

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 257**

51 Int. Cl.:

C07D 403/06 (2006.01)

C07D 413/06 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11764930 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2621920**

54 Título: **Nuevos análogos de piperazina con grupos heteroarilo sustituidos como antivirales de amplio espectro de la gripe**

30 Prioridad:

28.09.2010 US 387186 P

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**CIANCI, CHRISTOPHER W.;
GERRITZ, SAMUEL;
KIM, SEAN;
LANGLEY, DAVID R.;
LI, GUO;
PEARCE, BRADLEY C.;
PENDRI, ANNAPURNA;
SHI, SHUHAO;
ZHAI, WEIXU y
ZHU, SHIRONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 564 257 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos análogos de piperazina con grupos heteroarilo sustituidos como antivirales de amplio espectro de la gripe

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de piperazina con uno o más grupos heteroarilo sustituidos, útiles para la profilaxis y el tratamiento del virus de la gripe, y a composiciones y formulaciones que contienen estos compuestos.

10

Antecedentes de la invención

El virus de la gripe es un importante agente causal de infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en los seres humanos. Se transmite fácilmente, dando como resultado epidemias anuales que se pueden manifestar en enfermedad grave y muerte para las poblaciones de alto riesgo. Es uno de los virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae* que afecta a aves y mamíferos, y es responsable de la enfermedad denominada habitualmente "gripe". Los síntomas más comunes de la gripe son escalofríos, fiebre, dolor de garganta, dolor muscular, cefalea intensa, tos, debilidad/fatiga y malestar general. El dolor de garganta, la fiebre y la tos son los síntomas más frecuentes. En casos más graves, la gripe provoca neumonía, que puede ser fatal, particularmente para los jóvenes y los ancianos. Aunque a menudo se confunde con otras enfermedades similares a la gripe, especialmente el resfriado común, la gripe es una enfermedad más grave que el resfriado común y está causada por un tipo de virus diferente. La gripe puede producir náuseas y vómitos, particularmente en niños, pero estos síntomas son más comunes en la gastroenteritis no relacionada, que a menudo se denomina "gripe estomacal" o "gripe de 24 horas".

15

20

25

Por lo general, el virus de la gripe se transmite a través del aire mediante la tos o los estornudos, creando aerosoles que contienen el virus. La gripe también se puede transmitir por contacto directo con excrementos de aves o secreciones nasales, o por contacto con superficies contaminadas. Se piensa que los aerosoles transmitidos por el aire causan la mayoría de las infecciones, aunque no está absolutamente claro cuál es el medio de transmisión más importante.

30

La gripe supone una amenaza constante, dado que surgen nuevas variantes estacionalmente. Las epidemias anuales afectan económicamente debido a la pérdida de productividad de la fuerza de trabajo, mientras que fuerzan los recursos de los servicios de salud. Además, el virus de la gripe es responsable de grandes pandemias cada 10-50 años. En 2009, una nueva mezcla genética triple de H1N1 de gripe porcina surgió en América del Norte y alcanzó proporciones de pandemia (Zimmer y Burke, 2009). La capacidad del virus de la gripe para mutar (deriva antigénica), así como para mezclarse genéticamente con otros virus de la gripe de diferentes especies de mamíferos (desplazamiento antigénico), son los mecanismos que causan la variación epidémica estacional y el surgimiento de virus pandémicos, respectivamente (Chen y Deng, 2009). Además, la resistencia a los agentes antigripales disponibles está en aumento. La mayoría de los aislados H3N2 y 2009 H1N1 son resistentes a los inhibidores adamantanos del canal iónico M2 (Deyde *et al.*, 2009). Además, 2008 H1N1 ha mostrado resistencia al inhibidor de neuraminidasa Tamiflu (Oseltamivir), el estándar de tratamiento (Moscona, 2009). Ninguna clase ha mostrado ser eficaz frente al virus aviar H5N1 altamente patógeno (Soepandi, 2010).

35

40

45

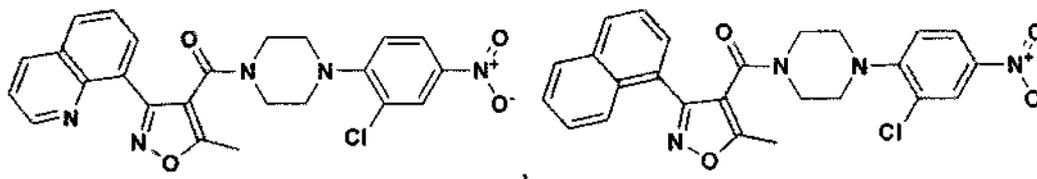
El documento de Patente WO 2011/015037 desvela compuestos que tienen actividad antiviral. En particular, este documento desvela amidas heterocíclicas que contienen anillos de piperazina e isoxazol que pueden ser útiles en el tratamiento de la gripe. Su *et al.* (PNAS, 2010, vol. 7, n.º 45, 19151-19156) discute un procedimiento de análisis sistemático desarrollado para investigar nuevos inhibidores antigripales. El documento de Patente WO 2009/131957 desvela composiciones y métodos para tratar una enfermedad en un mamífero que es sensible a la inhibición del polipéptido CFTR, tal como diarrea y enfermedad poliquística renal. El documento de Patente EP 1396487 A1 desvela compuestos que son inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 4.

