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, un compuesto de la invención junto, y/o en mezcla, con al menos un vehículo o diluyente farmacéutico. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse en la prevención o el tratamiento de las enfermedades o afecciones indicadas anteriormente.

50 El vehículo puede ser farmacéuticamente aceptable y debe ser compatible con, es decir, no tener ningún efecto perjudicial sobre, los demás ingredientes de la composición. El vehículo puede ser un sólido o líquido y se formula preferentemente como formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido que puede contener de un 0,05 a

un 95 % en peso del ingrediente activo. Si se desea, también pueden incorporarse otros ingredientes fisiológicamente activos a las composiciones farmacéuticas de la invención.

5 Las formulaciones posibles incluyen las adecuadas para administración oral, sublingual, bucal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, o intravenosa), rectal, tópica incluyendo transdérmica, intranasal e inhalación. El medio más adecuado de administración para un paciente particular dependerá de la naturaleza de la gravedad de la enfermedad o afección que se trate o la naturaleza de la terapia que se use y de la naturaleza del compuesto activo pero, cuando sea posible, es preferente la administración oral para la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por FXR. Pueden proporcionarse formulaciones adecuadas para administración oral en forma
10 de unidades discretas, tales como comprimidos, cápsulas, obleas, grageas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de polvos o gránulos; en forma de soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; o en forma de emulsiones de aceite en agua o agua en aceite.

15 Las formulaciones adecuadas para administración sublingual o bucal incluyen grageas que comprenden el compuesto activo y, por lo general, una base aromatizada, tal como azúcar y goma arábiga o tragacanto y pastillas que comprenden el compuesto activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa goma arábiga.

20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden por lo general soluciones acuosas estériles que contienen una concentración predeterminada del compuesto activo; la solución es preferentemente isotónica con la sangre del receptor pretendido.

25 Algunas formulaciones adicionales adecuadas para administración parenteral incluyen formulaciones que contienen codisolventes y/o agentes de formación de complejos fisiológicamente adecuados tales como tensioactivos y ciclodextrinas. Las emulsiones de aceite en agua también son formulaciones adecuadas para formulaciones parenterales. Aunque tales soluciones se administran preferentemente por vía intravenosa, también puede administrarse mediante inyección subcutánea o intramuscular.

30 Las formulaciones adecuadas para administración rectal se proporcionan preferentemente en forma de supositorios de dosis unitaria que comprenden el ingrediente activo en uno o más vehículos sólidos que forman la base de supositorio, por ejemplo, manteca de cacao.

35 Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica o intranasal incluyen pomadas, cremas, lociones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles y aceites. Algunos vehículos adecuados para tales formulaciones incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, y combinaciones de los mismos.

40 Las formulaciones de la invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, por lo general mediante mezcla uniforme e íntima del compuesto activo con vehículos líquidos o sólidos finamente divididos, o ambos, en las proporciones requeridas y, a continuación, si fuera necesario, conformación de la mezcla resultante en la forma deseada.

45 Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión de una mezcla íntima que comprende un polvo o gránulos del ingrediente activo y uno o más ingredientes opcionales, tales como un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, o agente de dispersión tensioactivo, o por moldeado de una mezcla íntima de ingrediente activo en polvo y diluyente líquido inerte.

50 Las formulaciones adecuadas para administración por inhalación incluyen polvos o vapores de partícula fina que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles presurizados de dosis medida, nebulizadores, o insufladores.

55 Para administración pulmonar a través de la boca, el tamaño de partícula de los polvos o gotas está por lo general el intervalo de 0,5-10 μm , preferentemente 1-5 μm , para asegurar el suministro al árbol bronquial. Para administración nasal, es preferente un tamaño de partícula en el intervalo de 10-500 μm para asegurar la retención en la cavidad nasal.

60 Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizado, que contienen por lo general una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante su uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido, por lo general de 10 a 150 μl , para producir una pulverización de partícula fina que contiene el ingrediente activo. Los propelentes adecuados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener además uno o más codisolventes, por ejemplo, etanol, tensioactivos, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitán, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.

65 Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman soluciones o suspensiones del ingrediente activo en un vapor de aerosol terapéutico por medio de la aceleración de un gas comprimido, por lo general aire u oxígeno, a través de un orificio de Venturi estrecho, o por medio de agitación ultrasónica. Las

5 formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores consisten en el ingrediente activo en un vehículo líquido y comprenden hasta un 40 % p/p de la formulación, preferentemente menos de un 20 % p/p. Por lo general, el vehículo es agua o una solución alcohólica acuosa diluida, preferentemente hecha isotónica con los fluidos corporales por adición, por ejemplo, de cloruro sódico. Algunos aditivos opcionales incluyen conservantes, si la formulación no se prepara estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes de tamponamiento y tensioactivos.

10 Las formulaciones adecuadas para formulación por insuflación incluyen polvos finamente triturados que se pueden suministrar por medio de un insuflador o aspirarse por la cavidad nasal al igual que el rapé. En el insuflador, el polvo está contenido en cápsulas o cartuchos, por lo general hechas de gelatina o plástico, que pueden estar perforadas o abrirse *in situ*, y el polvo se suministra mediante el aire extraído del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba operada manualmente. El polvo empleado en el insuflador puede consistir solamente en el ingrediente activo o en una mezcla en polvo que comprende el ingrediente activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El ingrediente activo comprende por lo general de 0,1 a 100 p/p de la formulación.

15 Además de los ingredientes mencionados de forma específica anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes conocidos por los expertos en la técnica farmacéutica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes y las formulaciones adecuadas para administración intranasal pueden incluir perfumes.

20 Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no se deberían interpretar en modo alguno como limitantes del ámbito de la invención.

