

“DERIVATI DEL COLANO PER L’USO NEL TRATTAMENTO E/O LA
PREVENZIONE DI MALATTIE MEDIATE DA FXR E TGR5/GPBAR1”

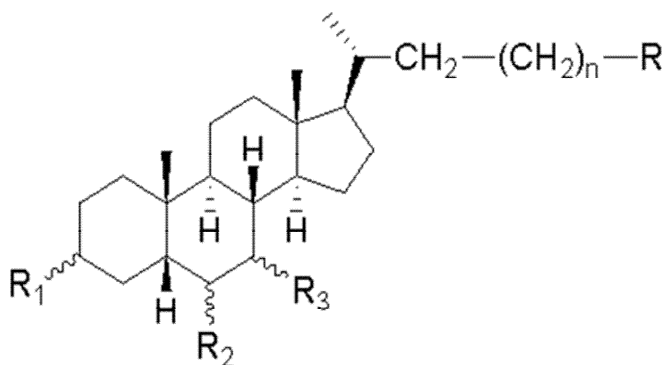
TRADUZIONE

5 Del testo del Brevetto Europeo n. 3 626 725, domanda n.
19204247.1 depositata il 28 maggio 2015,
di BAR PHARMACEUTICALS S.R.L., di nazionalità italiana,
con sede in VIA GRAMSCI, 88/A - 42124 REGGIO EMILIA (ITALIA)
Inventori: ZAMPELLA Angela, FIORUCCI Stefano

10

RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda composti aventi
impalcature di colano di formula (I), detti composti per
l’uso nel trattamento e/o nella prevenzione delle
malattie mediate da FXR e TGR5/GPBAR1.



15

DESCRIZIONE

CAMPO DELL’INVENZIONE

La presente invenzione riguarda composti aventi
impalcature di colano, detti composti per l’uso nel
20 trattamento e/o nella prevenzione di malattie mediate da
FXR e TGR5/GPBAR1.

STATO DELLA TECNICA

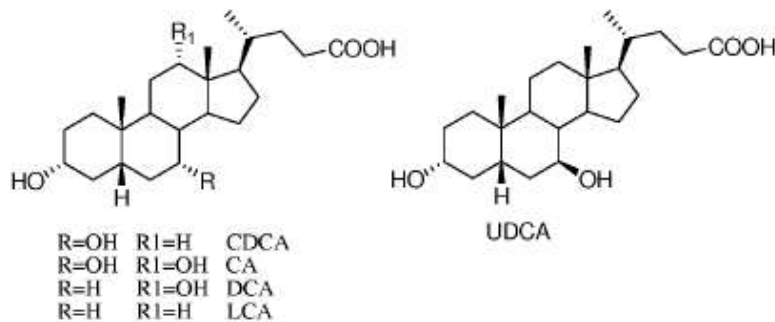
Gli acidi biliari (BA) sono molecole segnale che interagiscono con due tipi di recettori cellulari dedicati, i recettori nucleari intracellulari e i
5 recettori di superficie cellulare. I recettori nucleari includono il recettore del farnesoide X (FXR), identificato come sensore dell'acido biliare endogeno (Makishima et al. *Science* 1999, 284, 1362; Parks et al. *Science* 1999, 284, 1365).

10 Altamente espresso nei tessuti entero-epatici (fegato e intestino), l'FXR regola l'omeostasi dell'acido biliare, le vie metaboliche includendo anche l'omeostasi dei lipidi e del glucosio (Zhang et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 1006). Inoltre gli agonisti di FXR
15 forniscono effetti antinfiammatori, antifibrotici e anticancro (Renga et al. *FASEB J.* 2012, 26, 3021-3031).

Il recettore di superficie cellulare dell'acido biliare (GPBAR1, M-BAR1, GP-BAR1, TGR5) appartiene alla superfamiglia rodopsina-simile dei recettori accoppiati
20 alla proteina G (Takeda et al. *FEBS Lett.* 2002, 520, 97; Kawamata et al. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 9435).

Il legame del ligando a TGR5/GPBAR1 determina l'aumento dei livelli intracellulari di cAMP con conseguente attivazione di una cascata di segnalazione.
25 GPBAR1 è altamente espresso nel fegato e nell'intestino

ma anche in muscoli, cervello, tessuto adiposo, macrofagi
e cellule entoteliali. Nel muscolo e nel tessuto adiposo
bruno, TGR5/GPBAR1 aumenta il dispendio di energia e il
consumo di ossigeno (Watanabe et al. Nature 2006, 439,
5 484) nelle cellule L entero-endocrine, l'attivazione di
TGR5/GPBAR1 stimola la secrezione del peptide glucagone-
simile (GLP)-1, una incretina che aumenta il rilascio di
insulina pancreatico, regolando così i livelli di
glicemia, la motilità gastrointestinale e l'appetito
10 (Thomas, et al. Cell. Metab. 2009, 10, 167).



Chimicamente i BA sono derivati della catena
laterale del colesterolo tronca. Il loro repertorio
molecolare è generato dapprima nel fegato con la
15 produzione di acidi biliari primari, acido colico (CA) e
acido chenodeossicolico (CDCA). La microbiotrasformazione
nell'intestino genera acidi biliari secondari, acido
deossicolico (DCA) e acido litocolico (LCA).
Nell'organismo umano gli acidi biliari sono coniugati
20 alla glicina e alla taurina. L'attività verso i due
recettori BA è struttura dipendente con CDCA l'attivatore

di FXR endogeno più potente, e LCA e TLCA i più forti agonisti naturali di TGR5/GPBAR1.

Il prurito da colestasi è stato citato come grave effetto collaterale associato all'uso degli agonisti di FXR in PBC e un recente studio ha indicato TGR5/GPBAR1
5 FXR in PBC e un recente studio ha indicato TGR5/GPBAR1 come il target molecolare coinvolto nello sviluppo di questo effetto collaterale (Alemi et al. J. Clin. Invest. 2013, 123, 1513-1530).

WO2013192097 descrive l'acido 6-alfa-etil-
10 chenodeossicolico (6-ECDCA), un potente e selettivo agonista di FXR dotato di effetto anticolestatico.

WO2008002573 descrive derivati dell'acido biliare come ligandi di FXR per la prevenzione o il trattamento di malattie o condizioni mediante da FXR.

15 WO2010014836 e Sato H. (J Med Chem. 2008, 51, 4849) descrive modulatori di TGR5.

D'Amore C. et al. (J. Med. Chem. 2014, 57, 937) descrive progetto, sintesi, e valutazione biologica di doppi agonisti GPBAR1/FXR. D'Amore et al. descrive i
20 composti BAR502 e BAR504 come intermedi di sintesi.

Iguchi Y. et al. (J Lipid Res. 2010, 51, 1432) descrive la funzione degli alcoli biliari come ligandi di TGR5.

Il composto BAR107 è descritto come intermedio di
25 sintesi da Kihira K. et al. (Steroids 1992, 57(4), 193-

198).

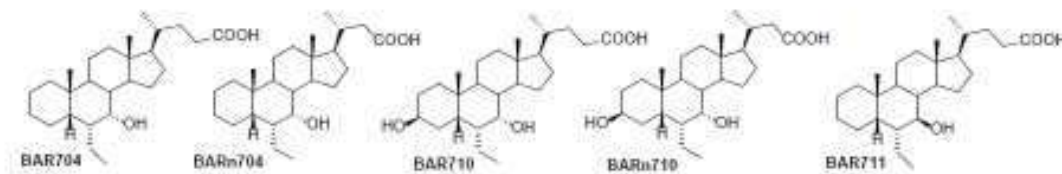
Swaan P. W. et al. (J. Comp.-Aid. Mol. Des. 1997, 11, 581-588) in una modellazione molecolare del trasportatore di acido biliare intestinale testato ursocolato (nella
5 presente composto 15, BARn406) tra un gruppo di coniugati all'acido biliare. È stato riscontrato che BARn406 ha una capacità non rilevabile di inibire il trasporto dell'acido taurocolico nelle cellule CaCo-2.

Burns et al. (Steroids 2011, 76(3), 291-300)
10 descrive la sintesi e l'attività olfattiva dei derivati dell'acido 5-biliare solfato nella lampreda di mare (Petromyzon marinus). Ivi il composto 9e descritto (nella presente composto BAR407) non stimola una risposta olfattiva.

15 Lo scopo della presente invenzione è l'identificazione di nuovi composti contenenti l'impalcatura chimica di colano e che modulano FXR e/o TGR5/GPBAR1.

RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

20 L'oggetto della presente invenzione è un composto scelto tra i seguenti: BAR704, BARn704, BAR710, BARn710 and BAR711, come qui definiti. Questi composti hanno le seguenti formule, inclusi sali farmaceuticamente accettabili inorganici e organici.



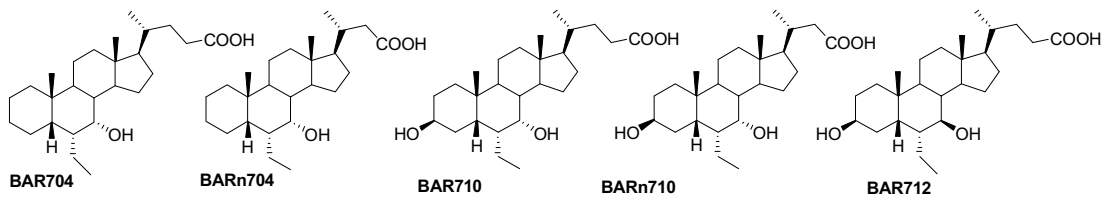
È stato riscontrato che composti come sopra descritti sono modulatori di FXR o/e TGR5/GPBAR1 e sono pertanto utili nel trattamento di malattie mediate da FXR e TGR5/GPBAR1.

Pertanto un aspetto della presente invenzione riguarda i composti di cui sopra per l'uso come farmaco.

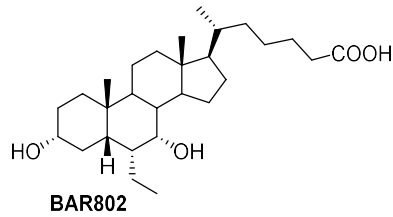
Per un ulteriore aspetto la presente invenzione riguarda un composto dell'invenzione come sopra descritto per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di disturbi gastrointestinali, malattie epatiche, malattie cardiovascolari, aterosclerosi, malattie metaboliche, malattie infettive, cancro, disturbi renali, disturbi infiammatori e disturbi neurologici (quali ictus), detto composto dell'invenzione come sopra descritta.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo l'invenzione sono forniti i composti BAR704, BARn704, BAR710, BARn710 e BAR711 come sopra definiti. Sono anche forniti i composti illustrati sotto, in cui, di questi, il composto BAR712 non è un composto secondo l'invenzione.

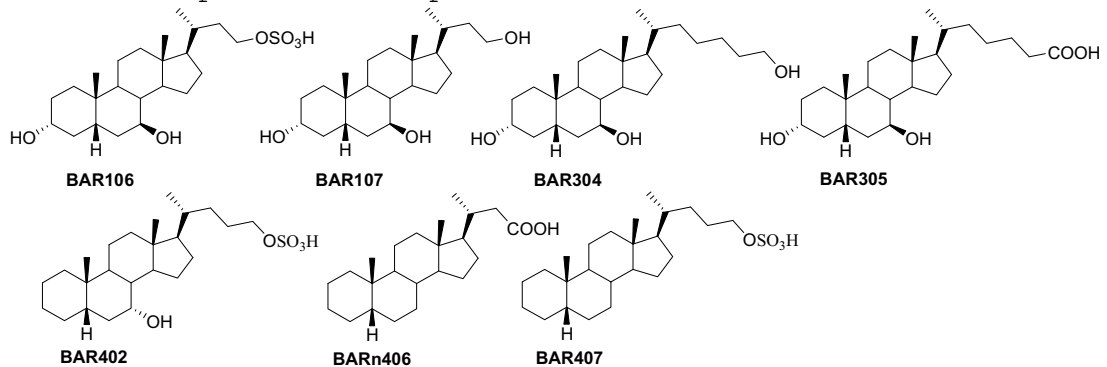


Viene qui inoltre fornito il seguente composto che non fa parte della presente invenzione:



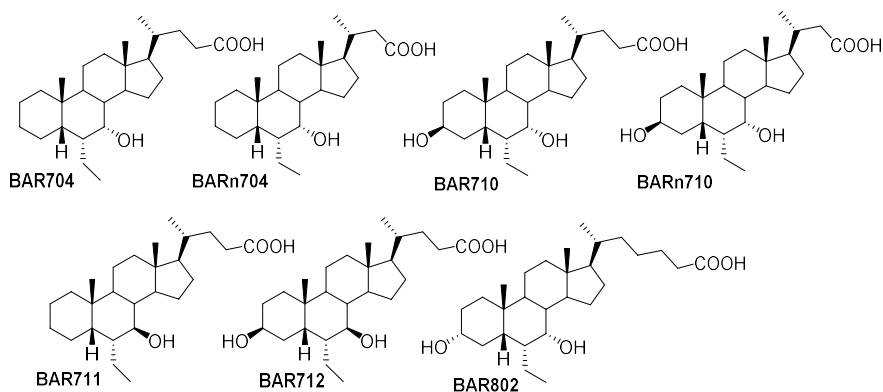
5

Vengono qui inoltre forniti i seguenti composti che non fanno parte della presente invenzione:



10

Sono inoltre forniti i seguenti composti. I composti BAR704, BARn704, BAR710, BARn710 e BAR11 sono parte della presente invenzione, mentre i composti BAR712 e BAR802 non sono parte della presente invenzione:



I composti secondo l'invenzione, sono modulatori altamente selettivi di FXR o TGR5/GPBAR1 o doppi modulatori di FXR e TGR5/GPBAR1 e sono pertanto utili
5 come farmaci in particolare per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di disturbi gastrointestinali, malattie epatiche, malattie cardiovascolari, aterosclerosi, malattie metaboliche, disturbi metabolici, malattie infettive, cancro, disturbi renali, disturbi
10 infiammatori e disturbi neurologici quali ictus.

In alcune forme di realizzazione la malattia epatica è selezionata nel gruppo costituito da malattie epatiche croniche incluse cirrosi biliare primaria (PBC), xantomatosi cerebrotendinea (CTX), colangite sclerosante
15 primaria (PSC), colestasi indotta da farmaci, colestasi intraepatica della gravidanza, colestasi associata a nutrizione parenterale, colestasi associata a iperproliferazione batterica e sepsi, epatite autoimmune, epatite virale cronica, malattia epatica alcolica,
20 steatosi non alcolica (NAFLD), steatoepatite non alcolica

(NASH), malattia del trapianto contro l'ospite associata a trapianto del fegato, trapianto di donatore vivo, rigenerazione epatica, fibrosi epatica congenita, malattia epatica granulomatosa, tumore maligno intra o
5 extraepatico, malattia di Wilson, emocromatosi, e carenza di alfa 1-antitripsina.