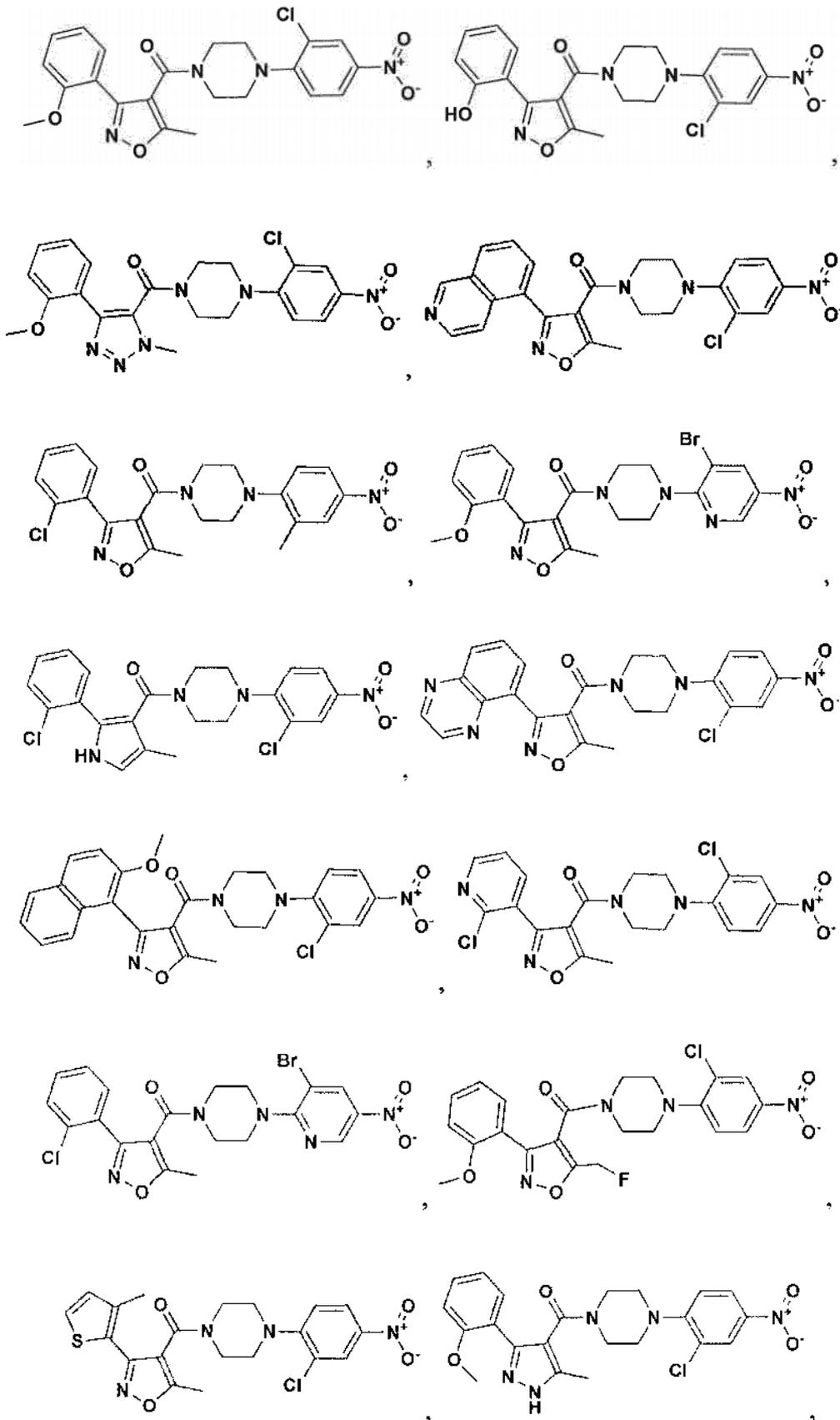
50

Por lo tanto, actualmente se necesitan en la técnica múltiples agentes terapéuticos y profilácticos nuevos frente al virus de la gripe. También se necesitan nuevas composiciones y formulaciones que contengan estos agentes.

55 **Sumario de la invención**

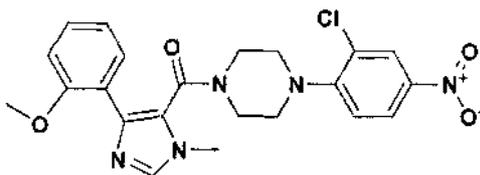
La invención proporciona compuestos que se seleccionan entre el grupo que consiste en:





5

10



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 También se proporciona como parte de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad antiviral eficaz de uno o más de los compuestos de la invención, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

10 Además, se proporciona un compuesto de la invención incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de un mamífero infectado con el virus de la gripe.

También se proporcionan en el presente documento métodos para preparar los compuestos de la invención.

- 15 La invención se refiere a estos y otros fines importantes, que se describen en lo sucesivo en el presente documento.

Descripción detallada de las realizaciones

20 Dado que los compuestos de la presente invención pueden poseer centros asimétricos y aparecer por lo tanto en forma de mezclas de diastereómeros y enantiómeros, la presente invención incluye las formas diastereoméricas y enantioméricas individuales de los compuestos de la invención además de las mezclas de las mismas.