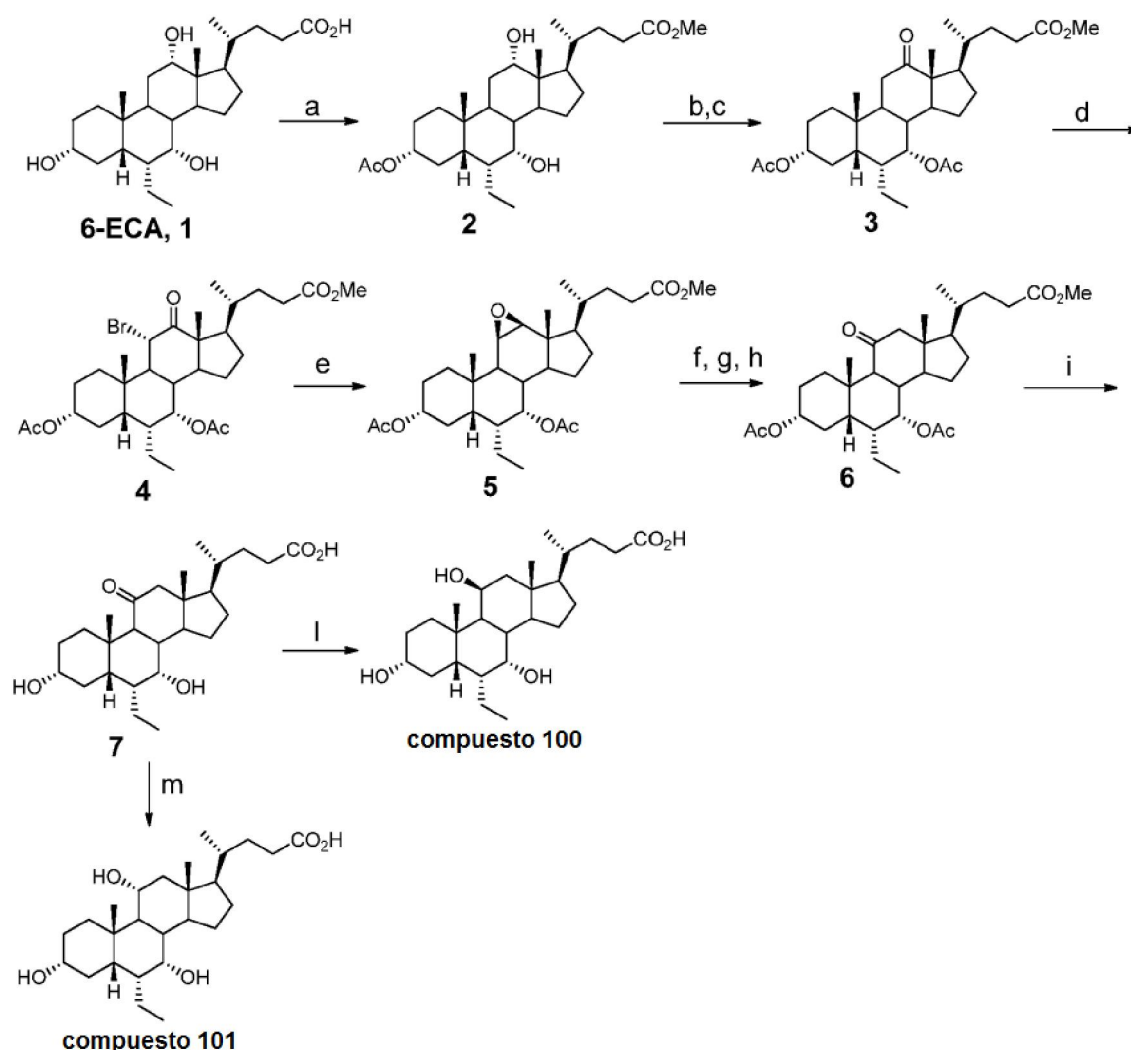
25 EJEMPLOS

25 En general, el potencial de un compuesto de la invención como fármaco candidato puede someterse a ensayo usando diversos ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la validación *in vitro* de FXR: su actividad y selectividad pueden evaluarse usando AlphaScreen (ensayo bioquímico); la expresión génica puede evaluarse usando RT-PCR (gen diana de FXR); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) puede evaluarse usando el contenido de ATP, liberación de LDH, y activación de Caspasa-3. Para la validación *in vitro* de TGR5: su actividad y selectividad pueden evaluarse usando HTR-FRET (ensayo basado en células); la expresión génica puede evaluarse usando RT-PCR (gen diana de TGR5 (es decir, cFOS)); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) puede evaluarse usando el contenido de ATP, liberación de LDH, y activación de Caspasa-3. Las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo, y excreción)/farmacocinéticas y la validación *in vivo* de los compuestos de la invención también pueden estudiarse usando métodos conocidos en la técnica.

35 Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos 100 y 101

40 Los Compuestos 100 y 101 se sintetizaron de acuerdo con el siguiente esquema.

Esquema 1



5 Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, *p*-TSA, ultrasonidos, 3 h, cuantitativo; 2) Ac₂O, NaHCO₃, THF, reflujo 12 h, 85 %; b) PCC, CH₂Cl₂, 6 h, 62 %; c) Ac₂O, Bi(OTf)₃, CH₂Cl₂, 1 h, 91 %; d) Br₂, Benceno, 30 °C durante una noche, 74 %; e) NaBH₄, NaOAc, Pyr, t.a. 2 días, 80 %; f) HI 57 %, AcOH, t.a. 30 min; g) CrO₃, AcOH, t.a. 45 min; h) Zn en polvo, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2 M, MeOH, t.a. durante una noche, 65 % a partir del compuesto 5; l) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70 %; m) Na(s), *sec*-BuOH, 50 °C, 70 %.

10 La síntesis se basa en el uso del ácido 6 α -etil-cólico (6-ECA, 1) como material de partida, que se preparó usando métodos conocidos en la técnica. 6-ECA (1) se trató con *p*-TSA en MeOH con irradiación ultrasónica para dar el correspondiente éster de metilo, que se protegió selectivamente en la posición C3 por reflujo con Ac₂O en presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. El tratamiento del compuesto 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente seguido de tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el compuesto intermedio 3 α ,7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; aproximadamente 48 % a partir del compuesto 2).

20 El tratamiento de compuesto 3 con Br₂ en benceno durante, por ejemplo, 12 h proporcionó el compuesto 4. La reacción del compuesto 4 con NaBH₄ y NaOAc en piridina recién destilada dio el correspondiente 11 β -12 β epóxido (compuesto 5), con aproximadamente un 59 % de rendimiento después de purificación sobre gel de sílice. La reacción del compuesto 5 con HI en AcOH a temperatura ambiente proporcionó la halohidrina intermedia que a continuación se oxidó en la posición C11 con CrO₃ en AcOH para generar el compuesto 6. La reacción del compuesto 6 con Zn en polvo en AcOH en ebullición e hidrólisis alcalina (NaOH/MeOH) proporcionó ácido 3 α ,7 α -hidroxi-12-ceto-5 β -colan-24-oico (compuesto 7; aproximadamente 65 % de rendimiento partir del compuesto 5).

25 El compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el carbonilo C11 usando NaBH₄ en una mezcla de THF/H₂O =

(4:1, v/v) para dar ácido 3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-6 α -etil-5 β -colan-24-oico (Compuesto 100; aproximadamente 27 % a partir del compuesto 3), después de purificación cromatográfica para proporcionar el Compuesto 100. Alternativamente, el compuesto 7 se redujo con sodio en *sec*-BuOH a 50 °C para dar el Compuesto 101 (aproximadamente 70 % de rendimiento), después de purificación.

5

Ejemplo 2: El Compuesto 100 es un agonista potente y específico de FXR

En el núcleo, los receptores nucleares unidos a ligandos (NR) modulan el inicio de la transcripción interactuando directamente con la maquinaria transcripcional basal o poniendo en contacto factores puente llamados coactivadores (Onate SA, *et al.*, Science 1995; 270:1354-1357; Wang JC, *et al.*, J Biol Chem 1998; 273:30847-30850; Zhu Y, *et al.*, Gene Expr 1996; 6:185-195). La interacción dependiente de ligando de los NR con sus coactivadores se produce entre la función de activación 2 (AF-2), situada en el dominio de unión a ligando del receptor (LBD) y las cajas del receptor nuclear (caja NR) situadas en los coactivadores (Nolte RT, *et al.*, Nature 1998; 395:137-143). Varias líneas de evidencia han demostrado que la secuencia peptídica LXXLL presente en la caja NR representa un motivo distintivo que facilita la interacción de diferentes proteínas con la región AF-2 (Heery DM, *et al.*, Nature 1997; 387:733-736; Torchia J, *et al.*, Nature 1997; 387:677-684).

10

15

20

AlphaScreen se usó con el objetivo de identificar nuevos moduladores aprovechando la interacción bimolecular predominante entre FXR y el motivo LXXLL presente en la caja NR del coactivador 1 del receptor de esteroides (SRC-1).

25

Se incubó FXR-LBD-GST humano con concentraciones crecientes de los ligandos indicados en presencia de péptido LXXLL SRC-1 biotinado. La señal de AlphaScreen aumenta cuando se forma el complejo receptor-coactivador. Los valores de CE₅₀ fueron 8,9 μ M para ácido quenodesoxicólico (CDCA; que es un control positivo), 0,16 μ M para el Compuesto A, y 0,16 μ M para el Compuesto 100. Estos resultados son el valor medio \pm S.D. de muestras por triplicado de un experimento representativo de tres realizados. El ensayo AlphaScreen es un ensayo muy robusto y reproducible, como se muestra mediante el factor Z de 0,84 (Zhang JH, *et al.*, J Biomol Screen 1999; 4:67-73). De ese modo, el Compuesto 100 es un agonista de FXR altamente potente.

30

Además, los datos de la siguiente tabla muestran que el Compuesto 100 es selectivo para FXR humano y no es activo para TGR5 humano.

Tabla 1

Compuesto	Ensayo AlphaScreen FXR humano	HTR-FRET (AMPc) TGR5 humano (células NCI-H716)	HTR-FRET (AMPc) Sobreexpresión de TGR5 humano
	Ref. CDCA = 15 \pm 3 μ M	Ref. LCA = 7 \pm 3 μ M	Ref. LCA = 0,9 \pm 0,1 μ M
Compuesto 100	0,180 \pm 0,02	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto 101	3 \pm 2	41,5	
Compuesto A	0,2 \pm 0,018	15 \pm 5	
Compuesto B	0,03	0,63	
Compuesto C	175	0,9	

35

Además, usando el ensayo AlphaScreen, se demostró que el Compuesto 100 activa específicamente FXR y no activa otros 13 receptores nucleares implicados en las rutas metabólicas.