In alcune forme di realizzazione la malattia gastrointestinale è selezionata nel gruppo costituito da malattia infiammatoria dell'intestino (IBD) (inclusi
10 morbo di Crohn, colite ulcerosa e colite indeterminata), sindrome dell'intestino irritabile (IBS), iperproliferazione batterica, pancreatite acuta e cronica, malassorbimento, colite post-radiazione, e colite microscopica.

15 In alcune forme di realizzazione la malattia renale è selezionata nel gruppo costituito da nefropatia diabetica, nefropatia ipertensiva, malattia glomerulare cronica, incluse glomerulonefrite cronica e glomerulopatia da trapianto cronica, malattie
20 tubulointerstiziali croniche e disturbi vascolari del rene.

In alcune forme di realizzazione la malattia cardiovascolare è selezionata nel gruppo costituito da aterosclerosi, dislipidemia, ipercolesterolemia,
25 ipertrigliceridemia, ipertensione anche nota come

ipertensione arteriosa, cardiopatia infiammatoria incluse miocardite ed endocardite, cardiopatia ischemica angina stabile, angina instabile, infarto miocardico, malattia cerebrovascolare incluso ictus ischemico, cardiopatia polmonare incluse ipertensione polmonare, arteriopatia periferica (PAD), anche nota come malattia vascolare periferica (PVD) arteriopatia occlusiva periferica e arteriopatia obliterante periferica.

In alcune forme di realizzazione la malattia metabolica è selezionata nel gruppo costituito da insulino resistenza, sindrome metabolica, diabete di tipo I e di tipo II, ipoglicemia, disturbi della corteccia surrenalica inclusa insufficienza della corteccia surrenalica.

In alcune forme di realizzazione il disturbo metabolico è selezionato nel gruppo costituito da obesità e condizioni associate a chirurgia bariatrica.

In alcune forme di realizzazione il cancro è selezionato nel gruppo di cancro epatico, cancri del dotto biliare, cancro pancreatico, cancro gastrico, cancro colon-rettale, cancro mammario, cancro ovarico e condizione associata a resistenza alla chemioterapia.

In alcune forme di realizzazione il disturbo infettivo è selezionato nel gruppo di malattia associata ad immunodeficienza umana (AIDS) e disturbi correlati,

infezione da virus B e virus C.

In alcune forme di realizzazione il disturbo infiammatorio è selezionato nel gruppo di artrite reumatoide, fibromialgia, sindrome di Sjogren, sclerodermia, sindrome di Behcet, vasculite e lupus eritematoso sistemico.

I dati sull'attività di alcuni composti dell'invenzione e altri composti qui descritti su FXR e TGR5/GPBAR1 sono descritti nella tabella seguente. In questa tabella, le attività per i composti dell'invenzione e altri composti qui descritti su FXR e GPBAR1 sono state confrontate con quelle dei composti di riferimento: ovvero CDCA per FXR e TLCA per TGR5/GPBAR1. Ciascun composto è stato testato alla concentrazione di 10 microM e l'attività di transattivazione di CDCA su FXR e TLCA su CRE (ovvero TGR5/GPBAR1) è stata considerata uguale al 100%.

Tabella 1

Composti di formula (I)	FXR (% di attività rispetto a CDCA 10 μ M)	GPBAR1 (% di attività rispetto a TLCA 10 μ M)
BAR106	0	19.0 \pm 1.3
BAR107	1.8 \pm 0.3	9.9 \pm 1.7
BAR305	0	23.9 \pm 4.0

BAR304	0	55.1 ± 12.5
BAR402	336.4 ± 20.8	28.0 ± 1.8
BARn406	27.0 ± 1.5	4.8 ± 1.8
BAR407	177.1 ± 3.5	37.3 ± 2.5
BAR501	9.9 ± 0.1	64.5 ± 0.5
BAR501-6a	15.4 ± 1.2	46.6 ± 6.7
BARn501	8.5 ± 1.4	83.1±7.4
BAR502	263.0 ± 32.0	74.5 ± 6.4
BAR503	68.8 ± 26.6	59.8 ± 0.1
BAR504	488.5 ± 17.5	103.0 ± 12.1
BAR504-6b	32.4 ± 14.1	75.3 ± 3.4
BAR506	411.5 ± 36.5	80.9 ± 9.5
BAR701	101.3 ± 10.1	50.2 ± 2.3
BARn701	90 ± 22	55 ± 1.0
BAR701solf	229 ± 2.0	63.5 ± 0.5
BAR702	11.7 ± 0.8	35.8 ± 1.2
BAR703	8.6 ± 0.8	47.7 ± 1.0
BAR704	220.5 ± 37.5	27.9 ± 6.3
BARn704	202.5 ± 1.5	64 ± 2.0
BAR705	43.7 ± 3.9	67.0 ± 9.9
BAR706	153 ± 9.0	66.05 ± 7.6
BARn706	197.5 ± 4.5	69.5 ± 6.5
BARn706solf	120 ± 9.5	71.5 ± 0.5
BAR707	92.5 ± 7.5	65 ± 6.0
BAR708	6.4 ± 0.8	57.6 ± 4.6

BAR709	33.7 ± 2.0	54.2 ± 0.3
BAR710	179 ± 43	49.5 ± 0.5
BARn710	142 ± 1.0	75 ± 8.0
BAR712	33.0 ± 0.15	49.7 ± 1.2
BAR802	11.5 ± 8.5	56 ± 5.0
BAR803	122.5 ± 5.5	80.5 ± 5.0
BAR804	196.5 ± 6.5	52.5 ± 3.5

Per un aspetto, la presente invenzione riguarda i composti dell'invenzione in cui i composti sono doppi agonisti di FXR e TGR5/GPBAR1. Un composto, non secondo l'invenzione, ma che ha tale attività duale è BAR502.

5 Sorprendentemente, BAR502 non induce prurito quando somministrato ad animali resi colestatici mediante somministrazione di ANIT o estrogeni. In sindromi colestatiche, l'accumulo corporeo di acidi biliari è ritenuto la causa di prurito. Recentemente, è stato

10 dimostrato che TGR5/GPBAR1 mediano il prurito provocato dalla somministrazione intradermica di DCA e LCA (Alemi et al. J. Clin. Invest. 2013, 123, 1513-1530). In sperimentazioni cliniche, la somministrazione a pazienti affetti da cirrosi biliare primaria (PBC) di acido

15 obeticolico ha determinato grave prurito in circa l'80% di pazienti. Un vantaggio specifico e sorprendente di BAR502 è che questo agente non induce prurito quando somministrato ad animali resi colestatici mediante



somministrazione di α -naftil-isotiocianato (ANIT) o 17α -
etinilestradiolo (due modelli convalidati di colestasi).
In questo scenario sperimentale la somministrazione di
BAR502 aumenta la sopravvivenza, attenua i livelli serici
5 di fosfatasi alcalina e modula fortemente l'espressione
epatica di geni target di FXR canonici inclusi OSTa,
BSEP, SHP e MDR1, senza indurre prurito. Nel modello 17α -
etinilestradiolo, BAR502 attenua la colestasi e reintegra
il pool di acidi biliari senza indurre prurito,
10 dimostrando che in modelli di colestasi non ostruttiva,
BAR502 attenua le lesioni epatiche senza provocare
prurito.

In un aspetto, la presente invenzione riguarda
composti dell'invenzione che sono agonisti altamente
15 selettivi di FXR senza effetti su GPBAR1 quando
somministrati da soli ma efficaci nell'inibizione
dell'attivazione di GPBAR1 provocata da TLCA ($10 \mu\text{M}$),
comportandosi così come antagonisti di GPBAR1. In un
aspetto, la presente invenzione riguarda composti
20 dell'invenzione in cui i composti sono agonisti altamente
selettivi di GPBAR1 senza effetti su FXR. In un aspetto,
la presente invenzione riguarda composti di formula (I)
in cui i composti sono antagonisti altamente selettivi di
GPBAR1 senza effetti su FXR.

25 La presente invenzione potrebbe essere meglio



compresa in considerazione degli esempi e della sezione
sperimentale di seguito. I seguenti esempi sono
esemplificativi della presente invenzione solo nella
misura in cui riguardano la sintesi e la sperimentazione
5 dei composti BAR704, BARn704, BAR710, BARn710 e BAR711.
La sintesi e la sperimentazione di altri composti negli
esempi seguenti sono solo a scopo di confronto.

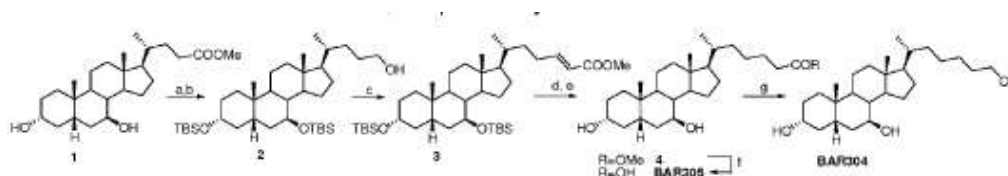
SEZIONE SPERIMENTALE

Chimica

10 **ESEMPIO 1. Preparazione di composti di formula (I)**
in cui $R_2=H$

ESEMPIO 1A. Sintesi di derivati di bis- omoursodeossicolano

Una sequenza di reazione a quattro fasi su **1**,
15 inclusa la protezione delle funzioni alcoliche in C3 e
C7, la riduzione del metil estere della catena laterale,
e la successiva ossidazione di Swern in un unico
contenitore (one pot)/omologazione Wittig C2 fornivano il
metil estere protetto di $\Delta^{24,25}$ -bis-omoUDCA.
20 L'idrogenazione del doppio legame della catena laterale e
la deprotezione della funzione alcolica fornivano il
bisomoUDCA metil estere **4**, che è stato stato usato come
materiale di partenza nella preparazione di BAR305 e il
corrispondente alcol, BAR304, attraverso trattamento con
25 LiOH e LiBH₄, rispettivamente.



a) 2,6-lutidina, t-butildimetilsilil trifluorometansolfonato, CH_2Cl_2 , 0°C ; LiBH_4 , MeOH anidro, THF, 0°C , resa quantitativa in due fasi; c) DMSO, ossalil cloruro, TEA anidro, CH_2Cl_2 -78°C quindi metil(trifenilfosforanilidene)acetato, 76%; d) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ tipo Degussa, THF/MeOH 1:1, resa quantitativa; e) HCl 37%, MeOH, resa quantitativa; f) NaOH 5% in MeOH/ H_2O 1:1 v/v, 60%; g) LiBH_4 , MeOH anidro, THF, 0°C , 77%.

Fase a, b) Preparazione di 3α , 7β -di(terz-butildimetilsililossi)- 5β -colan-24-olo (2)

Il composto **1** (1,2 g, 3 mmol) è stato protetto su due funzioni alcoliche seguendo la stessa procedura sintetica descritta in J. Med. Chem. 2014, 57, 937 per ottenere 1,9 g di metil 3α , 7β -di(terz-butildimetilsililossi)- 5β -colan-24-oato (resa quantitativa) sotto forma di aghi incolori, che è stato sottoposto alla fase successiva senza alcuna purificazione.

Metanolo (850 μL , 21 mmol) e LiBH_4 (10,5 mL, 2 M in THF, 21 mmol) sono stati addizionati ad una soluzione di metil estere (1,9 g, 3 mmol) in THF anidro (30 mL) a 0°C seguendo la stessa procedura di sintesi descritta in J.



Med. Chem. 2014, 57, 937. La purificazione mediante gel di silice (esano/etil acetato 99:1 e 0,5% TEA) forniva **2** come sostanza solida bianca (1,8 g, resa quantitativa).

Fase c) Preparazione in un unico contenitore di
5 **metil 3 α , 7 β -di(terz-butildimetilsililossi)-25, 26-**
bisomo-5 β -col-24-en-26-oato (3).

DMSO (2,1 mL, 30 mmol) è stato addizionato a gocce per 15 minuti ad una soluzione di ossalil cloruro (7,5 mL, 15 mmol) in diclorometano anidro (30 mL) a -78°C
10 sotto una atmosfera di argon. Dopo 30 minuti è stata addizionata una soluzione di **2** (1,8 g, 3 mmol) in CH₂Cl₂ anidro attraverso cannula e la miscela è stata agitata a -78°C per 30 minuti. È stato addizionato a gocce Et₃N (2,5 mL, 18 mmol). Dopo 1 ora è stato addizionato
15 metil(trifenilfosforanilidene)acetato (2,0 g, 6 mmol) e la miscela è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente. Una soluzione satura di NaCl è stata addizionata e la fase acquosa è stata estratta con dietil etere (3x100 mL). Le fasi organiche combinate sono state
20 lavate con acqua, anidrificate (Na₂SO₄) e concentrate. La purificazione mediante gel di silice (esano-etil acetato 95:5 e 0,5% TEA) forniva il composto **3** come olio incolore (1,5 g, 76%).

Fase d) Preparazione di metil 3 α ,7 β -di(terz-
25 **butildimetilsililossi)-25, 26-bisomo-5 β -colan-26-oato.**

Una soluzione del composto **3** (1,5 g, 2,3 mmol) in THF anidro/MeOH anidro (25 mL/25 mL, v/v) è stata idrogenata in presenza di Pd(OH)₂ 5% in peso su carbone attivo tipo Degussa (20 mg) seguendo la stessa procedura di sintesi descritta in J. Med. Chem. 2014, 57, 937
5 ottenendo il metil 3 α , 7 β -di(terz-butildimetilsililossi)-25, 26-bisomo-5 β -colan-26-oato (1,5 g, resa quantitativa) che è stato sottoposto alla fase e) senza purificazione.

Fase e) Preparazione di metil 3 α ,7 β -diidrossi-25, 26-bisomo-5 β -colan-26-oato (4)
10

Metil 3 α , 7 β -di(terz-butildimetilsililossi)-25, 26-bisomo-5 β -colan-26-oato (1,5 g) è stato dissolto in metanolo (70 mL). Alla soluzione è stato addizionato HCl (2 mL, 37% v/v) seguendo la stessa procedura di sintesi
15 descritta in J. Med. Chem. 2014, 57, 937 ottenendo **4** come sostanza solida amorfa incolore (1,0 g, resa quantitativa).