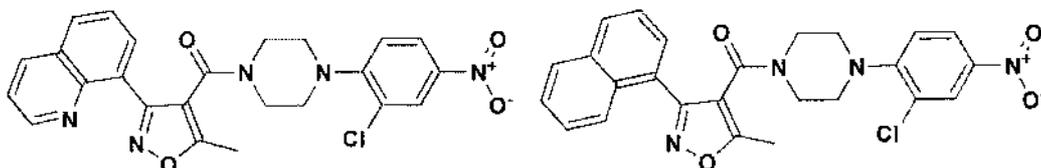
Definiciones

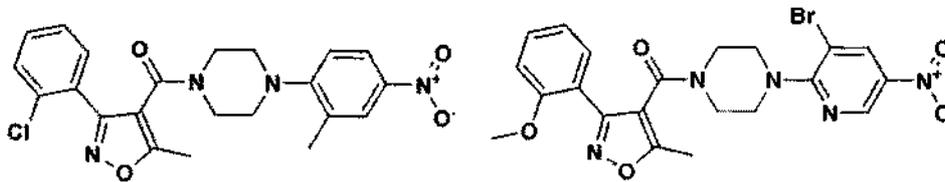
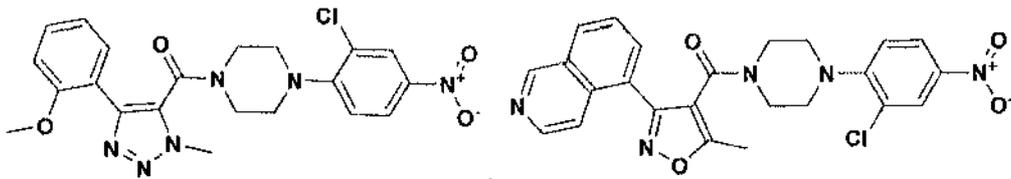
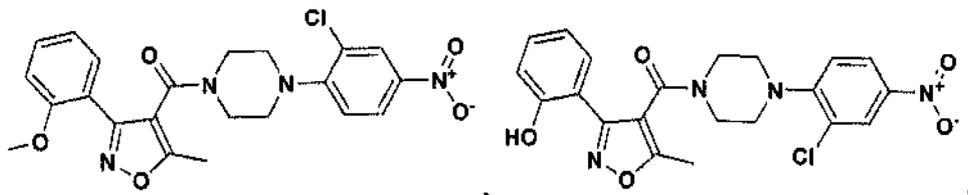
25 A menos que se exprese específicamente otra cosa en otro lugar en la solicitud, en el presente documento se pueden usar uno o más de los siguientes términos, y tendrán los siguientes significados:

30 Se conoce en la técnica que los átomos de nitrógeno de los sistemas de heteroarilo pueden "participar en un doble enlace del anillo de heteroarilo", y esto se refiere a la forma de dobles enlaces en las dos estructuras tautoméricas que comprenden los grupos heteroarilo de anillos de cinco miembros. Esto dicta si los nitrógenos se pueden sustituir como entienden bien los químicos expertos en la materia. La divulgación y las reivindicaciones de la presente divulgación se basan en los principios generales conocidos del enlace químico. Se entiende que las reivindicaciones no incluyen estructuras conocidas por ser inestables o por no ser capaces de existir basándose en la bibliografía.

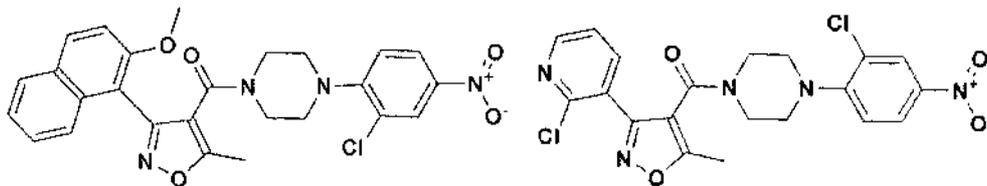
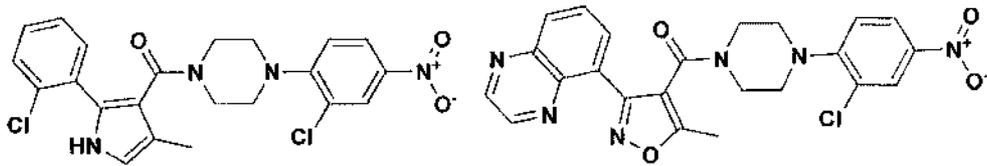
35 Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos que se desvelan en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, pretende incluir sales de adición de base no tóxicas. Algunas sales adecuadas incluyen las obtenidas a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido sulfínico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido sórbico, ácido aconítico, ácido salicílico, ácido ftálico, y similares. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, también pretende incluir sales de grupos ácidos, tales como un carboxilato, con contraiones tales como amonio, sales de metales alcalinos, particularmente sodio o potasio, sales de metales alcalinotérreos, particularmente calcio o magnesio, y sales con bases orgánicas adecuadas tales como alquilaminas inferiores (metilamina, etilamina, ciclohexilamina, y similares) o con alquilaminas inferiores sustituidas (por ejemplo alquilaminas sustituidas con hidroxilo tales como dietanolamina, trietanolamina o tris(hidroximetil)-aminometano), o con bases tales como piperidina o morfolina.

