

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 638**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 43/00 (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 20211780 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2022 EP 3848038**

54 Título: **Derivados sustituidos con 11-Hidroxil-6 de ácidos biliares y conjugados de aminoácidos 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:

21.03.2023

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
305 Madison Avenue
Morristown NJ 07960, US**

72 Inventor/es:

PELLICCIARI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 936 638 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 sustituidos con 11-Hidroxi-6 de ácidos biliares y conjugados de aminoácidos de los mismos como moduladores del receptor X farnesoide

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de, y el beneficio de, U.S.S.N. 61/823,169, presentada el 14 de mayo de 2013.

10

Antecedentes de la invención

El receptor X farnesoide (FXR, por sus siglas en inglés) es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligandos que incluye receptores para las hormonas esteroides, retinoides y tiroideas (D.J. Mangelsdorf, et al., Cell 83:841-850 (1995)). Los análisis de Northern e *in situ* muestran que FXR se expresa más abundantemente en el hígado, intestino, riñón y glándula suprarrenal (B.M. 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 un heterodímero con el receptor de ácido 9-cis-retinoico (RXR, por sus siglas en inglés). El FXR de rata se activa mediante concentraciones micromolares de farnesoide, tales como farnesol y hormona juvenil (B.M. Forman, et al., Cell 81:687-693 (1995)). Sin embargo, estos compuestos no activaron el FXR humano y de ratón, dejando en duda la naturaleza de los ligandos de FXR endógeno. Varios ácidos biliares de origen natural (por ejemplo, ácido quenodesoxicólico (CDCA, por sus siglas en inglés), ácido desoxicólico (DCA, por sus siglas en inglés), ácido litocólico (LCA, por sus siglas en inglés), y los conjugado de taurina y glicina de los mismos) actúan como ligandos de FXR, y se unen al y activan el FXR a concentraciones fisiológicas (WO 00/37077,

15

20

25

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 (2004-07-23), páginas 4559-4569, EP 1 568 706 y WO 2004/007521 divulgan agonistas del receptor FXR que son útiles en el tratamiento de la colestasis. EP 1 734 970 divulga ligandos de FXR, tales como ácido 6-etil-quenodesoxicólico o ácido tauro-6-etil-quenodesoxicólico para el tratamiento de la fibrosis.

30

Los ácidos biliares son metabolitos de colesterol que se forman en el hígado y se secretan en el duodeno del intestino, en donde tienen papeles importantes en la solubilización y absorción de lípidos dietéticos y vitaminas. La mayoría de los ácidos biliares (~95%) son reabsorbido posteriormente en el íleon y regresan al hígado por el sistema circulatorio enterohepático. La conversión de colesterol a ácidos biliares en el hígado está bajo regulación de retroalimentación: los ácidos biliares regulan a la baja la transcripción del citocromo P450 7a (CYP7a), que codifica la enzima que cataliza el paso limitante de la tasa en la biosíntesis de ácidos biliares. Se sugiere que FXR está involucrado en la represión de la expresión de CYP7a por ácidos biliares (D.W. Russell, Cell 97:539-542 (1999)). En el íleon, los ácidos biliares inducen la expresión de la proteína de unión a ácido biliar intestinal (IBABP, por sus siglas en inglés), que une los ácidos biliares con una alta afinidad y puede estar involucrada 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 tipo IR-1 que se conserva en los promotores de genes IBABP humanos, de rata y de ratón. Por lo tanto, FXR está involucrado tanto en la estimulación (IBABP) como la represión (CYP7a) de genes objetivo involucrados en la homeostasis del ácido biliar y el colesterol. Por consiguiente, existe una necesidad por moduladores de FXR adecuados para el desarrollo de fármacos. La presente invención aborda esta necesidad.

35

40

45

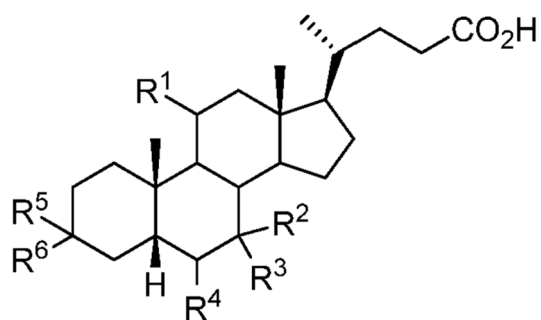
Breve descripción de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente para fines informativos. Las referencias a métodos de tratamiento en la descripción breve y las descripción detallada de la invención en la presente memoria descriptiva debe interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento de un cuerpo humano (o animal) por una terapia.

50

La invención proporciona un compuesto de la fórmula I:

55



5 o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son según se describe en la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis, o uno o más síntomas de colestasis intrahepática o colestasis extrahepática.

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

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen las plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden usarse en la práctica o análisis de la presente invención, a continuación, 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 limitativos.

20 Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones a continuación.

Breve descripción de los dibujos

25 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.

30 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 (CHO, por sus siglas en inglés) humanas que sobreexpresan TGR5 (B).

35 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 OSTα (A), OSTβ (B), BSEP (C), MRP2 (D), CYP7A1 (E), SHP (F), FGF-19 (G), y UGT2B4 (H).

40 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 involucrado en el metabolismo de los lípidos (A), SREBP-1C (B), APOCII (C), y PPAPγ (D).

45 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.

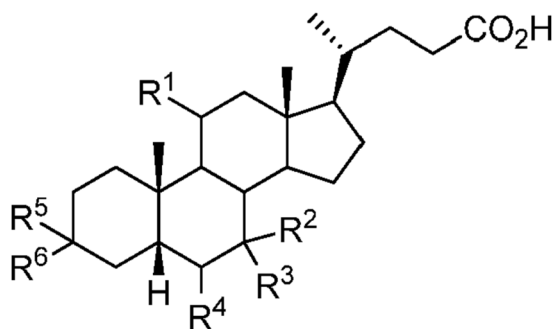
La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de ATP en células HepG2, tratadas con las concentraciones indicadas de un compuesto de la invención durante 4 h.

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

Descripción detallada de la invención

Compuestos de la invención

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



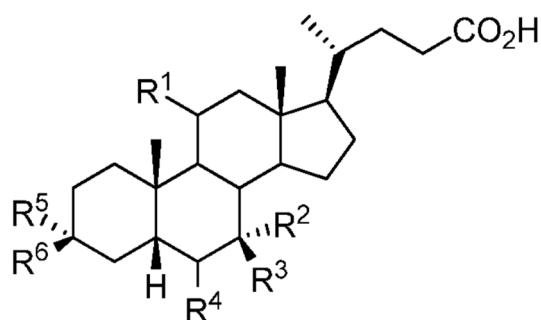
(I),

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

- 5 R¹ es hidroxilo;
 R² es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^a;
 R³ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^b;
 R⁴ es alquilo, alquenilo, alquinilo o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^c;
 R^a, R^b y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;
 10 R⁵ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno; y
 R⁶ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno;
 o en conjunto R⁵ y R⁶ con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo.

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

15

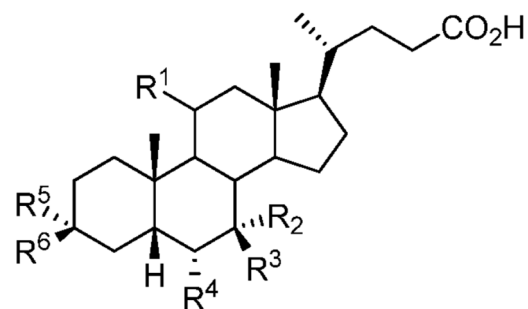


(II),

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

20

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

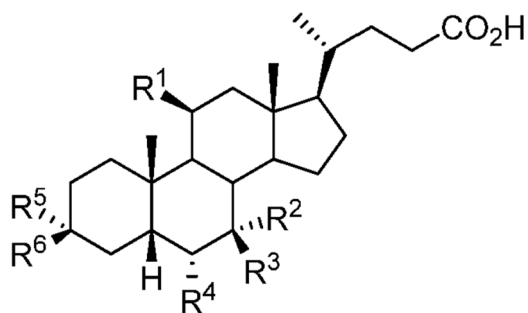


(III),

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

25

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



(IV),

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

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la 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, no solvatada y no conjugada).

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

15

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I, en donde uno de R² o R³ es hidroxilo o halógeno, y el R² o R³ restante es hidrógeno o alquilo no sustituido. En un aspecto, uno de R² o R³ es hidroxilo, y el R² o R³ restante es hidrógeno.

20

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

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la 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 la fórmula I, II, III o IV, en donde R³ es hidrógeno o alquilo no sustituido. En un aspecto, R³ es hidrógeno. En otro aspecto, R³ es metilo.

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

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

35

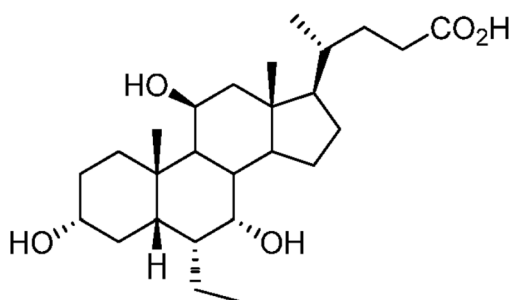
En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I, II, III o IV, en donde R² y R⁵ son cada uno hidroxilo, y R³ y R⁶ son cada uno hidrógeno.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I, II, III o IV, en donde R⁴ es alquilo. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I, II, III o IV, en donde R⁴ es alquilo no sustituido.

40

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.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto



(100),

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

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la 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 el FXR a una concentración menor a 1 μM , menor a 0,8 μM , menor a 0,6 μM , menor a 0,4 μM , o menor a 0,2 μM (por ejemplo, según lo medido por un ensayo AlphaScreen), en comparación con 15 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa el FXR a una concentración menor a 0,2 μM (por ejemplo, según lo medido por un ensayo AlphaScreen) Por ejemplo, el compuesto de la invención activa el FXR con una EC_{50} menor a 1
10 μM , menor a 0,8 μM , menor a 0,6 μM , menor a 0,4 μM , o menor a 0,2 μM (por ejemplo, según lo medido por un AlphaScreen), en comparación con 8,9 μM para CDCA. Por ejemplo, el compuesto de la invención activa el FXR con una EC_{50} menor a 0,2 μM (por ejemplo, según lo medido por un ensayo AlphaScreen)

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

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

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

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

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

40 En un aspecto no reivindicado, la presente divulgación se refiere a un método para sintetizar un compuesto de la invención, o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

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

55 Un problema técnico que debe resolver la presente divulgación es la identificación de compuestos novedosos que son agonistas del receptor X farnesoide (FXR) hormonal nuclear, que representa un objetivo atractivo para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas y metabólicas. Es bien sabido que los ácidos biliares naturales modulan no solamente varios receptores hormonales nucleares, sino que también son agonistas para el receptor acoplado a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) TGR5. La selectividad puede ser un problema para compuestos de fármacos dirigidos a la modulación de un receptor hormonal nuclear. Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un compuesto que sea un agonista de FXR específico, por ejemplo, un compuesto que no muestre actividad contra otros receptores nucleares o un compuesto que no active el GPCR TGR5 de ácido biliar. Otros problemas en el desarrollo de un compuesto de fármaco incluyen un perfil farmacocinético no adecuado, problemas de seguridad, tales como toxicidad (por ejemplo, hígado) e interacciones farmacológicas no deseadas. Por consiguiente, otros objetivos de la presente invención son proporcionar compuestos que no sufran de los problemas técnicos mencionados anteriormente, es decir, un compuesto que tenga un perfil farmacocinético adecuado, un compuesto que no que no ejerza un efecto citotóxico en las células, un compuesto que no inhiba las enzimas del citocromo P450, y/o un compuesto que no inhiba hERG.

60 La patente y la literatura científica a la que se hace referencia en la presente establecen conocimientos que están disponibles para los expertos en la técnica. En caso de inconsistencias, prevalecerá la presente divulgación.

65 Para los fines de la presente invención, se usarán las siguientes definiciones (a menos que se indique expresamente lo contrario).

Los términos químicos generales que se utilizan a lo largo de la presente tienen sus significados usuales. Por ejemplo, el término alquilo se refiere al grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado. El término "*n*-alquilo" se refiere a un grupo alquilo no ramificado. El término "alquilo $\text{C}_x\text{-C}_y$ " se refiere a un grupo alquilo que tiene entre 'x' y 'y' átomos de

carbono, de manera inclusiva, en el grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado. A modo de ilustración, pero sin limitación, el término "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. El término "*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. El término "cicloalquilo C₃-C₆" se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. El término "cicloalquilo C₃-C₇" también incluye cicloheptilo. El término "cicloalquilo C₃-C₈" también incluye ciclooctilo. Cicloalquilalquilo se refiere a restos de cicloalquilo unidos a través de una cadena enlazadora 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 sustituirse opcionalmente como se especifica en la presente.

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

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

El término "hidroxilo" significa OH.

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución sea de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución de como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no sufre una transformación espontáneamente, tal como por reordenamiento, ciclación, eliminación, etc. Como se usa en la presente, se contempla que el término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos, a menos que se especifique lo contrario. En un aspecto amplio, los sustituyentes permitidos incluyen sustituyentes de compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos. Los sustituyentes permitidos pueden ser uno o más, e iguales o diferentes para los compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos descritos en la presente que satisfacen las valencias de los heteroátomos. No se pretende que la invención se vea limitada de ninguna manera por los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos.