Fase f) Preparazione dell'acido 3 α ,7 β -diidrossi-25, 26-bisomo-5 β -colan-26-oico (BAR305). Una porzione del
20 composto **4** (430 mg, 1 mmol) è stata idrolizzata con NaOH (400 mg, 10 mmol) in una soluzione di MeOH: H₂O 1:1 v/v (20 mL) per 4 ore a riflusso. Un campione analitico è stato purificato mediante HPLC su un Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; d.i. 4,6 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (95:5) come
25 eluente (portata 1 mL/min) (t_R =5 min).

BAR305: C₂₆H₄₄O₄

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 3.47 (2H, m, H-3 e H-7),
2.27 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H₂-25), 0.96 (3H, s, H₃-19),
5 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-21), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 178.2, 72.1, 71.9, 57.6,
56.7, 44.8, 44.5, 44.0, 41.6, 40.7, 38.6, 38.0, 36.9,
36.8, 36.1, 35.3, 35.2, 30.9, 29.8, 27.9, 26.7, 26.6,
10 23.9, 22.4, 19.3, 12.7.

Fase g) 25, 26-bisomo-5β-colan-3α, 7β,26-triolo (BAR304). Il composto **4** (500 mg, 1,2 mmol) è stato ridotto nella stessa condizione operativa descritta nella fase b). La purificazione mediante gel di silice
15 (CH₂Cl₂/metanolo 9:1) forniva BAR304 come olio incolore (375 mg, 77%). Un campione analitico è stato purificato mediante HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; d.i.4,6 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (85:15) come eluente (portata 1 mL/min) (t_R=9 min).

20 **BAR 304:** C₂₆H₄₆O₃

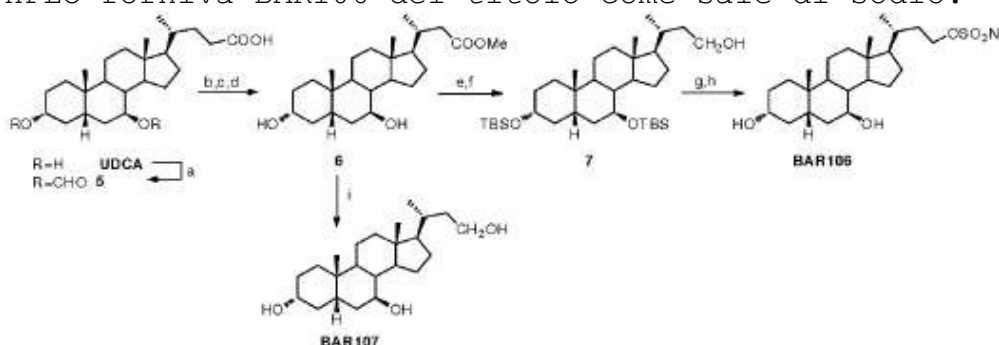
¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 3.53 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H₂-26), 3.48 (2H, m, H-3 e H-7), 0.95 (3H, s, H₃-19),
0.93 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-21), 0.70 (3H, s, H₃-18).

25 ¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,

usando CD₃OD come solvente: δ 72.1, 71.9, 63.0, 57.5, 56.7, 44.7, 44.4, 44.0, 41.6, 40.7, 38.5, 37.9, 37.2, 37.0, 36.1, 35.2, 33.7, 30.9, 29.8, 27.9, 27.4, 27.1, 23.9, 22.4, 19.4, 12.7.

5 **ESEMPIO 1B. Sintesi di 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-il-23-sodio solfato (BAR106) e 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BAR107)**

BAR106 è stato preparato partendo da UDCA mediante una sequenza di reazione comprendente la performilazione dei gruppi ossidrilici, la trasposizione di Beckmann di un atomo di carbonio in C24 e la trasformazione del gruppo carbossilico C23 nel corrispondente intermedio metil estere. La protezione sui gruppi ossidrilici in C-3 e C-7 come silil eteri, la riduzione in C23 metil estere, la solfatazione nella funzione alcolica primaria C23 e infine la deprotezione forniva BAR106 grezzo come sale di ammonio. La purificazione su Amberlite e quindi mediante HPLC forniva BAR106 del titolo come sale di sodio.



20 a) HCOOH, HClO₄, 96%; b) TFA, anidride trifluoroacetica, NaNO₂, 96%; c) KOH 30% in MeOH/H₂O 1:1 v/v, 97%; d) p-



TsOH, MeOH anidro, 98%; e) 2,6-lutidina, t-butildimetilsilil trifluorometansolfonato, CH₂Cl₂, 0°C, 88%; f) LiBH₄, MeOH anidro, TFH, 0°C, resa quantitativa; g) Et₃N.SO₃, DMF, 95°C; h) HCl 37%, MeOH, quindi Amberlite
5 CG-120, MeOH, 86% in due fasi; i) LiBH₄, MeOH anidro, TFH, 0°C, resa quantitativa.

Fasi a,d) Preparazione di metil 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-oato (6).

Acido ursodeossicolico (2.0 g, 5.1 mmol) è stato
10 trasformato in metil 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-oato (6, 1,6 g, 87%) seguendo la stessa procedura di sintesi descritta in J. Med. Chem. 2014, 57, 937.

Fase e) Preparazione di metil 3 α ,7 β -di(terz-butildimetilsililossi)-5 β -colan-24-oato

15 Il composto 6 (1,2 g, 3,0 mmol) è stato protetto sui gruppi ossidrile nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1A fase a). La purificazione mediante cromatografia flash su gel di silice usando esano/etil acetato 9:1 e 0,5% di trietilammina come
20 eluente, forniva il metil estere protetto (1,6 g, 88%).

Fase f) Preparazione di 3 α ,7 β -di(terz-butildimetilsililossi)-5 β -colan-24-olo (7)

Metil estere della catena laterale (818 mg, 1,3 mmol) è stato ridotto nella stessa condizione operativa
25 descritta nell'esempio 1A fase b). La purificazione

mediante cromatografia flash su gel di silice usando esano/etil acetato 98:2 e 0,5% di trietilammina come eluente, forniva **7** (770 mg, resa quantitativa).

Fasi g, h) Preparazione di 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-il-23-sodio solfato (BAR106)

Il complesso trietilammina-triossido di zolfo (2,0 g, 11 mmol) è stato addizionato ad una soluzione di **7** (660 mg, 1,1 mmol) in DMF anidra (25 mL) seguendo la stessa procedura di sintesi descritta in J. Med. Chem. 10 2014, 57, 937. HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; d.i.10 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (65:35) come eluente (portata 3 mL/min), forniva 442 mg (86% su due fasi) di BAR106 (t_R =8,4 min).

BAR 106: C₂₃H₃₉NaO₆S

15 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 4.04 (2H, m, H₂-23), 3.48 (2H, m, H-3 e H-7), 1.00 (3H, d, J= 6.5 Hz, H₃-21), 0.97 (3H, s, H₃-19), 0.72 (3H, s, H₃-18).

Fase i) Preparazione di 3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BAR107)

Il composto **6** è stato trasformato in BAR107 nella stessa condizione operativa descritta nella fase f.

BAR107: C₂₃H₄₀O₃

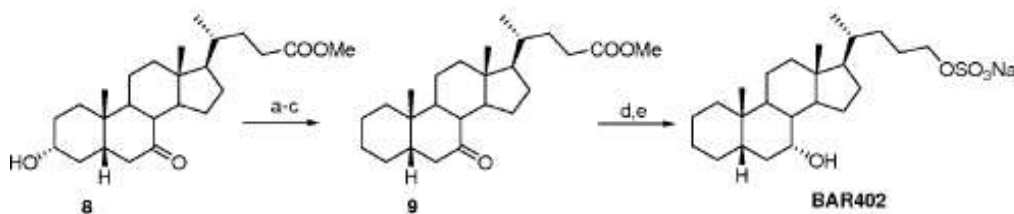
25 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.60 (1H, m, H-7), 3.51

(1H, m, H-3), 3.50 (2H, m, H₂-23), 0.97 (3H, d, ovl, H₃-21), 0.96 (3H, s, H₃-19), 0.72 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 72.1, 71.9, 60.8, 57.5, 57.1, 44.8, 44.5, 44.0, 41.6, 40.7, 39.9, 38.6, 38.0, 36.1, 35.2, 34.1, 31.0, 29.8, 27.9, 23.9, 22.4, 19.5, 12.6;

Esempio 1C. Sintesi di 7 α -idrossi-5 β -colan-24-il-24-sodio solfato (BAR402)

10 La tosilazione e l'eliminazione del gruppo ossidrile in C-3 su metil estere **8** seguita dalla riduzione del doppio legame, successivo trattamento con LiBH₄ e solfatazione regioselettiva nel gruppo ossidrile primario in C-24 forniva BAR402.



a) p-TsCl, piridina, resa quantitativa, b) LiBr, Li₂CO₃, DMF, riflusso, c) H₂, Pd(OH)₂, THF/ MeOH 1:1, temperatura ambiente, resa quantitativa; d) LiBH₄, MeOH anidro, THF, 0°C, 79%; e) Et₃N.SO₃, DMF, 95°C.

20 Fasi a-c) Preparazione di metil 7-cheto-5 β -colan-24-oato (9)

Ad una soluzione di **8** (965 mg, 2,5 mmol) in piridina anidra (100 mL), è stato addizionato tosil cloruro (4,7



g, 25,0 mmol), e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. È stata versata in acqua fredda (150 mL) ed estratta con CH₂Cl₂ (3 × 150 mL). Lo strato organico combinato è stato lavato con una soluzione di NaHCO₃ satura (150 mL), e acqua (150 mL), e quindi anidrificato su MgSO₄ anidro e fatto evaporare sottovuoto ottenendo 1,4 g di metil 3 α -tosilossi-7-cheto-5 β -colan-24-oato (resa quantitativa). Bromuro di litio (434 mg, 5,0 mmol) e carbonato di litio (370 mg, 5,0 mmol) sono stati addizionati ad una soluzione di 3 α -tosilossi-7-cheto-5 β -colan-24-oato (1,4 g, 2,5 mmol) in DMF anidra (30 mL), e la miscela è stata sottoposta a riflusso per 2 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela è stata lentamente versata in una soluzione di HCl al 10% (20 mL) ed estratta con CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). Lo strato organico combinato è stato lavato successivamente con acqua, soluzione di NaHCO₃ satura e acqua, e quindi anidrificato su MgSO₄ anidro e fatto evaporare a secchezza ottenendo 965 mg di un residuo oleoso (resa quantitativa), che è stato sottoposto alla fase successiva senza alcuna purificazione.

L'idrogenazione su Pd(OH)₂ nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1A, fase d forniva 975 mg di **9** (resa quantitativa), che è stato sottoposto alla fase successiva senza alcuna purificazione.



Fase d) Preparazione di 5 β -colan-7 α ,24-diolo

Trattamento con LiBH₄ sul composto **9** alla stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1A fase b e la purificazione mediante gel di silice (etil acetato-
5 esano, 85:15) forniva 5 β -colan-7 α ,24-diolo come sostanza solida bianca (714 mg, 79%).

Fase e) Preparazione di 7 α -idrossi-5 β -colan-24-il-24-sodio solfato (BAR402). La solfatazione su C24 è stata eseguita alle stesse condizioni operative descritte
10 nell'esempio 1B fase g) ottenendo BAR402 grezzo come sale di ammonio. RP18/HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; d.i.10 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (90:10) come eluente (portata 3 mL/min) forniva BAR402 (t_R= 6.6 min) come sale di sodio.

15 **BAR402:** C₂₄H₄₁NaO₅S

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.96 (2H, t, J = 6.6 Hz, H₂-24), 3.78 (1H, br s, H-7), 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, H₃-21), 0.92 (3H, s, H₃-19), 0.69 (3H, s, H₃-18);

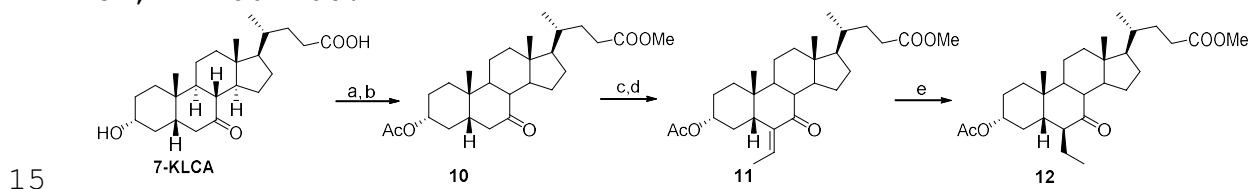
20 ¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 69.7, 69.4, 57.7, 51.6, 45.0, 43.8, 41.2, 41.0, 39.0, 37.1, 37.0 36.3, 34.2, 33.3, 31.7, 29.5, 29.0, 27.3, 24.8, 24.3, 22.7, 21.9, 19.2, 12.3.

25 **ESEMPIO 2. Preparazione dei composti di formula (I)**

in cui $R_2=Et$ o $=CH-CH_3$

ESEMPIO 2A. Sintesi di 6 β -etil-3 α ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR501)

La formazione del metil estere e l'acetilazione nel
5 gruppo ossidrile in C-3 su 7-KLCA forniva l'intermedio **10**
in una resa dell'84% in due fasi. L'addizione aldolica ad
un intermedio silil enol etere generava **11** che è stato
idrogenato sul doppio legame esociclico (H_2 su $Pd(OH)_2$)
ottenendo **12** in un resa dell'80% in tre fasi. Il
10 trattamento con $NaBH_4$ in metanolo seguito dalla riduzione
con $LiBH_4$ sul prodotto di reazione grezzo forniva una
miscela la cui purificazione HPLC (88% MeOH:H₂O) forniva
BAR501 puro in una resa del 79% rispetto al suo epimero
C7, BAR504-6b.



20 a) *p*-TsOH, MeOH anidro; b) anidride acetica, piridina,
resa dell'84% in due fasi; c) DIPA, *n*-BuLi, TMSCl, TEA
anidro, THF anidro -78°C; d) acetaldeide, $BF_3(OEt)CH_2Cl_2$,
-60°C, 80% in due fasi; e) H_2 , $Pd(OH)_2$, TFH/MeOH 1:1, resa
quantitativa; f) $NaBH_4$, MeOH; g) $LiBH_4$, MeOH anidro, THF,
0°C, 79% in due fasi.