Tabla 2

Compuesto	Activación de FXR	Activación de LXRβ	Activación de PXR	Activación de CAR	Activación de PPARα	Activación de PPARδ	Activación de PPARγ
(Estándar de referencia)	(CDCA = 10-20 μM)	(T0901317 = 0,08 μM)	(SR-12183 = 0,062 μM)	(CITCO = 0,005 μM)	(GW7647 = 0,003 μM)	(GW0742 = 0,004 μM)	(GW1929 = 0,012 μM)
	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)
Compuesto A	0,16	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto B	0,03	Sin actividad	Sin actividad	44*	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto 100	0,16	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad

Compuesto	Activación de RARα	Activación de VDR	Activación de TR	Activación de PR	Activación de RXR	Activación de GR	Activación de ER
(Estándar de referencia)	(ATRA = 0,001 μM)	(DiHidroxi VitD3 = 0,005 μM)	(T3 = 0,0001 μM)	(Corticosterona = 0,050 μM)	(9cisRA = 0,004 μM)	(Budenósido = 0,0002 μM)	(Estradiol = 0,001 μM)
	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)
Compuesto A	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto B	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
Compuesto 100	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad

*: agonista inverso.

Los valores para el compuesto B se tomaron de Rizzo G., *et al.*, Mol. Pharm., 2010; 78: 617-630.

5

La activación de FXR por el Compuesto 100 también se sometió a ensayo en ensayos de transactivación basados en células con el uso de la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con quimera Gal4-FXR-LBD y el sistema (UAS)5-Luc (Figura 1). La activación de FXR por el Compuesto 100 fue comparable a la inducida por el compuesto A, indicando que estos compuestos son potentes agonistas de FXR en ensayos basados en células. La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad del Compuesto 100 en comparación con el compuesto A en un ensayo de transactivación en células HEK293T. NT son células transfectadas con vector de FXR sin exposición al compuesto A o el Compuesto 100. Los valores se representan en μM.

10

Los ácidos biliares (BA) no solo modulan varios receptores de hormonas nucleares, sino también son agonistas del receptor acoplado a proteína G (GPCR) TGR5 (Makishima M, *et al.*, Science 1999; 284:1362-1365; Parks DJ, *et al.*, Science 1999; 284:1365-1368; Maruyama T, *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 2002; 298:714-719; Kawamata Y, *et al.*, J Biol Chem 2003; 278:9435-9440). La señalización a través de FXR y TGR5 modula varias rutas metabólicas, regulando no solo la síntesis de BA y la recirculación enterohepática, sino también la homeostasis de triglicéridos, colesterol, glucosa y energía. Para evaluar la capacidad de un compuesto de la invención para activar TGR5, se analizaron sistemáticamente el Compuesto 100 y otros compuestos de comparación para comprobar el aumento de AMPc intracelular como lectura para la activación de TGR5. Se expusieron células enteroendocrinas humanas NCI-H716 que expresan constitutivamente TGR5 a concentraciones crecientes del Compuesto 100, y se midieron los niveles intracelulares de AMPc mediante TR-FRET. Se usó ácido litocólico (LCA) como control positivo.

20

Como se muestra en la Figura 2A, el Compuesto 100 no induce actividad de TGR5 en células que expresan fisiológicamente el receptor, ya que no se observó ningún cambio en el nivel de AMPc intracelular. Para evaluar adicionalmente si Compuesto 100 podía unirse a TGR5, se expuso una línea celular clonal que sobreexpresa TGR5 a diferentes concentraciones del Compuesto 100. Los resultados ilustrados en la Figura 2B muestran que incluso con la sobreexpresión del receptor TGR5, el Compuesto 100 no tuvo el efecto pertinente. La Figura 2A es un gráfico que muestra la actividad de TGR5 para el Compuesto 100 (sin actividad) y LCA en células enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 a nivel fisiológico. Los resultados se muestran como el valor medio ± S.D. de muestras por triplicado de un experimento representativo de tres realizados. La Figura 2B es un gráfico que muestra la actividad de TGR5 para el Compuesto 100 (sin actividad) y LCA en células de ovario de hámster chino (CHO)

30

humano que sobreexpresan TGR5.

Ejemplo 3: Genes diana de FXR modulados por el Compuesto 100

5 Con el fin de evaluar la capacidad del Compuesto 100 para modular los genes diana de FXR, se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativa. Se seleccionaron células HepG2 como línea celular pertinente para determinar si un compuesto de la invención puede regular la red genética endógena de FXR. La capacidad de un compuesto de la invención para inducir genes diana de FXR se evaluó mediante el aislamiento de ARN total de células tratadas durante una noche con compuestos A, B y 100 1 μ M. El compuesto A se establece como un potente agonista selectivo de FXR y el compuesto B se establece como un agonista potente doble de FXR/TGR5. Se comparó el perfil de activación génica del Compuesto 100 en células HepG2 con los perfiles de los compuestos A y B. (Pellicciari, R, *et al.*, J Med Chem. 2002; Aug 15; 45: 3569-72; Rizzo, G, *et al.*, Mol. Pharm., 2010; 78: 617-630).

15 FXR regula la expresión de varios genes diana implicados en la homeostasis de BA. En resumen, FXR desempeña un papel principal en varias rutas metabólicas, incluyendo, por ejemplo, metabolismo de lípidos, metabolismo de ácidos biliares y metabolismo de carbohidratos. En lo que respecta al perfil de expresión génica, los genes que codifican las proteínas implicadas en el metabolismo lipídico incluyen, por ejemplo, APOCII, APOE, APOAI, SREBP-1C, VLDL-R, PLTP, y LPL; los genes que codifican las proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos biliares incluyen, por ejemplo, OST α / β , BSEP, MRP2, SHP, CYP7A1, FGF19, SULT2A1, y UGT2B4; y los genes que codifican las proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos incluyen, por ejemplo, PGC1 α , PEPCK, y GLUT2.

25 Como se muestra en las Figuras 3A-3H, la activación de FXR del Compuesto 100 reprime indirectamente la expresión de las enzimas biosintéticas de BA CYP7A1 por aumento de los niveles del receptor nuclear SHP en hígado e intestino y aumento del nivel de FGF19 (Goodwin, B, *et al.*, Mol. Cell 2000; 6: 517-526). FXR activado por el Compuesto 100 también regula positivamente la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en el transporte de BA, incluyendo, BSEP, y OST α y OST β . Los BA recién sintetizados se conjugan con taurina o glicina y a continuación se secretan activamente en la vesícula biliar, regulando FXR estos dos procesos críticos. A continuación, los BA conjugados de forma monoaniónica-dianiónica se secretan activamente en la vesícula biliar mediante BSEP y la proteína 2 relacionada con múltiples fármacos (MRP2), respectivamente. Estos transportadores pertenecen a la familia de transportadores ABC y ambos son inducidos por FXR a nivel transcripcional. La regulación de estos transportadores ABC es de importancia crítica para evitar la acumulación de BA en el hígado y la consiguiente lesión hepática (Schinkel AH, *et al.*, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev. 13 de septiembre de 2012).

35 La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la actividad del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en la regulación de la expresión de OST α (A), OST β (B), BSEP (C), MRP2 (D), CYP7A1 (E), SHP (F), FGF-19 (G), y UGT2B4 (H). Se ha de observar que en las Figuras 3A-3H, el eje y representa el número de veces de cambio en la expresión con respecto a las células sin tratar. Los datos se normalizaron con respecto a B2M. Las barras de error representan el error estándar de las tres réplicas.