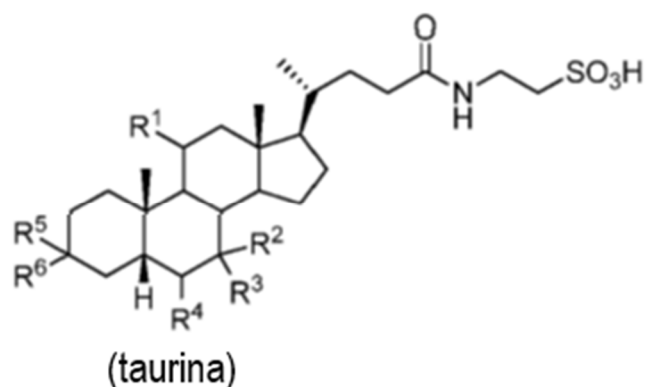
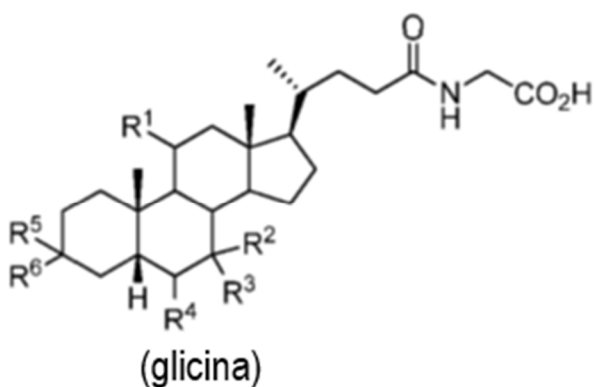
El término "farmacéutico" o "farmacéuticamente aceptable", cuando se usa en la presente como un adjetivo, significa sustancialmente no tóxico y sustancialmente no perjudicial para el receptor.

"Formulación farmacéutica" significa además que el portador, solvente, excipiente y sal deben ser compatibles con el ingrediente activo de la formulación (por ejemplo, un compuesto de la invención). Los expertos en la técnica entenderán que los términos "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" son generalmente intercambiables y se utilizan de tal manera para los fines de la presente solicitud.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de acuerdo con la invención serán determinadas fácilmente por un experto en la técnica e incluirán, por ejemplo, sales básicas, tales como sales alcalinas o de metales alcalinotérreos hechas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, y zinc o sales orgánicas hechas a partir de N,N'-dibenciletildiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), y procaína. También se pueden usar sales con aminas 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 adecuada con el compuesto de la invención.

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

Como se usa en la presente, el término "conjugado de aminoácidos" se refiere a un conjugado de un compuesto de la invención con cualquier aminoácido adecuado. En un aspecto, dicho conjugado de aminoácidos adecuado de un compuesto de la invención tendrá la ventaja añadida de una integridad mejorada en la bilis o fluidos intestinales. La presente invención abarca los conjugados de glicina y taurina de cualquiera de los compuestos de la invención. Por ejemplo, los conjugados de glicina y taurina de un compuesto de la fórmula I tienen la siguiente fórmula:

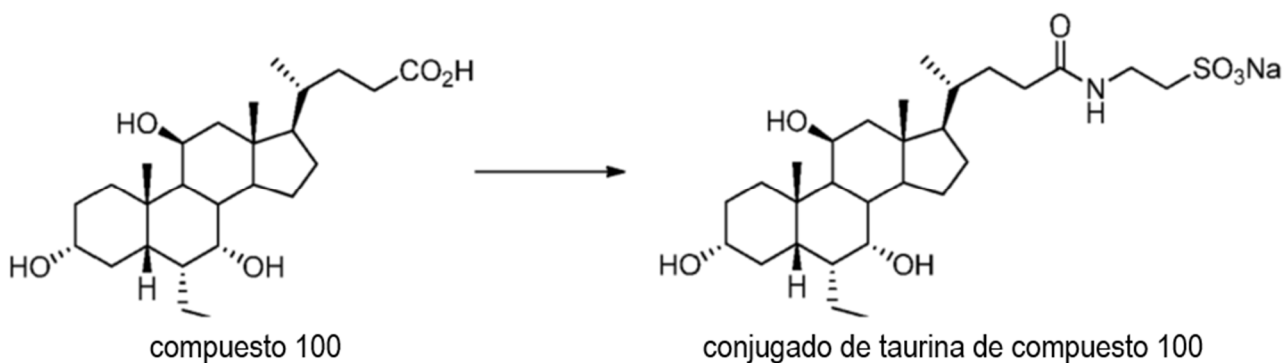


5

En un aspecto, los conjugados de glicina y taurina de la invención pueden ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los conjugados de aminoácidos de los compuestos de la invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido libre puede acoplarse a los aminoácidos de glicina o taurina usando condiciones estándar de acoplación de péptidos.

10

En un aspecto, la sal de sodio del conjugado de taurina del Compuesto 100 se puede preparar como se indica a continuación.



15

El Compuesto 100 se trata con una base (por ejemplo, Et₃N) y taurina en un disolvente prótico polar (por ejemplo, EtOH). La mezcla resultante puede tratarse con un reactivo de acoplamiento (por ejemplo, DMT-MM (cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio)). La mezcla de reacción puede concentrarse y disolverse en una base (por ejemplo, 3% p/v de solución acuosa de NaOH). La reacción resultante se puede extraer con un disolvente orgánico (por ejemplo, AcOEt). La fase acuosa puede concentrarse y filtrarse en una almohadilla de sílice, eluyendo primero con, por ejemplo, H₂O (hasta un pH neutro) y posteriormente con, por ejemplo, H₂O/MeOH 80:20 v/v para dar el conjugado de taurina del Compuesto 100. Los aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, glicina y taurina.

20

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como formas solvatadas, tales como, por ejemplo, hidratos.

25

La presente divulgación proporciona métodos para la síntesis de los compuestos de la invención descritos en la presente. La presente divulgación también proporciona métodos detallados para la síntesis de diversos compuestos de la invención de acuerdo con los siguientes esquemas, como se muestra en los ejemplos.

30

Los procesos sintéticos de la invención pueden tolerar una amplia variedad de grupos funcionales, por lo tanto, se puede utilizar diversos materiales de partida sustituidos. El proceso generalmente proporciona el compuesto final deseado al final o casi al final del proceso general, aunque en ciertos casos puede ser deseable convertir adicionalmente el compuesto en una sal farmacéuticamente aceptable, éster, o profármaco del mismo.

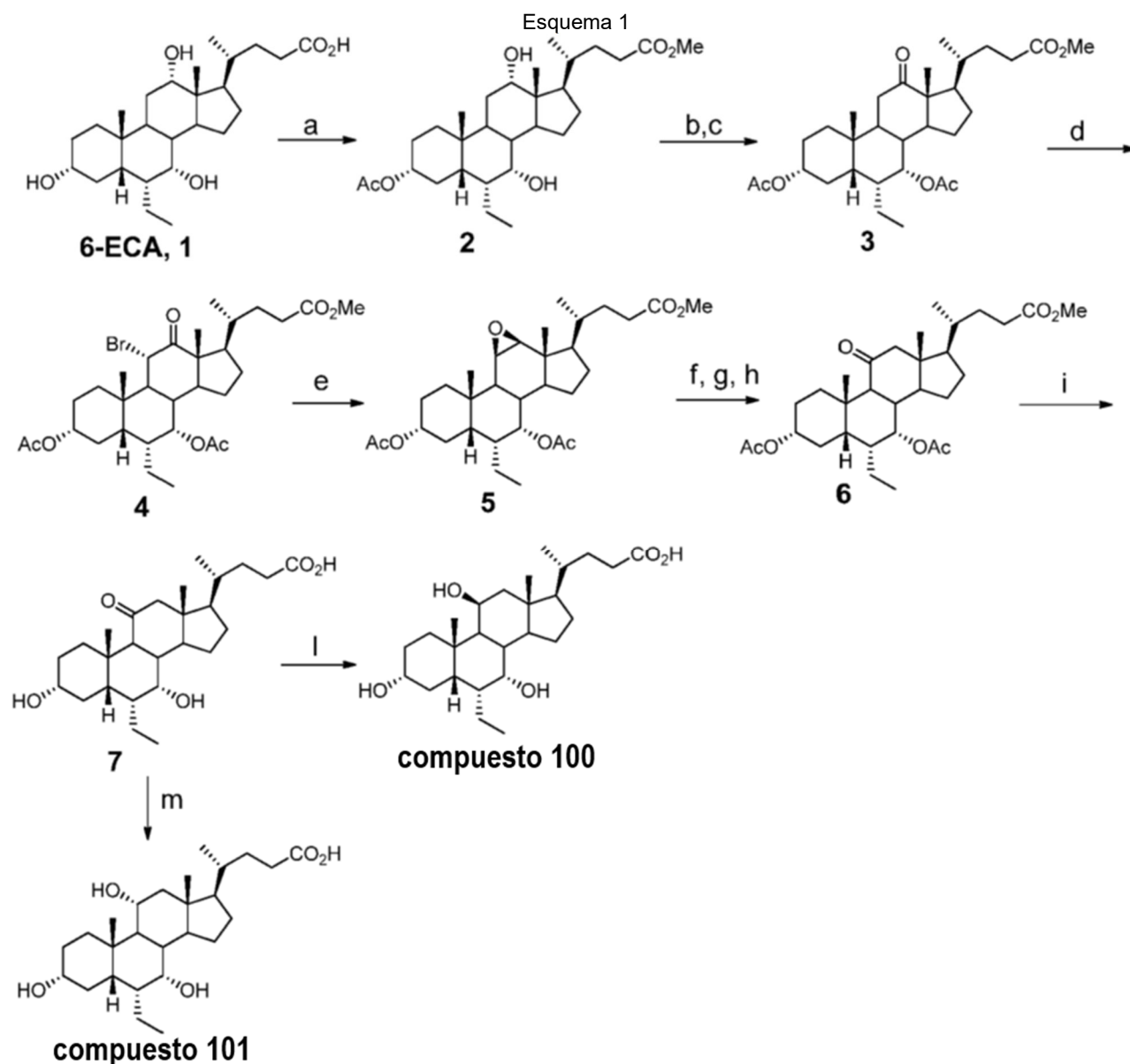
35

Los compuestos de la invención se pueden preparar de diversas formas usando materiales de partida disponibles comercialmente, compuestos conocidos en la literatura, o a partir de productos intermedios preparados fácilmente, empleando métodos y procedimientos sintéticos estándar, ya sea conocidos por los expertos en la técnica o que serán aparentes para un experto en la técnica en vista de las enseñanzas de la presente. Los métodos sintéticos estándar y los procedimientos para la preparación de moléculas orgánicas, y transformaciones y manipulaciones de grupos pueden obtenerse de la literatura científica relevante o de libros de texto estándar del campo. Aunque no se limita a una o varias fuentes, los textos clásicos, tales como Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5ª edición, John Wiley & Sons: Nueva York, 2001; y Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons: Nueva York, 1999, son útiles y son reconocidos libros de

40

texto de referencia de la síntesis orgánica que conocen los expertos en la técnica. Las siguientes descripciones de métodos sintéticos pretenden ilustrar, pero no limitar, los procedimientos generales para la preparación de compuestos de la presente invención.

- 5 Todas las abreviaturas utilizadas 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 proveedores de productos químicos, tales como Aldrich, o de acuerdo con el uso conocido en la técnica.



10

Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, *p*-TSA, ultrasonido, 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 la noche, 74%; e) NaBH₄, NaOAc, Pyr, TA, 2 días, 80%; f) HI 57%, AcOH, TA 30 min; g) CrO₃, AcOH, TA 45 min; h) polvo de Zn, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2M, MeOH, TA durante la noche, 65% del compuesto 5; l) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70%; m) Na(s), *sec*-BuOH, 50 °C, 70%.

15

20

La síntesis se basa en el uso de 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 bajo irradiación de ultrasonido para proporcionar el éster de metilo correspondiente, que se protegió selectivamente en la posición C3 mediante reflujo con Ac₂O en la presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. Tratar el compuesto 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, seguido por tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el producto intermedio 3 α ,7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; aproximadamente 48% del compuesto 2).

El tratamiento del compuesto 3 con Br₂ en benceno durante, por ejemplo, 12 h produjo el compuesto 4. La reacción del compuesto 4 con NaBH₄ y NaOAc en piridina recién destilada dio el correspondiente epóxido 11β-12β (compuesto 5), en aproximadamente 59% de rendimiento tras la purificación en gel de sílice. La reacción del compuesto 5 con HI en AcOH a temperatura ambiente proporcionó el producto intermedio de halohidrina que posteriormente se oxidó en la posición C11 con CrO₃ en AcOH para generar el compuesto 6. La reacción del compuesto 6 con polvo de Zn dust en AcOH hirviendo e hidrólisis alcalina (NaOH/MeOH) proporcionó ácido 3α,7α-hidroxi-12-keto-513-colan-24-oico (compuesto 7; aproximadamente 65% de rendimiento del compuesto 5).

El Compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el C11-carbonilo usando NaBH₄ en una mezcla de THF/H₂O= (4:1, v/v) para dar ácido 3α,7α,11β-trihidroxi-6α-etil-5β-colan-24-oico (Compuesto 100; aproximadamente 27% del compuesto 3), tras la 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 la purificación.