**Fasi a-d). Preparazione di metil 3 α -acetossi-6-
etiliden-7-cheto-5 β -colan-24-oato (11)**



Ad una soluzione di acido 7-chetolitocolico (5 g, 12,8 mmol), dissolto in 100 mL di metanolo anidro è stato addizionato acido p-toluenesolfonico (11 g, 64,1 mmol). La soluzione è stata lasciata a riposo a temperatura ambiente per 2 ore. La miscela è stata spenta mediante addizione di una soluzione satura di NaHCO₃. Dopo l'evaporazione del metanolo, il residuo è stato estratto con EtOAc (3x150 mL). L'estratto combinato è stato lavato con soluzione salina, anidrificato su Na₂SO₄, e fatto evaporare ottenendo il metil estere come sostanza solida amorfa (5,13 g, resa quantitativa).

Alla soluzione del metil estere (5,13 g, 12,7 mmol) in piridina anidra (100 mL), è stato addizionato un eccesso di anidride acetica (8,4 mL, 89 mmol). Quando la reazione era completa, la piridina è stata concentrata sottovuoto. Il residuo è stato versato in acqua fredda (100 mL) ed estratto con AcOEt (3x150 mL). Le fasi organiche combinate sono state anidificate (Na₂SO₄) e concentrate ottenendo un residuo che è stato ulteriormente purificato mediante cromatografia flash su gel di silice usando esano/etil acetato 8:2 e 0,5% di trietilammina come eluente (4,8 g di **10** come sostanza solida bianca, resa dell'84% in due fasi).

Ad una soluzione di diisopropilammina (23 mL, 0,16 mol) in THF anidro (50 mL) è stata addizionata a gocce



una soluzione di n-butillitio (60 mL, 2,5 M in esano, 0,15 mol) a -78°C . Dopo 30 minuti, è stato addizionato trimetilclorosilano (27,1 mL, 0,21 mol). Dopo altri 30 minuti, è stata addizionata una soluzione del composto **10**
5 (4,8 g, 10,7 mmol) in THF anidro (70 mL). La reazione è stata agitata a -78°C per altri 45 minuti e quindi è stata addizionata trietilammina (54 mL, 0,38 mol). Dopo 1 ora, la miscela di reazione è stata lasciata riscaldare a -20°C , trattata con una soluzione satura acquosa di
10 NaHCO_3 (100 mL) e portata fino a temperatura ambiente in 2 ore. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato (3x50 mL). Le fasi organiche combinate sono state lavate quindi con soluzione satura di NaHCO_3 , acqua e soluzione salina. Dopo anidificazione su Na_2SO_4 anidro, il residuo
15 è stato fatto evaporare sottovuoto ottenendo 6 g di residuo giallo, che è stato diluito in CH_2Cl_2 anidro (50 mL) e raffreddato a -78°C . A questa soluzione agitata sono stati addizionati a gocce acetaldeide (3 mL, 53 mmol) e $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (13,5 mL, 0,107 mol). La miscela di
20 reazione è stata agitata per 2 ore a -60°C e lasciata riscaldare a temperatura ambiente. La miscela è stata spenta con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 ed estratta con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche combinate sono state lavate con soluzione salina, anidificate su Na_2SO_4
25 anidro e concentrate sotto vuoto.

La purificazione mediante gel di silice (esano-etil acetato 9:1 e 0,5% TEA) forniva il composto **11** (4,1 g, 80%). L'analisi NMR dimostrava un rapporto diastereomerico E/Z >95%. La configurazione *E* sul doppio legame esociclico era stabilizzata mediante accoppiamento dipolare H₃-26 (δ 1.67)/H-5 (δ 2.62) nello spettro Noesy (400 MHz, tempo di miscelazione 400 ms).

(E)-3 α -acetossi-6-etiliden-7-cheto-5 β -colan-24-oato

(11): C₂₉H₄₄O₅

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 6.16 (1H, q, *J* = 7.0 Hz, H-25), 4.74 (1H, m, H-3), 3.64 (3H, s, COOCH₃), 2.62 (1H, dd, *J* = 13.0, 3.6 Hz, H-5), 1.98 (3H, s, COCH₃), 1.67 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H₃-26), 1.00 (3H, s, H₃-19), 0.92 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-21), 0.67 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 204.5, 174.6, 170.7, 143.1, 130.2, 72.5, 54.5, 51.4, 50.7, 48.6, 45.2, 43.5, 39.1, 38.9, 35.1, 34.9, 34.1, 33.4, 31.0, 30.9, 28.4, 25.9 (2C), 22.8, 21.4, 21.2, 18.4, 12.7, 12.2.

Fase e) Preparazione di metil 3 α -acetossi-6 β -etil-7-cheto-5 β -colan-24-oato (12).

Una soluzione di **11** (4,0 g, 8,5 mmol) in THF anidro/MeOH anidro (100 mL, 1:1 v/v) è stata idrogenata in presenza di Pd(OH)₂ 20% in peso su carbone attivo (100



mg) tipo degussa. La miscela è stata trasferita in un
apparecchio PARR standard e lavata con azoto e quindi con
idrogeno diverse volte. L'apparecchio è stato lasciato
sotto 344.738 Pa (50 psi) di H₂. La reazione è stata
5 agitata a temperatura ambiente per 8 ore.

Il catalizzatore è stato filtrato attraverso Celite,
e il filtrato recuperato è stato concentrato sottovuoto
ottenendo **12** (4,0 g, resa quantitativa).

Metil 3 α -acetossi-6 β -etil-7-cheto-5 β -colan-24-oato

10 **(12)**: C₂₉H₄₆O₅

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 4.65 (1H, m, H-3), 3.66
(3H, s, COOCH₃), 2.56 (1H, t, J = 11.5 Hz, H-8), 2.35 (1H,
m, H-23a), 2.22 (1H, m, H-23b), 1.99 (3H, s, COCH₃), 1.22
15 (3H, s, H₃-19), 0.92 (3H, d, J = 6.3 Hz, H₃-21), 0.83 (3H,
t, J = 7.2 Hz, H₃-26), 0.67 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 214.7, 174.3, 170.2, 72.6,
61.7, 54.8, 51.3, 49.0, 48.5, 45.3, 42.7, 42.3 (2C),
20 38.6, 35.4, 35.1, 35.0, 31.0, 30.8, 28.0 (2C), 26.4,
25.7, 24.7, 21.3, 21.1, 18.2, 12.9, 11.9. La
configurazione β del gruppo etile in C-6 è stata
determinata mediante accoppiamento dipolare H₃-26 (δ
0.83)/H₃-19 (δ 1.22) e H-8 (δ 2.56)/H-25 (δ 1.83) nello
25 spettro Noesy (400 MHz, tempo di miscelazione 400 ms).

Fasi f, g) Preparazione di 6 β -etil-3 α ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR501).

Ad una soluzione di metanolo del composto **12** (1,18 g, 2,5 mmol), è stato addizionato a 0°C un grande eccesso di NaBH₄. La miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per 2 ore e quindi sono stati addizionati a gocce acqua e MeOH per un periodo di 15 minuti a 0°C con effervescenza osservata. Dopo l'evaporazione dei solventi, il residuo è stato diluito con acqua ed estratto con AcOEt (3x50 mL). L'estratto combinato è stato lavato con soluzione salina, anidrificato con Na₂SO₄, e fatto evaporare ottenendo 1,3 g di un residuo grezzo che è stato sottoposto alla fase successiva senza ulteriore purificazione. Il residuo grezzo è stato trattato con LiBH₄ (2 M in THF) nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1A fase b). La purificazione mediante HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; d.i.10 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (portata 3 mL/min), forniva 802 mg di BAR501 (79%, t_R= 11 min).

In alternativa la fase f è stata eseguita con Ca(BH₄)₂, prodotto in situ.

Ad una soluzione del composto **12** (500 mg, 1,05 mmol) ed etanolo assoluto (4 mL), a 0°C, è stato addizionato CaCl₂ (466 mg, 4,2 mmol). Alla stessa soluzione è stata

addizionata una soluzione di NaBH₄ (159 mg, 4,2 mmol) in etanolo assoluto (4 mL). Dopo 4 ore a -5°C, è stato addizionato a gocce MeOH. Quindi dopo evaporazione dei solventi, il residuo è stato diluito con acqua ed
5 estratto con AcOEt (3x50 mL). L'estratto combinato è stato lavato con soluzione salina, anidrificato con Na₂SO₄, e fatto evaporare ottenendo 500 mg di un residuo grezzo che è stato sottoposto alla fase g senza ulteriore purificazione.

10 **BAR501:** C₂₆H₄₆O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.74 (1H, dd, *J*= 10.3, 6.0 Hz, H-7), 3.51 (1H, ovl, H-3), 3.49 (2H, ovl, H₂-24), 1.00 (3H, s, H₃-19), 0.97 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-21),
15 0.96 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H₃-26), 0.72 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 75.3 71.9, 63.6, 57.5, 56.5, 51.6, 45.7, 44.9, 42.1, 41.5, 40.4, 40.3, 37.1, 35.8, 32.4, 30.7, 30.3, 29.7, 29.6, 28.3, 26.2, 23.4,
20 22.1, 19.4, 14.8, 12.7.

Esempio 2B. Preparazione di 6β-etil-3α,7α-diidrossi-5β-colan-24-olo (BAR504-6b)

BAR504-6b è stato preparato come descritto nell'esempio 2A (t_R= 20,4 min).

25 **BAR504-6b:** C₂₆H₄₆O₃

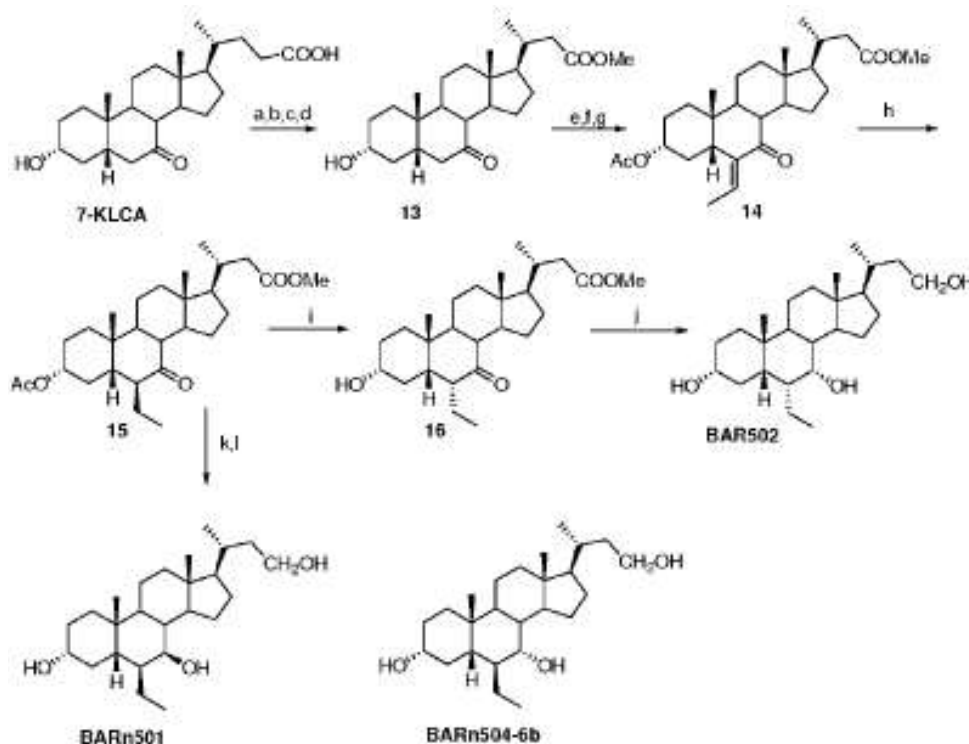
¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.60 (1H, s, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 3.35 (1H, ovl, H-3), 2.30 (1H, q, J = 13.5 Hz, H-4a), 0.97 (3H, d, J = 6.8 Hz, H₃-21), 0.95 (3H, t, J = 7.3 Hz, H₃-26), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 71.9, 71.8, 62.7, 56.8, 51.7, 50.5, 46.7, 42.5, 41.4, 40.1, 36.6, 36.4, 36.2, 36.0, 33.2, 32.4, 30.1, 29.5, 28.8, 28.5, 25.3, 23.9, 20.7, 18.4, 13.7, 11.4.

ESEMPIO 2C. Sintesi di 6α-etil-3α,7α-diidrossi-24-nor-5β-colan-23-olo (BAR502), 6β-etil-3α,7β-diidrossi-24-nor-5β-colan-23-olo (BARn501- non parte dell'invenzione) e 6β-etil-3α,7α-diidrossi-24-nor-5β-colan-23-olo (BARn504-6b)

7-KLCA (1 g, 2,56 mmol) è stato sottoposto a trasposizione di Beckmann in C24 e metilazione in C-23 che fornivano **13** in una resa del 66%. L'acetilazione in C-3 e l'alchilazione fornivano **14** che è stato idrogenato ottenendo **15**. Il trattamento con MeONa/MeOH forniva l'idrolisi simultanea in C-3 e l'epimerizzazione in C-6. La riduzione simultanea nella funzione metil estere C-23 e il gruppo carbonile C-7 fornivano BAR502 in una resa dell'89%. L'intermedio **15** (250 mg, 0,54 mmol) è stato

anche usato come materiale di partenza nella preparazione di BARn501 e BARn504-6b.



- a) HCOOH, HClO₄; b) TFA, anidride trifluoroacetica, NaNO₂;
5 c) KOH 30% in MeOH/H₂O 1:1 v/v, 88% in tre fasi; d) p-TsOH, MeOH anidro; e) anidride acetica, piridina; f) DIPA, *n*-BuLi, TMSCl, TEA anidro, THF anidro -78°C; g) acetaldeide, BF₃(OEt)₂, CH₂Cl₂, -60°C, 60% in quattro fasi;
h) H₂ Pd(OH)₂, THF/MeOH 1:1, resa quantitativa; i) MeONa,
10 MeOH; LiBH₄, MeOH, THF anidro, 0°C, 70% in due fasi; k) NaBH₄, MeOH anidro, 0°C; l) LiBH₄, MeOH, THF anidro, 0°C, 77% in due fasi.

Fasi a-d) Preparazione di metil 7-cheto-24-nor-LCA (13)

15 Il composto **13** (660 mg, 1,69 mmol, 66% in quattro

fasi) è stato preparato da 7-KLCA nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1B, fasi a-d).

