



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 318 927**

② Número de solicitud: 200502693

⑤ Int. Cl.:

**C07J 41/00** (2006.01)

**C07J 75/00** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **25.08.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.05.2009**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio CACTUS - Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

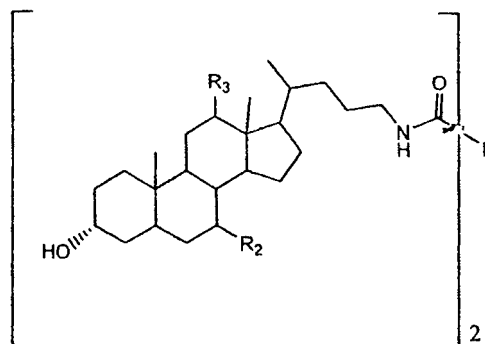
⑦ Inventor/es: **Vázquez Tato, José;  
Soto Tellini, Víctor Hugo;  
Trillo Novo, Juan Ventura;  
Meijide del Río, Francisco;  
Álvarez Alcalde, Mercedes;  
Antelo Queijo, Álvaro;  
Carrazana García, Jorge y  
Jover Ramos, Aída**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Nuevos dímeros de ácidos biliares funcionalizados en la posición 24 de la cadena alquílica de la sal biliar. Procedimientos para su obtención y aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Nuevos dímeros de ácidos biliares funcionalizados en la posición 24 de la cadena alquílica de la sal biliar. Procedimientos para su obtención y aplicaciones. Los nuevos compuestos resultan de la conjugación de 24-amino-derivados de ácidos biliares naturales, cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico con compuestos de carácter ácido activados que actúan como puente de unión entre los dos esteroides. Los puentes utilizados son los derivados de los compuestos: N,N'-1,2-etanodilbis[N(carboximetil), 1,1'-dimetil éster]glicina; ácido, 1,4-dimetil éster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico; ácido 1,5-dimetil éster-1,2,4,5-bencenetetracarboxílico; y N,N-bis[2-(2,6-dioxo-4-morfolinil)etil]glicina. Los procedimientos empleados para la preparación de los derivados anteriores, consisten en reacciones; (1) del grupo amino del ácido biliar con un cloruro de ácido; (2) del grupo amino del ácido biliar con un ácido activado con especies como DEPC o HOBT/DCC o DIC; y (3) del grupo amino del ácido biliar con un anhídrido. A partir de los ácidos sintetizados, se obtienen las sales sódicas y potásicas.



ES 2 318 927 A1

## DESCRIPCIÓN

Nuevos dímeros de ácidos biliares funcionalizados en la posición 24 de la cadena alquílica de la sal biliar. Procedimientos para su obtención y aplicaciones.

5

**Sector de la técnica**

La presente invención describe nuevos compuestos tensioactivos, obtenidos a partir del acoplamiento de los 24-aminoderivados de ácidos biliares naturales con cloruros de ácido, anhídridos y ácidos carboxílicos. Esta modificación permite incrementar las superficies hidrófoba e hidrófila presentes por molécula y mejorar sus propiedades tensioactivas. De modo general, se conservan en cada sal biliar, el número original de funciones hidrófilas de tipo hidroxilo y ácido. En algún caso, por la naturaleza del puente empleado, se ha aumentado en uno el número de funciones de carácter ácido. Los nuevos tensoactivos son susceptibles de ser utilizados como tales de un modo aislado o en combinación con otros tensoactivos; como solubilizadores de sustancias con baja solubilidad en agua, como por ejemplo, colesterol; como fármacos, como excipientes o vectores de fármacos; o bien para otros usos típicos de este tipo de productos como, por ejemplo, antibacterianos, antifúngicos o precursores de fármacos, fármacos, productos de limpieza, cosmética, etc.

En particular, la presente invención describe nuevos dímeros de ácidos biliares resultantes de la conjugación de 24-amino-derivados de los ácidos biliares naturales con ácidos, cloruros de ácido y anhídridos, lo que permite incrementar las superficies hidrófoba e hidrófila presentes por molécula y mejorar sus propiedades tensioactivas. Por ácido biliar o sal de ácido biliar se entiende aquí cualquiera de los ácidos resultantes de la bioconversión o modificación química del colesterol, particularmente, los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico, ursodesoxicólico y litocólico (Figura 1).

25

**Estado de la técnica**

Los ácidos y sales biliares naturales son compuestos anfipáticos resultado final del metabolismo del colesterol. Por este motivo, y también por el hecho de que algunos de ellos (encontrados, por ejemplo, en algunos ciprínidos) son tóxicos, se ha prestado una gran atención a la determinación de sus propiedades fisicoquímicas (estructura, reactividad química, agregación en disolución acuosa, resolución de su estructura cristalina, etc.) y a su papel biológico (Nair, P.P. *et al.*: *The Bile Acids. Chemistry, Physiology, and Metabolism*. Volume I: Chemistry. New York, Plenum Press, 1971). Los ácidos cólico y desoxicólico son ejemplos representativos de esta familia de compuestos y están presentes en muchas especies de mamíferos (Hofmann A. F.: *Bile Acids. In The Liver. Biology and Pathobiology*. Third Edition. New York, Raven Press Ltd. I. M. Arias, *et al.*, eds., 1994). También pueden estar conjugados con glicina o taurina, siendo entonces más solubles en las condiciones de pH del intestino delgado, resisten la precipitación en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y no traspasan las membranas. Estas propiedades permiten que los ácidos biliares estén presentes en altas concentraciones en los tractos biliar e intestinal. La intervención de las sales biliares en la circulación enterohepática permite la intervención terapéutica de muchos fármacos (como por ejemplo, colestiramina) para reducir, por ejemplo, el nivel de colesterol en sangre. En algunos casos se producen efectos laterales no deseados como avitaminosis o bien varios desórdenes gastrointestinales. Por este motivo es necesario encontrar nuevos fármacos que sean capaces de reducir el contenido de colesterol aterogénico en sangre o mejorar la circulación enterohepática con respecto a incrementar la excreción de ácidos biliares y la consecuente reducción del nivel colesterol pero sin las desventajas que algunos fármacos presentan hasta el momento.

45

Los ácidos biliares naturales pueden ser modificados químicamente, ya que poseen funciones hidroxílicas que pueden estar en las posiciones 3, 7 y 12. Además poseen un grupo ácido en la posición 24 susceptible también de modificación. Entre los trabajos que han centrado su atención en la modificación en esta función carboxílica y que, por lo tanto, pueden considerarse los precedentes más inmediatos de la presente invención, cabe destacar el llevado a cabo en 1992 por Fini *et al.* (*Basic Cholane Derivatives. XI: Comparison between Acid and Basic Derivatives. J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726). Estos autores sintetizaron una serie de hidroxicolan-24-aminas a partir de ácidos biliares. Al igual que los ácidos biliares de partida, los aminoderivados se autoagregan en disolución acuosa formando micelas catiónicas. Los valores medidos de las concentraciones micelares críticas resultaron ser del mismo orden de magnitud que las de los correspondientes ácidos biliares. Sin embargo, la introducción de la función básica en la cadena lateral del residuo colánico aumentó su actividad antimicrobiana hacia cepas gram-positivas.

55

Más recientemente, se han sintetizado una serie de amidas en la posición 24 de los ácidos biliares que tienen la particularidad de formar geles termorreversibles en disolventes orgánicos y que también poseen actividad antimicrobiana (Willemen, H. M. *et al.* *N-Cholyl amino acid alkyl esters-a novel class of organogelators. Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2329; *Micelle formation and antimicrobial activity of cholic acid derivatives with three permanent ionic head groups. Angew. Chem. Mt. Ed.* **2002**, *41*, 4275; *Aggregation of different amino acid conjugates of cholic acid in aqueous solution. Colloids and Surfaces A* **2003**, *218*, 59; *A Small-Angle Neutron Scattering Study of Cholic Acid-Based Organogel Systems. Langmuir* **2004**, *20*, 2075). Otros derivados han sido propuestos como formadores de poros en liposomas y podrían ser utilizados para la dosificación de agentes terapéuticos (Chen, W.-H., Regen, S. L. *Thermally gated liposomes. J Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6538).

65

Otro tipo de compuestos muy importantes que dependen de la formación de amidas en la posición 24, son los llamados "colafanos" que son oligómeros cíclicos sintetizados a partir de dímeros de ácidos biliares con la posición 24

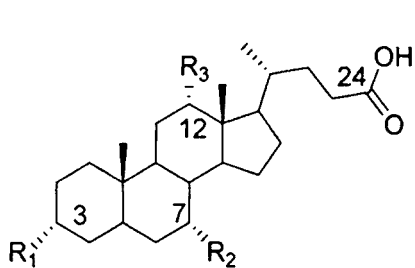
transformada en un grupo amida. Algunas de estas especies forman complejos con metales o bien pueden actuar como emuladores enzimáticos (Virtanen E. *et al.* *Multinuclear magnetic resonance, electrospray ionization time-of-flight mass spectral and molecular modelling characterization of lithocholic acid amide esters with various nitrogen heterocycles.* *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 567;  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, and  $^{15}\text{N}$ -NMR and ESI-TOF-MS studies of a supramolecular complex of silver(I) and a cholaphane. *J. Organometallic Chem.* **2003**, 668, 43; Ghosh, S. *et al.* *Selective and Unusual Fluoride Ion Complexation by A Steroidal Receptor Using  $\text{OH}^-$  F- and  $\text{CH}^-$  F- Interactions: A New Motif for Anion Coordination?* *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1441; Pramod S. *et al.* *Synthesis of cholic acid-based molecular receptors: head-to-head cholaphanes.* *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 918; Li, Y., Dias J. *Dimeric and Oligomeric Steroids.* *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 283; Khadga M. *et al.* *A New Generation of "Cholaphanes": Steroid-Derived Macrocyclic Hosts with Enhanced Solubility and Controlled Flexibility.* *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8463). Actualmente se están investigando sus posibles aplicaciones en el campo médico.

También se han descrito diversos oligómeros (fundamentalmente dímeros) de sales biliares por la posición 24. Así, Janout *et al.* han sintetizado diversos compuestos, recogidos bajo la denominación genérica de "paraguas", en las que las ácidos biliares se unen por su grupo ácido de la cadena lateral a un puente adecuado mediante un enlace amida (Molecular Umbrellas. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1573; *Design and Synthesis of Molecular Umbrellas.* *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640; *Molecular Umbrella-Assisted Transport of Glutathione Across a Phospholipid Membrane.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5401; *Ion Conductors Derived from Cholic Acid and Spermine: Importance of Facial Hydrophilicity on  $\text{Na}^+$  Transport and Membrane Selectivity.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7691; *Evidence for an Umbrella Mechanism of Bilayer Transport.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9926). Recientemente se han utilizado tetrámeros de tipo "paraguas" derivados del ácido cólico para aumentar la solubilidad del clorambucil. Los productos conjugados de este tipo se obtienen al generar una base de putrescina y espermidina a la cual se unen las sales biliares por la posición 24 y el clorambucil. Algunos de estos derivados poseen actividad contra la leucemia linfoblástica y las células de cancer de colon. (Vijayaraghavan, S. *et al.* *Nitrogen Mustard by Conjugation with Molecular Umbrellas.* *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 667). Por la facilidad de penetración del residuo biliar en las membranas celulares, se estudian actualmente otras moléculas "paraguas" como potenciales liberadores de aminoácidos y oligonucleótidos en células. Ello permite la penetración de especies polares a la célula que se incorporan en su metabolismo, con las consecuentes implicaciones en diversas terapias. (Jing, B. *et al.* *Fully Detachable Molecular Umbrellas as Peptide Delivery Agents.* *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 1191), así como de especies persulfatadas con actividad anti-HSV y anti-HIV (Jing, B. *et al.* *Persulfated Molecular Umbrellas as Anti-HIV and Anti-HSV Agents.* *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15930). En todos estos compuestos se ha perdido la función ácida original de los ácidos biliares.