"Solvato" significa una forma de adición de disolvente que contiene cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienden a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando así un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato; cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman por la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en las que el agua mantiene su estado molecular como H₂O, siendo tal combinación capaz de formar uno o más hidratos.

El término "disolvente adecuado" se refiere a cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, inerte a la reacción en curso que solubiliza suficientemente los reactivos para proporcionar un medio dentro del cual se efectúa la reacción deseada.

Los compuestos descritos en la presente pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Cómo preparar formas ópticamente activas es bien conocido en la técnica, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante la síntesis de materiales de partida ópticamente activos. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en la presente, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Los isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Se prevén todas las formas isoméricas quirales, diastereoméricas, racémicas y geométricas de la estructura, a menos que se indique específicamente una forma isomérica o estereoquímica específica. Todos los procesos utilizados para preparar los compuestos de la presente invención y los productos intermedios hechos en ellos se consideran como parte de la presente divulgación. Todos los tautómeros de los compuestos que se muestran o describen también se consideran como parte de la presente invención. Además, en un aspecto no reivindicado, la divulgación también incluye metabolitos de los compuestos descritos en la presente.

La invención también comprende compuestos etiquetados isotópicamente, que son idénticos a los enumerados en las fórmulas de la invención, salvo por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan con un átomo que tiene una masa atómica o número atómico que se encuentra en la naturaleza comúnmente. 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.

Los compuestos de la presente invención, así como las sales, solvatos o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que contienen los isótopos antes mencionados y/u otros isótopos de otros átomos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos etiquetados 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 tejido en fármaco y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y carbono-14, es decir, ¹⁴C, son particularmente preferidos debido a su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos ¹¹C y ¹⁸F son particularmente útiles en la tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés). PET es útil en la imagenología cerebral. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tal como el deuterio, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que son el resultado de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor vida media *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede ser preferible en algunas circunstancias. Los compuestos etiquetados isotópicamente de esta invención generalmente pueden prepararse a través de técnicas conocidas en el arte, tal como al llevar a cabo procedimientos divulgados en los Esquemas y/o en los Ejemplos a continuación, al sustituir un reactivo etiquetado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo etiquetado no isotópicamente. En una realización, los compuestos de la invención, sales, hidratos, solvatos o conjugados de aminoácidos de los mismos no están etiquetados isotópicamente.

Cuando cualquier variable (por ejemplo, R^X) aparece más de una vez en cualquier componente o fórmula para un compuesto, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cada aparición distinta. Así, por ejemplo, si se muestra que un grupo se ha sustituido con uno o más restos R^X, entonces R^X en cada caso se selecciona independientemente de la definición de R^X. Asimismo, las combinaciones de sustituyentes y/o variables están permitidas, pero solamente si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables dentro una valencia normal de átomo designada.

Como se usa en la presente, el término "tratar," "tratando" o "tratamiento" significa una disminución de los síntomas, marcadores y/o cualquier efecto negativo de la afección en cualquier grado apreciable en un sujeto que actualmente padece de la afección. En algunas realizaciones, se puede administrar el tratamiento a un sujeto que presenta sólo signos tempranos de la afección con el fin de reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, el término "prevenir," "prevención" o "previniendo" se refiere a cualquier método para prevenir o retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas o características de la enfermedad, trastorno y/o afección. La prevención se puede administrar a un sujeto que no presenta signos de la enfermedad o afección.

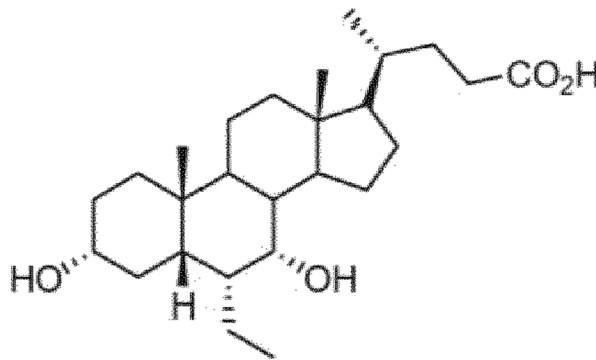
Como se usa en la presente, "sujeto" significa un ser humano o animal (en el caso de un animal, típicamente un mamífero). En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Se puede considerar que tal sujeto necesita un tratamiento con un agonista de FXR.

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

Como se usa en la presente, el término "un compuesto de la invención" incluye un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, II, III o IV, o cualquier compuesto explícitamente divulgado en la presente y que caiga bajo la presente fórmula (I).

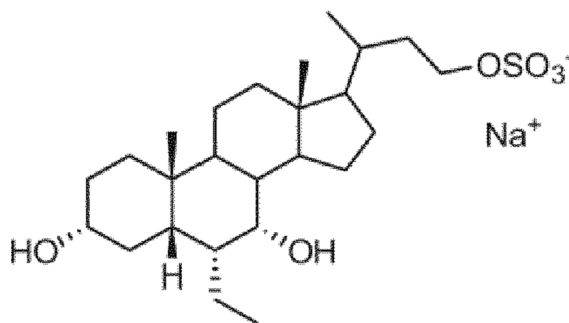
Como se usa en la presente, el receptor X farnesoide o FXR se refiere a todas las formas mamíferas de tal receptor, incluyendo, por ejemplo, isoformas de empalme alternativas e isoformas de origen natural (véase, por ejemplo, Huber et al., Gene 290:35-43 (2002)). Las especies representativas de FXR incluyen, sin limitación FXR de rata (No. de acceso GenBank: NM_021745), FXR de ratón (No. de acceso GenBank: NM_009108), y FXR humano (No. de acceso GenBank: NM_005123).

Como se usa en la presente, el Compuesto A es



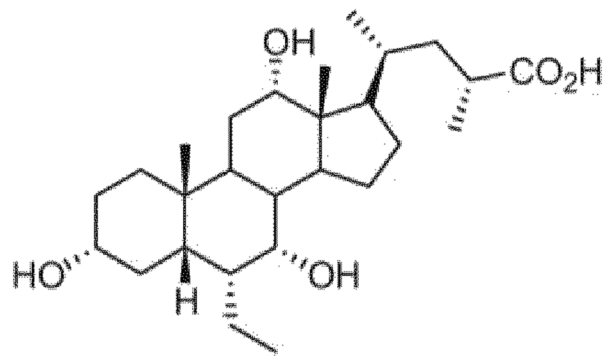
que también se conoce como ácido obeticólico INT-747, 6ECDCA, ácido 6-alfa-etil-quenodesoxicólico, o ácido 6α-etil-3α,7α-dihidroxi-5β-colan-24-oico.

Como se usa en la presente, el Compuesto B es



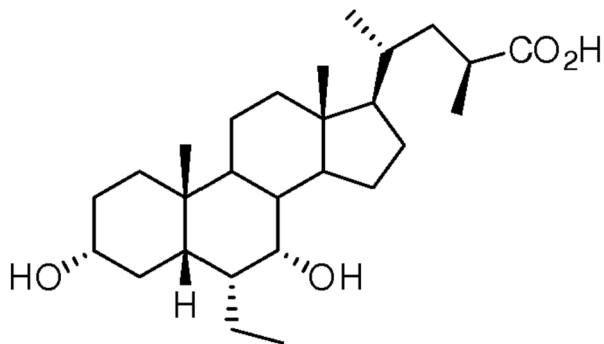
que también se conoce como INT-767 o sal de 6α-etil-3α,7α,23-trihidroxi-24-nor-5β-colan-23-sulfato de sodio.

Como se usa en la presente, el Compuesto C es



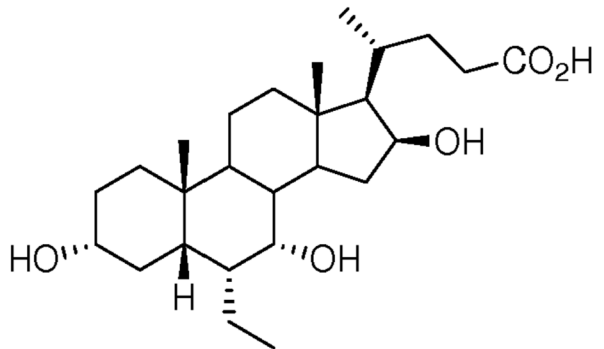
que también se conoce como INT-777 o ácido 6 α -etil-23(S)-metil-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oico.

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

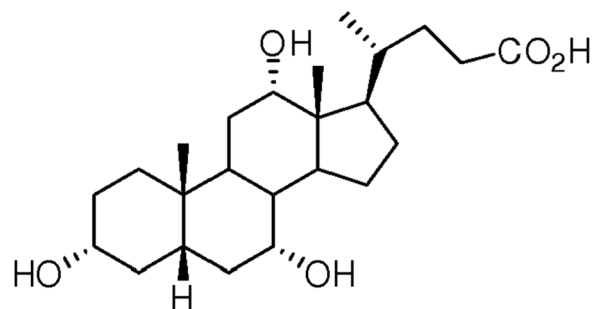


que también se conoce como ácido 6 α -etil-23(R)-metil quenodesoxicólico, y S-EMCDCA.

10 Como se usa en la presente, el Compuesto E es

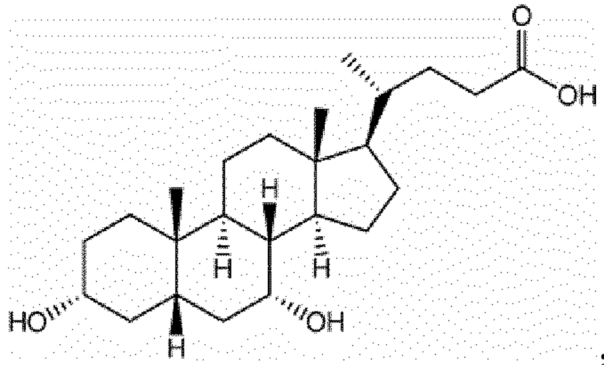


15 Como se usa en la presente, el ácido cólico es



que también se conoce como CA.

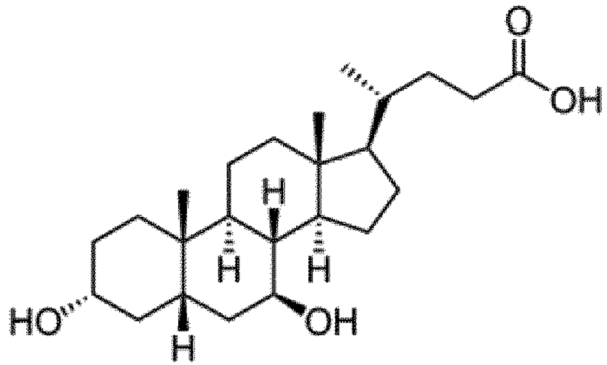
Como se usa en la presente, el ácido quenodesoxicólico es



5

que también se conoce como CDCA.

Como se usa en la presente, el ácido ursodesoxicólico es

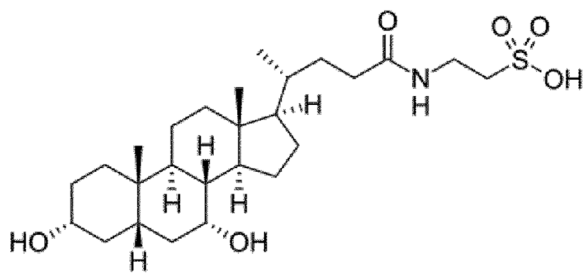


10

que también se conoce como UDCA.

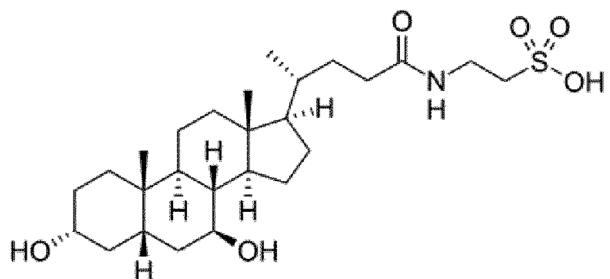
Como se usa en la presente, el ácido tauroquenodesoxicólico es

15



que también se conoce como TCDCA.

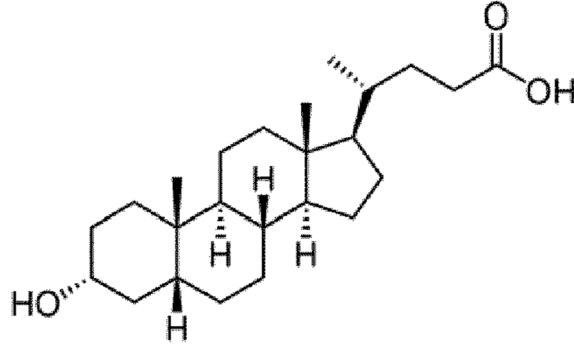
20 Como se usa en la presente, el ácido tauroursodesoxicólico es



que también se conoce como TUDCA.

Como se usa en la presente, el ácido litocólico es

5



que también se conoce como LCA.

10 Métodos de la invención

La invención se refiere a compuestos de la fórmula (I) para uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis, o uno o más síntomas de colestasis intrahepática o colestasis extrahepática.