50 Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención se refiere a los siguientes compuestos específicos, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

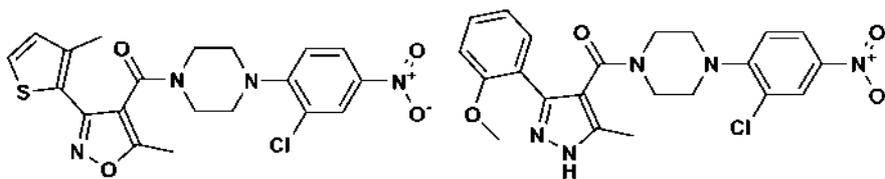
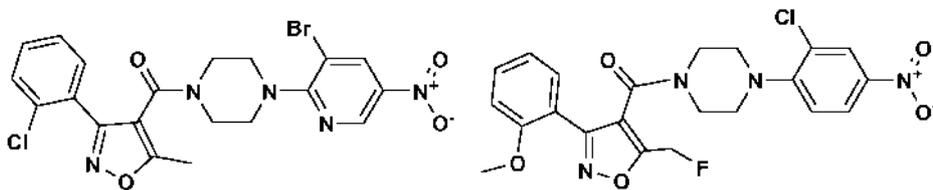




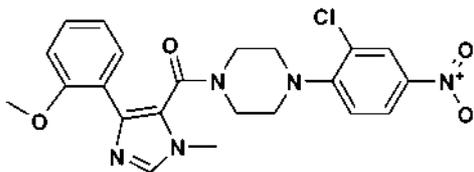
5



10



y



5 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral (incluyendo inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión), mediante inhalación por pulverización, o por vía rectal o mediante otra vía disponible en la técnica, en formulaciones de dosificación unitaria que contienen vehículos, adyuvantes y diluyentes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales.

10 De ese modo, de acuerdo con la presente invención, se proporciona además una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación para su uso en el tratamiento de infecciones virales tales como infección por gripe.

15 La composición farmacéutica puede estar en forma de suspensiones o comprimidos administrables por vía oral; pulverizaciones nasales, preparaciones inyectables estériles, por ejemplo, en forma de suspensiones inyectables estériles acuosas u oleaginosas o supositorios.

20 Cuando se administran por vía oral en forma de una suspensión, estas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas disponibles en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido algínico o alginato sódico como agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad, y agentes edulcorantes/aromatizantes conocidos en la técnica. En forma de comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/o otros excipientes, aglutinantes, expansores, disgregantes, diluyentes, y lubricantes conocidos en la técnica.

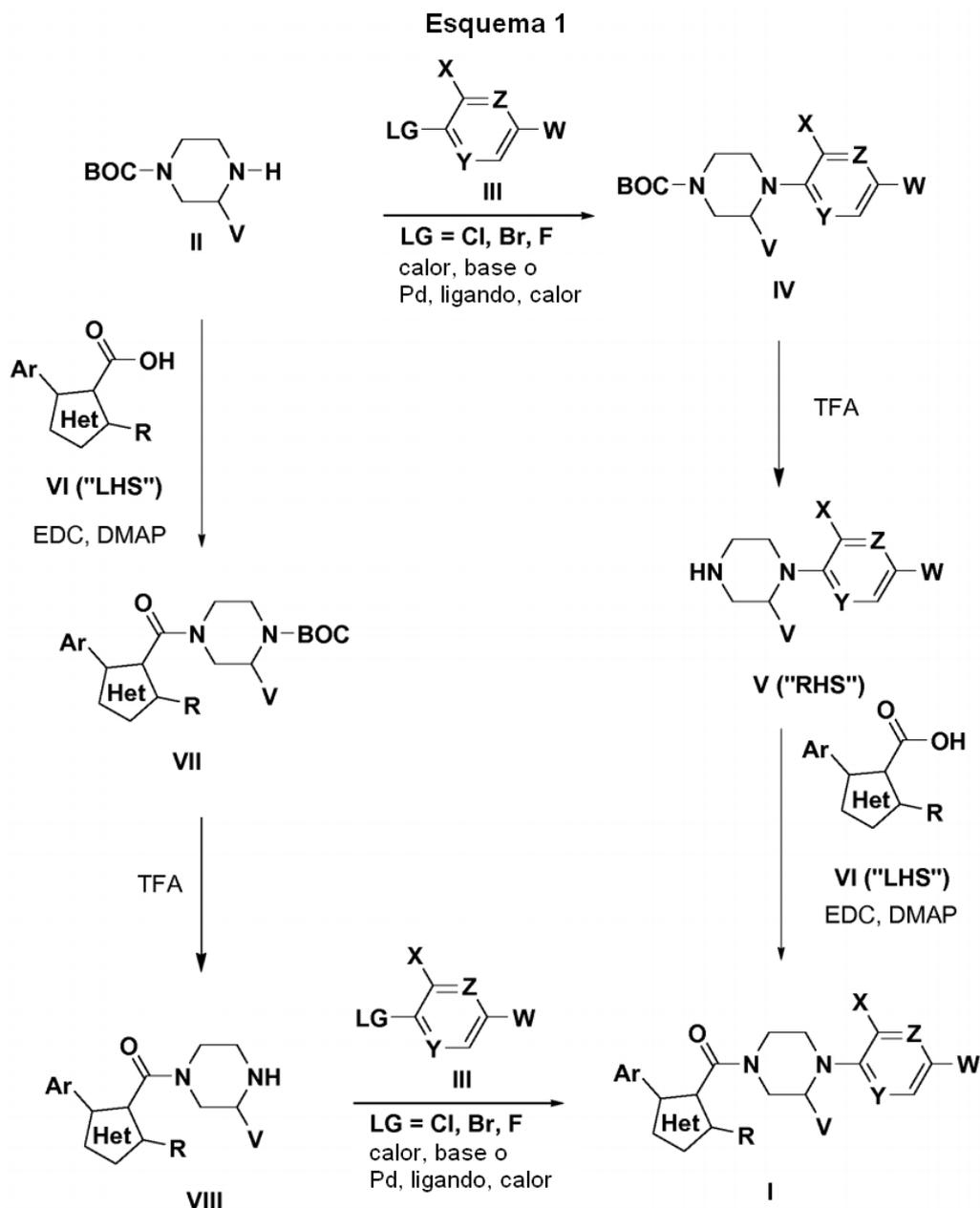
25 Las soluciones o suspensiones inyectables se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando diluyentes o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro sódico, o agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados, tales como aceites no volátiles insípidos estériles, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.