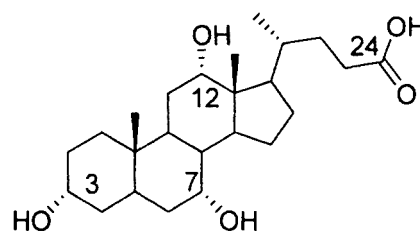
En la bibliografía se pueden encontrar numerosas patentes y aplicaciones relacionadas con sales biliares en distintos ámbitos. Así, por ejemplo, se han utilizado los ácidos biliares como residuos portadores de agentes quelatantes para ser utilizados como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (De Haen *et al.*, *Bile acids conjugates with metal ion chelates and the use thereof* N° de Patente WO 01/64708; Anelli, P. L. *et al.*, *Use of bile acid conjugates derivatives thereof with metal complexes as blood pool agents for nuclear magnetic resonance diagnostics.* US 6,461,588 (2002)). También han sido preparados diversos derivados como agentes antibacterianos (Shibagami M. *Preparation of steroid derivatives as antibacterial agents*, Application N° JP 2002-236988, Número de patente: JP 2004075599); antifúngicos (Salunke, D. B. *et al.*, *New Steroidal Dimers with Antifungal and Antiproliferative Activity.* *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6); o precursores de fármacos (Tolle-Sander, S. *et al.*, *Increased Acyclovir Oral Bioavailability via a Bile Acid Conjugate.* *Molecular Pharm.* **2004**, *1*, 40-48).

### Descripción de la invención

Como material de partida se utilizan ácidos biliares de origen natural (Figura 1). En lo que sigue CA identificará los residuos derivados del ácido cólico, DCA los del ácido desoxicólico, CDCA los del ácido quenodesoxicólico, UDCA los del ácido ursodesoxicólico y LCA los del ácido litocólico.



Fórmula general de los ácidos biliares naturales utilizados en esta invención



Ácido Cólico (CA,  $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\alpha\text{OH}$ ): Ácido [3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ]-3,7,12-trihidroxicolan-24-oico

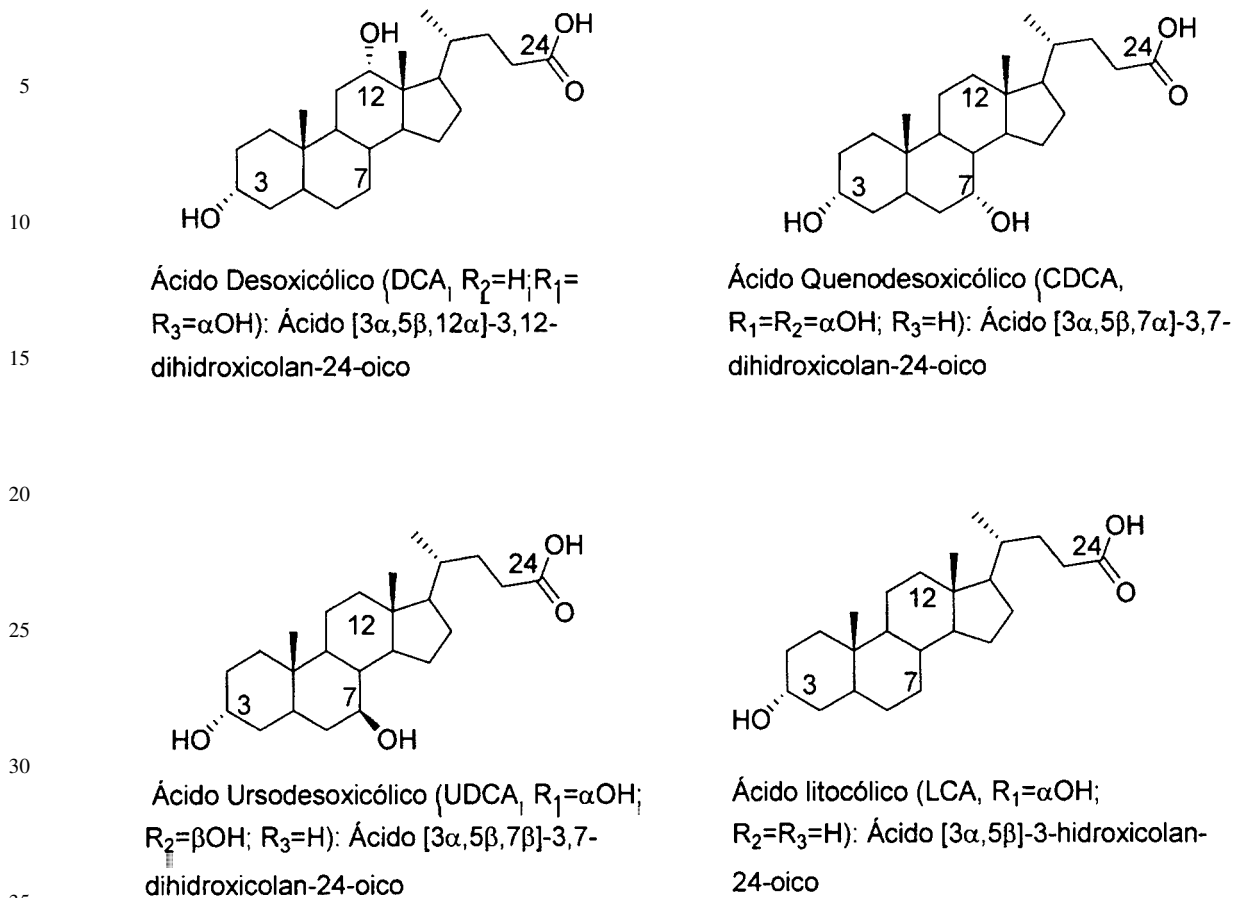


Figura 1. Estructura de los ácidos biliares de origen natural, nombres triviales, abreviaturas usadas y nombres IUPAC.

40

45

50

55

60

65

Los productos que se describen en la presente invención son nuevos dímeros derivados de los ácidos biliares anteriores cuya característica principal es la de ser dímeros en los que los ácidos biliares se unen a un puente (un dianhídrido, un diácido, un dicloruro) mediante grupos amina previamente introducidos en la posición 24. El esquema general de síntesis se muestra en la Figura 2. Como se puede ver, el proceso consta de tres etapas: la primera consiste en la sustitución del grupo carboxilo de la posición 24 del ácido biliar por un grupo amino, obteniéndose un 24-amino derivado. Posteriormente el 24-amino derivado se hace reaccionar con puentes alifáticos y aromáticos difuncionalizados con grupos ácido, anhídridos o dicloruro. Es en esta etapa en la que se produce el dímero. Para obtener el producto final se hidrolizan, de ser necesario, los dos grupos éster del puente. En el esquema descrito, y con respecto a los ácidos biliares naturales, las modificaciones objeto de la presente invención implican únicamente uno de los grupos sustituyentes (el grupo ácido de la posición 24), manteniendo los grupos remanentes sin modificar. Se reivindican los dímeros en su forma ácida y los procedimientos de su síntesis.

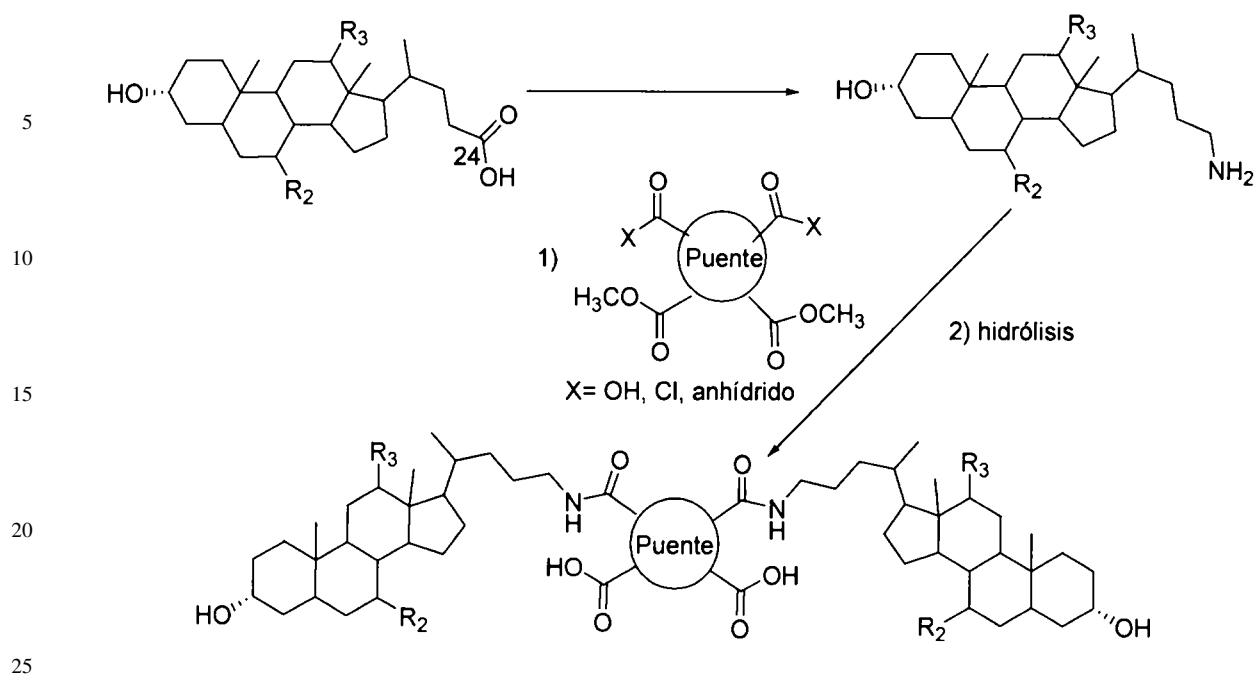


Figura 2. Esquema general de síntesis de los nuevos dímeros derivados de ácidos biliares naturales modificados en su posición 24 mediante un grupo amino y posterior reacción con una molécula puente mediante enlaces amida.  $R_2$  y  $R_3$  son los grupos sustituyentes indicados en la Figura 1.

Los dímeros así resultantes pueden transformarse en sus sales sódica o potásica por simple neutralización con la base correspondiente. Asimismo, se reivindican las sales sódica y potásica de los dímeros, y los procedimientos de su obtención, los cuales obedecen al esquema general de la Figura 3.