Fasi e-h) Preparazione di metil 3 α -acetossi-6 β -etil-7-cheto-24-nor-5 β -colan-23-oato (15). Il composto **13** (660 mg, 1,69 mmol) è stato sottoposto alla stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A, fasi b-d ottenendo 603 mg di **14** (78% in tre fasi). L'analisi NMR dimostrava un rapporto diastomerico E/Z >95%. La configurazione *E* sul doppio legame esociclico è stata determinata mediante accoppiamento dipolare H₃-25 (δ 1.67)/H-5 (δ 2.61) nello spettro Noesy (400 MHz, tempo di miscelazione 400 ms).

(E)-3 α -acetossi-6-etilidene-7-cheto-24-nor-5 β -colan-23-oato (14): C₂₈H₄₂O₅

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 6.17 (1H, q, *J* = 7.2 Hz, H-24), 4.75 (1H, m, H-3), 3.64 (3H, s, COOCH₃), 2.61 (1H, dd, *J* = 13.1, 4.0 Hz, H-5), 1.98 (3H, s, COCH₃), 1.67 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H₃-25), 1.00 (3H, s, H₃-19), 0.97 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H₃-21), 0.67 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 204.5, 174.2, 170.5, 143.0, 130.6, 72.5, 54.7, 51.4, 50.7, 48.6, 45.3, 43.7, 41.5, 39.1, 38.8, 34.6, 34.2, 33.6, 33.4, 28.5, 25.9 (2C), 22.8, 21.3 (2C), 19.7, 12.7, 12.1.

L'idrogenazione su Pd(OH)₂ nella stessa condizione

operativa descritta nell'esempio 2A, fase e, forniva 600 mg di **15** (resa quantitativa).

La configurazione β del gruppo etile in C-6 è stata determinata mediante accoppiamenti dipolari H₃-25 (δ 0.83)/ H₃-19 (δ 1.22) nello spettro Noesy (400 MHz, tempo di miscelazione 400 ms).

3 α -acetossi-6 β -etil-7-cheto-24-nor-5 β -colan-23-oato

(15): C₂₈H₄₄O₅

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 4.65 (1H, m, H-3), 3.67 (3H, s, COOCH₃), 2.60 (1H, t, J = 11.2 Hz, H-8), 2.43 (1H, dd, J = 14.2, 2.6 Hz, H-22a), 1.98 (3H, s, COCH₃), 1.88 (1H, m ovl, H-6), 1.22 (3H, s, H₃-19), 0.98 (3H, d, J = 6.4 Hz, H₃-21), 0.83 (3H, t, J = 7.0 Hz, H₃-25), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 215.3, 174.0, 170.5, 72.8, 61.9, 55.0, 51.4, 49.2, 48.7, 45.5, 42.9, 42.6, 41.4, 38.7 (2C), 35.6, 35.3, 34.9, 28.3 (2C), 26.5, 25.9, 24.8, 21.4, 21.3, 19.6, 13.0, 12.1.

Fasi i, j) Preparazione di 6 α -etil-3 α ,7 α -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BAR502)

Ad una soluzione del composto **15** (450 mg, 1,0 mmol) e metanolo anidro (4 mL), è stato addizionato MeONa (20 mL, 0,5 M in MeOH, 10 mmol). Dopo 24 ore, è stata



addizionata a gocce H₂O. Quindi dopo evaporazione dei solventi, il residuo è stato diluito con acqua ed estratto con AcOEt (3x50 mL). L'estratto combinato è stato lavato con acqua, anidrificato con Na₂SO₄, e fatto
5 evaporare ottenendo **16** che è stato sottoposto alla fase g senza ulteriore purificazione.

Metil 6 α -etil-3 α -idrossi-7-cheto-24-nor-5 β -colan-23-oato (16): C₂₆H₄₂O₄

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 3.64 (3H, s, COOCH₃), 3.45 (1H, m, H-3), 2.83 (1H, q, J = 7.3 Hz, H-6), 2.51 (1H, t, J = 11.2 Hz, H-8), 2.45 (1H, dd, J = 14.5, 3.2 Hz, H-22a), 1.26 (3H, s, H₃-19), 0.98 (3H, d, J = 6.6 Hz, H₃-21), 0.81 (3H, t, J = 7.0 Hz, H₃-25), 0.73 (3H, s, H₃-
15 18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CDCl₃ come solvente: δ 214.9, 175.4, 71.6, 56.2, 53.2, 52.0, 51.9, 51.0, 50.5, 45.2, 43.8, 42.2, 40.2, 36.7, 35.3, 34.8, 32.5, 30.5, 29.4, 25.6, 24.0, 22.9,
20 20.1, 20.0, 12.6, 12.4.

Il composto **16** è stato sottoposto a riduzione con LiBH₄ nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 1A, fase g. La cromatografia su gel di silice eluendo con esano/EtOAc 6:4 forniva BAR502 (274
25 mg, 70% in due fasi). Un campione analitico è stato

ottenuto mediante HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m;
d.i.4,6 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente
(portata 1 mL/min, t_R =10.8 min).

BAR502: C₂₅H₄₄O₃

5 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 3.65 (1H, s, H-7), 3.61
(1H, m, H-23a), 3.53 (1H, m, H-23b) 3.31 (1H, m, H-3),
0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, H₃-21), 0.92 (3H, s, H₃-19),
0.91 (3H, t, J = 7.0 Hz, H₃-25), 0.71 (3H, s, H₃-18).

10 ¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 73.2, 71.1, 60.7, 57.7,
51.4, 46.9, 43.8, 42.9, 41.3, 40.9, 39.8, 36.7, 36.5,
34.6, 34.5, 34.2, 31.2, 29.4, 24.5, 23.7, 23.4, 21.8,
19.3, 12.1, 11.9.

15 **Fasi k, l).** Preparazione di **6 β -etil-3 α , 7 β -
diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn501) e 6 β -etil-
3 α ,7 α -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn504-6b). Il
composto **15** (100 mg, 0,22 mmol) è stato sottoposto alla
stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A,
20 fasi f-g. La purificazione mediante HPLC su Nucleodur
100-5 C18 (5 μ m; d.i.10 mm x 250 mm) con MeOH/H₂O (86:14)
come eluente (portata 3 mL/min), forniva 47 mg di BARn501
(54%, t_R = 11 min) e 20 mg di BARn504-6b (23%, t_R = 15
min).**

25 **BARn501:** C₂₅H₄₄O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.73 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, H-7), 3.61 (1H, m, H-23a), 3.51 (1H, m, ovl, H-23b), 3.51 (1H, m, ovl, H-3), 0.98 (3H, d, ovl, H₃-21), 0.97
5 (3H, s, H₃-19), 0.96 (3H, t, ovl, H₃-25), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 75.2, 71.8, 60.8, 57.5, 56.6, 51.5, 45.5, 44.8, 42.0, 41.4, 40.7, 40.3, 39.9,
10 36.9, 36.0, 34.2, 30.5, 29.6, 28.3, 26.2, 23.4, 22.0, 19.4, 14.7, 12.9.

BARn504-6b: C₂₅H₄₄O₃

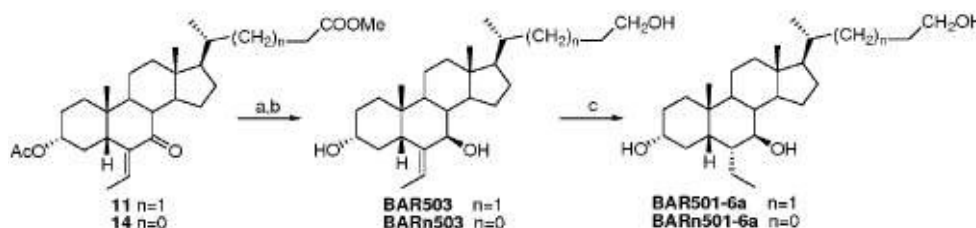
¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.63 (1H, m, H-23a), 3.60
15 (1H, m, H-7), 3.55 (1H, m, H-23b), 3.37 (1H, m, H-3), 2.30 (1H, q, *J* = 12.5 Hz, H-4a), 0.97 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-21), 0.95 (3H, s, H₃-19), 0.95 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H₃-25), 0.72 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 72.8, 72.7, 60.8, 57.9,
20 52.7, 51.4, 47.5, 43.7, 42.3, 41.0, 39.9, 37.5, 37.3, 36.7, 34.2, 33.3, 31.0, 29.6, 29.4, 26.2, 24.8, 21.6, 19.3, 14.5, 12.1.

**ESEMPIO 2D. Sintesi di 6-etilidene-3α,7β-diidrossi-
25 5β-colan-24-olo (BAR503), 6α-etil-3α,7β-diidrossi-5β-**

colan-24-olo (BAR501-6a), 6-etilidene-3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn503) e 6 α -etil-3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn501-6a)

L'intermedio **11** è stato sottoposto a riduzione con NaBH₄ seguita da trattamento con LiBH₄. In alternativa il trattamento con LiAlH₄ procedeva in un modo lineare ottenendo la riduzione simultanea in C-24 e C-7. BAR503 è stato anche usato come materiale di partenza per BAR501-6a mediante idrogenazione su catalizzatore Pd(OH)₂. Lo stesso protocollo di sintesi è stato eseguito sull'intermedio **14** producendo i corrispondenti 23-derivati, BARn503 e BARn501-6a.



a) NaBH₄, MeOH; b) LiBH₄, MeOH anidro, THF, 0°C, 85% in due fasi; c) H₂, Pd(OH)₂, THF:MeOH 1:1 v/v.

Fasi a, b). Preparazione di 6-etilidene-3 α , 7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR503) e 6-etilidene-3 α ,7 β -diidrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn503).

Il composto **11** (1 g, 2,11 mmol) è stato sottoposto alla stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A, fasi f, g. La purificazione mediante HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; d.i.10 mm i. x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (portata 3 mL/min), forniva



727 mg di BAR503 (85% in due fasi, $t_R = 9,2$ min). In alternativa il trattamento con LiAlH_4 su **11** forniva BAR503.

BAR503: $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_3$

5 ^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD_3OD come solvente: δ 5.66 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-25), 3.90 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 3.55 (1H, m, H-3), 3.50 (2H, m, H₂-24), 2.50 (1H, dd, $J = 4.0, 13.1$ Hz, H-5), 1.62 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-26), 0.97 (3H, d, $J = 6.8$
10 Hz, H₃-21), 0.81 (3H, s, H₃-19), 0.70 (3H, s, H₃-18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD_3OD come solvente: δ 142.7, 114.5, 73.4, 71.1, 63.6, 57.1, 56.1, 45.2, 44.9, 44.2, 40.7, 40.2, 36.3, 36.2, 35.9, 34.7, 32.4, 30.2, 29.5, 28.8, 27.4, 22.6,
15 21.5, 18.5, 11.8, 11.7.

Lo stesso protocollo di sintesi è stato eseguito sull'intermedio **14**. La purificazione mediante HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μm ; d.i. 10 mm x 250 mm) con $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (86:14) come eluente (portata 3 mL/min), forniva
20 BARn503 ($t_R = 8$ min).

BARn503: $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_3$

^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD_3OD come solvente: δ 5.66 (1H, q, $J = 6.8$ Hz, H-24), 3.92 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-7), 3.60 (1H, m, H-23a),
25 3.56 (1H, m, H-3), 3.55 (1H, m, H-23b), 2.52 (1H, dd, $J =$

3.7, 13.2 Hz, H-5), 1.63 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-25), 0.98
(3H, d, $J = 6.5$ Hz, H₃-21), 0.95 (3H, s, H₃-19), 0.71
(3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
5 usando CD₃OD come solvente: δ 143.7, 115.4, 74.1, 71.8,
60.8, 58.0, 57.1, 46.1, 45.9, 45.1, 41.6, 41.1, 39.9,
37.0, 36.4, 35.8, 34.1, 30.9, 29.8, 28.1, 23.5, 22.5,
19.5, 12.7, 12.6.

**Fase c). Preparazione di 6 α -etil-3 α ,7 β -diidrossi-5 β -
10 colan-24-olo (BAR501-6a) e 6 α -etil-3 α ,7 β -diidrossi-24-
nor-5 β -colan-23-olo (BARn501-6a)**

BAR503 (350 mg, 0,86 mmol) è stato sottoposto alla
stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A
fase e, ottenendo BAR501-6a in resa quantitativa.

15 **BAR501-6a: C₂₆H₄₆O₃**

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 3.50 (2H, t, $J = 6.8$ Hz,
H₃-24), 3.44 (1H, m, H-3), 3.07 (1H, t, $J = 9.8$ Hz, H-7),
0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-21), 0.95 (3H, s, H₃-19),
20 0.86 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H₃-26), 0.71 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
usando CD₃OD come solvente: δ 76.5, 72.3, 63.6, 57.9,
57.3, 46.3, 45.0, 44.8, 41.8, 41.0, 39.9, 37.0, 36.4,
35.5, 33.3, 31.3, 31.0, 30.3, 29.8, 27.8, 24.3, 22.5,
25 22.0, 19.3, 12.8, 11.8.



BARn503 è stato sottoposto alla stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A fase e, ottenendo BARn501-6a in resa quantitativa.

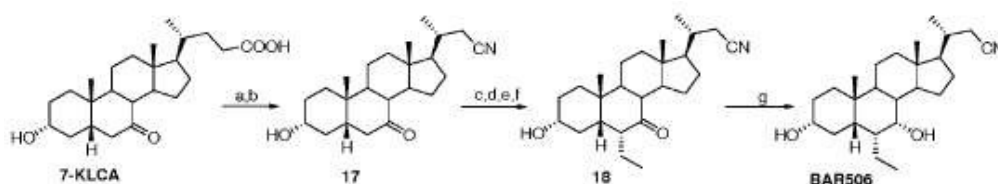
BARn501-6a: C₂₅H₄₄O₃

5 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 3.62 (1H, m, H-23a), 3.54 (1H, m, H-23b), 3.45 (1H, m, H-3), 3.08 (1H, t, J = 9.8 Hz, H-7), 0.97 (3H, d, J = 6.5 Hz, H₃-21), 0.95 (3H, s, H₃-19), 0.86 (3H, t, J = 7.4 Hz, H₃-25), 0.73 (3H, s, H₃-18).

10 ¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, usando CD₃OD come solvente: δ 76.4, 72.5, 60.8, 57.9, 57.2, 46.2, 45.1, 44.7, 41.8, 41.2, 40.0, 39.8, 36.5, 35.6, 34.2, 31.2, 30.9, 29.9, 27.9, 24.1, 22.7, 22.0, 15 19.5, 12.7, 11.7.