30 Los compuestos que se exponen en el presente documento se pueden administrar por vía oral a seres humanos en un intervalo de dosificación de 1 a 100 mg/kg de peso corporal, quizás en dosis divididas. Un intervalo de dosificación preferente es de 1 a 10 mg/kg de peso corporal por vía oral en dosis divididas. Otro intervalo de dosificación preferente es de 1 a 20 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. Sin embargo, se ha de entender que el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y duración de acción de este compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y la terapia que experimenta el hospedador.

40 La expresión "cantidad eficaz antiviral" significa la cantidad total de cada compuesto o componente activo de la composición o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, la prevención de la infección por gripe o la curación de las afecciones o síntomas agudos caracterizados por la infección por gripe. Los términos "tratar", "tratando", y "tratamiento", como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones, significan prevenir o mejorar las enfermedades y los síntomas asociados a la infección por gripe. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, en serie o simultáneamente.

50 La presente invención también se refiere a combinaciones de los compuestos que se describen en el presente documento con uno o más agentes distintos útiles para el tratamiento de la gripe. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden administrar de forma eficaz, ya sea en periodos de exposición previa y/o de exposición posterior, en combinación con cantidades eficaces de otros antivirales, inmunomoduladores, antiinfectivos, o vacunas para la gripe disponibles en la técnica.

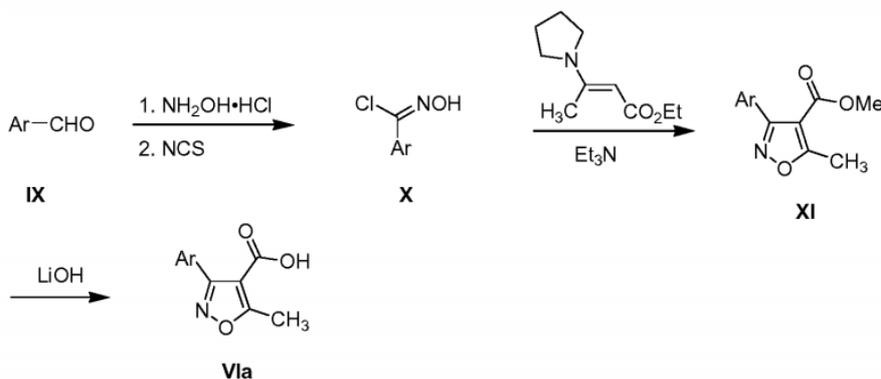
55 Los siguientes esquemas son procedimientos generalizados para que los expertos en la materia preparen los compuestos de la invención.



En el que V es H, X es Cl, Br o Me, Y es CH o N, Z es CH, W es NO₂, R es Me o CH₂F y Het y Ar son los grupos aromáticos mostrados en la reivindicación 1. Los compuestos de fórmula I se prepararon a partir de los compuestos intermedios de fórmula II a través de dos rutas complementarias que se ilustran en el Esquema 1. En la primera ruta, los compuestos intermedios de fórmula II se trataron con los compuestos intermedios de fórmula III en presencia de una base y calor o en presencia de una base, calor y un catalizador de paladio para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula IV. Los compuestos intermedios de fórmula III se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. Los compuestos intermedios de fórmula IV se trataron con TFA para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula V (también denominados "RHS" o cara a mano derecha). Los compuestos intermedios de fórmula V se trataron con los ácidos carboxílicos de fórmula VI (también denominados "LHS" o cara a mano izquierda) y un reactivo formador de enlace amida (es decir EDC) para proporcionar los compuestos de fórmula I. Los ácidos carboxílicos de fórmula VI se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. En la segunda ruta, se invierten las etapas sintéticas descritas en la primera ruta. Los compuestos intermedios de fórmula II se trataron con los ácidos carboxílicos de fórmula VI (también denominados "LHS" o cara a mano izquierda) y un reactivo formador de enlace amida para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula VII. Los ácidos carboxílicos de fórmula VI se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la