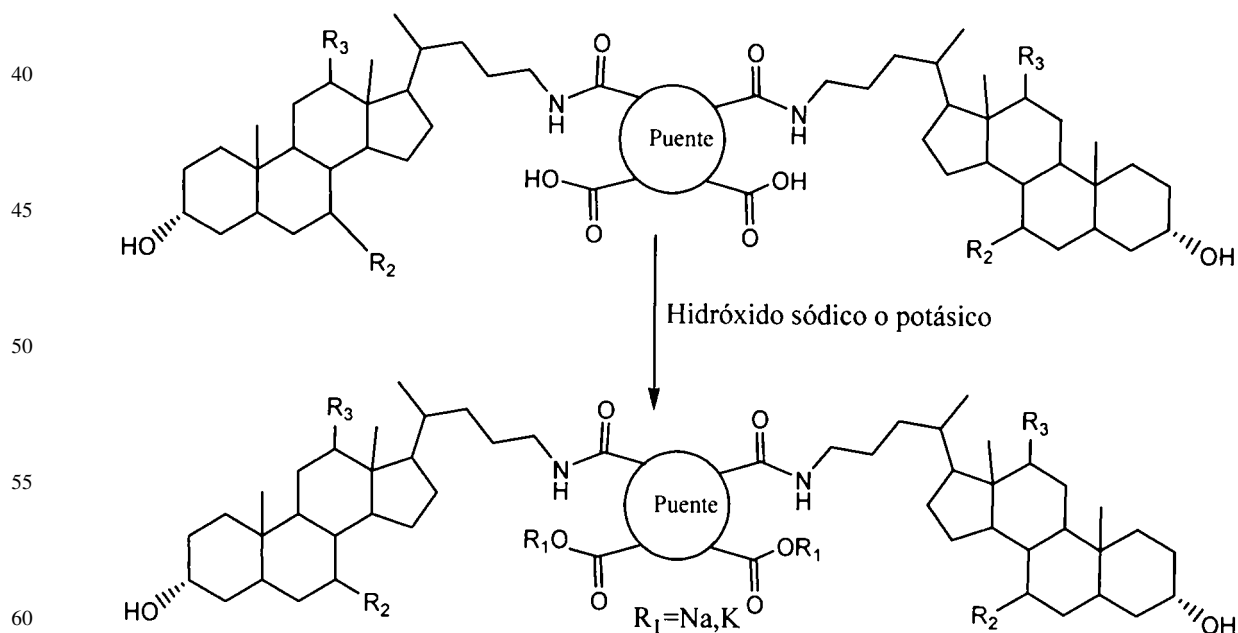


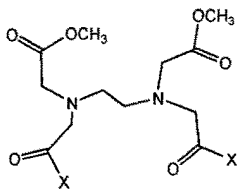
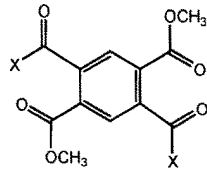
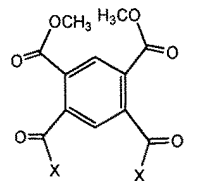
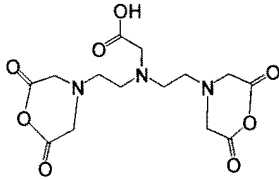
Figura 3. Esquema general de síntesis de las nuevas sales derivadas de los dímeros de los ácidos biliares naturales, sintetizados según el esquema general de la Figura 2.  $R_2$  y  $R_3$  son los grupos sustituyentes indicados en la Figura 1.

En la Tabla 1 se recogen los puentes de unión y los correspondientes productos químicos que, al reaccionar con los 24-aminoesteroides, darán como resultado los compuestos que, una vez hidrolizados, son objeto de reivindicación (Figuras 4-7).

5

TABLA 1

*Estructura del puente y especies reactivas (portadoras del puente) utilizadas en las reacciones con los 24-aminoesteroides para la formación de los dímeros. El sustituyente X puede ser OH o bien Cl*

N o	Estructura	Especies Reactivas	Comentarios
<u>1</u>		<p>X=OH: N,N'-1,2-etanodiilbis [N-(carboximetil)-1,1'-dimetil éster]glicina</p> <p>X=Cl: Dicloruro de N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetiléster]glicina</p>	<p>El diácido (X=OH) se sintetizó a partir del dianhídrido del AEDT y posterior solvolisis con metanol.</p> <p>El dicloruro se sintetizó a partir del diácido y cloruro de tionilo.</p>
<u>2</u>		<p>X=OH: Ácido 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-benzenotetracarboxílico</p> <p>X=Cl: 2,5-bis(clorocarbonil)-1,4-benzenodicarboxilato de dimetilo</p>	<p>Los productos se sintetizan a partir del dianhídrido piromielítico y posterior solvolisis con metanol.</p> <p>El dicloruro se sintetizó a partir del diácido y cloruro de tionilo.</p>
<u>3</u>		<p>X=OH: Ácido 1,5-dimetiléster-1,2,4,5-benzenotetracarboxílico</p> <p>X=Cl: 4,6-bis(clorocarbonil)-1,3-benzenodicarboxilato de dimetilo</p>	<p>El ácido se sintetiza a partir del dianhídrido piromielítico y posterior solvolisis con metanol.</p> <p>El dicloruro se sintetiza a partir del dianhídrido piromielítico, solvolisis con metanol y reacción con cloruro de tionilo.</p>
<u>4</u>		<p>N,N-bis[2-(2,6-dioxo-4-morfolinil)etil]glicina</p>	<p>El producto se puede obtener comercialmente.</p>

60

Las Figuras 4-7 recogen todos los ácidos y sales sódicas y potásicas objeto de reivindicación. Los compuestos son identificados mediante una nomenclatura que hace referencia al puente según el número de la tabla 1 y al radical esteroide según la abreviatura indicada en la figura 1, seguido con una o dos letras que indica si trata de ácidos (letra H), de sales de sodio (letras Na) o de sales de potasio (letra K). Los ácidos y las sales sódicas y potásicas derivadas de los compuestos de las Figuras 4-7 se nombran en las Tablas 2-5. Por ejemplo, 1-DCA<sub>2</sub>-H se refiere al dímero formado por dos residuos del ácidosesoxicólico unidos mediante el puente 1 de la tabla 1 en su forma ácida.

65

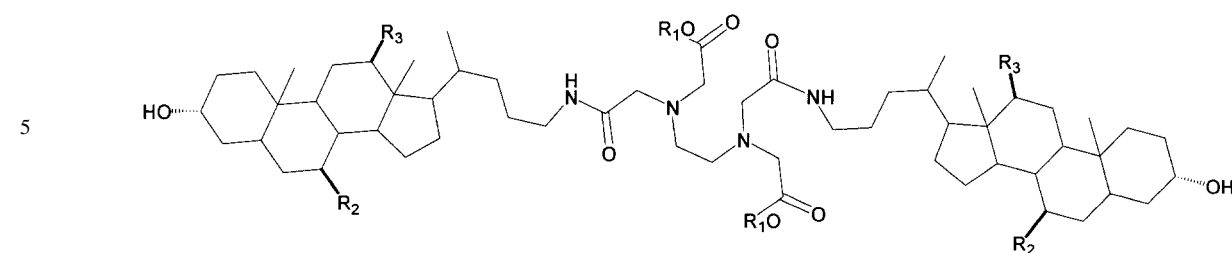


Figura 4. Nuevos dímeros derivados de los ácidos biliares naturales formados por dos residuos de los ácidos biliares de la figura 1 y el puente 1 de la tabla 1 en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ) sales sódicas ( $R_1=Na$ ) o potásicas ( $R_1=K$ ).

TABLA 2

*Relación de compuestos que pertenecen a la fórmula general de la figura 4*

Abreviatura	Nomenclatura IUPAC
<u>1</u> -CA <sub>2</sub> -H	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina]
<u>1</u> -DCA <sub>2</sub> -H	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina]
<u>1</u> -UCDCA <sub>2</sub> -H	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina]
<u>1</u> -CDCA <sub>2</sub> -H	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina]
<u>1</u> -LCA <sub>2</sub> -H	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina]
<u>1</u> -CA <sub>2</sub> -Na	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio
<u>1</u> -CA <sub>2</sub> -K	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio
<u>1</u> -DCA <sub>2</sub> -Na	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio
<u>1</u> -DCA <sub>2</sub> -K	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio
<u>1</u> -UCDCA <sub>2</sub> -Na	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio
<u>1</u> -UCDCA <sub>2</sub> -K	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio
<u>1</u> -CDCA <sub>2</sub> -Na	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio
<u>1</u> -CDCA <sub>2</sub> -K	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio

<u>1</u> -LCA <sub>2</sub> -Na	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio
<u>1</u> -LCA <sub>2</sub> -K	N,N'-1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio

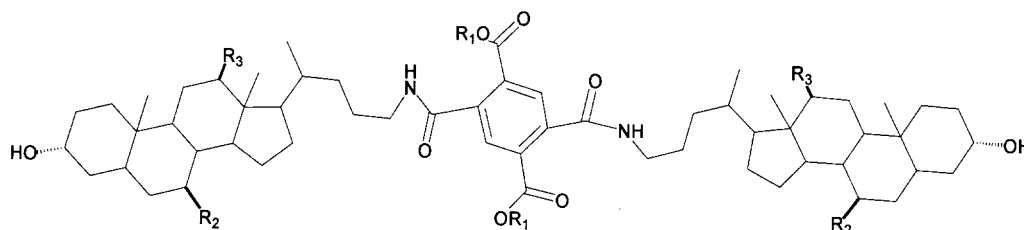


Figura 5. Nuevos dímeros derivados de los ácidos biliares naturales formados por dos residuos de los ácidos biliares de la figura 1 y el puente 2 de la tabla 1 en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ), sales sódicas ( $R_1=Na$ ) o potásicas ( $R_1=K$ ).

TABLA 3

Relación de compuestos que pertenecen a la fórmula general de la figura 5

Abreviatura	Nomenclatura IUPAC
<u>2</u> -CA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxílico
<u>2</u> -DCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxílico
<u>2</u> -UCDCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxílico;
<u>2</u> -CDCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxílico
<u>2</u> -LCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxílico
<u>2</u> -CA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio
<u>2</u> -CA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio
<u>2</u> -DCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio
<u>2</u> -DCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio



5	<u>2</u> -UCDCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de sodio
	<u>2</u> -UCDCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de dipotasio
10	<u>2</u> -CDCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de sodio
15	<u>2</u> -CDCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de dipotasio
	<u>2</u> -LCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de sodio
20	<u>2</u> -LCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de dipotasio

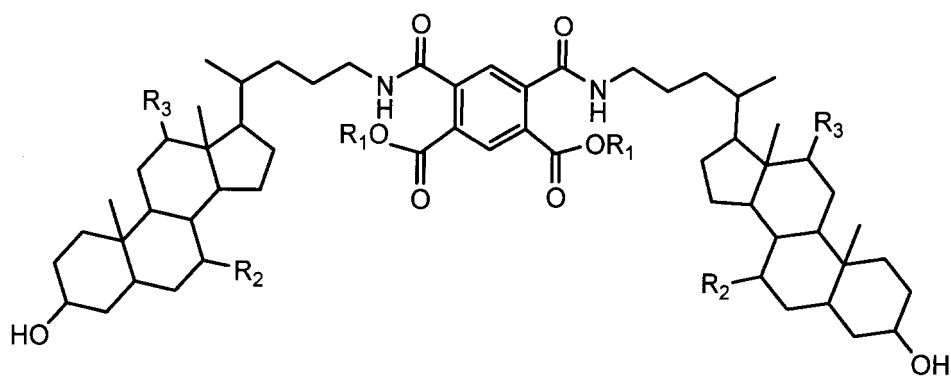


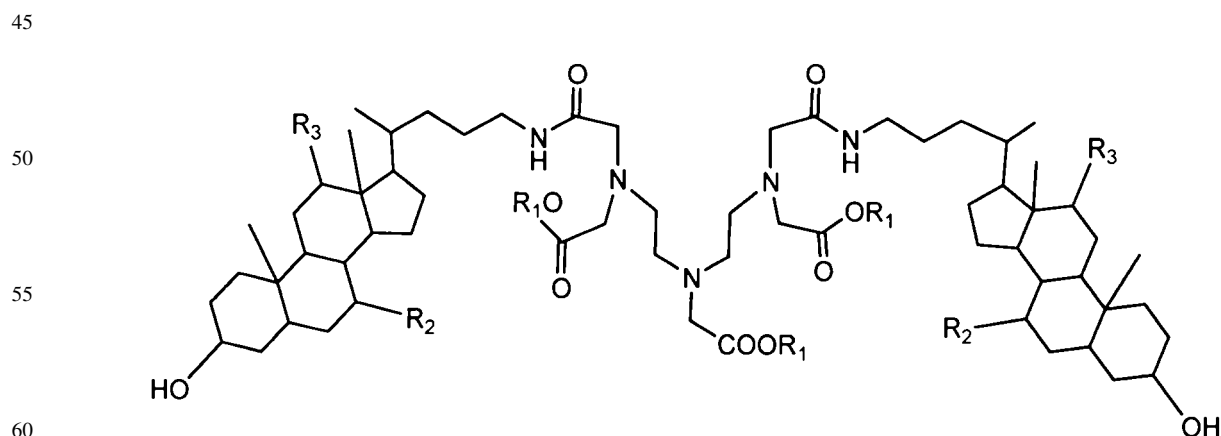
Figura 6. Nuevos dímeros derivados de los ácidos biliares naturales formados por dos residuos de los ácidos biliares de la figura 1 y el puente 3 de la tabla 1 en sus formas de ácido (R<sub>1</sub>=H), sales sódicas (R<sub>1</sub>=Na) o potásicas (R<sub>1</sub>=K).