15 Los compuestos de la invención son útiles en la 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 administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la enfermedad o afección está mediada por FXR (por ejemplo, FXR juega un papel en el inicio o progreso de la enfermedad o afección).
 20 En un aspecto, la enfermedad o afección está mediada por una disminución de la actividad de FXR. En un aspecto no reivindicado, la enfermedad o afección se selecciona de enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática crónica, trastorno de lípidos, enfermedad gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad metabólica, cáncer y enfermedad neurológica.

25 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir la enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad cardiovascular. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad cardiovascular. En un aspecto, la enfermedad cardiovascular se selecciona de aterosclerosis, arteriosclerosis, dislipidemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia e hipertrigliceridemia.

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

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

En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método seleccionado para reducir los niveles de colesterol o modular el metabolismo del colesterol, catabolismo, absorción del colesterol dietético, y transporte inverso de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad que afecta los niveles de colesterol, triglicéridos o ácidos biliares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para reducir los triglicéridos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir un estado de enfermedad asociado a niveles elevados de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar un estado de enfermedad asociado a niveles elevados de colesterol en un sujeto. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir un estado de enfermedad asociado a niveles elevados de colesterol en un sujeto. En un aspecto, el estado de la enfermedad se selecciona de enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho, enfermedad de la arteria carótida, ataques cerebrales, arterioesclerosis cerebral y xantoma.

10 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno de lípidos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de lípidos. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir un trastorno de lípidos.

15 Los trastornos de lípidos son el término para las anomalías del colesterol y los triglicéridos. Las anomalías lipídicas están asociadas a un mayor riesgo de enfermedad vascular, y en especial infartos y ataques cerebrales. Las anomalías en los trastornos de lípidos son una combinación de predisposición genética, así como de la naturaleza de la ingesta dietética. Muchos trastornos de lípidos están asociados con el sobrepeso. Los trastornos de lípidos pueden estar asociados con otras enfermedades, incluyendo la diabetes, el síndrome metabólico (a veces denominado síndrome de resistencia a la insulina), tiroides hipoactiva, o son el resultado de ciertos medicamentos (tales como los usados para regímenes anti-rechazo en personas que han tenido trasplantes).

20 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad que afecta el metabolismo de los lípidos (es decir, lipodistrofia) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar uno o más síntomas de una enfermedad que afecta el metabolismo de los lípidos. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir uno o más síntomas de una enfermedad que afecta el metabolismo de los lípidos.

25 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para disminuir la acumulación de lípidos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir la enfermedad hepática crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad hepática crónica. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad hepática crónica. En un aspecto, la enfermedad hepática crónica se selecciona de cirrosis biliar primaria (PBC, por sus siglas en inglés), xantomatosis cerebrotendinosa (CTX, por sus siglas en inglés), colangitis esclerosante primaria (PSC, por sus siglas en inglés), colestasis inducida por fármacos, colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC, por sus siglas en inglés), colestasis asociada a sobrecrecimiento bacteriano o sepsis, hepatitis autoinmune, hepatitis viral crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés), esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), enfermedad de injerto contra huésped asociada a trasplante de hígado, regeneración de trasplante de hígado del donante vivo, fibrosis hepática congénita, coledocolitiasis, enfermedad granulomatosa hepática, malignidad intrahepática o extrahepática, síndrome de Sjögren, sarcoidosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, hemocromatosis, y deficiencia de alfa-1 antitripsina.

35 En un aspecto, la invención 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 efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar uno o más síntomas de colestasis. En un aspecto, la invención se refiere a prevenir uno o más síntomas de colestasis.

40 La colestasis normalmente es causada por factores dentro del hígado (intrahepática) o fuera del hígado (extrahepática), y conduce a la acumulación de sales biliares, bilirrubina de pigmentos biliares, y lípidos en el torrente sanguíneo en lugar de que sean eliminados normalmente. La colestasis intrahepática se caracteriza por un bloqueo extendido de los conductos pequeños o por trastornos, tal como la hepatitis, que perjudican la capacidad del cuerpo de eliminar la bilis. La colestasis intrahepática también puede ser causada por la enfermedad hepática alcohólica, cirrosis biliar primaria, cáncer que se ha propagado (metastatizado) de otra parte del cuerpo, colangitis esclerosante primaria, cálculos biliares, colecistitis cólica biliar y aguda. También puede aparecer como una complicación de cirugía, lesión grave, fibrosis quística, infección o alimentación intravenosa, o puede ser inducida por fármacos. La colestasis también puede aparecer como una complicación del embarazo y a menudo se desarrolla durante el segundo y tercer trimestres.

5 La colestasis extrahepática más frecuentemente es causada por coledocolitiasis (piedras del conducto biliar), estenosis biliares benignas (estrechamiento no canceroso del conducto común), colangiocarcinoma (carcinoma de conducto) y carcinoma de páncreas. La colestasis extrahepática puede aparecer como un efecto secundario de muchos medicamentos.

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

15 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para potenciar la regeneración del hígado en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, el método es potenciar la regeneración del hígado para un trasplante de hígado.

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

25 Por consiguiente, como se usa en la presente, el término fibrosis se refiere a todos los trastornos fibróticos reconocidos, incluyendo fibrosis debido a afecciones o enfermedades patológicas, fibrosis debido a un trauma físico ("fibrosis traumática"), fibrosis debido al daño por radiación y fibrosis debido a exposición a agentes quimioterapéuticos. Como se usa en la presente, el término "fibrosis de órganos" incluye, pero no se limita a, fibrosis hepática, fibrosis del riñón, fibrosis del pulmón y fibrosis del intestino. La "fibrosis traumática" incluye, pero no se limita a, fibrosis secundaria a cirugía (cicatrices quirúrgicas), trauma físico accidental, quemaduras, o cicatrices hipertróficas.

30 Como se usa en la presente, "fibrosis hepática" incluye fibrosis hepática debido a cualquier causa, incluyendo, pero sin limitarse a, fibrosis hepática inducida por virus, tal como debido al virus de la hepatitis B o C; exposición al alcohol (enfermedad hepática alcohólica), ciertos compuestos farmacéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, metotrexato, algunos agentes quimioterápicos, e ingestión crónica de arsenicales o vitamina A en megadosis, estrés oxidativo, terapia de radiación contra el cáncer o ciertos químicos industriales, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 para fibrosis hepática se enfoca principalmente a eliminar el agente causal, por ejemplo, eliminar el exceso de hierro (por ejemplo, en el caso de hemocromatosis), reducir la carga viral (por ejemplo, en el caso de hepatitis viral crónica), o eliminar o reducir la exposición a toxinas (por ejemplo, en el caso de enfermedad hepática alcohólica). Los fármacos antiinflamatorios, tales como corticosteroides y colchicina también son conocidos por su uso en el tratamiento de la inflamación que puede conducir a la fibrosis hepática.

45 Como se sabe en la técnica, la fibrosis hepática puede clasificarse clínicamente en cinco etapas de gravedad (S0, S1, S2, S3 y S4), que usualmente se basan en un examen histológico de una muestra de biopsia. S0 indica que no hay fibrosis, mientras que S4 indica cirrosis. Aunque existen diversos criterios para la estadificación de la gravedad de la fibrosis hepática, en general las etapas tempranas de la fibrosis se identifican por áreas localizadas y separadas de cicatrización en un portal (zona) del hígado, mientras que las etapas posteriores de la fibrosis se identifican por fibrosis en puente (cicatrices que cruzan las zonas del hígado).

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

55 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedad gastrointestinal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad gastrointestinal. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad gastrointestinal. En un aspecto, la enfermedad gastrointestinal se selecciona de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés), síndrome del intestino irritable (IBS, por sus siglas en inglés), sobrecrecimiento bacteriano, malabsorción, colitis post-radiación y colitis microscópica. En un aspecto, la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

60 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedad renal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad renal. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad renal se selecciona de nefropatía diabética,

glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS, por sus siglas en inglés), nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.

5 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir la enfermedad metabólica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad renal. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad renal. En un aspecto, la enfermedad metabólica se selecciona de resistencia a la insulina, hiperglucemia, diabetes mellitus, diabetes, y obesidad. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes tipo I. En un aspecto, la diabetes mellitus es diabetes tipo II.

15 La diabetes mellitus, comúnmente denominada diabetes, se refiere una enfermedad o afección que generalmente se caracteriza por defectos metabólicos en la producción y utilización de la glucosa, lo que da como resultado que no se puedan mantener niveles adecuados de azúcar en la sangre en el cuerpo.

20 En el caso de la diabetes tipo II, la enfermedad se caracteriza por resistencia a la insulina, en la que la insulina pierde su habilidad para ejercer sus efectos biológicos a lo largo de un amplio rango de concentraciones. La sensibilidad de la resistencia a la insulina da como resultado una activación de insulina insuficiente de la captación, oxidación y almacenamiento de glucosa en el músculo y una represión de insulina inadecuada de lipólisis en el tejido adiposo y la producción y secreción de glucosa en el hígado. La afección resultante es glucosa en sangre elevada, que se denomina "hiperglucemia". La hiperglucemia no controlada se asocia con una mayor mortalidad o mortalidad prematura debido al aumento en el riesgo de enfermedades microvasculares y macrovasculares, incluyendo retinopatía (el deterioro o pérdida de la visión debido al daño a los vasos sanguíneos en los ojos); neuropatía (daño a los nervios y problemas en los pies debido al daño a los vasos sanguíneos en el sistema nervioso); y nefropatía (enfermedad renal debido al daño a los vasos sanguíneos en los riñones), hipertensión, enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria. Por lo tanto, el control de homeostasis de la glucosa es un enfoque de gran importancia para el tratamiento de la diabetes.

30 Se ha hipotetizado que la resistencia a la insulina une el grupo de hipertensión, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento en los niveles de triglicéridos y disminución del colesterol HDL, así como obesidad central y general. La asociación de resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa, un aumento en triglicéridos plasmáticos y una disminución en las concentraciones de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, hipertensión, hiperuricemia, partículas de lipoproteínas de baja densidad más pequeñas y densas, y niveles circulantes más altos del inhibidor 1 del activador del plasminógeno, se ha denominado "Síndrome X". Por consiguiente, se divulgan métodos para tratar o prevenir cualquier trastorno relacionado con la resistencia a la insulina, incluyendo el grupo de estados de la enfermedad, afecciones o trastornos que conforman el "Síndrome X". En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir el síndrome metabólico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar el síndrome metabólico. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir el síndrome metabólico.

40 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir el cáncer. En un aspecto, el cáncer es cáncer colorrectal.

50 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir los cálculos biliares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar los cálculos biliares. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir los cálculos biliares.

55 Un cálculo biliar es una concreción cristalina que se forma dentro de la vesícula biliar por la acreción de componentes biliares. Estos cálculos se forman en la vesícula biliar, pero pueden pasar distalmente a otras partes de las vías biliares, tales como el conducto cístico, conducto biliar común, conducto pancreático o la ampolla de Vater. Rara vez, en casos de inflamación grave, los cálculos biliares pueden erosionar a través de la vesícula biliar y dentro del intestino adherente, potencialmente causando una obstrucción denominada íleo biliar. La presencia de cálculos biliares en la vesícula biliar puede conducir a colecistitis aguda, una afección inflamatoria que se caracteriza por la retención de bilis en la vesícula biliar y frecuentemente una infección secundaria por microorganismos intestinales, predominantemente *Escherichia coli* y especies de bacteroides. La presencia de cálculos biliares en otras partes de las vías biliares puede causar la obstrucción de los conductos biliares, lo que puede conducir a afecciones graves, tales como colangitis ascendente o pancreatitis.

65 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir la enfermedad de cálculos biliares de colesterol en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad de cálculos biliares de

colesterol. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad de cálculos biliares de colesterol.

5 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir la enfermedad neurológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad neurológica. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para prevenir la enfermedad neurológica. En un aspecto, la enfermedad neurológica es un ataque cerebral.

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

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

20 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para regular el nivel de expresión de uno o más genes involucrados en la homeostasis del ácido biliar.

25 En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para regular a la baja el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados de CYP7 α 1 ySREBP-1C en una célula mediante la administración a la célula de un compuesto de la invención. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a un método para regular al alza el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados de OST α , OST β , BSEP, SHP, UGT2B4, MRP2, FGF-19, PPAR γ , PLTP, APOCII y PEPCK en una célula mediante la administración a la célula de un compuesto de la invención.

30 La divulgación 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, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en la presente, en donde el medicamento comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 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, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a una composición para uso en un método para tratar o prevenir cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en la presente, en donde la composición comprende un compuesto de la invención o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Formulaciones

45 Los métodos de la invención comprenden el paso de administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la invención. Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que es suficiente para lograr un efecto declarado. Por consiguiente, una cantidad efectiva de un compuesto de la invención que se usa en un método para la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por FXR será una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad o afección mediada por FXR.

50 De manera similar, una cantidad efectiva de un compuesto de la invención para uso en un método para la prevención o tratamiento de enfermedad hepática colestásica para aumentar el flujo de la bilis será una cantidad suficiente para aumentar el flujo de la bilis al intestino.

55 La cantidad del compuesto de la invención que se requiere para lograr el efecto biológico deseado dependerá de varios factores, tales como el uso previsto, el medio de administración y el receptor, y finalmente será según el criterio del médico o veterinario asistente. En general, se puede esperar que un dosis típica para el tratamiento de una enfermedad y afección mediada por FXR, por ejemplo, se encuentre en el rango de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Esta dosis se puede administrar como una dosis unitaria única o como varias dosis unitarias separadas, o como una infusión continua. Dosis similares serían aplicables al tratamiento de otras enfermedades, afecciones y terapias, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas.