ESEMPIO 2E Sintesi di 6α-etil-3α,7a-diidrossi-24-nor-5β-colan-23-nitrile (BAR506)

7-KLCA è stato trasformato in nitrile **17** seguendo la stessa procedura di sintesi descritta nell'esempio 1B 20 fasi a-b. L'alchilazione seguita da riduzione su doppio legame e l'epimerizzazione in C-6 nella stessa condizione operativa descritta nell'esempio 2A fasi c-d ed esempio 2C fase i, rispettivamente fornivano **18**. Il trattamento con LiBH₄ come nell'esempio 2C fase j forniva il gruppo 25 ossidrilico 7α desiderato in BAR506.



a) HCOOH , HClO_4 ; b) TFA, anidride trifluoroacetica, NaNO_2 ; c) DIPA, $n\text{-BuLi}$, TMSCl , TEA anidro, THF anidro, -78°C ; d) acetaldeide, $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$, CH_2Cl_2 , -60°C ; e) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, THF/MeOH 1:1; f) MeONa , MeOH; g) LiBH_4 , MeOH, THF anidro, 0°C .

BAR506: $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_2$

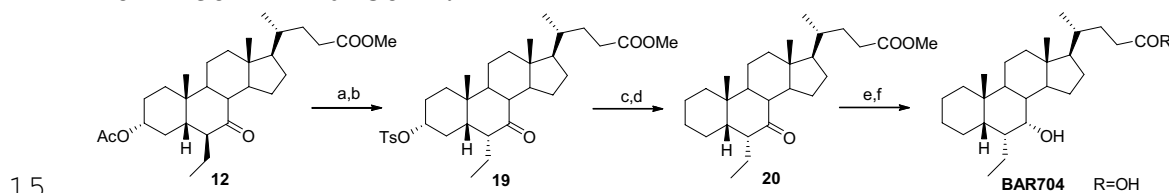
^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz, usando CD_3OD come solvente: δ 3.66 (1H, br s, H-7), 3.31 (1H, ovl, H-3), 2.46 (1H, dd, $J = 3.8, 16.9$ Hz, H-22a), 2.34 (1H, dd, $J = 7.4, 16.9$ Hz, H-22b), 1.16 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H₃-21), 0.91 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-25), 0.92 (3H, s, H₃-19), 0.73 (3H, s, H₃-18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, usando CD_3OD come solvente: δ 120.3, 72.9, 70.9, 56.1, 51.5, 46.7, 43.4, 42.9, 41.4, 40.2, 36.5, 36.2, 34.3 (2C), 34.2, 30.7, 29.2, 24.9, 24.4, 23.4, 23.3, 21.9, 18.5, 12.1, 11.6.

ESEMPIO 2F. Sintesi di 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-olo (BAR701), 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-il 24-sodio solfato (BAR701solf), 6 β -etil-7 β -idrossi-5 β -colan-24-olo (BAR702), 6 α -etil-7 β -idrossi-5 β -colan-24-olo (BAR703), acido 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-oico

(BAR704), 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-oil taurina sodio solfato (BART704), 6 β -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-olo (BAR705) e acido 6 α -etil-7 β -idrossi-5 β -colan-24-oico (BAR711)

5 Il composto **12** è stato trattato con MeONa in metanolo per ottenere la deacetilazione a C-3 e l'inversione al C-6. La tosilazione, l'eliminazione e l'idrogenazione del doppio legame sull'anello A ha dato **20**. L'idrolisi a livello della funzione metil-estere, seguita dal trattamento con LiBH₄, ha fornito BAR704 in
10 alta resa chimica. L'intermedio **20** è stato utilizzato anche come materiale di partenza per BAR701. La solfatazione su C-24 su una piccola aliquota di BAR701 ha fornito BAR701solf.



20 a) MeONa, MeOH; b) p-TsCl, piridina, resa quantitativa su due fasi; c) LiBr, Li₂CO₃, DMF, refluxo, d) H₂, Pd(OH)₂, THF/MeOH 1:1, temperatura ambiente, 88% su due fasi; e) NaOH, MeOH:H₂O 1:1 v/v, 82%; f) LiBH₄, MeOH secco, THF, 0 °C, 83%; g) DMT-MM, Et₃N, taurina, DMF secco; h) LiBH₄, MeOH secco, THF, 0 °C, 77 %; i) Et₃N.SO₃, DMF, 95 °C.

Fasi a-f) Preparazione dell'acido 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-oico (BAR704).



Il composto **12** (500 mg, 1,05 mmol) è stato trattato con MeONa (2,1 mL, 0,5 M in MeOH, 1,05 mmol) in MeOH (5 mL) per una notte nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 2C, fase i. La tosilazione sul prodotto di
5 reazione grezzo nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 1C, fase a, ha fornito **19** (620 mg, resa quantitativa su due fasi). L'intermedio 19 (500 mg, 0,85 mmol) è stato sottoposto alle stesse condizioni operative dell'Esempio 1C, fasi b,c, per ottenere 312 mg di **20** (88%
10 in due fasi). Il composto **20** (200 mg, 0,48 mmol) è stato idrolizzato con NaOH (96 mg, 2,4 mmol) in una soluzione di MeOH:H₂O 1:1 v/v (10 mL) nella stessa condizione operativa dell'Esempio 1A, fase f. L'intermedio acido
15 carbossilico grezzo (190 mg, 0,47 mmol) è stato trattato con LiBH₄ (1,65 mL, 2 M in THF, 3,3 mmol) e MeOH (133 L, 3,3 mmol) in THF secco (5 mL). La purificazione su gel di silice (CH₂Cl₂-MeOH 99:1) ha fornito 157 mg di BAR704 (83%). Negli stessi casi, il trattamento con LiBH₄ dopo
20 l'idrolisi alcalina ha prodotto piccole quantità (circa il 10%) di acido 6 α -etil-7 β -idrossi-5 β -colan-24-oico (BAR711) che è stato isolato mediante purificazione HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; 10 mm i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min, t_R= 16 min).

25 **BAR704**: C₂₆H₄₄O₃



¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.65 (1H, br s, H-7), 2.34 (1H, m, H-23a), 2.20 (1H, m, H-23b), 0.96 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H₃-21), 0.92 (3H, s, H₃-19), 0.89 (3H, t, $J =$
5 7.4 Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 178.0, 71.6, 57.4, 51.7, 48.7, 43.8, 43.3, 41.5, 41.1, 39.3, 37.4, 36.8, 34.6, 32.5 (2C), 29.3, 28.8, 25.1, 24.6 (2C), 23.5, 22.5,
10 22.0, 18.8, 12.2, 12.1.

BAR711: C₂₆H₄₄O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.08 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-7), 2.32 (1H, m, H-23a), 2.20 (1H, m, H-23b), 0.96
15 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H₃-21), 0.95 (3H, s, H₃-19), 0.85 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

Fase g) Preparazione di 6α-etil-7α-idrossi-5β-colan-24-oil taurina solfato di sodio (BART704)

Un'aliquota di BAR704 (10 mg, 0,024 mmol) in DMF
20 secco (5 mL) è stata trattata con DMT-MM (20,5 mg, 0,07 mmol) e trietilammina (83 μL, 0,6 mmol) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti. Alla miscela è stata poi aggiunta la taurina (18 mg, 0,14 mmol). Dopo 3 ore, la miscela di reazione è stata
25 concentrata sotto vuoto e disciolta in acqua (5 mL). La

purificazione su colonna di gel di silice C18 e poi HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; 10 mm i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (83:17) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min), ha dato 4,5 mg di BART704 (t_R = 10 min).

5 **BART704:** C₂₈H₄₈NNaO₅S

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.65 (1H, br s, H-7), 3.58 (2H, t, J = 7.0 Hz, CH₂-N), 2.96 (2H, t, J = 9.6 Hz, CH₂-S), 2.25 (1H, m, H-23a), 2.10 (1H, m, H-23b), 0.97
10 (3H, d, J = 6.4 Hz, H₃-21), 0.92 (3H, s, H₃-19), 0.89 (3H, t, J = 7.1 Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

Fase h) Preparazione del 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-olo (BAR701)

Il composto **20** (100 mg, 0,24 mmol) è stato trattato
15 nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 2C fase j. Purificazione HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; 10 mm i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (92:8) come eluente (velocità di flusso 3 mL /min), ha dato 64 mg di BAR701 (t_R = 31 min) e una piccola quantità di 6 α -etil-7 β -idrossi-5 β -
20 colan-24-olo (BAR703) (8 mg, t_R = 24,8 min).

BAR701: C₂₆H₄₆O₂

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.65 (1H, br s, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 0.97 (3H, d, J = 6.3 Hz, H₃-21),



0.92 (3H, s, H₃-19), 0.89 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H₃-26),
0.71 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 71.6, 63.6, 57.6,
5 51.8, 48.7, 43.7, 43.3, 41.5, 41.1, 39.3, 37.5, 37.0,
34.6, 33.2, 30.3, 29.4, 28.8, 25.1, 24.6 (2C), 23.5,
22.5, 22.0, 19.2, 12.3, 12.1.

BAR703 C₂₆H₄₆O₂

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
10 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.51 (2H, m, H₂-24),
3.07 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-7), 0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz,
H₃-21), 0.84 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H₃-26), 0.95 (3H, s, H₃-
19), 0.71 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
15 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 76.3, 63.6, 57.9,
56.8, 46.3, 45.3, 45.0, 44.7, 41.7, 41.1, 38.8, 37.0,
36.3, 33.3, 30.3, 28.1, 27.9 (2C), 25.0 (2C), 22.0, 21.9
(2C), 19.4, 12.7, 11.6.

**Fase i) Preparazione del 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -
20 colan-24-il 24-solfato di sodio (BAR701solf)**

La solfatazione su C-24 di una piccola aliquota di
BAR701 è stata eseguita nelle stesse condizioni operative
descritte nell'esempio 1B fase g) per ottenere il
BAR701solf grezzo come sale di ammonio. La RP18/HPLC su
25 Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; 10 mm i.d. x 250 mm) con

MeOH/H₂O (82:18) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min) ha permesso di ottenere BAR701solf (t_R = 14,2 min) come sale di sodio.

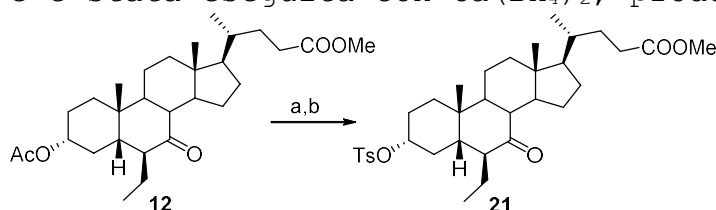
BAR701solf: C₂₆H₄₅ NaO₅S

5 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.96 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H₂-24), 3.64 (1H, br s, H-7), 0.96 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-21), 0.91 (3H, s, H₃-19), 0.88 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H₃-26), 0.69 (3H, s, H₃-18).

10 **Preparazione del 6β-etil-7β-idrossi-5β-colan-24-olo (BAR702) e del 6β-etil-7α-idrossi-5β-colan-24-olo (BAR705)**

Il composto **12** (500 mg, 1,05 mmol) è stato trattato con MeONa (2,1 mL, 0,5 M in MeOH, 1,05 mmol) in MeOH (10
15 mL) nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 2C, fase i, ad eccezione del tempo di reazione (2 h). La tosilazione sul prodotto di reazione grezzo nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 1C, fase a, ha fornito **21** (620 mg, resa quantitativa in due fasi). L'intermedio
20 **21** (600 mg, 1,02 mmol) è stato sottoposto alle stesse condizioni operative dell'Esempio 1C, fasi b,c, per ottenere 400 mg di **22** (94%). Il composto **22** (350 mg, 0,84 mmol) è stato ridotto con NaBH₄/LiBH₄ nelle stesse condizioni operative dell'Esempio 2A, fasi f,g. La
25 purificazione HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μm; 10 mm

i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (92:8) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min), ha fornito 180 mg di BAR702 (t_R = 25 min) e 75,4 mg di BAR705 (t_R = 13 min). In alternativa, la fase e è stata eseguita con Ca(BH₄)₂, prodotto in situ.



5

a) MeONa, MeOH; b) p-TsCl, piridina, resa quantitativa su due fasi; c) LiBr, Li₂CO₃, DMF, refluxo; d) H₂, Pd(OH)₂, THF/MeOH 1:1, temperature ambiente, 94% su due fasi; e) NaBH₄, MeOH; f) LiBH₄, MeOH secco, THF, 0 °C, 78% su due

10 fasi.

BAR702: C₂₆H₄₆O₂

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.67 (1H, dd, J = 8.7, 4.7 Hz, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 0.98 (3H, s, H₃-19),

15 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, H₃-21), 0.96 (3H, t, J = 7.4 Hz, H₃-26), 0.71 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 75.5, 63.8, 57.6, 56.5, 44.2, 43.7, 42.8, 41.0, 40.9, 40.8, 38.2 (2C),

20 36.9, 34.4, 32.8, 29.7, 28.9, 27.0, 26.1, 24.7, 22.2, 22.0 (2C), 19.2, 13.9, 12.3.

BAR705: C₂₆H₄₆O₂

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.59 (1H, br s, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 2.23 (1H, dq, $J = 13.9, 4.0$ Hz, H-4a), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$, H₃-21), 0.95 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H₃-26), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 73.1, 63.2, 57.3, 52.8, 51.4, 49.4, 43.8, 41.3, 39.7, 37.4 (2C), 37.2, 34.2, 32.6 (2C), 29.9, 29.5, 28.9, 28.3, 27.3, 24.5, 21.7, 21.2, 18.8, 14.3, 12.3.

ESEMPIO 2G. Sintesi di acido 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-oico (BAR710), 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-oil taurina solfato di sodio (BART710), 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR706), 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-il 24-solfato di sodio (BAR706solf), 6 α -etil-3 β ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR707), 6 β -etil-3 β ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR708) e 6 β -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR709) e acido 6 α -etil-3 β ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-oico (BAR712).

In un protocollo convergente, l'inversione sul C-3 del derivato **19** seguita da trattamento con MeONa/MeOH ha dato **23** che è stato utilizzato come materiale di partenza nella sintesi di BAR706, BAR706solf, BAR710 e BART710.



2C, fase i, ha fornito **23** (320 mg, 74% su due fasi) che è stato sottoposto a idrolisi seguita da trattamento con LiBH₄ come descritto nell'Esempio 2F, fasi e,f. La purificazione HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 µm; 10 mm
5 i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min), ha fornito 208 mg di BAR710 (65%, t_R= 11 min). In alternativa, l'inversione a C-3 del 21, seguita da idrolisi alcalina e successivo trattamento con LiBH₄, ha permesso di ottenere BAR710 in
10 modo diretto.