45  
50  
TABLA 4

*Relación de compuestos que pertenecen a la fórmula general de la figura 6*

Abreviatura	Nomenclatura IUPAC
55 <u>3</u> -CA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-benzenodicarboxílico
60 <u>3</u> -DCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-benzenodicarboxílico
65 <u>3</u> -UCDCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-benzenodicarboxílico
<u>3</u> -CDCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-

	bencenodicarboxílico	
5	<u>3</u> -LCA <sub>2</sub> -H	Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico
10	<u>3</u> -CA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio
	<u>3</u> -CA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio
15	<u>3</u> -DCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio
20	<u>3</u> -DCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio
	<u>3</u> -UCDCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio
25	<u>3</u> -UCDCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio
30	<u>3</u> -CDCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio
	<u>3</u> -CDCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio
35	<u>3</u> -LCA <sub>2</sub> -Na	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio
40	<u>3</u> -LCA <sub>2</sub> -K	2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio



65 Figura 7. Nuevos dímeros derivados de los ácidos biliares naturales formados por dos residuos de los ácidos biliares de la figura 1 y el puente 4 de la tabla 1 en sus formas de ácido (R<sub>1</sub>=H), sales sódicas (R<sub>1</sub>=Na) o potásicas (R<sub>1</sub>=K).

## ES 2 318 927 A1

TABLA 5

Relación de compuestos que pertenecen a la fórmula general de la figura 7

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Abreviatura	Nomenclatura IUPAC
<u>4</u> -CA <sub>2</sub> -H	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina
<u>4</u> -DCA <sub>2</sub> -H	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina
<u>4</u> -UCDCA <sub>2</sub> -H	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina;
<u>4</u> -CDCA <sub>2</sub> -H	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina;
<u>4</u> -LCA <sub>2</sub> -H	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina
<u>4</u> -CA <sub>2</sub> -Na	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio
<u>4</u> -CA <sub>2</sub> -K	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio
<u>4</u> -DCA <sub>2</sub> -Na	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio
<u>4</u> -DCA <sub>2</sub> -K	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio
<u>4</u> -UCDCA <sub>2</sub> -Na	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio
<u>4</u> -UCDCA <sub>2</sub> -K	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio
<u>4</u> -CDCA <sub>2</sub> -Na	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio
<u>4</u> -CDCA <sub>2</sub> -K	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio
<u>4</u> -LCA <sub>2</sub> -Na	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio
<u>4</u> -LCA <sub>2</sub> -K	N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio

Asimismo, se reivindican las aplicaciones como agentes tensioactivos de todos los compuestos sintetizados, tanto en sus formas ácidas como de sales, dado que se ha comprobado que estos compuestos presentan una mayor actividad superficial que los ácidos y sales biliares de partida. Entre estas aplicaciones típicas cabe mencionar: modificadores de las características reológicas, estabilización o rotura de interfaces, producción de nanomateriales por autoensamblado vía estructuras micelares, vesiculares, cristales líquidos, emulsiones y microemulsiones o cualquier otro tipo de micro o nanonestructuras; como excipientes, solubilizantes, estabilizadores para formulaciones farmacológicas como pomadas, ungüentos, geles, cremas, comprimidos, grageas, emulsiones, pellets, granulados, jarabes, suspensiones, soluciones, cápsulas, supositorios, parches, inyectables, aerosoles, como vectores de fármacos y para la dosificación controlada de fármacos; productos de cosmética, acondicionadores de pelo, champús, jabones, geles, productos de limpieza facial, cremas hidratantes, nutritivas, antiarrugas, regeneradoras, maquillajes, lociones, sprays, lacas de uñas, pinturas y lápices de ojos, barras y perfiladores de labios, coloretes, polvos faciales; pastas dentífricas; como sondas bioquímicas, purificación de receptores, separación de proteínas, agentes desnaturizantes, identificación de proteínas, solubilización de proteínas, cristalización de proteínas, disociación de proteínas de ácidos nucleicos o su extracción de materiales biológicos, solubilización de enzimas y su aislamiento de proteínas hidrófobas; formulación de pesticidas y fertilizantes líquidos, aplicaciones en fermentaciones; tratamientos de aguas como agentes antieaporación y dispersantes, humectantes para facilitar la entrada de los biocidas en los microorganismos, permeabilización de precipitados porosos o no; productos de limpieza doméstica o industrial, lavado de vidrio óptico, doméstico o de laboratorio, desengrasado de productos, limpieza de superficies incluyendo las metálicas, suelos, cementos, limpieza de textiles, a mano o en máquina; pinturas y recubrimientos, artes gráficas, ceras, y adhesivos; como lubricantes para minimizar la fricción entre superficies en rozamiento; humectación de sustancias; solubilización de compuestos químicos, incluyendo disolventes, no solubles o inmiscibles con el agua o disoluciones de la misma; emulsificadores y dispersantes en los que la fase continua es agua, una disolución salina o una disolución reguladora a cualquier valor del pH; solubilización de grasas, en particular de colesterol; tecnología de polímeros incluyendo los procesos de polimerización, emulsiones, espumas; catalizadores químicos; técnicas analíticas como las cromatografía preparativa o analítica de HPLC y electroforesis; como fármacos, en particular para todos los tratamientos relacionados con el metabolismo del colesterol, ya que se ha comprobado que algunos de ellos son coleréticos e inhiben el transporte de ácidos biliares; aditivos alimentarios. Esta utilización puede ser como producto puro o en combinación con otros tensioactivos que pudieran originar un efecto multiplicativo (sinérgico) de su actividad.

### 30 Modo de realización

La obtención de los compuestos de las Figuras 4-7, a partir de los ácidos biliares cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico, ursodesoxicólico y litocólico, comprende métodos sintéticos implicando reacciones como:

- 35 1.- Protección y desprotección de grupos funcionales.
- 2.- Funcionalización de grupos sustituyentes.
- 40 3.- Funcionalización de los ácidos biliares.
- 4.- Síntesis convergente de los compuestos funcionalizados para generar la estructura final.

En esta síntesis convergente final, tiene lugar la formación de enlaces amida, utilizando alguno de los siguientes métodos:

45 1.- Como material de partida se utilizan los ácidos biliares de la Figura 1. En un primer paso, el grupo ácido se convierte en una 24-amida y, posteriormente, se convierte en su 24-aminoderivado por reducción con  $\text{LiAlH}_4$  (Bellini, A. M. *et al. Cholic and deoxycholic acids derivatives (Part I). Antimicrobial activity of cholane compounds. Eur. J. Med. Chem. -Chim. Ther.* **1983**, 18, 185). Una vez obtenido el grupo amino se hace reaccionar el mismo con un dicloruro de ácido.

55 2.- Por reacción entre dos sintones: (i) el puente, consistente en una molécula que es simultáneamente un diéster y un diácido, y que se obtiene por metanolisis de los anhídridos del AEDT (compuesto 1, Tabla 1), del ácido piromielfítico (compuestos 2 y 3 Tabla 1); y (ii) el esteroide con un grupo amino primario en la posición 24. En el proceso se utilizan catalizadores, como DEPC (dietilcianofosfonato), ó HOBt/DIC (1-hidroxibenzotriazol/1,3-diisopropilcarbodiimida), para acelerar la formación del enlace amida.

60 3.- Por reacción de dos sintones (puente y esteroide), siendo el puente un dianhídrido que reacciona con 2 equivalentes del 24-amino derivado del ácido biliar. Este método es útil solamente para el anhídrido del AEDT y el del ácido dietilenaminopentaacético.

En todos los casos:

- 65 (i) los ácidos se obtienen por la posterior hidrólisis básica de los grupos éster y neutralización con ácido clorhídrico.
- (ii) las sales derivadas de los ácidos, se obtienen por neutralización con hidróxido de sodio o hidróxido potásico de estos ácidos y posterior precipitación en una mezcla de agua y acetona.

## ES 2 318 927 A1

Puede observarse que el puente utilizado puede tener naturaleza aromática o alifática, y puede portar otros grupos funcionales no utilizados en el proceso sintético. En algún caso, el puente es un producto comercial, pero en otros casos es necesario sintetizarlo. Por lo tanto, se describen en primer lugar los métodos de su síntesis.

5 El dianhídrido de AEDT se obtiene siguiendo métodos descritos en la bibliografía (Wieder, I.; Wollenberg, R. H. *Species-linked diamine triacetic acids and their chelates. Species-linked diamine triacetic acids and their chelates. US Patent N° 4,352,751*; Lennon, W. J. *Stabilization of fats and oils with esters of EDTA and related compounds. US Patent N° 3,497,535*): En un balón se depositan 3,64 g (0,0125 mol) de AEDT, 5,19 g (4,8 mL; 0,051 mol) de anhídrido acético y 6 g de piridina (6,13 mL; 0,076 mol) y se calientan a 65°C durante 24 horas. Se filtra a temperatura ambiente  
10 y el residuo se lava primero con anhídrido acético 2x50 mL y con éter etílico 3x50 mL. Se seca a 60°C a vacío y se obtiene un producto con un rendimiento casi cuantitativo.

El ácido N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetiléster] glicina (puente 1 tabla 1), al igual que los ácidos  
15 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico, (puente 2, Tabla 1) 1,5-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico  
(puente 3, Tabla 1) se obtuvieron siguiendo la síntesis propuesta por Houlihan (Houlihan, F. M. *et al. Synthesis and  
characterization of the tert-butyl ester of the oxydianiline/pyromellitic dianhydride polyamic acid. Macromolecules  
1989*, 22, 4477) y Mythili *et al. (Preparation and evaluation of [<sup>66</sup>Ho]holmium-dimethyldiethylenetriaminepen-  
taacetic acid (DMDTPA) as potential radiopharmaceutical for endovascular radiation therapy (EVRT). Appl. Rad.  
Isotopes 2002*, 56, 863). El producto de partida para la obtención de los puentes 2 y 3 de la Tabla 1 es el anhídrido pi-  
20 romielítico. Este anhídrido refluje en metanol durante 2 horas, se evapora parcialmente el disolvente hasta la aparición  
de una turbidez y se deja precipitar a baja temperatura. De ser necesario se agrega agua para producir la precipitación.  
Los dicloruros de ácido se obtienen por reacción de los correspondientes diácidos con cloruro de tionilo siguiendo el  
método clásico descrito en la bibliografía general.