60 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, un compuesto de la invención junto, y/o mezclado, con al menos un portador o diluyente

farmacéutico. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse en la prevención o tratamiento de las enfermedades o afecciones anteriores.

- 5 El portador debe ser farmacéuticamente aceptable y debe ser compatible con, es decir, no debe tener un efecto perjudicial sobre, los otros ingredientes en la composición. El portador puede ser un sólido o líquido, y preferiblemente se formula como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido que puede contener de 0,05 a 95% en peso del ingrediente activo. Si se desea, otros ingredientes activos fisiológicamente se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas de la invención.
- 10 Las posibles formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral, sublingual, bucal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal, tópica, incluyendo administración transdérmica, intranasal y por inhalación. Los medios de administración más adecuados para un paciente particular dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección que se trata, o la naturaleza de la terapia que se usa y la naturaleza del compuesto activo, pero, cuando sea posible, se prefiere la administración oral para la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por FXR. Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden proporcionarse como unidades separadas, tales como comprimidos, cápsulas, obleas, grageas, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvos o gránulos; como soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; o como 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, normalmente, una base saborizada, tal como azúcar y acacia o tragacanto, y pastillas que comprenden el compuesto activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa acacia.
- 20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral normalmente comprenden soluciones acuosas estériles que contienen una concentración predeterminada del compuesto activo; la solución es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor previsto.
- 25 Las formulaciones adicionales adecuadas para administración parenteral incluyen formulaciones que contienen co-disolventes fisiológicamente adecuados y/o agentes complejantes, tales como tensioactivos y ciclodextrinas. Las emulsiones de aceite en agua también son formulaciones adecuadas para formulaciones parenterales. Aunque tales soluciones preferiblemente se administran por vía intravenosa, también pueden administrarse mediante una inyección subcutánea o intramuscular.
- 30 Las formulaciones adecuadas para la administración rectal preferiblemente se proporcionan como supositorios de dosis unitarias que comprenden el ingrediente activo en uno o más portadores sólidos que forman la base del supositorio, por ejemplo, mantequilla de cacao.
- 35 Las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica o intranasal incluyen ungüentos, cremas, lociones, pastas, geles, sprays, aerosoles y aceites. Los portadores adecuados para tales formulaciones incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, y combinaciones de los mismos.
- 40 Las formulaciones de la invención pueden prepararse por cualquier método adecuado, normalmente mediante el mezclado uniforme y a fondo del compuesto activo con líquidos o portadores sólidos divididos, o ambos, en las proporciones requeridas y, posteriormente, si es necesario, formando la mezcla resultante en la forma deseada.
- 45 Por ejemplo, un comprimido se puede preparar al comprimir una mezcla de un polvo o gránulos del ingrediente activo y uno o más ingredientes opcionales, tales como un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente dispersante activo en la superficie, o al moldear una mezcla del ingrediente activo en polvo y un diluyente inerte líquido.
- 50 Las formulaciones adecuadas para la administración por inhalación incluyen polvos o neblinas de partículas finas que pueden generarse mediante diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados de dosis medida.
- 55 Para la administración pulmonar por la boca, el tamaño de partícula del polvo o las gotas normalmente está en el rango de 0,5-10 μm , preferiblemente 1-5 μm , para garantizar la administración al árbol bronquial. Para la administración, se prefiere un tamaño de partícula en el rango de 10-500 μm , para asegurar la retención en la cavidad nasal.
- 60 Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados, que normalmente contienen una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante el uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido, normalmente de 10 a 150 μl , para producir un spray de partículas finas 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 adicionalmente uno o más co-disolventes, por ejemplo, tensioactivos de etanol, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitán, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.
- 65 Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una neblina de aerosol terapéutico por medio de la aceleración de un gas comprimido, normalmente

aire u oxígeno, a través de un orificio de Venturi estrecho, o por medio de agitación ultrasónica. Las formulaciones adecuadas para uso en nebulizadores consisten del ingrediente activo en un portador líquido y comprenden hasta 40% p/p de la formulación, preferiblemente menos de 20% p/p. El portador normalmente es agua o una solución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente hecha isotónica con los fluidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara de forma estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes amortiguadores y tensioactivos.

Las formulaciones adecuadas para administraciones por insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden suministrarse por medio de un insuflador o pueden aplicarse en la cavidad nasal como un rapé. En el insuflador, el polvo se encuentra contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente hechos de gelatina o plástico, que se perforan o abren en el sitio, y el polvo se administra por aire aspirado a través del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba operada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste ya sea solamente del ingrediente activo o de una mezcla en polvo que comprende el ingrediente activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El ingrediente activo normalmente comprende de 0,1 a 100 p/p de la formulación.

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

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como limitativos del alcance de la invención

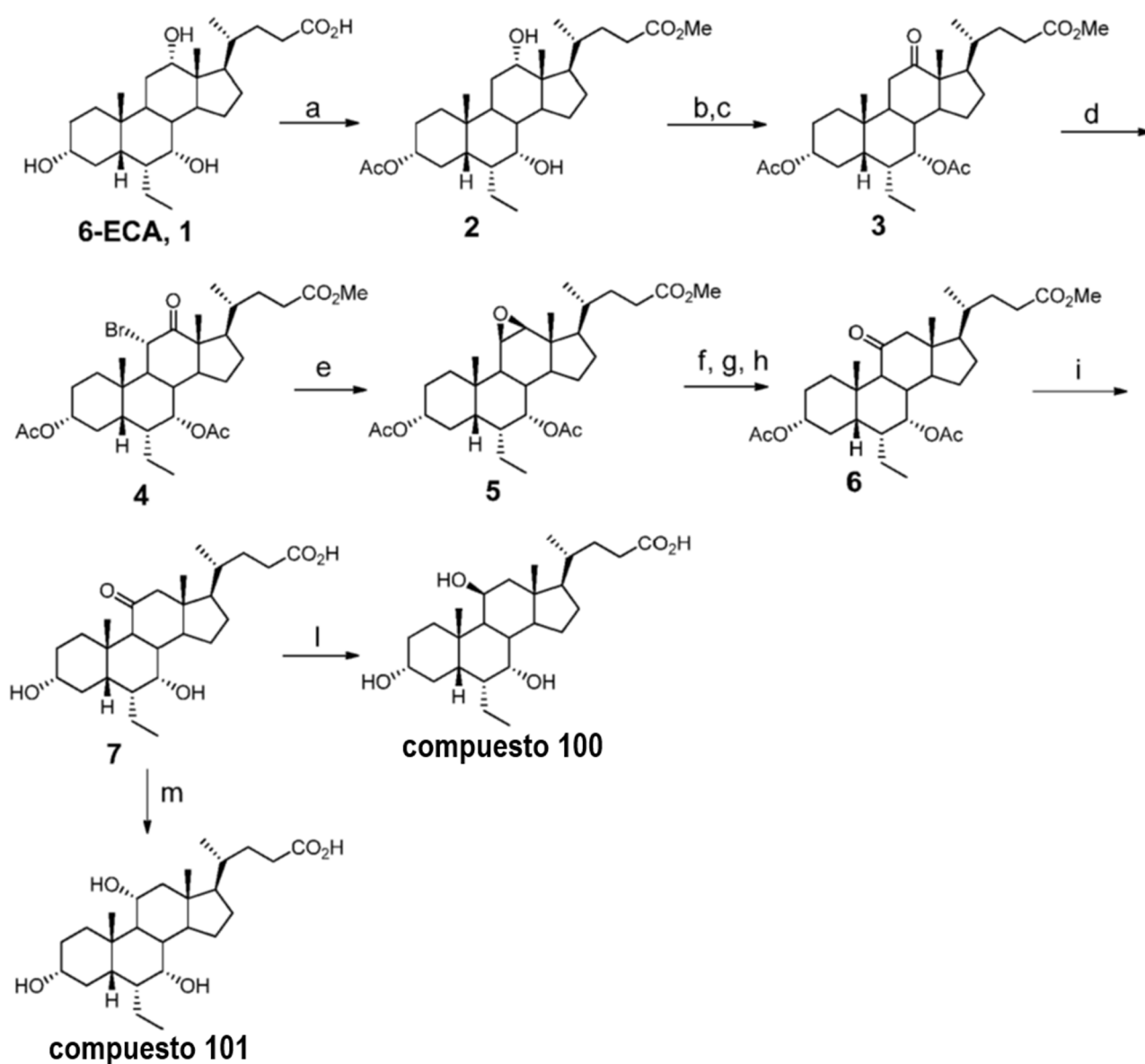
25 **Ejemplos**

En general, el potencial de un compuesto de la invención como un candidato de fármaco puede analizarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la validación *in vitro* de FXR: se puede evaluar su actividad y selectividad usando un ensayo AlphaScreen (ensayo bioquímico); la expresión de genes se puede evaluar usando RT-PCR (gen objetivo de FXR); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) se puede evaluar usando el contenido de ATP, liberación de LDH, y la activación de Caspasa-3. Para la validación *in vitro* de TGR5: se puede evaluar su actividad y selectividad usando un ensayo HTR-FRET (ensayo basado en células); la expresión de genes se puede evaluar usando RT-PCR (gen objetivo de TGR5 (es decir, cFOS)); y la citotoxicidad (por ejemplo, HepG2) se puede evaluar usando el contenido de ATP, liberación de LDH, y la 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 puede estudiarse usando métodos conocidos en la técnica.

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos 100 y 101

40 Los Compuestos 100 y101 se sintetizaron de acuerdo con el esquema a continuación.

Esquema 1



Reactivos y condiciones: a) 1) MeOH, *p*-TSA, ultrasonido, 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 la noche, 74%; e) NaBH₄, NaOAc, Pyr, TA, 2 días, 80%; f) HI 57%, AcOH, TA 30 min; g) CrO₃, AcOH, TA 45 min; h) polvo de Zn, NaOAc, reflujo 20 min; i) NaOH 2M, MeOH, TA durante la noche, 65% del compuesto 5; l) 1) NaBH₄, THF/H₂O 4:1, 70%; m) Na(s), *sec*-BuOH, 50 °C, 70%.

La síntesis se basa en el uso de 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 bajo irradiación de ultrasonido para proporcionar el éster de metilo correspondiente, que se protegió selectivamente en la posición C3 mediante reflujo con Ac₂O en la presencia de NaHCO₃ en THF para proporcionar el compuesto 2. Tratar el compuesto 2 con PCC en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, seguido por tratamiento con Ac₂O, Bi(OTf)₃ en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente proporcionó el producto intermedio 3 α ,7 α -diacetoxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (compuesto 3; aproximadamente 48% del compuesto 2).

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

El Compuesto 7 se redujo estereoselectivamente en el C11-carbonilo 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% del compuesto 3), tras la 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 la purificación.

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

10 En el núcleo, los receptores nucleares unidos a ligandos (NR, por sus siglas en inglés) modulan el inicio de la transcripción al interactuar directamente con la maquinaria transcripcional basal o al entrar en contacto con factores de empalme denominados 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 ligandos de NR con sus coactivadores se produce entre la función de activación 2 (AF-2, por sus siglas en inglés), ubicada en el dominio de unión ligando del receptor (LBD, por sus siglas en inglés) y las cajas receptoras nucleares (caja NR) ubicadas 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 característico 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).

20 El ensayo de AlphaScreen se usó con el fin de identificar moduladores novedosos al aprovechar la interacción bimolecular que prevalece entre FXR y el motivo LXXLL presente en la caja NR del coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC-1, por sus siglas en inglés).

25 El FXR-LBD-GST humano se incubó con concentraciones crecientes de los ligandos indicados en presencia de péptido LXXLL SRC-1 biotinilado. La señal AlphaScreen se aumenta cuando se forma el complejo de receptor-coactivador. Los valores de EC₅₀ fueron 8,9 μ M para el 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 resultado son la \pm DE media de las muestras por triplicado de un experimento representativo de tres que se llevaron a cabo. El ensayo AlphaScreen es un ensayo altamente robusto y reproducible, como se muestra por el factor Z' factor de 0,84 (Zhang JH, et al., *J Biomol Screen* 1999; 4:67-73). Por lo tanto, el Compuesto 100 es un agonista de FXR altamente potente.

30 Además, los datos en la tabla a continuación 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 (cAMP) TGR5 humano (células NCI-H716)	Sobreexpresión de HTR-FRET (cAMP) TGR5 humano
	Ref. CDCA = 15 \pm 3 μ M	Ref. LCA = 7 \pm 3 μ M	Ref. LCA = 0,9+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 el FXR y no activa 13 otros receptores nucleares involucrados en las vías metabólicas.