45 La activación de FXR contribuye a invertir el transporte de colesterol, un proceso que da como resultado el suministro de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su desecho biliar y la consiguiente eliminación fecal (Lambert, G, *et al.*, J Biol Chem 2003; 278, 2563-70). En este escenario metabólico, FXR regula la expresión de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), responsable de la transferencia de fosfolípidos y colesterol de LDL a HDL, lipoproteínas hepáticas, tales como ApoE, ApoC-I, ApoC-IV, y receptor captador B1 (SRB1), que está implicado en la captación hepática de HDL.

50 FXR controla el metabolismo de triglicéridos (TG) por regulación de la lipogénesis hepática *de novo* y el aclaramiento de triglicéridos. Tras la activación por el Compuesto 100, FXR regula negativamente la expresión de SREBP-1c, un factor de transcripción que desempeña un papel crítico en la estimulación de la síntesis y lipogénesis de ácidos grasos (Figuras 4A-4D) (Landrier, JF, *et al.*, J Clin Invest 2004; 113, 1408-18). Además de la reducción de la lipogénesis *de novo*, la activación de FXR también modula el aclaramiento de TG. Este efecto reductor de TG adicional de FXR se explica a nivel molecular por la inducción de genes clave, tales como Apo-C-11 LPL y receptor de VDL (Kast, HR, *et al.*, Mol Endocrinol 2001; 15, 1720-8).

60 La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran la actividad del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en la regulación de PLTP implicada en el metabolismo lipídico (A), SREBP-1C (B), APOCII (C), y PPAR γ (D). Se ha de entender que en las Figuras 4A-4D, el eje y representa el número de veces de cambio en la expresión con respecto a las células sin tratar. Los datos se normalizaron con respecto a B2M. Las barras de error representan el error estándar de las tres réplicas.

65 FXR también puede desempeñar un papel en el metabolismo de los carbohidratos (Ma K, *et al.*, J Clin Invest. 2006; 116:1102-9). Se estudió la regulación del gen PEPCK (Figura 5) usando el Compuesto 100. La Figura 5 es un gráfico que muestra la regulación del Compuesto 100 y otros compuestos comparativos en el gen PEPCK. El eje y representa el número de veces de cambio en la expresión con respecto a las células sin tratar. Los datos se

normalizaron con respecto a B2M. Las barras de error representan el error estándar de las tres réplicas.

Colectivamente, los estudios de expresión génica mostraron que el Compuesto 100 modula los mismos genes diana de FXR que el compuesto A o B (véase también la Tabla 3).

5

Tabla 3

gen	Compuesto A (1 μ M)	Compuesto B (1 μ M)	Compuesto 100 (1 μ M)
OST α	positiva	positiva	positiva
OST β	positiva	positiva	positiva
BSEP	positiva	positiva	positiva
SHP	positiva	positiva	positiva
CYP7 α 1	negativa	negativa	negativa
UGT2B4	positiva	positiva	positiva
MRP2	positiva	positiva	positiva
FGF-19	positiva	positiva	positiva
PPAR γ	positiva	positiva	positiva
PLTP	positiva	positiva	positiva
APOCII	positiva	positiva	positiva
PEPCK	positiva	positiva	positiva
SREBP-1C	negativa	negativa	negativa

Ejemplo 4: El Compuesto 100 no ejerce efectos citotóxicos en células HepG2.

10 Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* del Compuesto 100, se emplearon dos métodos de ensayo diferentes. Los ensayos evaluaron la viabilidad celular por medición de los niveles de ATP y la citotoxicidad por medición de la liberación de LDH. El nucleótido trifosfato de adenosina (ATP) representa la fuente de energía a nivel molecular básico, ya que es una molécula multifuncional que se usa en cada célula como coenzima y es una parte integral del ADN mitocondrial (Kangas L, *et al.*, Medical Biology, 1984; 62, 338-343; Crouch SPM, *et al.*, J. Immunol. Methods, 1993; 160, 81 - 88; Petty RD, *et al.*, J. Biolumin. Chemilumin. 1995; 10, 29 - 34). Se le ha llamado la "unidad monetaria molecular" cuando se convierte en la transferencia de energía intracelular. Esto es para asegurar el importante papel del ATP en el metabolismo y que una caída en el contenido de ATP sea la primera etapa para revelar daño celular (Storer RD, *et al.*, Mutation Research, 1996; 368, 59 - 101; Cree IA, Andreotti PE., Toxicology in Vitro, 1997; 11, 553 - 556).

20 La viabilidad celular se determinó como medida del ATP intracelular con respecto al tiempo de exposición y la concentración de los compuestos de ensayo (Sussman, NL.; Promega Cell Notes, Número 3. 2002).

25 La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de ATP en células HepG2, tratadas con las concentraciones de compuestos indicadas durante 4 h. Se demostró que todas las células en presencia de diferentes concentraciones del Compuesto 100 fueron viables como las células tratadas solo con vehículo, es decir, todas las células tratadas con el Compuesto 100 permanecen viables (100 %). Se usó como comparador LCA, un ácido biliar citotóxico bien conocido, y se usó tamoxifeno como control positivo para los ensayos.

30 Un método adicional para determinar la viabilidad de las células es detectar la integridad de la membrana que define la compartimentación celular. La medición de la fuga de componentes fuera del citoplasma, en membranas celulares dañadas, indica pérdida de integridad de membrana, y la liberación de LDH es el método usado para determinar toxicidad común en células. Se trataron células HepG2 con el Compuesto 100, se realizaron diluciones seriadas, se añadieron diluciones de LCA a las células en placa como control de ensayo junto con pocillos sin células y células sin tratar. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de compuesto de ensayo.

35 Los resultados muestran que el Compuesto 100 no induce ningún efecto citotóxico en células HepG2. El ácido litocólico aumentó la liberación de LDH a 70 μ M mientras que el control de Tamoxifeno ejerció los efectos citotóxicos a aproximadamente 25 μ M (véase la Tabla 4).

40

Tabla 4

Compuesto	Integridad de membrana CE ₅₀ (µM) (medida de LDH)
Tamoxifeno	35 ± 10
LCA	75 ± 5
Compuesto A	190 ± 30
Compuesto B*	670
Compuesto 100	Sin toxicidad (100 % de células vivas)
Compuesto 101	Sin toxicidad (100 % de células vivas)
* Rizzo <i>et al.</i> , Mol. Pharm. 2010	

Ejemplo 5: El Compuesto 100 no inhibe las enzimas del citocromo P450.

- 5 Para evaluar el potencial del Compuesto 100 en las interacciones fármaco-fármaco, se investigaron las seis isoformas principales de CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) (Obach, RS, *et al.*, J Pharmcol Exp Ther, 2006; 316(1): pág. 336-48).

- 10 Para determinar la interacción entre el Compuesto 100 y las enzimas del citocromo P450, el Compuesto 100 se analizó para su capacidad de inhibir (o no inhibir) la producción de una señal fluorescente, usando proteínas recombinantes de CYP450 (baculosomas; Invitrogen), sustratos e inhibidores (Bidstrup, TB, *et al.*, Br J Clin Pharmacol, 2003; 56(3): pág. 305-14). Como control positivo, se sometió a ensayo un inhibidor selectivo para cada isoforma de CYP450 en la misma placa (Tabla 5).

15

Tabla 5

CPY450	Compuesto A CI ₅₀ (µM)	Compuesto B CI ₅₀ (µM)	Compuesto 100 CI ₅₀ (µM)
CYP1A2 Referencia: Furafilina = 0,5 µM	>10	>10	>10
CYP3A4 (Sustrato verde) Referencia: Ketoconazol = 0,044 µM	>10	>10	>10
CYP3A4 (Sustrato azul) Referencia: Ketoconazol = 0,04 µM	>10	>10	>10
CYP2C9 Referencia: Sulfafenazol = 0,4 µM	>10	>10	>10
CYP2C19 Referencia: Miconazol = 0,06 µM	>10	>10	>10
CYP2D6 Referencia: Quinidina = 0,01 µM	>10	>10	>10
CYP2E1 Referencia: DCC = 0,4 µM	>10	>10	>10

CI₅₀ > 10 µM significa que el compuesto no inhibe CYP450. Los resultados obtenidos demostraron que el Compuesto 100, como los compuestos A y B, no inhibe las enzimas del Citocromo P450 sometidas a ensayo,

mostrando que no es probable que el Compuesto 100 se vea influido por efectos de interacciones fármaco-fármaco (Rizzo, G, *et al.*, Mol Pharm, 2010; 78: 617-630).