Negli stessi casi, il trattamento con LiBH₄ dopo l'idrolisi alcalina ha prodotto piccole quantità (circa il 10%) di acido 6α-etil-3β,7β-diidrossi-5β-colan-24-oico (BAR712) che è stato isolato mediante purificazione HPLC
15 su Nucleodur 100-5 C18 (5 µm; 10 mm i.d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (velocità di flusso 3 mL/min, t_R= 8 min).

BAR710: C₂₆H₄₄O₄

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3),
20 3.67 (1H, br s, H-7), 2.33 (1H, m, H-23a), 2.21 (1H, m, H-23b), 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, H₃-21), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.91 (3H, t, J = 7.6 Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
utilizzando CD_3OD come solvente: δ 178.3, 71.3, 67.5,
57.4, 51.7, 43.8, 42.8, 41.5, 41.2, 41.0, 37.0, 36.7,
33.8, 32.4, 32.0, 31.1 (2C), 29.3, 28.3, 24.6, 24.2,
5 23.3, 22.2, 18.8, 12.3, 12.2.

BAR712: $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_4$

^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
utilizzando CD_3OD come solvente: δ 4.01 (1H, br s, H-3),
3.06 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, H-7), 2.32 (1H, m, H-23a), 2.19
10 (1H, m, H-23b), 0.97 (3H, s, H_3 -19), 0.96 (3H, d, ovl,
 H_3 -21), 0.87 (3H, t, $J = 7.7$ Hz, H_3 -26), 0.71 (3H, s, H_3 -
18).

**Fase e) Preparazione di 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -
colan-24-ol taurina solfato di sodio (BART710)**

15 Un'aliquota di BAR710 (10 mg) è stata trattata nelle
stesse condizioni operative dell'Esempio 2F fase g.

BART710: $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{NNaO}_6\text{S}$

^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
utilizzando CD_3OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3),
20 3.67 (1H, br s, H-7), 3.59 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_2 -N),
2,96 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_2 -S), 0.97 (3H, d, $J = 6.4$ Hz,
 H_3 -21), 0.95 (3H, s, H_3 -19), 0.91 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H_3 -
26), 0.70 (3H, s, H_3 -18).

Fasi f) Preparazione del 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR706) e del 6 α -etil-3 β ,7 β -diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR707)

L'intermedio **23** (500 mg, 1,16 mmol) è stato trattato
5 con LiBH₄ (4 mL, 8,1 mmol) e MeOH (327 L, 8,1 mmol) in
THF secco (10 mL) come descritto nell'Esempio 2C, fase j.
Purificazione HPLC su Nucleodur 100-5 C18 (5 μ m; 10 mm i.
d. x 250 mm) con MeOH/H₂O (88:12) come eluente (velocità
di flusso 3 mL/min), ha dato BAR706 (250 mg, t_R= 12,6
10 min) e una piccola quantità di 6 α -etil-3 β ,7 β -diidrossi-
5 β -colan-24-olo (BAR707) (23 mg, t_R= 8,2 min).

BAR706: C₂₆H₄₆O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3)
15 , 3.66 (1H, br s, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 0.96 (3H, d,
 J = 6.6 Hz, H₃-21), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.91 (3H, t, J =
7.5 Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 125 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 71.4, 67.4, 63.6,
20 57.6, 51.7, 43.7, 42.8, 41.5, 41.2, 41.1, 37.1 (2C),
33.8, 33.2, 31.3 (2C), 30.3, 29.4, 28.3, 24.6, 24.2,
23.3, 22.3, 19.2, 12.7, 12.1.

BAR707: C₂₆H₄₆O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
25 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 4.01 (1H, br s, H-3),



3.51 (2H, m, H₂-24), 3.05 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, H-7), 0.97
(3H, s, H₃-19), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H₃-21), 0.88
(3H, t, $J = 7.6$ Hz, H₃-26), 0.72 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
5 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 76.3, 67.1, 63.6,
57.8, 56.8, 45.0, 44.8, 44.5, 41.7, 40.3, 39.1, 37.0,
35.9, 33.0, 31.2, 30.2, 29.8, 28.4, 28.0, 27.9, 24.8,
22.9, 21.8, 19.3, 12.8, 11.6.

**Fase g) Preparazione del 6 α -etil-3 β ,7 α -diidrossi-5 β -
10 colan-24-il 24-solfato di sodio (BAR706solf)**

La solfatazione sul C-24 su una piccola aliquota di
BAR706 è stata eseguita nelle stesse condizioni operative
descritte nell'esempio 1B fase g.

BAR706solf: C₂₆H₄₅NaO₆S

15 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 500 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s ovl, H-
3), 3.96 (2H, t ovl, H₂-24), 3.65 (1H, br s, H-7), 0.96
(3H, d, $J = 6.6$ Hz, H₃-21), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.90
(3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

20 **Fasi h,i,j) Preparazione del 6 β -etil-3 β ,7 β -
diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR708) e del 6 β -etil-3 β ,7 α -
diidrossi-5 β -colan-24-olo (BAR709).**

Il composto **19** è stato trattato nelle stesse
condizioni operative della fase a. La riduzione
25 NaBH₄/LiBH₄ di 100 mg (0,23 mmol) nelle stesse condizioni



operative dell'Esempio 2A, fasi f,g, ha permesso di
ottenere una miscela la cui purificazione HPLC (88%
MeOH:H₂O) ha dato il 6β-etil-3β,7β-diidrossi-5β-colan-24-
olo (BAR708) puro (48.3 mg, t_R= 11 min) e 6β-etil-3β,7α-
5 diidrossi-5β-colan-24-olo (BAR709) (20,7 mg, t_R= 13 min).
In alternativa, la fase i è stata eseguita con Ca(BH₄)₂,
prodotto in situ.

BAR708: C₂₆H₄₆O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz,
10 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.59 (1H, br s, H-3),
3.57 (1H, dd, J = 12.6, 2.3 Hz, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-
24), 0.98 (3H, s, H₃-19), 0.96 (3H, ovl, H₃-21), 0.96
(3H, t, ovl, H₃-26), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz,
15 utilizzando CD₃OD come solvente: δ 75.2, 68.3, 63.6,
58.3, 57.1, 45.7 (2C), 44.2, 41.8 (2C), 41.2, 40.0, 37.0,
35.9, 33.3, 31.1, 30.3, 29.4 (2C), 26.6 (2C), 23.2 (2C),
19.3, 13.0, 12.3.

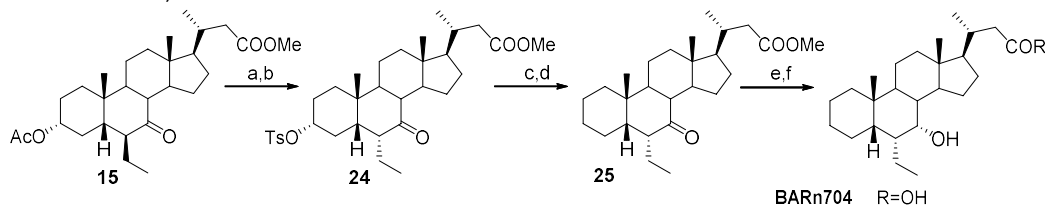
BAR709: C₂₆H₄₆O₃

20 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 700 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.91 (1H, br s, H-3),
3.60 (1H, br s, H-7), 3.51 (2H, m, H₂-24), 2.45 (1H, t, J
= 13.3 Hz, H-4a), 0.97 (3H, s, H₃-19), 0.97 (3H, ovl, H₃-
21), 0.95 (3H, t, J = 7.4 Hz, H₃-26), 0.71 (3H, s, H₃-
25 18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 72.8, 67.4, 63.4, 57.2, 51.3, 51.2, 43.2, 41.6, 40.5, 37.3, 37.1 (2C), 36.9, 34.0, 33.3, 32.1, 30.3, 29.3, 28.9, 28.6, 26.3, 24.9, 22.0, 19.3, 13.8, 12.1.

ESEMPIO 2H. Sintesi dell'acido 6 α -etil-7 α -idrossi-24-nor-5 β -colan-23-oico (BARn704), del 6 α -etil-7 α -idrossi-24-nor-5 β -colan-23-oil taurina solfato di sodio (BARTn704), del 6 α -etil-7 α -idrossi-24-nor-5 β -colan-23-olo (BARn701) e del 6 α -etil-7 α -idrossi-24-nor-5 β -colan-23-il 23-sodio solfato (BARn701solf)

BARn704, BARTn704, BARn701 e BARn701solf sono stati preparati a partire da **15** e seguendo lo stesso protocollo sintetico descritto per i loro omologhi C24 (Esempio 2F, fasi a-i).



a) MeONa , MeOH ; b) $p\text{-TsCl}$, piridina, 73% su due fasi; c) LiBr , Li_2CO_3 , DMF , refluxo, d) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, THF/MeOH 1:1, temperature ambiente, resa quantitativa su due fasi; e) NaOH , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v, 80%; f) LiBH_4 , MeOH secco, THF , 0°C , 92%; g) DMT-MM , Et_3N , taurina, DMF secco; h) LiBH_4 , MeOH secco, THF , 0°C , 70%; i) $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF , 95°C .

BARn704: C₂₅H₄₂O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.64 (1H, br s, H-7),
2.41 (1H, dd, *J* = 11.0, 2.6 Hz, H-22a), 1.00 (3H, d, *J* =
5 6.0 Hz, H₃-21), 0.90 (3H, s, H₃-19), 0.87 (3H, t, *J* = 7.4
Hz, H₃-25), 0.71 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 178.9, 71.6, 57.5,
51.7, 48.6, 43.8, 43.4, 43.3, 41.5, 40.9, 39.1, 37.4,
10 35.2, 34.6, 29.4, 28.8, 25.0, 24.6 (2C), 23.5, 22.4,
22.0, 20.1, 12.2, 12.1.

BARTn704: C₂₇H₄₆NNaO₅S

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.64 (1H, br s, H-7),
15 3.59 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₂-N), 2.96 (2H, t, *J* = 6.8 Hz,
CH₂-S), 2.40 (1H, dd, *J* = 11.0, 2.8 Hz, H-22a), 1.00 (3H,
d, *J* = 6.0 Hz, H₃-21), 0.89 (3H, s, H₃-19), 0.86 (3H, t,
J = 7.4 Hz, H₃-25), 0.70 (3H, s, H₃-18).

BARn701: C₂₅H₄₄O₂

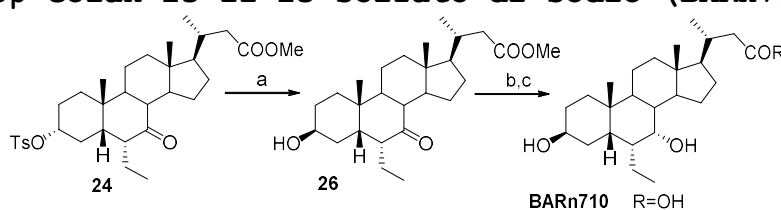
20 ¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.66 (1H, br s, H-7),
3.61 (1H, m, H-23a), 3.54 (1H, m, H-23b), 0.96 (3H, d, *J* =
6.7 Hz, H₃-21), 0.91 (3H, s, H₃-19), 0.89 (3H, t, *J* =
7.3 Hz, H₃-25), 0.70 (3H, s, H₃-18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 71.5, 60.8, 57.8, 51.7, 48.6, 43.8, 43.3, 41.5, 41.1, 39.9, 39.2, 37.4, 34.5, 34.2, 29.4, 28.8, 25.0, 24.6 (2C), 23.5, 22.5, 22.0, 19.4, 12.2, 12.1.

BARn701solf: $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NaO}_5\text{S}$

^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 4.02 (2H, m, H_2 -23), 3.65 (1H, br s, H-7), 0.97 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H_3 -21), 0.91 (3H, s, H_3 -19), 0.88 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H_3 -25), 0.70 (3H, s, H_3 -18).

ESEMPIO 2I. Sintesi dell'acido 6α -etil- $3\beta,7\alpha$ -diidrossi-24-nor- 5β -colan-23-oico (BARn710), del 6α -etil- $3\beta,7\alpha$ -diidrossi-24-nor- 5β -colan-23-oil taurina solfato di sodio (BARTn710), del 6α -etil- $3\beta,7\alpha$ -diidrossi-24-nor- 5β -colan-23-olo (BARn706), e del 6α -etil- $3\beta,7\alpha$ -diidrossi-24-nor- 5β -colan-23-il 23-solfato di sodio (BARn706solf)



a) CH_3COOK , $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$ 5:1 v/v; b) NaOH , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v; c) LiBH_4 , MeOH secco, THF , 0°C , 58% su due fasi; d) DMT-MM , Et_3N , taurina, DMF secco; e) LiBH_4 , MeOH secco, THF , 0°C , 57%; f) $\text{Et}_3\text{N}.\text{SO}_3$, DMF , 95°C .

BARn710, BARTn710, BARn706 e BARn706solf sono stati preparati partendo da **24** e seguendo lo stesso protocollo sintetico descritto per i loro omologhi C24 (Esempio 2G, fasi c-g).

5 **BARn710:** C₂₅H₄₂O₄

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3), 3.66 (1H, br s, H-7), 2.42 (1H, dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, H-22a), 1.02 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-21), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.91 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, H₃-25), 0.73 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 177.7, 71.3, 67.4, 57.4, 51.8, 43.8 (2C), 42.8, 41.5, 41.2, 41.0, 37.0, 15 35.1, 33.8, 31.3, 31.2, 29.4, 28.3, 24.6, 24.2, 23.3, 22.2, 20.0, 12.2, 12.1.

BARTn710: C₂₇H₄₆NNaO₆S

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3), 20 3.66 (1H, br s, H-7), 3.59 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₂-N), 2.96 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₂-S), 2.42 (1H, dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, H-22a), 1.00 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H₃-21), 0.94 (3H, s, H₃-19), 0.90 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H₃-25), 0.70 (3H, s, H₃-18).