Tabla 2

Compuesto (Estándar de referencia)	Activación de FXR	Activación de LXR α	Activación de PXR	Activación de CAR	Activación de PPAR α	Activación de PPAR δ	Activación de PPAR γ
	(CDCA = 10-20 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(T0901317 = 0,08 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(SR-12183 = 0,062 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(CITCO = 0,005 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(GW7647 = 0,003 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(GW0742 = 0,004 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(GW1929 = 0,012 μ M) EC ₅₀ (μ M)
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 (Estándar de referencia)	Activación de RAR α	Activación de VDR	Activación de TR	Activación de PR	Activación de RXR	Activación de GR	Activación de ER
	(ATRA = 0,001 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(DiHidroxi VitD3 = 0,005 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(T3 = 0,0001 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(Corticosterona = 0,050 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(9cisRA = 0,004 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(Budesonida = 0,0002 μ M) EC ₅₀ (μ M)	(Estradiol = 0,001 μ M) EC ₅₀ (μ M)
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

La activación de FXR por el Compuesto 100 también se analizó en ensayos de transactivación basados en células con el uso de una 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, lo que indica 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 FXR sin exposición al compuesto A o Compuesto 100. Los valores se representan en μM .

Los ácidos biliares (BA, por sus siglas en inglés) no sólo modulan varios receptores hormonales nucleares, sino que también son agonistas para el receptor acoplado a proteínas 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 mediante FXR y TGR5 modula varias vías metabólicas, regulando no sólo 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, el Compuesto 100 y otros compuestos de comparación se analizaron con respecto a un aumento de cAMP intracelular como una lectura para la activación de TGR5. Las células NCIH716 enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 constitutivamente se expusieron a concentraciones crecientes del Compuesto 100, y los niveles de cAMP intracelulares se midieron mediante TR-FRET. El ácido litocólico (LCA) se usó como control positivo.

Como se muestra en la Figura 2A, el Compuesto 100 no induce actividad de TGR5 en células que expresan el receptor fisiológicamente, ya que no se observó ningún cambio en el nivel de cAMP intracelular. Para evaluar adicionalmente si el Compuesto 100 podría unirse a TGR5, una línea celular clonal que sobreexpresa TGR5 se expuso 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 efectos relevantes. La Figura 2A es un gráfico que muestra la actividad TGR5 del Compuesto 100 (sin actividad) y LCA en células enteroendocrinas humanas que expresan TGR5 a nivel fisiológico. Los resultados se muestran como la $\pm\text{DE}$ media de las muestras por triplicado de un experimento representativo de tres que se llevaron a cabo. La Figura 2B es un gráfico que muestra la actividad TGR5 del Compuesto 100 (sin actividad) y LCA en células de ovario de hámster chino (CHO) humanas que sobreexpresan TGR5.

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

Para evaluar la capacidad del Compuesto 100 de modular los genes objetivo de FXR, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR cuantitativos. Las células HepG2 se seleccionaron como una línea celular relevante para determinar si un compuesto de la invención puede regular la red genética de FXR endógena. La habilidad de un compuesto de la invención de inducir los genes objetivo de FXR se evaluó mediante el aislamiento del ARN total de células tratadas durante la noche con $1\mu\text{M}$ de los compuestos A, B y 100. El Compuesto A se estableció como un potente agonista de FXR selectivo, y el compuesto B se estableció como un potente agonista dual de FXR/TGR5. El perfil de activación de genes en células HepG2 del Compuesto 100 se comparó con los perfiles de los compuestos A y B (Pellicciari, R, et al., J Med Chem. 2002; 15 Ago; 45: 3569-72; Rizzo, G, et al., Mol. Pharm., 2010; 78: 617-630).

FXR regula la expresión de varios genes objetivos involucrados en la homeostasis de BA. Brevemente, FXR juega un papel principal en varias vías metabólicas, incluyendo, por ejemplo, metabolismo de lípidos, metabolismo de ácidos biliares, y metabolismo de carbohidratos. Con respecto al perfil de la expresión de genes, los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos incluyen, por ejemplo, APOCII, APOE, APOAI, SREBP-1C, VLDL-R, PLTP y LPL; los genes que codifican proteínas involucradas 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 proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos incluyen, por ejemplo, PGC1 α , PEPCK y GLUT2.

Como se muestra en las Figuras 3A-3H, la activación de FXR del Compuesto 100 reprime indirectamente la expresión de las enzimas biosintéticas BA CYP7A1 al aumentar los niveles del receptor nuclear SHP en el hígado y el intestino, y al aumentar el nivel de FGF19 (Goodwin, B, et al., Mol. Cell 2000; 6: 517-526). El FXR activado por el Compuesto 100 también regula positivamente la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de ácido biliar BA, incluyendo, BSEP, así como OST α y OST β . Los BA sintetizados recientemente se conjugan con taurina o glicina, y posteriormente se secretan activamente en la vesícula biliar, FXR regula estos dos importantes procesos. Los ácidos biliares conjugados monoaniónicos y dianiónicos posteriormente son secretados activamente en la vesícula biliar por BSEP y la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2, por sus siglas en inglés), 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 gran importancia 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.* 2012; 13 Sep).

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). Cabe notar que en las Figuras 3A-3H, el eje y muestra cambios en número de veces en la expresión relativa a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres replicas.

La activación de FXR contribuye a revertir el transporte del colesterol, un proceso que da como resultado la administración de colesterol de tejidos periféricos al hígado para la eliminación biliar y 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, por sus siglas en inglés), responsable de la transferencia de fosfolípidos y colesterol de LDL a HDL, lipoproteínas hepáticas, tales como ApoE, ApoC1, ApoC-IV, y receptor eliminador B1(SRB1, por sus siglas en inglés), que está involucrado con la captación hepática de HDL.

El FXR controla el metabolismo de triglicéridos (TG) al regular la lipogénesis *de novo* hepática y la depuración de triglicéridos. Tras la activación por el Compuesto 100, el FXR regula a la baja la expresión de SREBP-1c, un factor de transcripción que juega un papel importante en la estimulación de la síntesis de ácidos grasos y lipogénesis (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 la depuración de TG. Este efecto reductor de TG adicional de FXR se explica a nivel molecular por la inducción de genes clave, tales como Apo-C11 LPL y receptor de VDL (Kast, HR, et al., *Mol Endocrinol* 2001; 15, 1720-8).

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la actividad del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en la regulación de PLTP involucrado en el metabolismo de los lípidos (A), SREBP-1C (B), APOCII (C), y PPAK γ (D). Cabe notar que en las Figuras 4A-4D, el eje y muestra cambios en número de veces en la expresión relativa a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres replicas.

El FXR también puede jugar un papel en el metabolismo de carbohidratos. (Ma K, et al., *J Clin Invest.* 2006; 116:1102-9). La regulación del gen PEPCK se estudió (Figura 5) utilizando el Compuesto 100.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la regulación del Compuesto 100 y otros compuestos de comparación en el gen PEPCK. El eje y muestra cambios en número de veces en la expresión relativa a las células no tratadas. Los datos se normalizaron en relación con B2M. Las barras de error muestran el error estándar de las tres replicas.

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

Tabla 3

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

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

Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* del Compuesto 100, se emplearon dos métodos de ensayo diferentes. Los ensayos evaluaron la viabilidad celular al medir los niveles de ATP y la citotoxicidad al medir la liberación de LDH. El nucleótido trifosfato de adenosina (ATP) representa la fuente de energía en el nivel molecular básico, ya que se trata de una molécula multifuncional que se utiliza en todas las células como una co-enzima 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 ha denominado como la "unidad de divisa molecular" cuando se trata de transferencia de energía intracelular. Lo anterior es para asegurar el importante papel de ATP en el metabolismo, y una caída en el contenido de ATP es el primer paso para revelar el daño celular (Storer RD, et al., Mutation Research, 1996; 368, 59 - 101; Cree IA, Andreotti PE., Toxicology in Vitro, 1997; 11, 553 - 556).

La viabilidad celular se determinó como una media de ATP intracelular relativo al tiempo de exposición y concentración de los compuestos de prueba (Sussman, NL.; Promega Cell Notes, Issue 3. 2002).

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

Un método adicional para determinar la viabilidad de las células es detectar la integridad de la membrana que define la compartimentalización celular. La medición de la fuga de componentes fuera del citoplasma, en membranas celulares dañadas, indica la pérdida de integridad de la membrana y la liberación de LDH es el método utilizado para determinar toxicidad común en las células. Las células HepG2 se trataron con el Compuesto 100, se realizaron diluciones en serie, se añadieron diluciones de LCA a las células en placa como un control de ensayo junto con no células y células no tratadas. El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada concentración de compuesto de prueba.

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

Tabla 4

Compuesto	Integridad de la membrana EC ₅₀ (μM) (medida de LDH)
Tamoxifeno	35 \pm 10
LCA	75 \pm 5
Compuesto A	190 \pm 30
Compuesto B*	670
Compuesto 100	Sin toxicidad (100% células vivas)
Compuesto 101	Sin toxicidad (100% células vivas)

* Rizzo et al., Mol. Pharm. 2010

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

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

Para determinar la interacción entre el Compuesto 100 y las enzimas del citocromo P450, el Compuesto 100 se analizó por su capacidad para inhibir (o no) la producción de una señal fluorescente, usando proteínas 450 recombinantes (baculosomas; Invitrogen), sustratos e inhibidores (Bidstrup, TB, et al., Br J Clin Pharmacol, 2003; 56(3): p. 305-14). Como un control positivo, se probó en la misma placa un inhibidor selectivo para cada isoforma de CYP450.

Tabla 5

CPY450	Compuesto A IC ₅₀ (μM)	Compuesto B IC ₅₀ (μM)	Compuesto 100 IC 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	>10	>10	>10

Referencia. Sulfafenazol = 0,4µM			
CYP2C19	>10	>10	>10
Referencia. Miconazol = 0,06µM			
CYP2D6	>10	>10	>10
Referencia. Quinidina = 0,01µM			
CYP2E1	>10	>10	>10
Referencia. DCC = 0,4µM			

IC₅₀ > 10 µM significa que el compuesto no inhibe el CYP450. Los resultados obtenidos demostraron que el Compuesto 100, como los compuestos A y B, no inhibe las enzimas del Citocromo P450 analizadas, lo que muestra que es poco probable que el Compuesto 100 sea influenciado por efectos de las interacciones farmacológicas. (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, empleó el ensayo de polarización de fluorescencia de hERG Predictor™, ya que proporciona un método eficiente para una determinación inicial de la propensión de los compuestos de prueba para bloquear el canal hERG (Dorn, A, et al. J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47). El ensayo se basó en el supuesto de que la actividad del canal de potasio hERG contribuye al potencial de membrana en reposo en células transfectadas permanentemente, y, por lo tanto, un bloqueo de los canales hERG debería dar como resultado la despolarización de la membrana celular. El ensayo se diseñó para identificar potenciales bloqueadores del canal hERG al producir datos que se correlacionan precisamente con estudios de electrofisiología de fijación de membrana. Los resultados del ensayo Predictor demostraron una correlación alta con los obtenidos de las técnicas de fijación de membrana (Tabla 6) (Dorn, A, et al. J Biomol Screen, 2005; 10(4): 339-47).

Tabla 6

Compuesto	Fijación de membrana*	Radioligando*	FP
	IC ₅₀ (nM)		
Asternizol	1,2	1	1,3
Dofetilida	12	40	6,9
Terfenadina	16	30	23
E-4031	48	20	34
Bepridil	550	170	210
Tioridazina	1250	510	708
Fluoxetina	990	2230	4310
Amitriptilina	10000	2440	11200

La Tabla 6 muestra la comparación de los valores IC₅₀ generados con el ensayo de polarización de fluorescencia de hERG Predictor™ con valores IC₅₀ reportados de ensayos de fijación de membrana y desplazamiento de radioligandos.

Las preparaciones de membrana para las células de de ovario de hámster chino transfectadas establemente con canal de potasio se usaron para evaluar el efecto inhibitorio potencial del Compuesto 100 en este canal usando el ensayo de polarización de fluorescencia de Predictor. La reducción en la polarización de membrana como resultado de la inhibición del canal de potasio hERG se correlaciona directamente con una reducción de la polarización de fluorescencia (FP, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que, al igual que los compuestos A y B, el Compuesto 100 no bloquea ni inhibe el cana de potasio hERG.

El ensayo se realizó en triplicado usando una dosis-respuesta de 16 puntos del compuesto de prueba y los controles positivos E-4031 y Tamoxifeno. Se obtuvo una IC₅₀ de 15 nM (ΔmP = 163) para E-4031 y de 1,4 µM (ΔmP = 183) para Tamoxifeno. La ventana de ensayo de más de 100 mP (milipolarización) se considera buena. El valor Z' fue de 0,78, que indica un ensayo excelente. Las curvas de regresión no lineal se obtuvieron mediante el análisis de GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), para calcular lo valores IC₅₀.

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

Notablemente, aunque potencialmente activó el FXR, el Compuesto 100 no mostró actividad contra otros receptores nucleares y no activo el GPCR TGR5 de ácido biliar. Además de una selectividad de receptor nuclear alta, el Compuesto

100 posee un perfil farmacológico adecuado para un candidato de fármaco. El Compuesto 100 no muestra efectos citotóxicos en células hepáticas HepG2 humanas, lo que indica una falta de toxicidad hepática, y no inhibe ninguna de las enzimas de CYP450 analizadas, lo que indica que el Compuesto 100 está libre de un riesgo de interacciones farmacológicas significativo. Además, el Compuesto 100 no inhibe el canal de potasio ERG humano.

La selectividad y potencia combinadas del Compuesto 100 junto con sus propiedades similares a fármaco favorables, en particular un excelente perfil de seguridad, hacen del Compuesto 100 un candidato atractivo para tratar y prevenir una enfermedad.