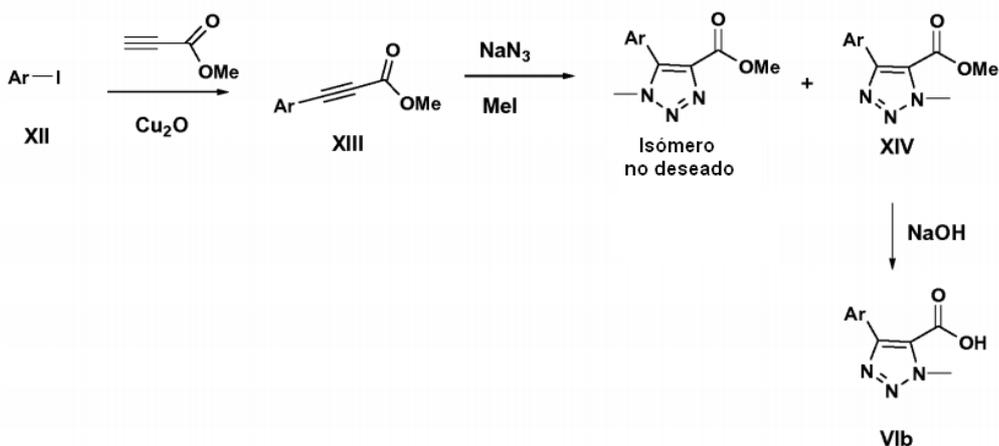
- materia. Los compuestos intermedios de fórmula **VII** se trataron con ácido trifluoroacético para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula **VIII**. Los compuestos intermedios de fórmula **VIII** se trataron con los compuestos intermedios de fórmula **III** en presencia de una base y calor o en presencia de una base, calor y un catalizador de paladio para proporcionar los compuestos de fórmula **I**. Los compuestos intermedios de fórmula **III** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia.

Esquema 2



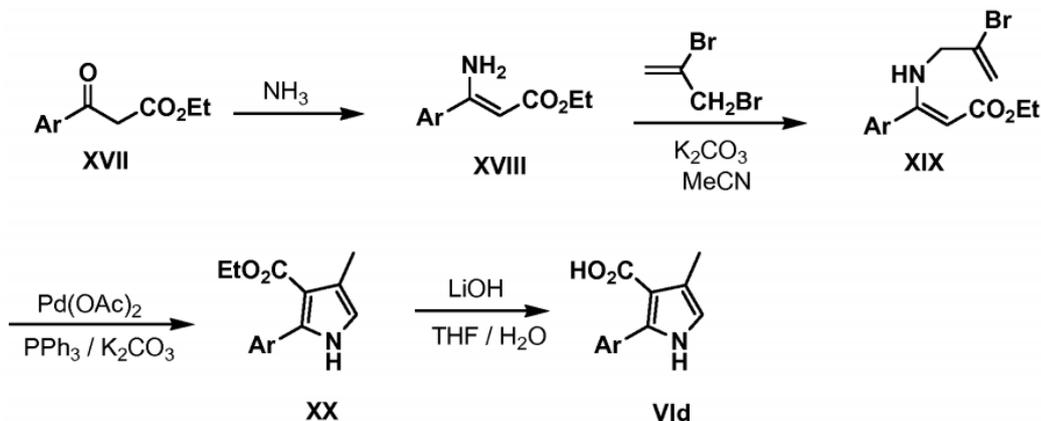
- Los compuestos de fórmula **VIa** se prepararon como se indica en el Esquema 2 y como se describe en la bibliografía. [Véase: Gerald W. Zamponi, Stephanie C. Stotz, Richard J. Staples, Tina M. Andro, Jared K. Nelson, Victoria Hulubei, Alex Blumenfeld, y Nicholas R. Natale, *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 87-96]. El tratamiento secuencial de los derivados de arilaldehído de fórmula **IX** con clorhidrato de hidroxilamina, y a continuación con N-clorosuccinimida proporcionó los compuestos intermedios de fórmula **X**. Los derivados de aldehído de fórmula **IX** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. Los compuestos intermedios de fórmula **XI** se prepararon por tratamiento de las clorooximas de fórmula **XII** con (E)-3-(pirrolidin-1-il)but-2-enoato de etilo para proporcionar los isoxazoles de fórmula **XI**. La hidrólisis del éster de metilo de los isoxazoles de fórmula **XI** proporcionó los compuestos de fórmula **VIa**.