Ejemplo 6: El Compuesto 100 no inhibe el canal de potasio ERG humano

Para determinar la función del canal iónico, se empleó el ensayo de polarización de fluorescencia de hERG Predictor™ hERG Fluorescence Polarization, ya que proporciona un método eficaz para la determinación inicial de la propensión de los compuestos de ensayo a bloquear el canal hERG (Dorn, A, *et al.* J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47). El ensayo se basa en la suposición de que la actividad del canal de potasio hERG contribuye al potencial de membrana en reposo en células transfectadas permanentemente y, de ese modo, un bloqueo de los canales hERG debería dar como resultado una despolarización de la membrana celular. El ensayo se diseñó para identificar bloqueadores potenciales del canal hERG mediante la producción de datos que correlacionen con precisión con estudios de electrofisiología de pinza de parche (*patch clamp*). Los resultados del ensayo Predictor demuestran una alta correlación con los obtenidos con las técnicas de pinza de parche (Tabla 6) (Dorn, A, *et al.* J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47).

Tabla 6

Compuesto	Pinza de parche*	Radioligando*	FP
	CI ₅₀ (nM)		
Astemizol	1,2	1	1,3
Dofetilida	12	40	6,9
Terfenadina	16	30	23
E-4031	48	20	34
Bepidil	550	170	210
Tioridazina	1250	510	708
Fluoxetina	990	2230	4310
Amitripilina	10000	2440	11200

La Tabla 6 muestra la comparación de los valores de CI₅₀ generados con el ensayo de polarización de fluorescencia Predictor™ hERG Fluorescence Polarization con los valores de CI₅₀ informados en ensayos de pinza de parche y desplazamiento de radioligando.

Se usaron preparaciones de membrana de células de ovario de hámster chino transfectadas de forma estable con canal de potasio hERG para evaluar el efecto inhibitor potencial del Compuesto 100 en este canal usando el ensayo de polarización de fluorescencia Predictor. La reducción de la polarización de membrana como resultado de la inhibición del canal de potasio hERG correlaciona directamente con la reducción de la polarización de fluorescencia (FP). Los resultados muestran que al igual que los compuestos A y B, el Compuesto 100 no bloquea ni inhibe el canal de potasio hERG.

El ensayo se realizó por triplicado usando una respuesta a dosis de 16 puntos de compuesto de ensayo y los controles positivos E-4031 y Tamoxifeno. Se obtuvieron valores de CI₅₀ de 15 nM ($\Delta mP = 163$) para E-4031 y 1,4 μM ($\Delta mP = 183$) para Tamoxifeno. La ventana de ensayo de más de 100 mP (milipolarización) se considera buena. El valor Z' fue 0,78, lo que indica un ensayo excelente. Las curvas de regresión no lineal se obtuvieron mediante análisis con GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) para calcular los valores de CI₅₀.

En resumen, la señalización a través de FXR modula una diversidad de vías metabólicas, de modo que los moduladores selectivos de FXR son candidatos atractivos para el tratamiento de una diversidad de enfermedades crónicas que afectan al hígado y riñón, así como enfermedades metabólicas. Los resultados de los ejemplos descritos en el presente documento caracterizan al Compuesto 100 como un agonista potente y específico de FXR.

De forma notable, aunque activó potentemente FXR, el Compuesto 100 no mostró ninguna actividad frente a otros receptores nucleares y no activó el ácido biliar GPCR TGR5. Además de alta selectividad de receptores nucleares, el Compuesto 100 posee un perfil farmacológico adecuado para ser candidato a fármaco. El Compuesto 100 no muestra ningún efecto citotóxico en células hepáticas HepG2 humanas, lo que indica carencia de toxicidad hepática, y no inhibe ninguna de las enzimas de CYP450 sometidas a ensayo, lo que indica que el Compuesto 100 está desprovisto de riesgo de interacción significativa fármaco-fármaco. Además, el Compuesto 100 no inhibe el canal de potasio ERG humano.

La selectividad y potencia combinadas del Compuesto 100 junto con sus propiedades favorables de tipo

farmacológico, en particular un excelente perfil de seguridad, hacen del Compuesto 100 un candidato atractivo para tratar y prevenir enfermedades.

Ejemplo 7: Propiedades fisicoquímicas del Compuesto 100

5 Las propiedades fisicoquímicas del Compuesto 100, tales como solubilidad en agua, concentración micelar crítica, tensión superficial y LogP_A , se determinaron usando métodos conocidos en la técnica. Estas propiedades del Compuesto 100 se compararon con análogos naturales y sintéticos (Tabla 7).

10

Tabla 7

Ácido biliar	$W_s^{(a)}$ (μM)	$\text{CMC}^{(b)}$ (mM)	$\text{ST}_{\text{CMC}}^{(c)}$ (Dina/cm)	$\text{LogP}_A^{(d)}$
Compuesto 100	143-150	15,8	47,8	0,8
CA	273	9-11	49,0	1,1
CDCA	32	3,2	45,5	2,2
UDCA	7-7,5	6-10	50,5	2,2
TCDCA	as	3,0	-	0,9
TUDCA	as	2,2	-	1,1
Compuesto A	9	2,9	43,2-48,8	2,5
Compuesto B	as	1,3	43,3-47,9	2,0
Compuesto C	99	2	50,1	1,4
Compuesto D	15	-	-	2,9
Compuesto E	120	5,9	52,4	1,6

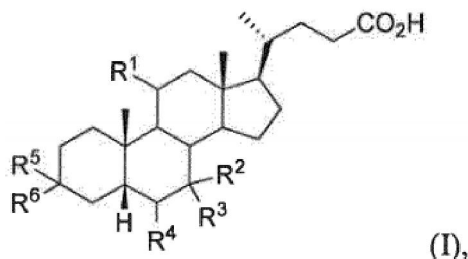
^a W_s : la solubilidad en agua se refiere a los BA como especies protonadas y por lo tanto no se evaluó para el Compuesto B, TCDCA y TUDCA, que son altamente solubles (as);
^b CMC: Concentración Micelar Crítica determinada en solución acuosa de NaCl 0,15 M;
^c ST_{CMC} : Tensión Superficial a CMC en solución acuosa de NaCl 0,15 M;
^d LogP_A : coeficiente de reparto en 1-octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas;

Ejemplo 8: Farmacocinética y metabolismo en rata con fistula biliar después de administración *id* e *iv*: *in vivo*

15 Se administró a los modelos *in vivo*, ratas, una dosis individual del Compuesto 100 de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Kg}$.1 hora (véanse las Figuras 7A, 7B, y 7C). La Figura 7A es un gráfico que muestra el efecto colerético del Compuesto 100 para administración *id* e *iv*. La Figura 7B es un gráfico que muestra la secreción del Compuesto 100 a lo largo del tiempo para administración *id* e *iv*. La Figura 7C es un gráfico que muestra la concentración plasmática del Compuesto 100 a lo largo del tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo, en donde:

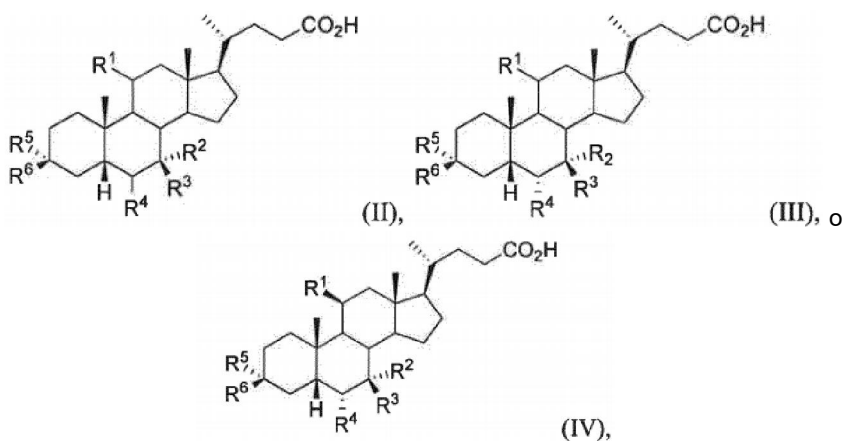
- 10 R^1 es hidroxilo;
- R^2 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^a ;
- R^3 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^b ;
- 15 R^4 es alquilo, alquenoilo, alquinilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sin sustituir o sustituido con uno o más R^c ;
- R^a , R^b , y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;
- R^5 es hidroxilo, OSO_3H , OSO_3^- , $OCOCH_3$, OPO_3H_2 , OPO_3^{2-} , o hidrógeno; y
- R^6 es hidroxilo, OSO_3H , OSO_3^- , $OCOCH_3$, OPO_3H_2 , OPO_3^{2-} , o hidrógeno;

20 o R^5 y R^6 tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad hepática crónica seleccionada entre cirrosis biliar primaria (PBC), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC), colestasis asociada a crecimiento bacteriano excesivo o sepsis, hepatitis autoinmune, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática

25 alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de injerto contra hospedador asociada a trasplante de hígado, regeneración hepática de trasplante de donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad hepática granulomatosa, tumores malignos intra o extrahepáticos, síndrome de Sjogren, Sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis, y déficit de alfa-1-antitripsina.

30

2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



35

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

3. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde uno de R^2 o R^3 es hidroxilo y el otro R^2 o R^3 es hidrógeno.

40

4. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde uno de R^5 o R^6 es hidroxilo y el

otro R⁵ o R⁶ es hidrógeno.

5. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R² es hidroxilo y R³ es hidrógeno.

5 6. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R⁵ es hidroxilo y R⁶ es hidrógeno.

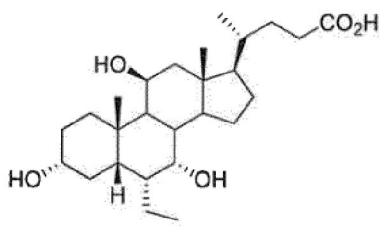
10 7. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R² y R⁵ son cada uno hidroxilo y R³ y R⁶ son cada uno hidrógeno.

8. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R⁴ es alquilo.

15 9. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde R⁴ es alquilo sin sustituir.

10. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde R⁴ es etilo.

11. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o conjugado de aminoácido del mismo.

25 12. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad hepática crónica es cirrosis biliar primaria (PBC).

13. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad hepática crónica es enfermedad hepática alcohólica.

30 14. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad hepática crónica es esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

35 15. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad hepática crónica es enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).

Figura 1

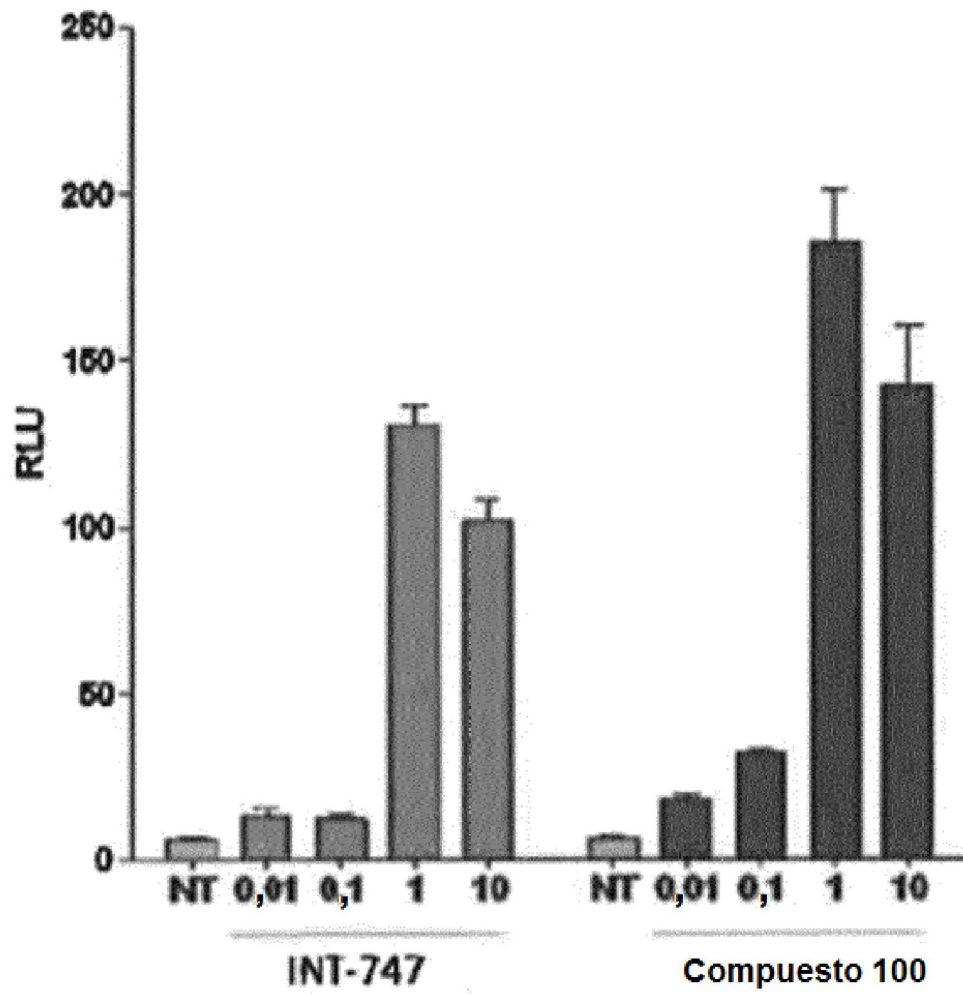
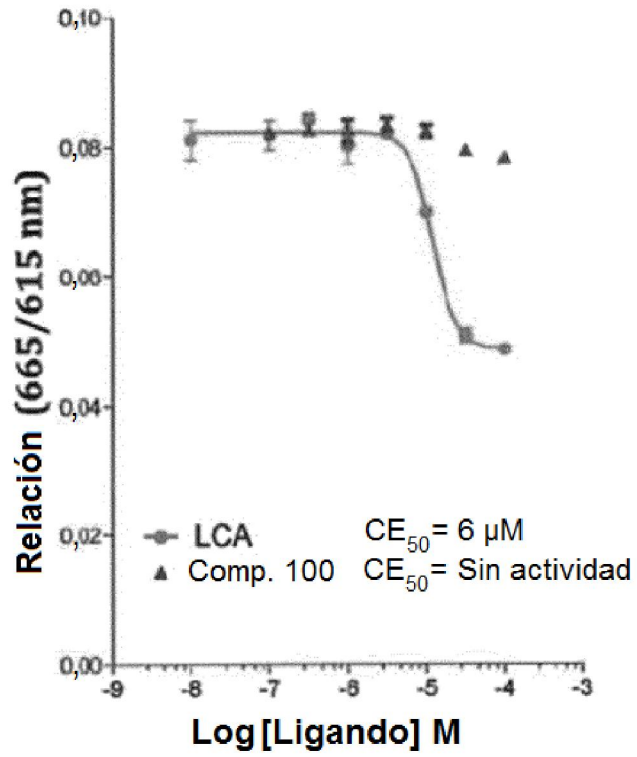