25 Los métodos sintéticos se agrupan como sigue:

1) *Procedimiento General 1: implica la reacción de los 24-aminoderivados de los ácidos biliares con dicloruros de  
ácido*

30 Una vez obtenidos los dicloruros de ácido de las moléculas puente, se les hace reaccionar con los 24-aminoderiva-  
dos de los esteroides en cloroformo con catálisis de trietilamina con el fin de generar una serie de amidas diméricas.  
Finalmente, se hidrolizan para eliminar el grupo éster terminal de forma convencional (metanol, KOH), obteniéndose,  
previa neutralización (con HCl) y cristalización (de metanol, etanol), los dímeros de ácidos biliares modificados en la  
35 posición 24 objeto de la reivindicación.

### Ejemplo 1

40 *Obtención del compuesto 2-DCA<sub>2</sub>-H de acuerdo con el Procedimiento General 1 (Figura 8)*

Una disolución de 24-aminoderivado del DCA (Figura 8) (0,58 g, 1,53 mmol) y trietilamina (3 mL, 21 mmol)  
en 15 mL de CHCl<sub>3</sub> se agita vigorosamente y se le agrega, gota gota en baño de hielo, una disolución del dicloruro  
(0,20 g, 0,63 mmol) en 5 mL de CHCl<sub>3</sub>. Se agita en atmósfera inerte durante 12 horas. Se evapora el CHCl<sub>3</sub> y se  
45 purifica en columna cromatográfica con 9:1 acetato de etilo:metanol como eluyente. Una vez obtenido el producto se  
hidrolizan los grupos éster como sigue: 1 g del producto protegido se añade en 50 mL de una disolución de KOH en  
metanol 1 mol·dm<sup>-3</sup>, refluendo durante 1 hora. Evaporado el disolvente, el concentrado se añade a 150 mL de agua,  
neutralizándolo con HCl concentrado hasta su completa precipitación. Filtrado el producto se lava 5x20 mL de agua,  
se seca y se recristaliza de etanol.

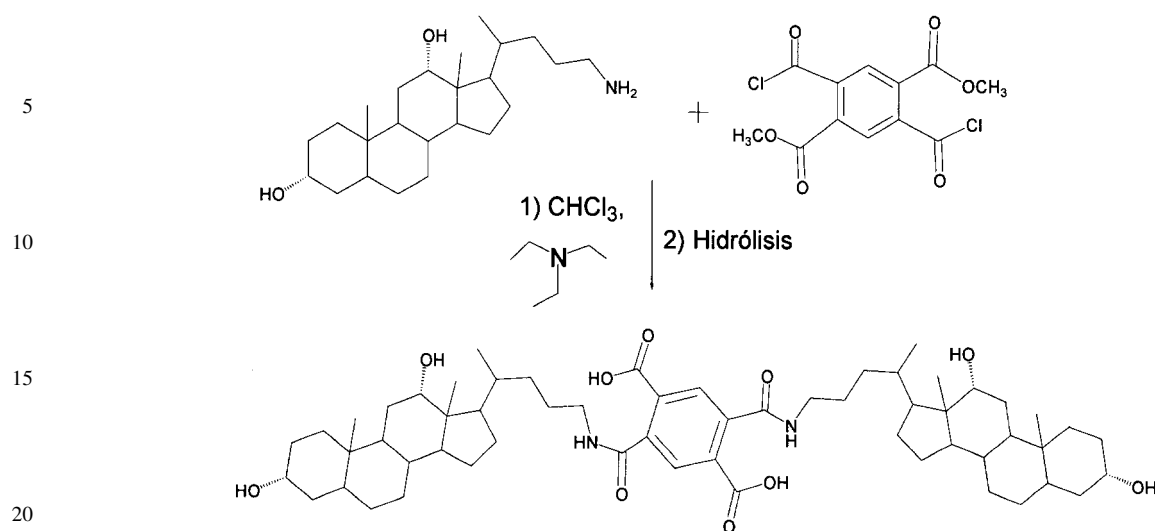
50

(Esquema pasa a página siguiente)

55

60

65



25 Figura 8. Esquema del ejemplo 1: Síntesis del compuesto 2-DCA<sub>2</sub>-H.

El ejemplo 1 ha sido aplicado con éxito, con las lógicas y obvias modificaciones de las cantidades implicadas de los cloruros de ácido o derivados aminados de los ácidos biliares, en la obtención de los compuestos i-CA<sub>2</sub>-H, i-DCA<sub>2</sub>-H, i-CDCA-H<sub>2</sub>, i-UDCA<sub>2</sub>-H e i-LCA<sub>2</sub>-H siendo i=1-3 según tabla 1.

2) *Procedimiento General 2 con DEPC ó HOBt/(DIC ó DCC): implica la reacción de los 24-aminoderivados de los ácidos biliares con ácidos carboxílicos activados*

35 Otra ruta sintética, probada con éxito para los puentes 1 a 3 (X=OH) de la Tabla 1, consiste en utilizar diácidos como puente de unión entre los dos 24-aminoderivados en cuyo caso, se emplearán las estrategias de acoplamiento con los sistemas DEPC (dietilcianofosfonato) y HOBt/(DIC ó DCC) (1-hidroxibenzotriazol/1,3-diisopropil carbodiimida o dicitlohexilcarbodiimida) (Anelli, P. L. *et al.* *L-Glutamic acid and L-lysine as useful building blocks for the preparation of bifunctional DTPA-like ligands. Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 137; Auzely-Velty, R. *et al.*, *Micellization of Hydrophobically Modified Cyclodextrins. 1. Micellar Structure. Langmuir* **2000**, *16*, 3727; Auzely-Velty, R. *et al.* *Cholesteryl-cyclodextrins: synthesis and insertion into phospholipid membranes. Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, 82; Finke, P. E. *et al.* *Inhibition of human leukocyte elastase. 4. Selection of a substituted cephalosporin (L-658, 758) as a topical aerosol. J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3731; Kim, D. C. *et al.* *Evaluation of the bile acid transporter in enhancing intestinal permeability to renin-inhibitory peptides. J. Drug Targeting* **1993**, *1*, 347). Estos activantes son de uso común en la síntesis de péptidos, siendo de los pocos reactivos que se han empleado con éxito para generar enlaces amida con derivados esteroideos.

Al igual que en el procedimiento anterior, la hidrólisis de los grupos protectores de tipo éster se realiza en condiciones básicas. Los ácidos finales deseados se obtienen después de neutralizar con HCl y cristalizar con metanol o etanol.

## Ejemplo 2

55 *Obtención del compuesto 2-DCA<sub>2</sub>-H de acuerdo con el Procedimiento General 2 mediante el uso de DEPC (Figura 9)*

En un balón de 50 mL y bajo atmósfera de argón, se dispersan 0,35 g (1,25 mmol) del ácido 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-benzenotetracarboxílico (ácido *p*-dimetoxipiromielfítico) en 10 mL de DMF seca. Posteriormente se adicionan 0,4 mL (2,29 mmol) de DEPC. Una vez disuelto el sólido en suspensión, se adiciona, en porciones, 1 g (2,65 mmol) del 24-amino derivado del ácido desoxicólico (Figura 9). Se agita durante 10 minutos, se enfría a 0°C y se adicionan 2 mL (3,58 mmol) de trietilamina gota a gota. El baño se deja durante 30 minutos y se retira para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez acabada la reacción, se evapora la DMF a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en 200 mL de acetato de etilo. A continuación se lava con 3×40 mL de agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra para concluir la purificación del producto mediante cromatografía de columna en gel de sílice con una mezcla de elución 9:1 en acetato de etilo:metanol, respectivamente.

## ES 2 318 927 A1

El ejemplo 2 ha sido aplicado con éxito, con las lógicas y obvias modificaciones de las cantidades implicadas, en la obtención de los compuestos  $i$ -CA<sub>2</sub>-H,  $i$ -DCA<sub>2</sub>-H,  $i$ -CDCA-H<sub>2</sub>,  $i$ -UDCA<sub>2</sub>-H e  $i$ -LCA<sub>2</sub>-H siendo  $i=1-3$  según tabla 1.

5

10

15

20

25

30

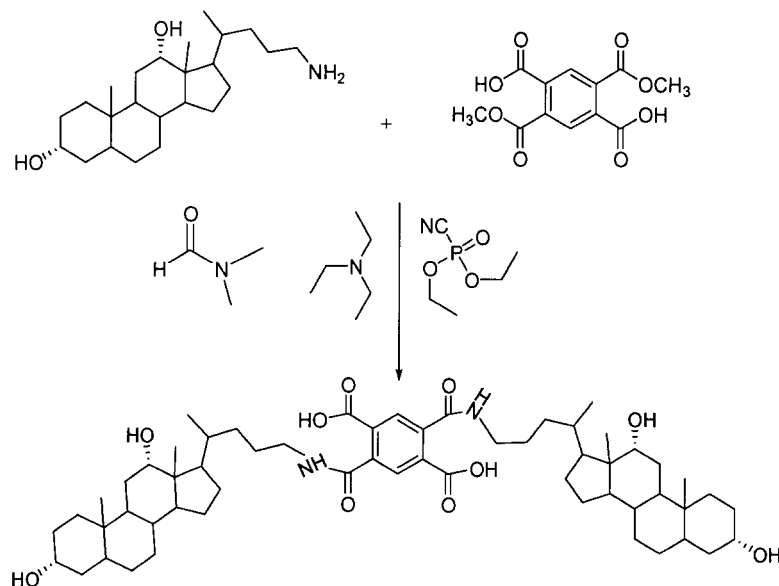


Figura 9. Esquema del ejemplo 2: Síntesis del compuesto  $2$ -DCA<sub>2</sub>-H según el Procedimiento General 2 mediante el uso de DEPC.

35

### Ejemplo 3

*Obtención del compuesto  $1$ -CA<sub>2</sub>-H de acuerdo con el Procedimiento General 2 mediante el uso de HOBt/DCC ó DIC (Figura 10)*

40

45

A una disolución de 0,66 g (2,05 mmol) de N,N'-1,2-etanodilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetiléster]glicina (dimetiléster derivado del AEDT) (puente 1, X=OH, Tabla 1) en 10 mL de DMF se agregan 2,22 g (16,42 mmol) de hidroxibenzotriazol (HOBt) y 2,6 mL (16,42 mmol) de DIC ó 3,39 g de DCC en 15 mL de DMF. La disolución se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo argón. Posteriormente se añaden 2,02 g (5,13 mmol) del 24-amino derivado del ácido cólico (Figura 10) en 15 mL de DMF y se agita durante 48 horas. Se filtra el precipitado formado, se concentra y el residuo se disuelve en cloroformo. La disolución se lava sucesivamente con agua (3 x 25 mL). Se seca, se concentra y se purifica mediante cromatografía de columna. Una vez obtenido el producto se hidrolizan los grupos éster como sigue: 1 g del producto protegido se añade en 100 mL de una disolución de KOH en metanol 1 mol·dm<sup>-3</sup>, refluendo durante 1 hora.

50

Evaporado el disolvente, el concentrado se añade a 150 mL de agua, neutralizándolo con HCl concentrado hasta su completa precipitación. Filtrado el producto se lava con agua, se seca y se recrystaliza de etanol.