Ejemplo 7: Propiedades fisicoquímicas del Compuesto 100

Las propiedades fisicoquímicas del Compuesto 100, tales como hidrosolubilidad, 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).

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	hs	3,0	-	0,9
TUDCA	hs	2,2	-	1,1
Compuesto A	9	2,9	43,2-48,8	2,5
Compuesto B	hs	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 : hidrosolubilidad se refiere a BA como especies protonadas y, por lo tanto, no evaluadas para el Compuesto B, TCDCA y TUDCA, que son altamente solubles (hs, por sus siglas en inglés);

^b CMC: Concentración micelar crítica determinada en solución de agua 0,15 M NaCl;

^c ST_{CMC} : Tensión superficial a CMC en solución de agua 0,15 M NaCl;

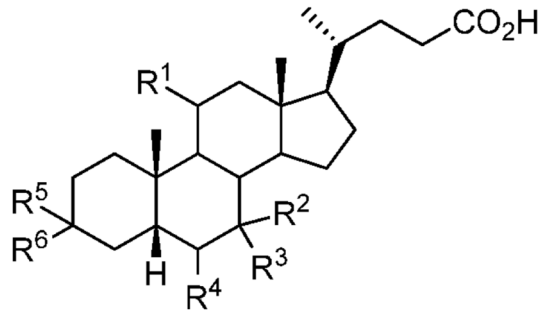
^d LogP_A : Coeficiente de partición de 1-octanol-agua de los ácidos biliares estudiados como especies ionizadas;

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

A los modelos *in vivo*, ratas, se les administró una sola dosis del Compuesto 100 a 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 la administración *id* e *iv*. La Figura 7B es un gráfico que muestra la secreción del Compuesto 100 a lo largo del tiempo para la administración *id* e *iv*. La Figura 7C es un gráfico que muestra la concentración en plasma del Compuesto 100 a lo largo del tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I:



(I),

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

R¹ es hidroxilo;

R² es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^a;

R³ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^b;

R⁴ es alquilo, alquenoilo, alquinilo o halógeno, en donde dicho alquilo está sustituido o no sustituido con uno o más R^c;

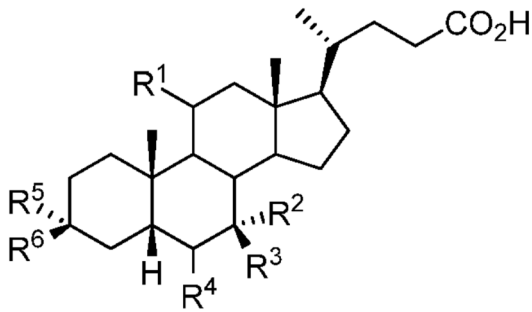
R^a, R^b y R^c son cada uno independientemente halógeno o hidroxilo;

R⁵ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno; y

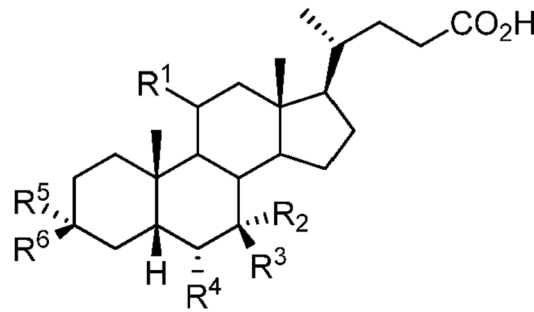
R⁶ es hidroxilo, OSO₃H, OSO₃⁻, OCOCH₃, OPO₃H₂, OPO₃²⁻, o hidrógeno;

o en conjunto R⁵ y R⁶ con el átomo de carbono al que están unidos forman un carbonilo, para uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis o uno o más síntomas de colestasis intrahepática o colestasis extrahepática.

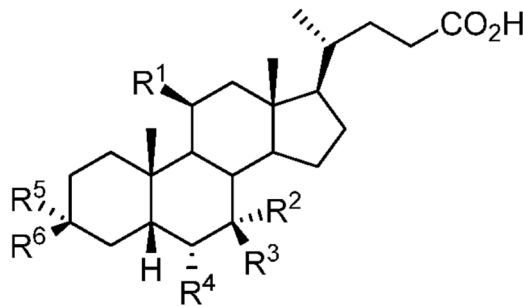
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



(II),



(III), o



(IV),

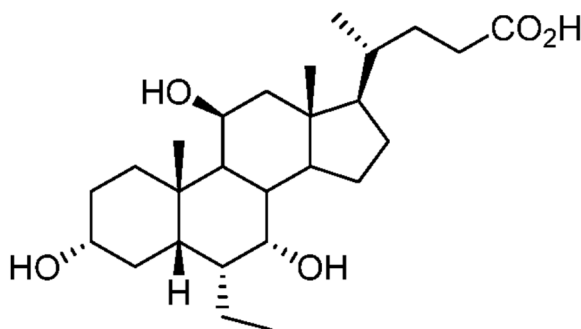
o una sal, solvato o conjugado de aminoácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde uno de R² o R³ es hidroxilo, y el R² o R³ restante es hidrógeno.

4. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde uno de R⁵ o R⁶ es hidroxilo, y el R⁵ o R⁶ restante es hidrógeno.

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

6. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R⁵ es hidroxilo y R⁶ es hidrógeno.
7. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R² y R⁵ son cada uno hidroxilo, y R³ y R⁶ son cada uno hidrógeno.
- 5 8. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R⁴ es alquilo.
9. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde R⁴ es alquilo no sustituido.
- 10 10. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde R⁴ es etilo.
11. El compuesto para uso de la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:



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

12. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis.
- 20 13. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en el tratamiento o la prevención de uno o más síntomas de colestasis intrahepática o colestasis extrahepática.
- 25 14. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde la fibrosis es fibrosis debido a afecciones o enfermedades patológicas, fibrosis debido a un trauma físico, fibrosis debido al daño por radiación, fibrosis debido a exposición a agentes quimioterapéuticos, fibrosis hepática, fibrosis del riñón, fibrosis del pulmón, o fibrosis del intestino.
- 30 15. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde la fibrosis es debido a una enfermedad seleccionada de cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hígado graso, obesidad, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística, hemocromatosis, hepatitis autoinmune y esteatohepatitis.
16. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde la fibrosis es fibrosis secundaria a cicatrices quirúrgicas, trauma físico accidental, quemaduras, o cicatrices hipertróficas.
- 35 17. El compuesto para uso de la reivindicación 13, en donde uno o más síntomas de colestasis intrahepática o colestasis extrahepática es atresia biliar, colestasis obstétrica, colestasis neonatal, colestasis inducida por fármacos o colestasis causada por la infección por hepatitis C.

Figura 1

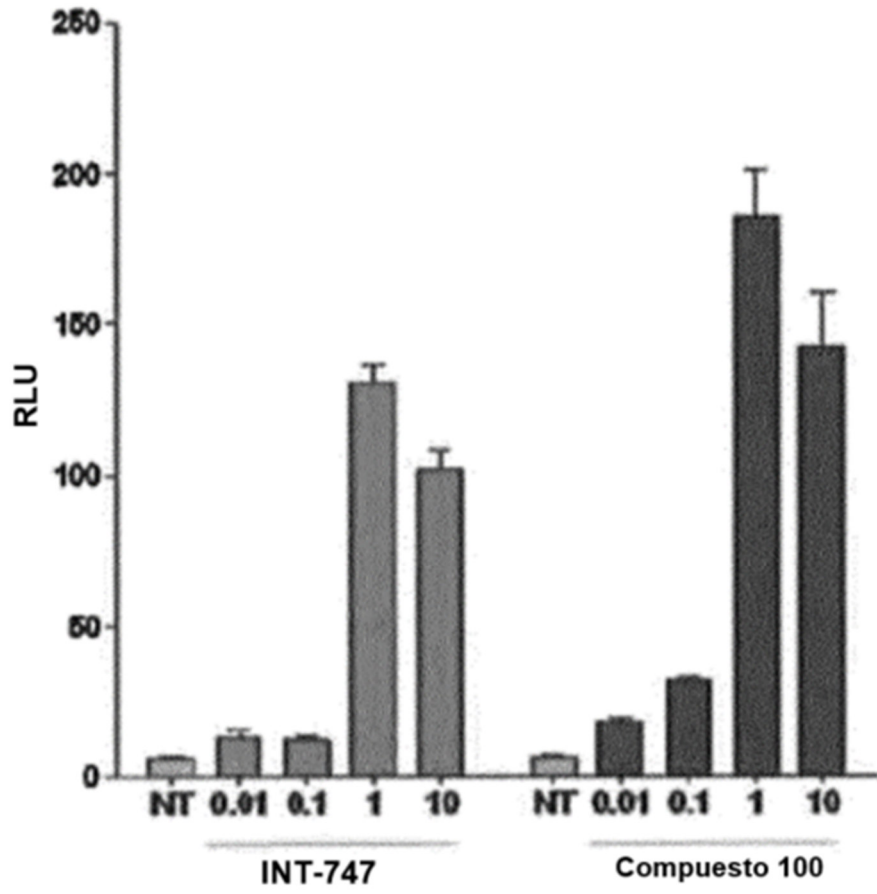
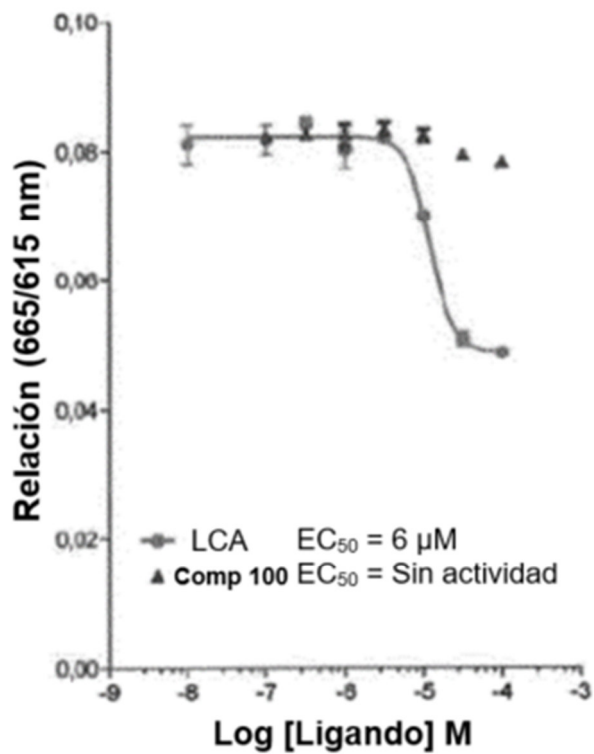