Esquema 3



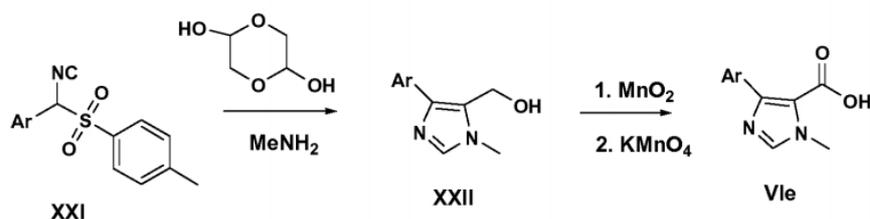
- Los compuestos de fórmula **VIb** se prepararon como se indica en el Esquema 3. Los yoduros de alilo de fórmula **XII** se acoplaron con propionato de metilo en presencia de óxido de cobre (I) [véase: Lilliebris, C.; Larsen, S.D; Ogg, D.; Palazuk, B.J; y Pleasdale, J.E. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 1785] para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula **XIII**. Los derivados de yoduro de alilo de fórmula **XII** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. Los compuestos intermedios de fórmula **XIII** se trataron con azida sódica y yoduro de metilo para proporcionar los triazoles de fórmula **XIV** después de separación cromatográfica de un regioisómero no deseado. El tratamiento de los triazoles de fórmula **XIV** con hidróxido sódico proporcionó los compuestos de fórmula **VIb**.

Esquema 5



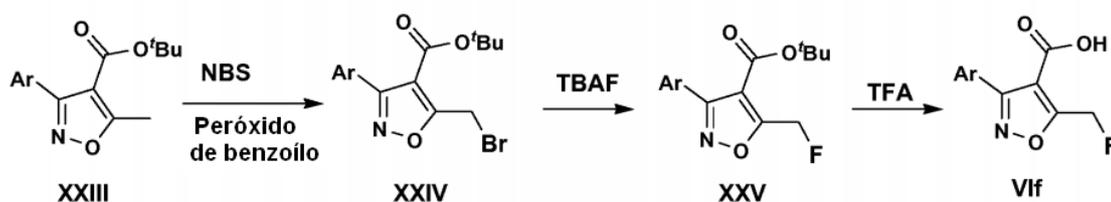
Los compuestos de fórmula **VId** se prepararon como se indica en el Esquema 5 y como se describe en la bibliografía. [Véase: Grigg, R.; Savic, V. Chem. Commun. 2000, (10), 873-874]. Los beta-cetoésteres de fórmula **XVII** se trataron con amoníaco para proporcionar las enaminas de fórmula **XVIII**. Los beta-cetoésteres de fórmula **XVII** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. El tratamiento de las enaminas de fórmula **XVIII** con 2,3-dibromoprop-1-eno proporcionó los compuestos intermedios de fórmula **XIX**, que tras tratamiento con acetato de paladio(II) proporcionaron los pirroles de fórmula **XX**. El tratamiento de los pirroles de fórmula **XX** con hidróxido de litio proporcionó los compuestos de fórmula **VId**.

Esquema 6



Los compuestos de fórmula **Vle** se prepararon como se indica en el Esquema 6 y como se describe en la bibliografía. [Véase: Luke, R.W.A.; Jones, C.D.; McCoull, W; Hayter, B.R. Documento de Patente WO 2004013141, 2004.] Los isocianatos de fórmula **XXI** se trataron con 1,4-dioxano-2,5-diol y metilamina para proporcionar los imidazoles de fórmula **XXII**. Los isocianatos de fórmula **XXI** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. El tratamiento secuencial de los imidazoles de fórmula **XXII** con óxido de manganeso (IV) y permanganato potásico proporcionó los compuestos de fórmula **Vle**.

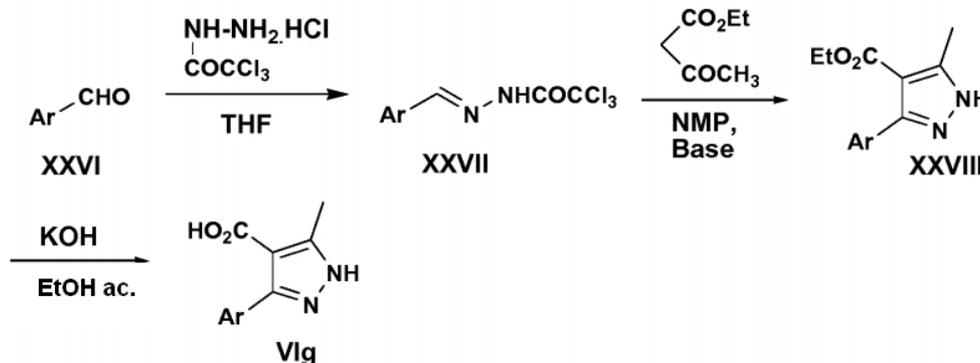
Esquema 7



Los compuestos de fórmula **VIf** se prepararon como se indica en el Esquema 7. Los isoxazoles de fórmula **XXIII** se bromaron en condiciones de radicales libres para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula **XXIV**. Los isoxazoles de fórmula **XXIV** se pueden obtener comercialmente, se puede preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, se pueden preparar de forma análoga al Esquema 2, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. Los compuestos intermedios de fórmula **XXIV** se trataron con fluoruro de tetrabutilamonio para proporcionar los compuestos intermedios de fórmula **XXV**. [Véase: Sun, H.; DiMagno, S. G., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127,

2050-2051]. El tratamiento de los compuestos intermedios de fórmula **XXV** con ácido trifluoroacético proporcionó los compuestos de fórmula **Vif**.