55

El ejemplo 3 ha sido aplicado con éxito, con las lógicas y obvias modificaciones de las cantidades implicadas, en la obtención de los compuestos  $i$ -CA<sub>2</sub>-H,  $i$ -DCA<sub>2</sub>-H,  $i$ -CDCA-H<sub>2</sub>,  $i$ -UDCA<sub>2</sub>-H e  $i$ -LCA<sub>2</sub>-H siendo  $i=1-3$  según tabla 1.

60

65

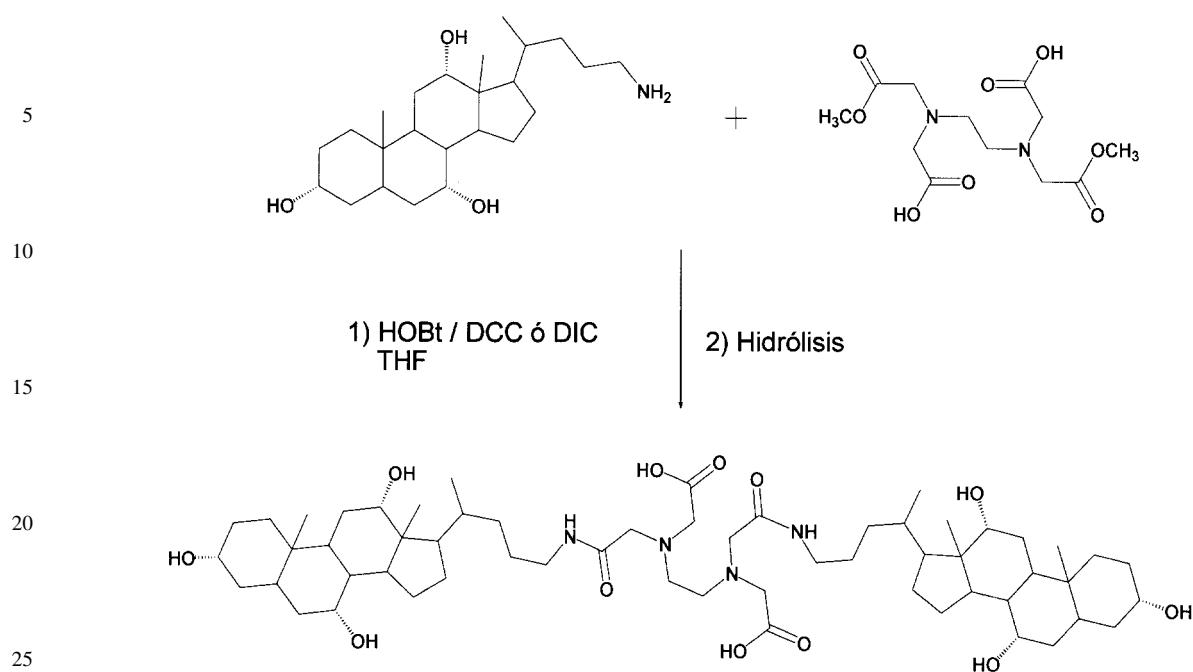


Figura 10. Esquema del ejemplo 3: Síntesis del compuesto 1-CA<sub>2</sub>-H según el Procedimiento General 2 mediante el uso de HOBT/DCC ó DIC.

3) *Procedimiento General 3: implica la reacción de los 24-aminoderivados de los ácidos biliares con anhídridos*

Los 24-aminoderivados se acoplan al N,N-bis[2-(2,6-dioxo-4-morfolinil)etil]glicina (dianhídrido 4 de la Tabla 1; abreviadamente DTPA) de forma directa en DMF y con la catálisis de trietilamina. (Liu, Y.-C. *et al. Syntheses, crystal structures and properties of two Mn(II) complexes of DTPA-bisamide derivative. Inorg. Chem. Commun.* **2005**, 8, 574).

Ejemplo 4

*Obtención del compuesto 1-UDCA<sub>2</sub>-H de acuerdo con el Procedimiento General tipo 3 (Figura 11)*

En un balón seco de 100 mL se agregan 0,93 g (2,37 mmol) del 24-amino derivado del ácido cólico (Figura 11), 30 mL (28,3 g; 430 mmol) de DMF seca y 15 mL (10,9 g; 0,11 mol) de trietilamina seca. La mezcla se agita hasta apreciar completa disolución. Se agregan ahora 1,02 g (2,86 mol) del DTPA disueltos en 15 mL (14,15 g; 215 mmol) de DMF seca gota a gota y se calienta la mezcla a 70°C durante 12 horas. Se evapora la DMF en rotavapor y se lava con agua 3x25 mL previa disolución en CHCl<sub>3</sub> (100 mL). Se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evapora y se purifica por cromatografía en columna.



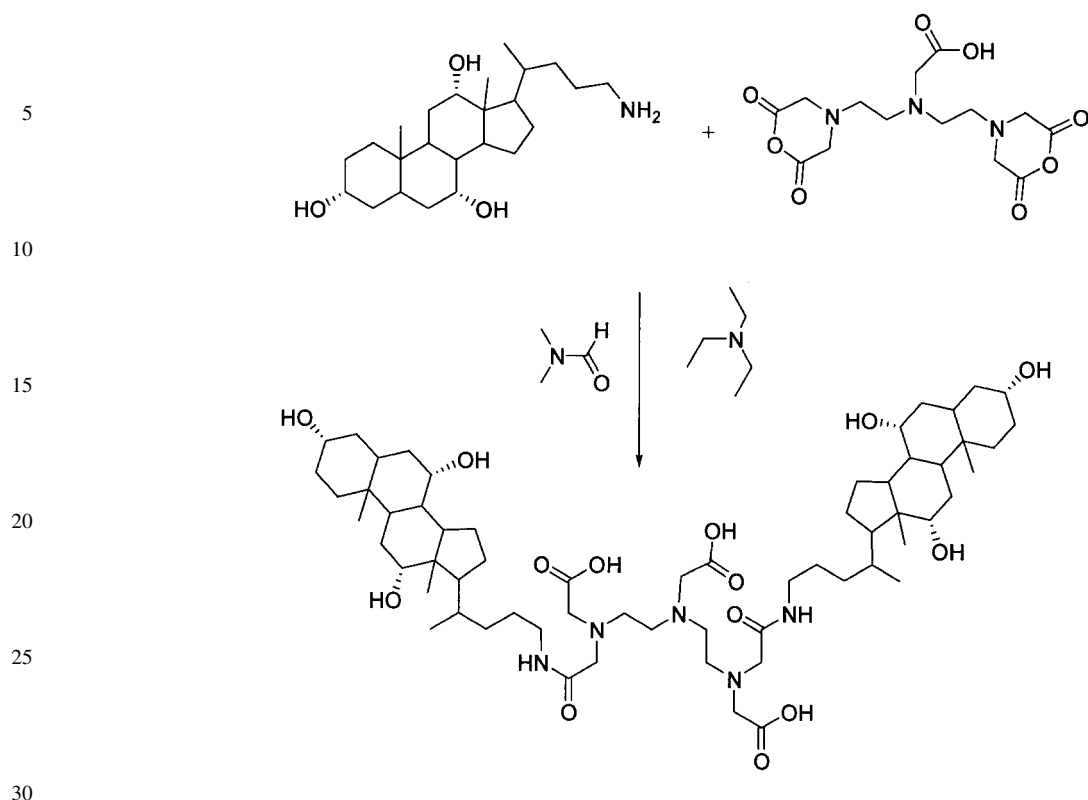


Figura 11. Esquema del ejemplo 4: Síntesis del compuesto 1-UDCA<sub>2</sub>-H según el Procedimiento General 3.

35 El ejemplo 4 ha sido aplicado con éxito, con las lógicas y obvias modificaciones de las cantidades implicadas, en la obtención de los compuestos 4-CA<sub>2</sub>-H, 4-DCA<sub>2</sub>-H, 4-CDCA<sub>2</sub>-H, 4-UDCA<sub>2</sub>-H y 4-LCA<sub>2</sub>-H según tabla 1.

#### 4) Procedimiento General de obtención de las sales sódicas y potásicas

40 Todas las sales de potasio y sodio que se reivindican se obtienen a partir de los ácidos correspondientes por neutralización con NaOH ó KOH en medio acuoso y posterior precipitación en acetona y secado.

#### Ejemplo 5

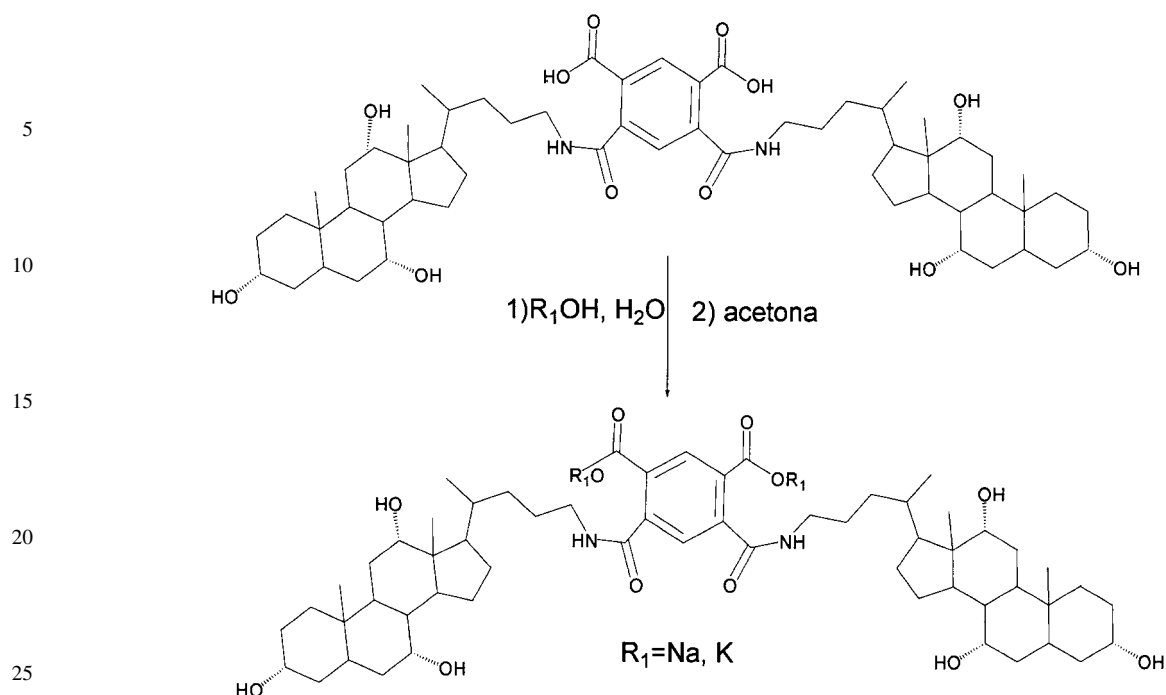
45 *Obtención de las sales 1-CDCA<sub>2</sub>-Na y 1-CDCA<sub>2</sub>-K por el Procedimiento General 4 (Figura 12)*

50 1 g (1 mmol) de 1-CDCA<sub>2</sub>-H se disuelve con dos equivalentes (0,088 g, 2,2 mmol) de NaOH o con dos equivalentes de KOH (0,36 g, 2,2 mmol) en la mínima cantidad de agua (aproximadamente 10 mL). Una vez disuelto el ácido se le añaden 300 mL de acetona y se deja reposar a temperatura ambiente hasta la aparición de un precipitado. Se filtra y se seca en estufa a vacío a 80°C durante el tiempo necesario para garantizar la ausencia de disolvente orgánico ocluido en el sólido.