Figura 2

A



B

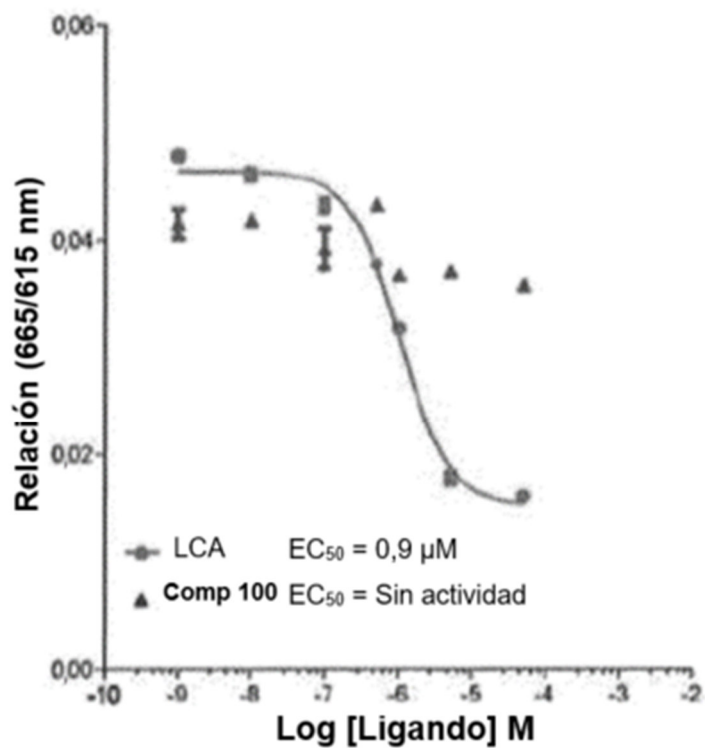


Figura 3

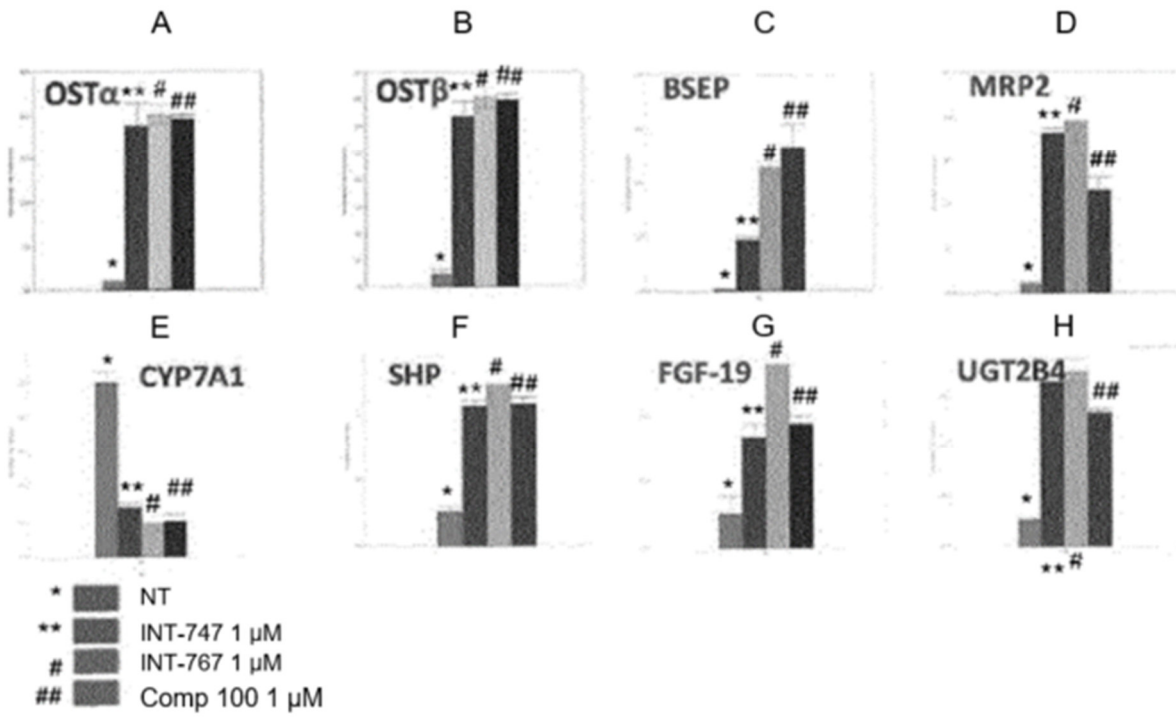


Figura 4

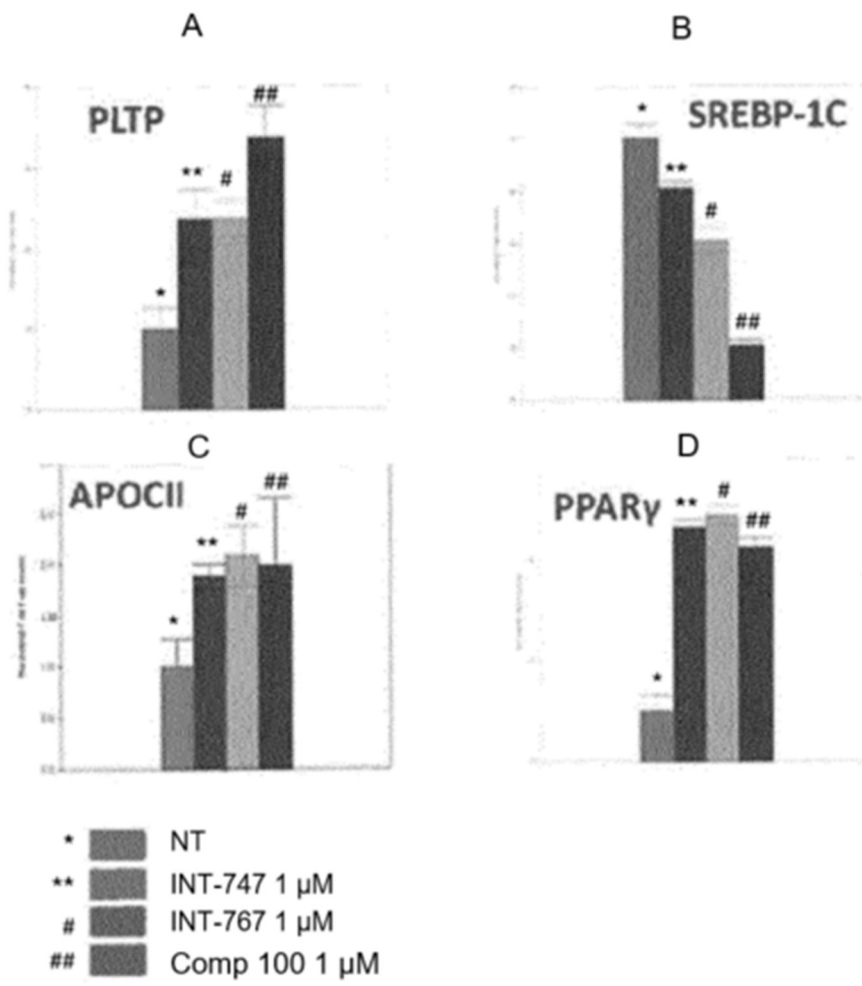
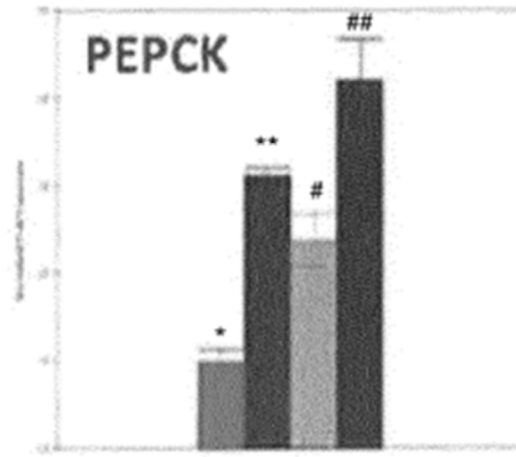


Figura 5



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

Figura 6

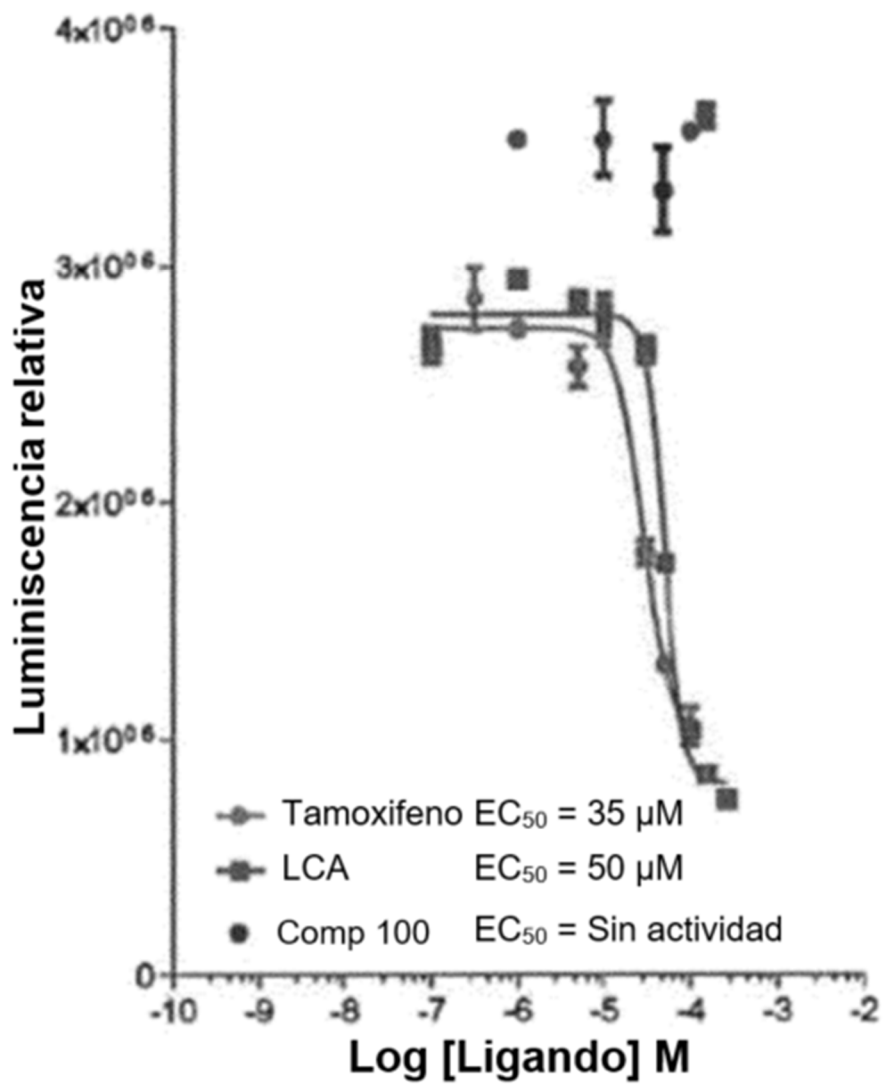
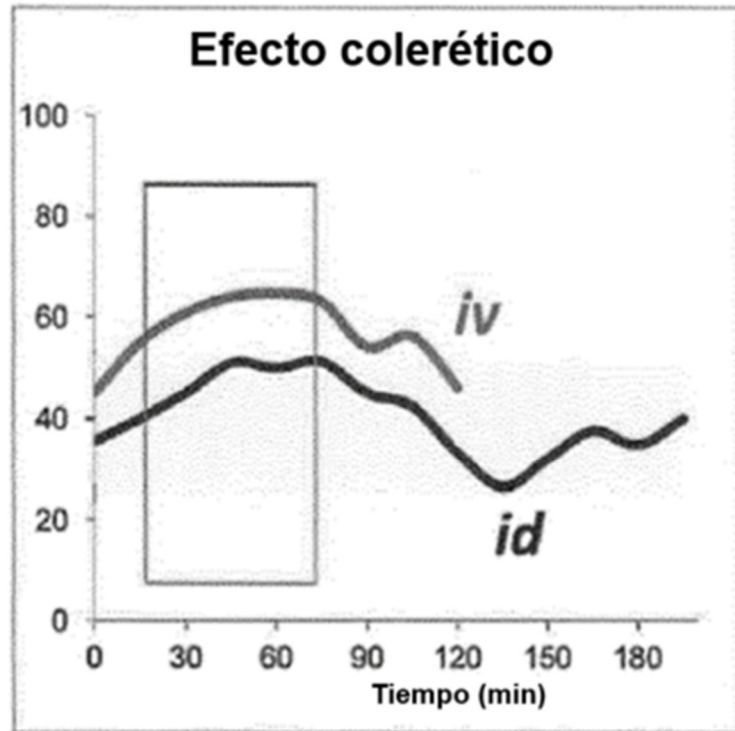
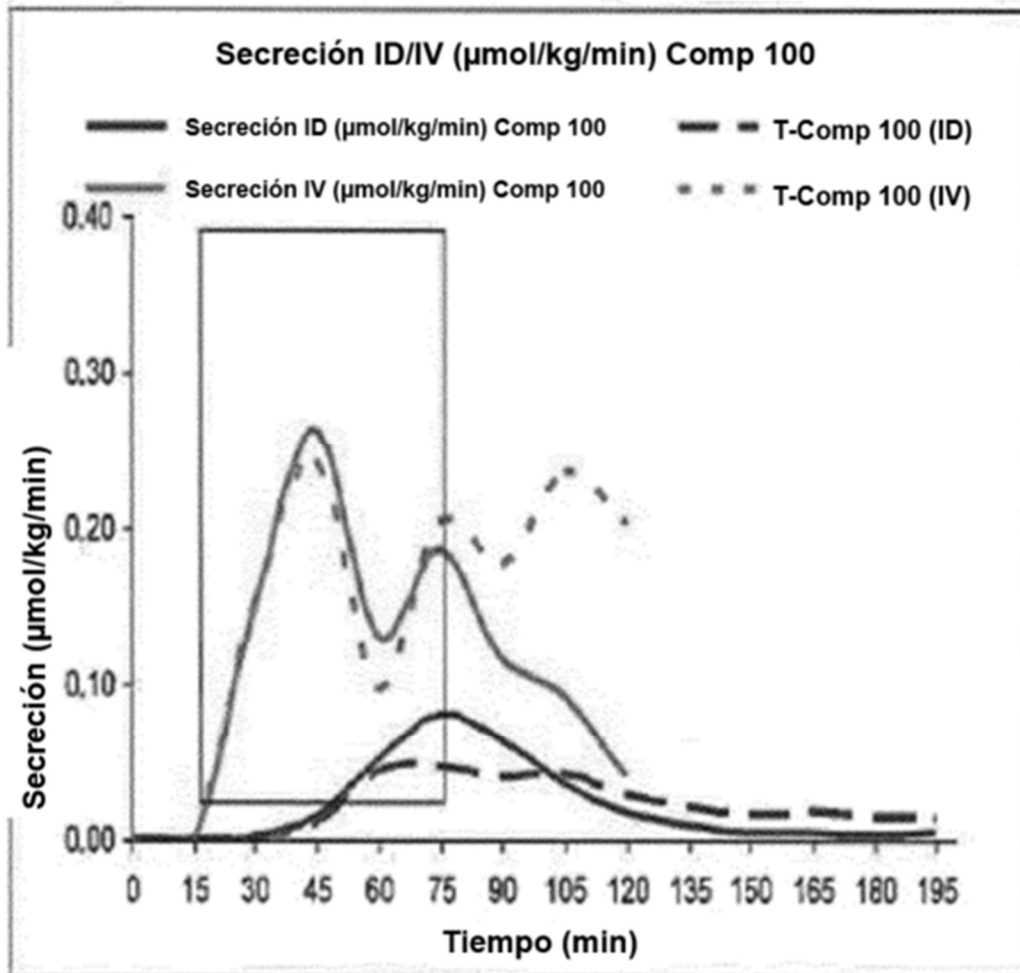


Figura 7

A



B



C