25 **BARn706:** C₂₅H₄₄O₃

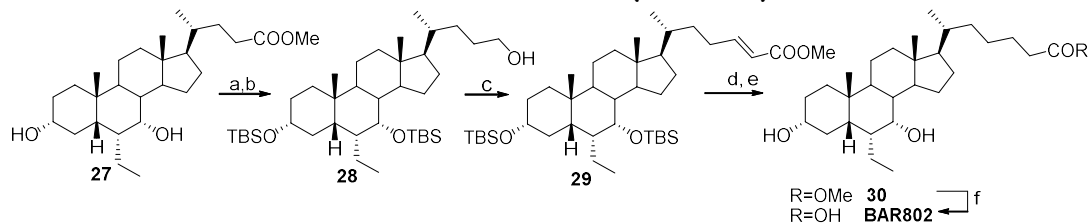
^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 3.97 (1H, br s, H-3), 3.67 (1H, br s, H-7), 3.61 (1H, m, H-23a), 3.55 (1H, m, H-23b), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H_3 -21), 0.95 (3H, s, H_3 -19), 0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H_3 -25), 0.71 (3H, s, H_3 -18).

^{13}C NMR è stato registrato su Varian Inova 100 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 71.4, 67.4, 60.8, 57.9, 51.8, 43.8, 42.8, 41.5, 41.2, 41.1, 39.9, 37.0, 34.2, 33.8, 31.3, 31.2, 29.4, 28.3, 24.6, 24.2, 23.3, 22.3, 19.4, 12.2, 12.1.

BARn706solf: $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NaO}_6\text{S}$

^1H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD_3OD come solvente: δ 4.05 (2H, m, H_2 -23), 3.97 (1H, br s, H-3), 3.66 (1H, br s, H-7), 1.00 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H_3 -21), 0.94 (3H, s, H_3 -19), 0.91 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H_3 -25), 0.71 (3H, s, H_3 -18).

ESEMPIO 2J. Preparazione di acido 6 α -etil-3 α ,7 α -diidrossi-25,26-bishomo-5 β -colan-26-oico (BAR802), 6 α -etil-3 α ,7 α -diidrossi-25,26-bishomo-5 β -colan-26-olo (BAR803) e 6 α -etil-3 α ,7 α -diidrossi-25,26-bishomo-5 β -colan-26-il-26-solfato di sodio (BAR804)





a) 2,6-lutidina, t-butildimetilsilil
trifluorometansulfonato, CH₂Cl₂, 0 °C; b) LiBH₄, MeOH
secco, THF, 0 °C, 68% su due fasi; c) DMSO, oxalyl
chloride, TEA dry, CH₂Cl₂, -78 °C then
5 methyl(triphenylphosphoranylidene)acetate, 79%; d) H₂,
Pd(OH)₂/C Degussa type, THF/MeOH 1:1, quantitative yield;
e) HCl 37%, MeOH, 87%; f) NaOH 5% in MeOH/H₂O 1:1 v/v,
89%; g) LiBH₄, MeOH dry, THF, 0 °C, 78%; h) Et₃N.SO₃,
DMF, 95 °C, 25 %.

10 BAR802-804 sono stati preparati seguendo gli stessi
protocolli sintetici dell'Esempio 1A, fasi a-g. La
solfatazione di una piccola aliquota di BAR803 nelle
stesse condizioni operative dell'Esempio 1B, fase g, ha
permesso di ottenere BAR804.

15 **BAR802:** C₂₈H₄₈O₄

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.66 (1H, br s, H-7),
3.31 (1H, m ovl, H-3), 2.24 (2H, t, J = 7.3 Hz, H₂-25),
0.95 (3H, d, J = 6.4 Hz, H₃-21), 0.92 (3H, s, H₃-19),
20 0.91 (3H, t, J = 6.9 Hz, H₃-28), 0.70 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz,
utilizzando CD₃OD come solvente: δ 186.7, 73.3, 71.3,
57.7, 51.7, 47.0, 43.7, 43.1, 41.6, 41.1, 37.1, 36.9,
36.8, 36.6, 34.5, 34.4 (2C), 31.3, 29.4, 27.0 (2C), 24.6,
25 23.8, 23.5, 22.0, 19.2, 12.2, 12.0.

BAR803: C₂₈H₅₀O₃

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.64 (1H, br s, H-7), 3.53 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H₂-26), 3.30 (1H, m ovl, H-3),
5 0.94 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H₃-21), 0.91 (3H, s, H₃-19), 0.90 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H₃-28), 0.68 (3H, s, H₃-18).

¹³C NMR è stato registrato su Varian Inova 175 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 73.3, 71.3, 63.1, 57.7, 51.7, 47.0, 43.7, 43.1, 41.6, 41.1, 37.1, 36.8
10 (2C), 36.6, 34.5, 34.4, 33.7, 31.3, 29.5, 27.4, 27.0, 24.6, 23.8, 23.5, 22.0, 19.3, 12.3, 12.0.

BAR804: C₂₈H₄₉NaO₆S

¹H NMR è stato registrato su Varian Inova 400 MHz, utilizzando CD₃OD come solvente: δ 3.99 (2H, t, *J* = 6.6
15 Hz, H₂-26), 3.65 (1H, br s, H-7), 3.31 (1H, m ovl, H-3), 0.94 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H₃-21), 0.91 (3H, s, H₃-19), 0.90 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H₃-28), 0.69 (3H, s, H₃-18).

Attività biologiche. L'attività dei composti selezionati è stata testata in vitro usando un modello a
20 cellula intera trasfettato con geni reporter per determinare la selettività dei composti mostrati in tabella 1 verso FXR e TGR5/GPBAR1 rispetto all'acido chenodeossicolico (CDCA) e TLCA. CDCA è un acido biliare primario che funziona come ligando endogeno per FXR,
25 mentre TLCA è un ligando fisiologico per TGR5/GPBAR1. In

questo saggio, le cellule HepG2 (una linea cellulare di origine epatica) sono state coltivate a 37°C in terreno essenziale minimo con sali di Earl contenenti siero di bovino fetale al 10% (FBS), l'1% di L-glutammina, e l'1% di penicillina/streptomina. Le cellule HEK-293T sono state coltivate a 37°C in D-MEM contenente siero di bovino fetale al 10% (FBS), l'1% di L-glutammina, e l'1% di penicillina/streptomina. Gli esperimenti di trasfezione sono stati eseguiti usando Fugene HD secondo le indicazioni del produttore. Le cellule sono state piastrate in una piastra a 24 pozzetti a 5×10^4 cellule/pozzetto. Per la transattivazione mediata da FXR le cellule HepG2 sono state trasfettate con 100 ng di pSG5-FXR, 100 ng di pSG5-RXR, 100 ng di pGL4.70 un vettore codificante il gene della Renilla umano e 250 ng del vettore reporter p(hsp27)-TK-LUC contenente l'elemento di risposta all'FXR IR1 clonato dal promoter della proteina da shock termico 27 (hsp27).

Per la transattivazione mediata da GPBAR1, le cellule HEK-293T sono state trasfettate con 200 ng di pGL4.29, un vettore reporter contenente un elemento di risposta cAMP (CRE) che dirige la trascrizione del gene reporter della luciferasi luc2P, con 100 ng di pCMVSPORT6-GPBAR1 umano, e con 100 ng di pGL4.70 un vettore codificante il gene della Renilla umano. In

esperimenti di controllo le cellule HEK-293T sono state trasfettate soltanto con i vettori pGL4.29 e pGL4.70 per escludere qualsiasi possibilità che i composti potessero attivare CRE in un modo GPBAR1 indipendente. 24 ore post-trasfezione, le cellule sono state stimulate per 18 ore con TLCA 10 μ M come agente di controllo o agonisti di GPBAR1 putativi alla stessa concentrazione. Dopo i trattamenti, le cellule sono state lisate in 100 μ L di tampone di lisi (Tris-fosfato 25 mM, pH 7.8; DTT 2 mM; 10% di glicerolo; 1% di Triton X-100), e 20 μ L di lisato cellulare sono stati valutati per l'attività luciferasica usando il sistema di saggio per la luciferasi. La luminescenza è stata misurata usando il luminometro Glomax 20/20. Le attività luciferasiche sono state normalizzate contro le attività della Renilla. L'antagonismo contro FXR di GPBAR1/TGR5 è stato misurato come percentuale di attività nel saggio di transattivazione considerando l'attività di TLCA come esempio di agonismo.

Animali e protocolli. Topi GPBAR1 null (topi GPBAR1-B6=GPBAR12/2, generati direttamente nel background C57BL/6NCr1), e i componenti della stessa nidiata congeniti su C57BL/6NCr1 sono stati alloggiati a temperature controllate (22°C) e fotoperiodi (un ciclo di 12:12-ore luce/buio), consentendo l'accesso illimitato a



mangime per topi standard e acqua di rubinetto e lasciati acclimatare a queste condizioni per almeno 5 gironi prima dell'inclusione in un esperimento.

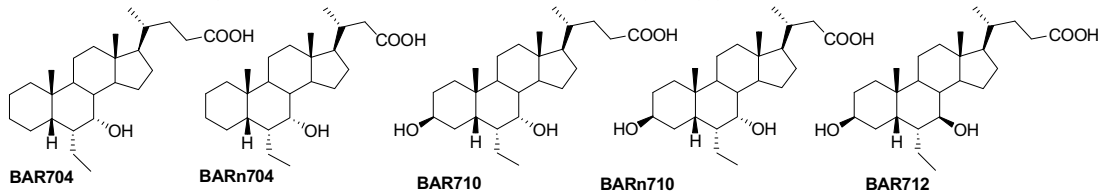
Test di grattamento. Topi maschi GPBAR1^{-/-} e i loro
5 compagni di nidiata congeniti (8-12 settimane di età) sono stati usati per questi studi. Il manto alla base del collo è stato rasato e i topi sono stati collocati in singoli cilindri su un piano di vetro. Una circonferenza di circa 0,5 cm di diametro è stata tracciata nel collo e
10 gli agenti di test sono stati iniettati in quest'area. I topi sono stati fatti abituare alla camera dell'esperimento, all'apparecchio di vincolo e agli esaminatori per periodi di 2 ore e due giorni consecutivi prima degli esperimenti. Il comportamento di grattamento
15 è stato quantificato da 2 osservatori ignari degli agenti di test o genotipi. Un graffio è stato definito come il sollevamento dell'arto posteriore sul sito di iniezione e quindi un collocamento della zampa sul pavimento, indipendentemente dal numero di azioni. Se i conteggi
20 differivano di oltre 5 graffi per un periodo di 30 minuti, entrambi gli osservatori rivalutavano le registrazioni. I risultati sono stati espressi come numero di eventi di grattamento durante 30 o 60 minuti di osservazione. Gli agenti testati erano: DCA (25 µg), TLCA
25 (25 µg), UDCA (25 µg), e BAR502 (25 µg), o con acido

betulinico (50 µg), acido oleanolico (50 µg). LCA e DCA sono stati dissolti in DMSO e gli altri agenti in 0,9% di NaCl (10 µL). In un altro scenario sperimentale ai topi GPBAR1^{-/-} e ai loro compagni di nidiata congeniti sono stati somministrati alfa-naftilisotiocianato (ANIT) (25 mg/kg, per os) dissolto in olio di oliva o olio di oliva da solo (topi di controllo) o con la combinazione di ANIT più BAR502 (15 mg/Kg una volta al giorno per os) per 10 giorni. Il giorno 5 è stato valutato il grattamento spontaneo per 60 minuti e dopo iniezione sottocutanea di 25 µg di DCA. I livelli serici di bilirubina totale, aspartato amminotransferasi (AST) e fosfatasi alcalina sono stati misurati mediante test di chimica clinica abituale eseguito su un analizzatore automatico Hitachi 717. Per il modello con gli estrogeni, ai topi C57BL6 di tipo selvatico sono stati somministrati 10 mg/Kg i.p. di 17α-Etinilestradiolo (17αE₂) dissolto in PEG o PEG da solo (topi di controllo) o la combinazione di 17αE₂ e BAR502 (15 mg/Kg giornalieri, per os) per 8 giorni. Al termine dello studio sono stati registrati il grattamento spontaneo e il grattamento indotto mediante iniezione s.c. di 25 µg di DCA. Sono anche stati misurati il peso della cistifellea e i livelli serici di bilirubina e fosfatasi alcalina. Durante gli studi gli animali sono stati valutati visivamente almeno due volte al giorno da

lunedì a venerdì e una volta al giorno nel fine settimana dagli esaminatori e dal personale della struttura per animali altamente addestrato, inclusi i veterinari della struttura. Gli animali sono stati pesati giornalmente e sacrificati ai punti temporali indicati o quando le loro condizioni cliniche divenivano critiche come valutato da una riduzione del peso corporeo superiore al 25% del peso corporeo di base in 7 giorni. Inoltre, gli animali sono stati sacrificati quando alla valutazione giornaliera essi dimostravano incapacità di alzarsi o deambulare. I topi sono stati sottoposti a eutanasia mediante un'overdose di sodio pentobarbital (>100 mg/kg i.p.).

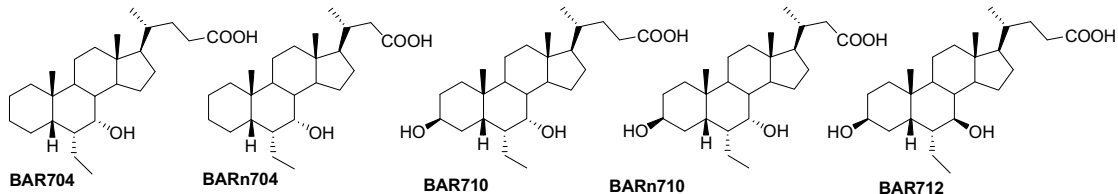
RIVENDICAZIONI

1. Composto selezionato dal gruppo costituito da:



2. Composto secondo la rivendicazione 1, detto composto essendo 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-oico.

3. Composto per l'uso come farmaco, detto composto essendo selezionato dal gruppo costituito da



4. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui detto composto è 6 α -etil-7 α -idrossi-5 β -colan-24-oico.

5 5. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 3, come modulatore di FXR e/o TGR5/GPBAR1, nella prevenzione e/o nel trattamento di disturbi gastrointestinali, malattie epatiche, malattie cardiovascolari, aterosclerosi, malattie metaboliche, malattie infettive,
10 cancro, disturbi renali, disturbi infiammatori, e disturbi neurologici.

6. Composizione farmaceutica comprendente un composto secondo la rivendicazione 1 e almeno un altro ingrediente farmaceutico.

15 p.i. BAR PHARMACEUTICALS S.R.L.

Si dichiara che la traduzione è perfettamente conforme al testo originale del brevetto concesso dall'Ufficio del Brevetto Europeo.

Ravenna, 22 febbraio 2023

20 Il Mandatario,



Ing. Davide Roncuzzi

USBM-CPI-027 BM