55 El ejemplo 5 ha sido aplicado con éxito, con las lógicas y obvias modificaciones de las cantidades implicadas, a todos los compuestos i-CA<sub>2</sub>-H, i-DCA<sub>2</sub>-H, i-CDCA<sub>2</sub>-H, i-UDCA<sub>2</sub>-H e i-LCA<sub>2</sub>-H siendo i=1-4, para obtener las sales correspondientes nombradas en las Tablas 2-5

60

65



30 Figura 12. Esquema del ejemplo 5 correspondiente a la preparación de la sal sódica  $L$ -CDCA<sub>2</sub>-Na y la sal potásica  $L$ -CDCA<sub>2</sub>-K de acuerdo con el Procedimiento General 4.

35 Las estructuras de los compuestos de esta invención fueron determinadas mediante las técnicas siguientes: Resonancia Magnética Nuclear mono- (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) y bidimensional (COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H; HMQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C; HMBC; ROESY) y Espectrometría de masas (Maldi-tof; impacto electrónico).

40 La medición de las características tensioactivas de los compuestos obtenidos se ha llevado a cabo mediante medidas de tensión superficial, lo que permite la determinación de la concentración micelar crítica (*cmc*) de las sales de estos compuestos. De un modo general, puede afirmarse que las propiedades tensioactivas de los nuevos compuestos son mejores que las de los ácidos biliares naturales de partida dado que sus valores de *cmc* son menores. Así, por ejemplo, se ha determinado para el compuesto  $L$ -CDCA<sub>2</sub>-Na un valor de *cmc* igual a 2  $\mu$ M que es cuatro órdenes de magnitud inferior a la de la sal biliar de partida (colato sódico) cuyo valor es 15-20 mM. Esto es debido a la gran superficie por molécula que ocupan los derivados objeto de la presente invención y que en algunos casos superan los 600  $\text{Å}^2$ /molécula.

45

50

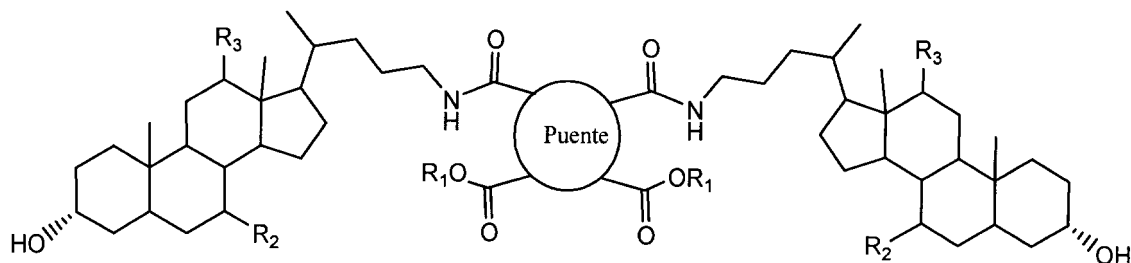
55

60

65

## REIVINDICACIONES

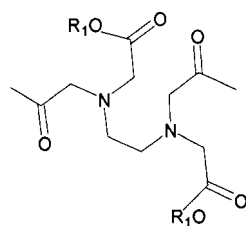
1. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursode-  
soxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) de fórmula general



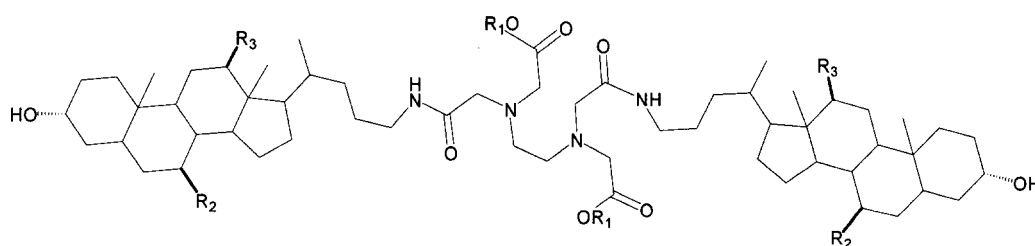
caracterizados porque:

$R_1$  es un átomo de hidrógeno, sodio o potasio;  $R_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (con orientación  $\alpha$  o  $\beta$ );  $R_3$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo con orientación  $\alpha$  unidas por un grupo que actúa como puente de unión entre los dos esteroides.

2. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursode-  
soxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 1, en las que el puente tiene como fórmula general



dando origen a dímeros de fórmula general



en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ), sales sódicas ( $R_1=Na$ ) y potásicas ( $R_1=K$ ).

3. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursode-  
soxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 2, en las que  $R_1$  es un átomo de hidrógeno, sodio o  
potasio;  $R_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (con orientación  $\alpha$  o  $\beta$ ) y  $R_3$  es un átomo de hidrógeno o  
un grupo hidroxilo con orientación  $\alpha$ , que son nominalmente:

$N,N'$ -1,2-etanodiilbis [N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina];

$N,N'$ -1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina];

$N,N'$ -1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina];

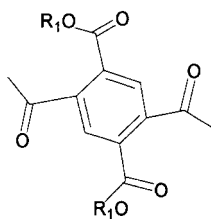
$N,N'$ -1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina];

$N,N'$ -1,2-etanodiilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicina];

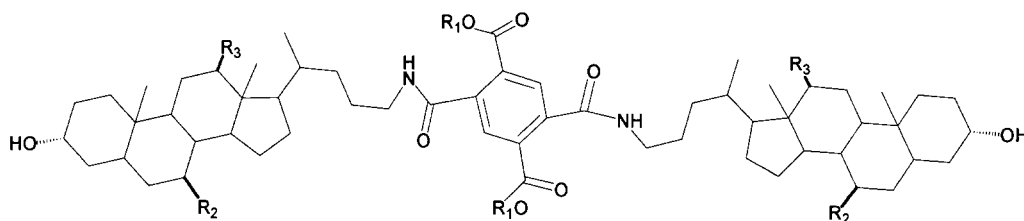
## ES 2 318 927 A1

N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio;  
 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio;  
 5 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio;  
 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio;  
 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio;  
 10 N,N'-1,2-etanodilbis [N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio;  
 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio;  
 15 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio;  
 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de disodio;  
 20 N,N'-1,2-etanodilbis[N-[2-((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino]-2-oxoetilglicinato] de dipotasio.

4. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursode-  
 soxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 1, en las que el puente tiene como fórmula general



dando origen a dímeros de fórmula general



en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ), sales sódicas ( $R_1=Na$ ) y potásicas ( $R_1=K$ ).

5. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursode-  
 soxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 4, en las que  $R_1$  es un átomo de hidrógeno, sodio o  
 50 potasio;  $R_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (con orientación  $\alpha$  o  $\beta$ ) y  $R_3$  es un átomo de hidrógeno o  
 un grupo hidroxilo con orientación  $\alpha$ , que son nominalmente:

55 Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxílico;

Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxílico;

60 Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxílico;

Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxílico;

65 Ácido 2,5-bis [(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxílico;

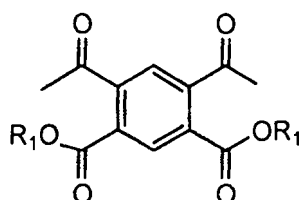
2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de disodio;

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-benzenodicarboxilato de dipotasio;

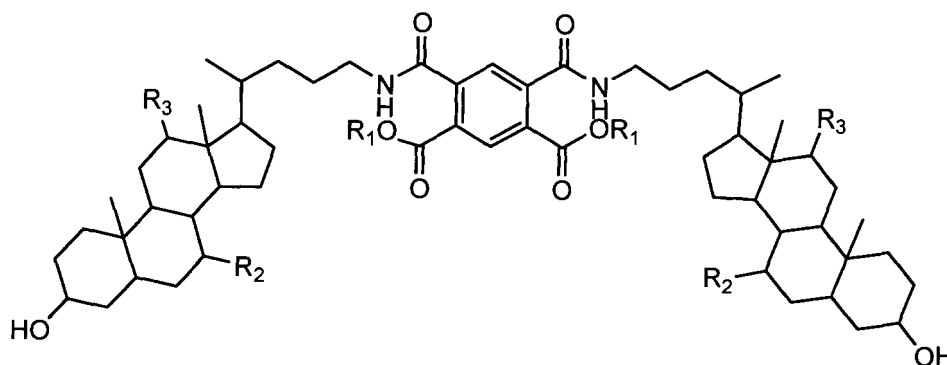
## ES 2 318 927 A1

- 2,5-bis [(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio;  
 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio;  
 5 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio;  
 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio;  
 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio;  
 10 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio;  
 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de disodio;  
 15 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,4-bencenodicarboxilato de dipotasio.

6. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 1, en las que el puente tiene como fórmula general



dando origen a dímeros de fórmula general



en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ), sales sódicas ( $R_1=Na$ ) y potásicas ( $R_1=K$ ).

7. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 6, en las que  $R_1$  es un átomo de hidrógeno, sodio o potasio;  $R_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (con orientación  $\alpha$  o  $\beta$ ) y  $R_3$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo con orientación  $\alpha$ , que son nominalmente:

- Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico;  
 Ácido 2,5-bis [(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico;  
 60 Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico;  
 Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico;  
 65 Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico;  
 2,5-bis [(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio;

## ES 2 318 927 A1

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio;

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio;

5 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio;

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio;

10 2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio;

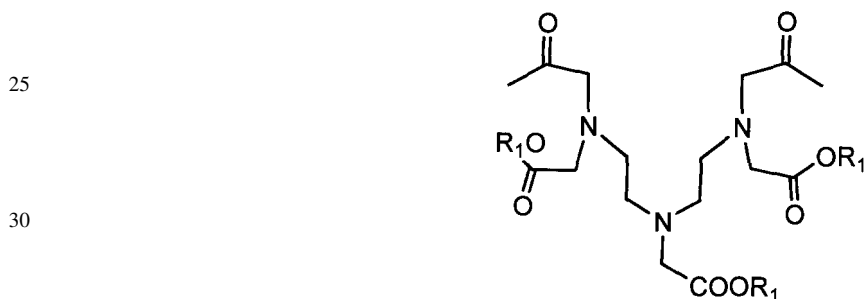
2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio;

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio;

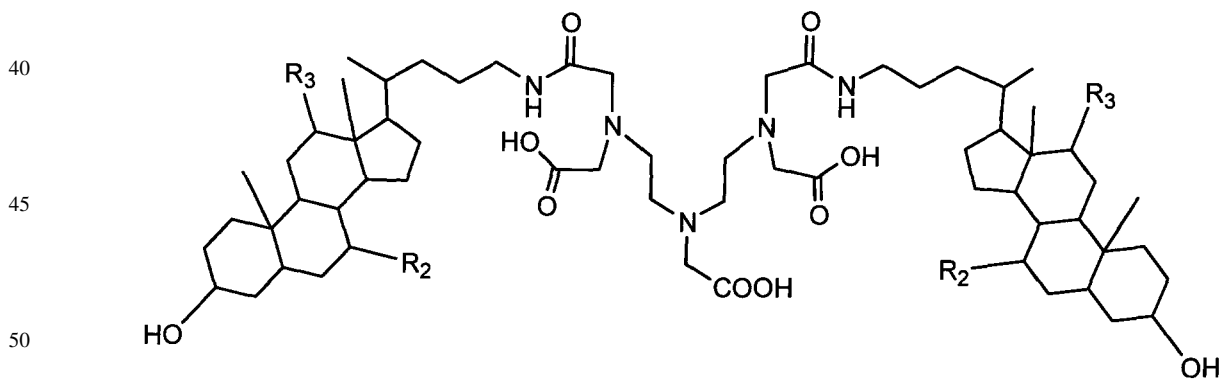
15 2,5-bi s [(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3 -hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de disodio;

2,5-bis[(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxilato de dipotasio.