Figura 2

A



B

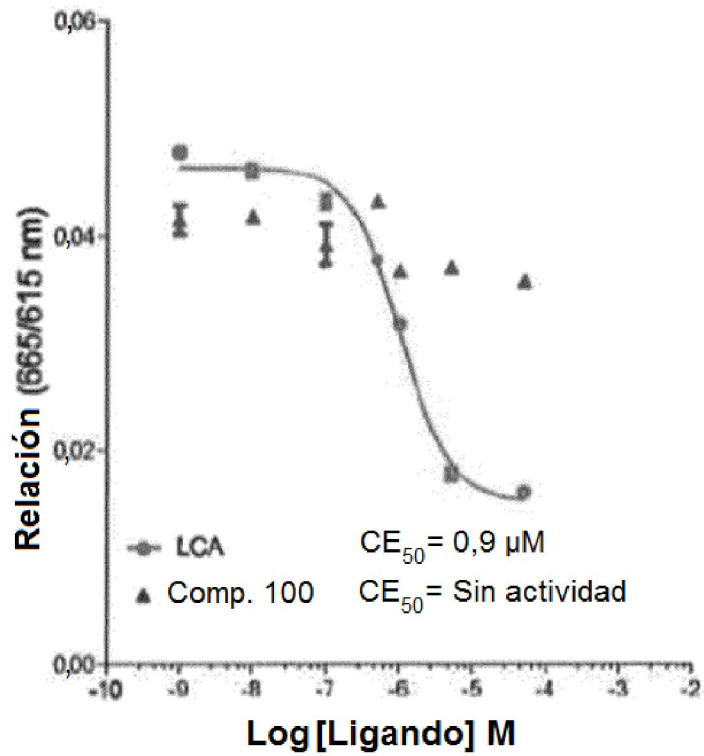


Figura 3

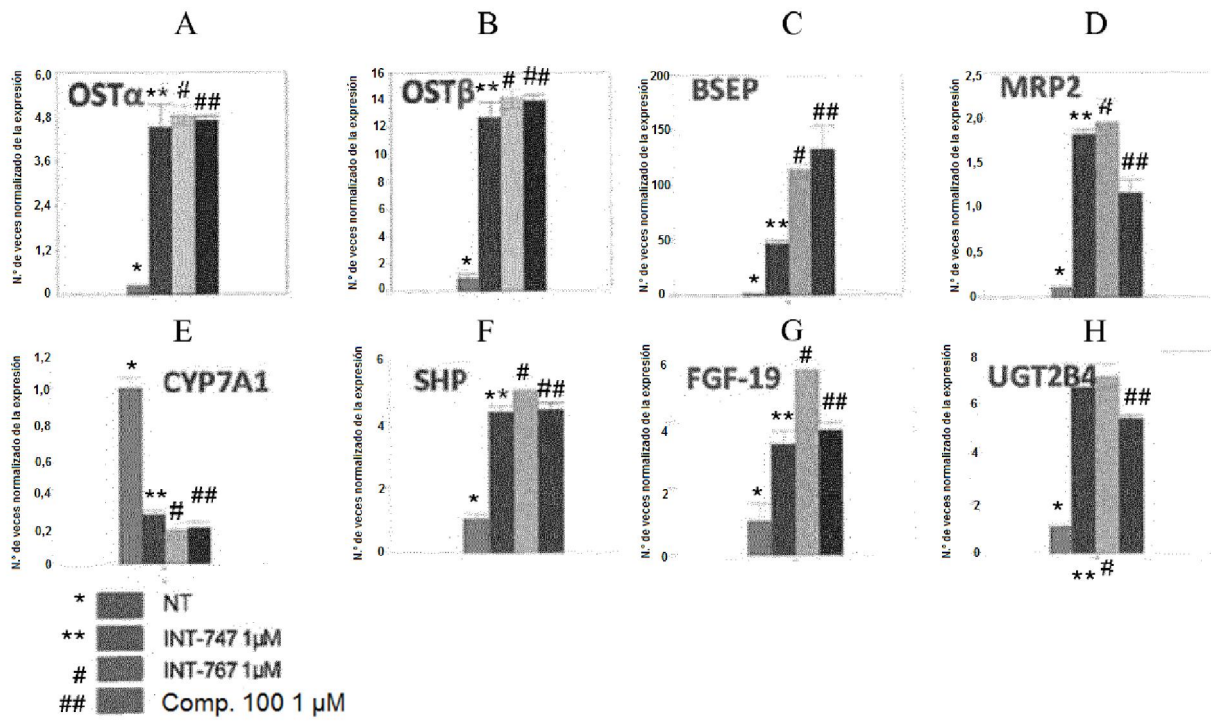


Figura 4

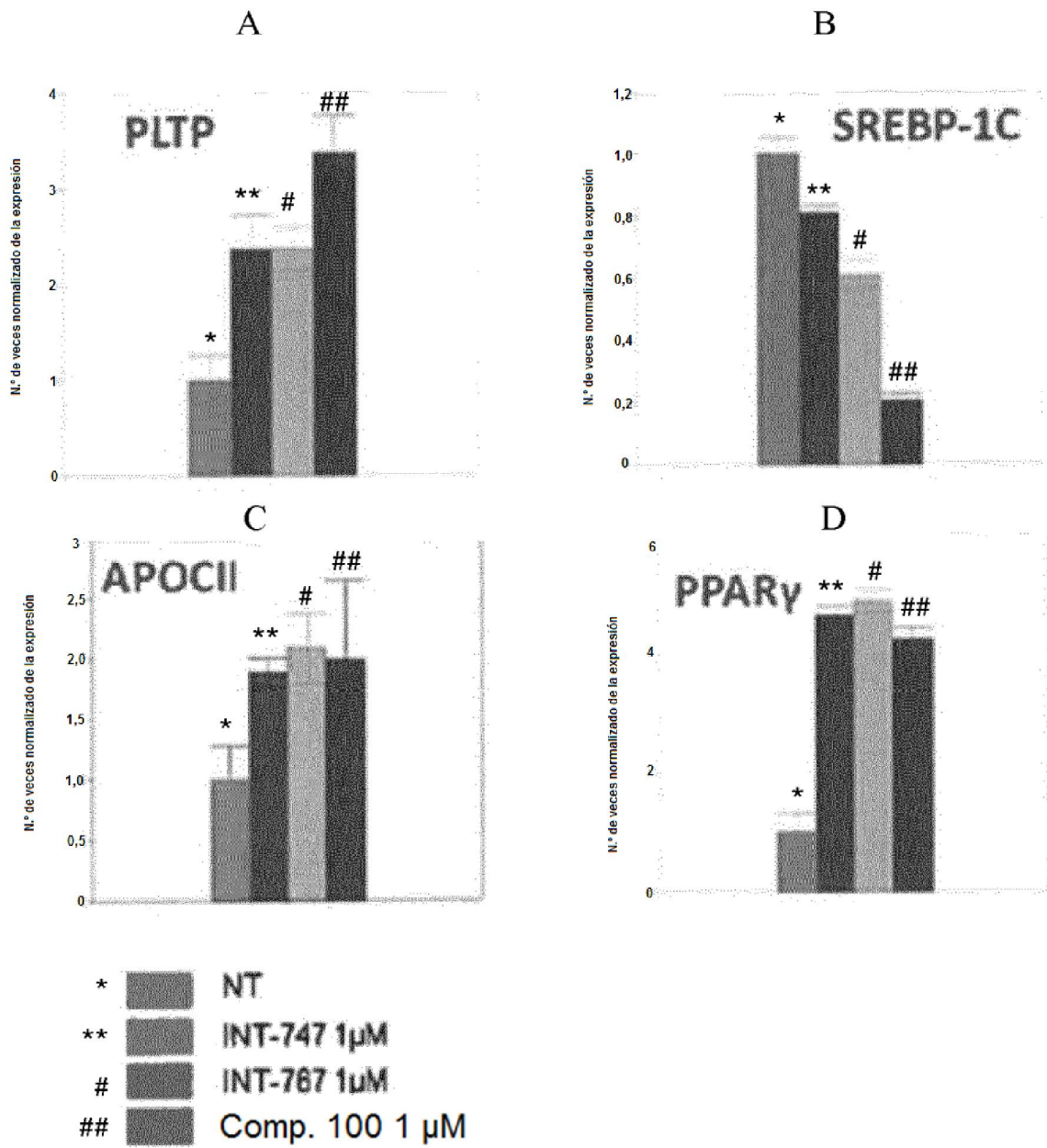
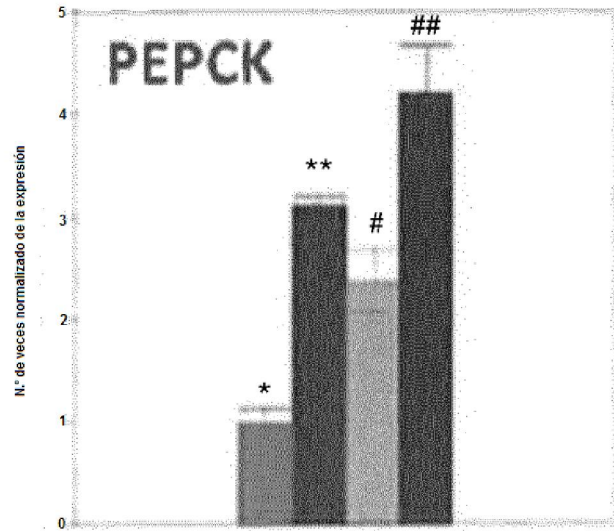