20 8. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 1, en las que el puente tiene como fórmula general



35 dando origen a dímeros de fórmula general



en sus formas de ácido ( $R_1=H$ ), sales sódicas ( $R_1=Na$ ) y potásicas ( $R_1=K$ ).

55 9. Nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) según reivindicación 8, en las que  $R_1$  es un átomo de hidrógeno, sodio o potasio;  $R_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (con orientación  $\alpha$  o  $\beta$ ) y  $R_3$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo con orientación  $\alpha$ , que son nominalmente:

60 N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)etil]amino)etil]glicina;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)etil]amino)etil]glicina;

65 N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)etil]amino)etil]glicina;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-(((3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)etil]amino)etil]glicina;

## ES 2 318 927 A1

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicina;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-3,7-dihidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de disodio;

N,N-bis[2-[(carboximetil)[2-oxo-2-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hidroxicolan-24-il)]etil]amino]etil]glicinato de dipotasio.

10. Procedimiento para la síntesis de nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de ácidos biliares naturales según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, **caracterizado** porque comprende el acoplamiento del grupo amino del 24-aminoderivado del ácido biliar correspondiente (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico) con los cloruros derivados de los siguientes ácidos: N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetiléster]glicina; 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetra carboxílico; y 1,5-dimetil éster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico.

11. Procedimiento para la síntesis de nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de ácidos biliares naturales según reivindicaciones 2-7, **caracterizado** porque comprende el acoplamiento del grupo amino del 24-aminoderivado del ácido biliar correspondiente, mediante el uso DEPC (dietilcianofosfonato), con los ácidos: N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetiléster] glicina; 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-benceno tetracarboxílico; y 1,5-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico.

12. Procedimiento para la síntesis de nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales según las reivindicaciones 2-7, **caracterizado** porque comprende el acoplamiento del grupo amino del 24-aminoderivado, mediante el uso de HOBt/DCC ó DCI (1-hidroxibenzotriazol/1,3-diciclohexilcarbodiimida o disopropil carbodiimida), con los ácidos: N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(carboximetil)-1,1'-dimetil éster]glicina; 1,4-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico; y 1,5-dimetiléster-1,2,4,5-bencenotetracarboxílico.

13. Procedimiento para la síntesis de nuevos dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales según reivindicaciones 8 y 9 mediante acoplamiento del grupo amino del 24-aminoderivado con el dianhídrido N,N-bis[2-(2,6-dioxo-4-morfolinil)etil]glicina (portador del grupo puente).

14. Procedimiento para la síntesis de las sales sódicas y potásicas derivadas de los nuevos dímeros nombrados en las reivindicaciones 2-9, obtenidas por neutralización con NaOH ó KOH de esos dímeros, y posterior precipitación en una mezcla de agua y acetona, resultando las sales correspondientes.

15. Aplicación de los compuestos de las reivindicaciones 1-9, de forma aislada o en combinación con otros tensioactivos que pudieran originar un efecto multiplicativo (sinérgico) de su actividad, en cualquiera de las aplicaciones asociadas a este tipo de compuestos, los tensioactivos, entre las que cabe mencionar: modificadores de las características reológicas, estabilización o rotura de interfases, producción de nanomateriales por autoensamblado vía estructuras micelares, vesiculares, cristales líquidos, emulsiones y microemulsiones o cualquier otro tipo de micro o nanonestructuras; como excipientes, solubilizantes, estabilizadores para formulaciones farmacológicas como pomadas, ungüentos, geles, cremas, comprimidos, grageas, emulsiones, pellets, granulados, jarabes, suspensiones, soluciones, cápsulas, supositorios, parches, inyectables, como vectores de fármacos y para la dosificación controlada de fármacos; productos de cosmética, acondicionadores de pelo, champús, jabones, geles, productos de limpieza facial, cremas hidratantes, nutritivas, antiarrugas, regeneradoras, maquillajes, lacas de uñas, pinturas y lápices de ojos, barras y perfiladores de labios, coloretes, polvos faciales; como sondas bioquímicas, purificación de receptores, separación de proteínas del resto de membranas, agentes desnaturalizantes, identificación de proteínas, solubilización de proteínas, cristalización de proteínas de membrana, disociación de proteínas de ácidos nucleicos o su extracción de materiales biológicos, solubilización de enzimas y su aislamiento de proteínas hidrófobas; formulación de pesticidas y fertilizantes líquidos, aplicaciones en fermentaciones; tratamientos de aguas como agentes anti evaporación y dispersantes, humectantes para facilitar la entrada de los biocidas en los microorganismos, permeabilización de precipitados porosos o no; productos de limpieza doméstica o industrial, lavado de vidrio óptico, doméstico o de laboratorio, desengrasado de productos,

## ES 2 318 927 A1

limpieza de superficies incluyendo las metálicas, suelos, cementos, limpieza de textiles, a mano o en máquina; pinturas y recubrimientos, artes gráficas, ceras, y adhesivos; como lubricantes para minimizar la fricción entre superficies en rozamiento; humectación de sustancias; solubilización de compuestos químicos, incluyendo disolventes, no solubles o inmiscibles con el agua o disoluciones de la misma; emulsificadores y dispersantes en los que la fase continua es agua, una disolución salina o una disolución reguladora a cualquier valor del pH; solubilización de grasas, en particular de colesterol, ya que se ha comprobado que algunos de ellos son coleréticos e inhiben el transporte de ácidos biliares; tecnología de polímeros incluyendo los procesos de polimerización, emulsiones, espumas; catalizadores químicos; técnicas analíticas como las cromatografía preparativa o analítica de HPLC y electroforesis; como agentes quelatantes de metales; como agentes de contraste en aplicaciones médicas o veterinarias; como fármacos, en particular para todos los tratamientos relacionados con el metabolismo del colesterol; aditivos alimentarios.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 927

② Nº de solicitud: 200502693

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.08.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SALUNKE, D.B. et al. "New Steroidal Dimers with Antifungal and Antiproliferative Activity". Journal of Medicinal Chemistry, 2004, Volumen 47, Número 6, páginas 1591-1594. Ver figura 4, compuestos 5-8; esquema 1.	1-15
A	GEALL, A.J. et al. "Spermine and thermine conjugates of cholic acid condense DNA, but lithocholic acid polyamine conjugates do so more efficiently". Chemical Communications, 1998, páginas 2035-2036. Ver compuestos 1 y 2.	1-15
A	COLEMAN, J.P. et al. "Synthesis and characterization of novel analogs of conjugated bile acids containing reversed amide bonds". Journal of Lipid Research, 1995, Volumen 36, páginas 901-910. Ver figuras 1 y 2, compuestos 6a y 6b.	1-15
A	ES 2096614 T3 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 16.03.1997, página 156, ejemplos 673-677, tabla 73.	1-15
A	TAMMINEN, J. & KOLEHMAINEN, E. "Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts". Molecules, 2001, Volumen 6, páginas 21-46. Ver esquemas 3 y 4, compuestos d-g.	1-15
A	BURROWS, C.J. & SAUTER, R.A. "Synthesis and Conformational Studies of a New Host System Based on Cholic Acid". Journal of Inclusion Phenomena, 1987, Volumen 5, páginas 117-121. Ver página 118, compuestos 1 y 2, esquema 1.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.03.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07J 41/00** (2006.01)

**C07J 75/00** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07J, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, HCAPLUS, NPL, XPESP, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.03.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**Consideraciones:**

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Journal of Medicinal Chemistry 2004, Vol. 47, pp. 1591	00-00-2004
D02	Chemical Communications 1998, pp. 2035-2036	00-00-1998
D03	Journal of Lipid Research 1995, Vol. 36, pp. 901-910	00-00-1995
D04	ES 2096614 T3	16-03-1997

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención es una serie de dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales (cólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico) que comprenden un grupo que actúa como puente de unión entre los dos esteroides, los procedimientos para su obtención por acoplamiento del correspondiente 24-aminoesteroide y un derivado del ácido dicarboxílico apropiado, y su uso en una aplicación relacionada con sus propiedades tensioactivas.

El documento D01 divulga dímeros de ácido cólico y desoxicólico, con puentes amida derivados de N,N-dietilentiaramina y N,N-trietilendiamina (figura 4, compuestos 5-8), y su síntesis por activación del ácido carboxílico del ácido biliar previa al acoplamiento con la amina (esquema 1). Estos compuestos dímeros derivados de ácidos biliares, que poseen actividad anticancerígena, se diferencian de los compuestos de la invención en que el grupo carboxílico del puente amida de unión entre las dos moléculas de ácido es el que ya está presente en posición 24 de dicho ácido biliar, al contrario que ocurre en los primeros, en los que es el grupo amina el que se encuentra originalmente en dicha posición 24; es decir, unos y otros difieren en la orientación del grupo amida.

El documento D02 divulga un dímero de aminoesteroide (compuesto 1), en el que dos moléculas del derivado 3,24-diamino de ácido litocólico se encuentran unidas a través de una cadena saturada de cuatro átomos de carbono, formando un puente diamino. Aunque el monómero de partida para llegar a este compuesto es, al igual que en los compuestos de la invención, un derivado 24-amino de un ácido biliar, el puente de unión es de naturaleza diamino, en lugar de diamido, y además posee un grupo amino adicional en posición 3. Este documento también divulga un dímero de ácido cólico que presenta un puente de unión diamida derivado de espermidina (compuesto 2), teniendo dichos grupos amido orientación opuesta a los compuestos de la invención.

El documento D03 divulga derivados 24-nor-23-amino de los ácidos cólico y ursodesoxicólico, y sus correspondientes "amidas inversas" conjugadas, obtenidas por reacción del derivado 23-amino con un ácido dicarboxílico (figura 1; figura 2, compuestos 6a y 6b). El grupo amido de estos compuestos tiene la misma orientación que en los compuestos de la invención, aunque se encuentra en posición 23 y no 24, pero en este caso no son dímeros, ya que poseen un solo grupo esteroideo.

El documento D04 divulga las bis-amidas derivadas de ácido cólico y diversas N,N-alquilendiaminas (página 156, compuestos 673-677), un procedimiento para su obtención a partir del ácido biliar correspondiente y su utilidad en determinados preparados farmacéuticos. Estos compuestos, al igual que los divulgados en D01, difieren de los de la invención en la orientación del puente amida.

Los documentos citados D01-D04 muestran tan sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia dímeros derivados de 24-aminoesteroides de los ácidos biliares naturales, que comprenden un grupo diamida que actúa como puente de unión entre los dos esteroides, presentando dichos grupos amida la orientación inversa a los derivados de los ácidos biliares naturales (reivindicación independiente 1); y por tanto, tampoco hacia los procedimientos para su preparación (reivindicaciones independientes 10-13); al procedimiento para la obtención de sus sales sódicas y potásicas (reivindicación independiente 14); y al uso de estos compuestos en una aplicación relacionada con sus propiedades tensioactivas (reivindicación independiente 15).

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones 1-15 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.