Figura 5



- * NT
- ** INT-747 1µM
- # INT-767 1µM
- ## Comp. 100 1 µM

Figura 6

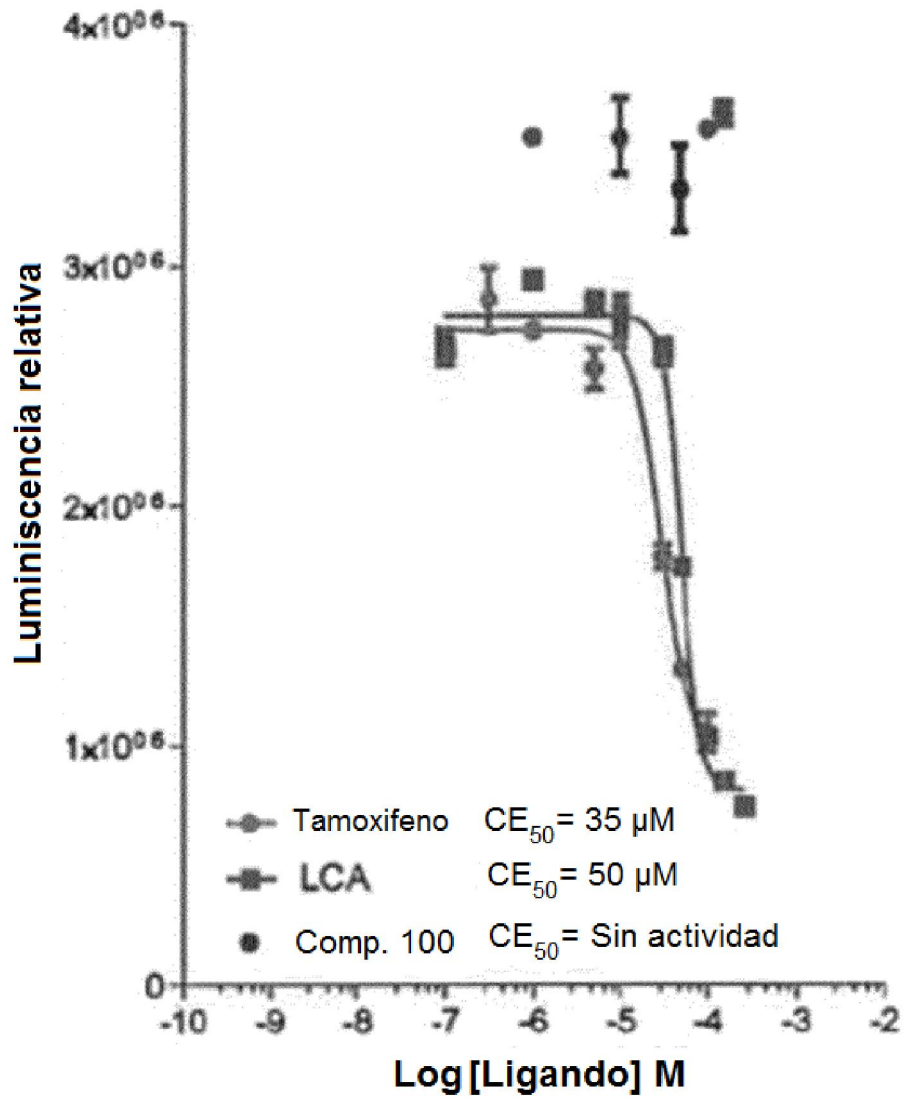
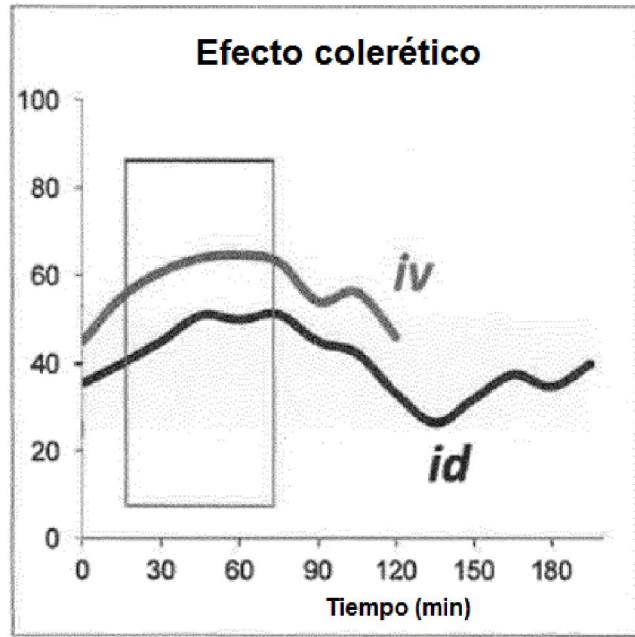
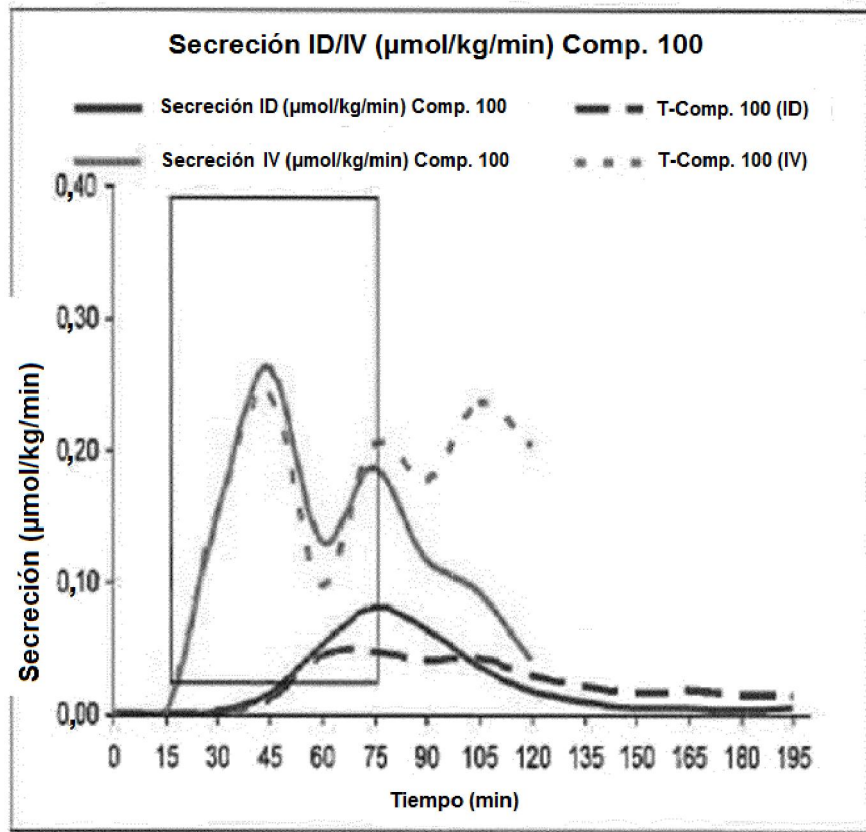


Figura 7

A



B



C