Esquema 8



5 Los compuestos de fórmula **VIg** se prepararon como se indica en el Esquema 8 y como se describe en la bibliografía. [Véase: El Kaim, L.; Lacroix, S. Synlett, 2000, 3, 353-354]. Los aldehídos de fórmula **XXVI** se condensaron con trichloroacetilhidrazida para proporcionar las hidrazonas de fórmula **XXVII**. Los aldehídos de fórmula **XXVI** se pueden obtener comercialmente, se pueden preparar mediante métodos conocidos en la bibliografía, o los puede preparar fácilmente un experto en la materia. El tratamiento de las hidrazonas de fórmula **XXVII** con acetoacetato de etilo en condiciones básicas proporcionó los pirazoles de fórmula **XXVIII**, que se hidrolizaron en una etapa posterior para proporcionar los compuestos de fórmula **VIg**.

Ejemplos

15 Los compuestos que se describen y se exponen en el presente documento y su preparación se puede comprender adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de trabajo. Estos ejemplos pretenden ser ilustrativos de la presente invención.

20 Las abreviaturas químicas usadas en los Ejemplos se definen como sigue a continuación:

- "Ac" para acetato,
- "CD₃OD" para deuterometanol,
- "CDCl₃" para deuterocloroformo,
- 25 "DCM" para diclorometano
- "DMF" para N,N-dimetilformamida,
- "DMAP" para 4-dimetilaminopiridina,
- "DMSO" para dimetilsulfóxido,
- "EDC" o "EDCI" para clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida,
- 30 "Et" para etilo,
- "EtOAc" para acetato de etilo,
- "HOAc" para ácido acético,
- "NBS" para N-bromosuccinimida,
- "NCS" para N-clorosuccinimida,
- 35 "TFA" para ácido trifluoroacético, y
- "THF" para tetrahydrofurano.

Las abreviaturas usadas en los Ejemplos se definen como sigue a continuación: "°C" para grados Celsius, "EM" para espectrometría de masas, "ESI" para espectroscopía de masas con ionización por electronebulización, "HR" para alta resolución, "CL-EM" para cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, "eq" para equivalente o equivalentes, "g" para gramo o gramos, "h" para hora u horas, "mg" para miligramo o miligramos, "ml" para mililitro o mililitros, "mmol" para milimolar, "M" para molar, "min" para minuto o minutos, "ta" para temperatura ambiente, "RMN" para espectroscopía de resonancia magnética nuclear, "tlc" para cromatografía en capa fina, "atm" para atmósfera, y "α", "β", "R", "S", "E", y "Z" son denominaciones estereoquímicas familiares para el experto en la materia.

45 "HPLC" es una abreviatura usada en el presente documento para cromatografía líquida de alta presión. La HPLC en fase inversa se puede llevar a cabo usando una columna Vydac C-18 con un gradiente de elución de un 10 % a un 100 % de tampón B en tampón A (tampón A: agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 %, tampón B: 10 % de agua, 90 % de acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 %). Si fuera necesario, las fases orgánicas se pueden secar sobre sulfato sódico a menos que se indique otra cosa. Sin embargo, a menos que se indique otra cosa,

generalmente son aplicables las siguientes condiciones. "CL-EM" se refiere a cromatografía líquida de alta presión llevada a cabo de acuerdo con la definición de HPLC con un detector de espectrometría de masas.

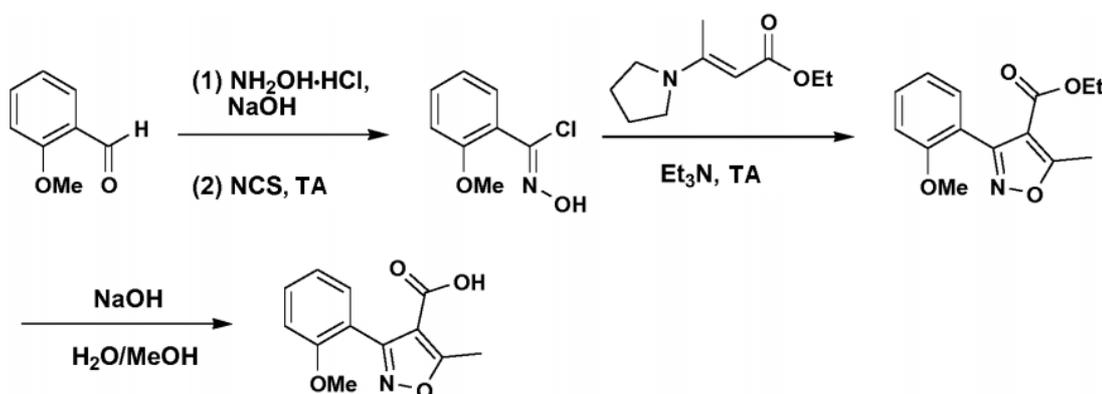
Método	% B inicial	% B final	Tiempo de gradiente (min)	Caudal (ml/min)	λ	Columna	Disolvente A	Disolvente B
A	0	100	3	4	220	Xterra 4,6 x 30 mm S5	10 % de MeOH - 90 % de H ₂ O - TFA al 0,1 %	90 % de MeOH - 10 % de H ₂ O - TFA al 0,1 %
C	0	100	3	4	220	SunFire C18 5u 4,6 x 50 mm	90 % de Agua / 10 % de ACN/ TFA al 0,1 %	10 % de Agua / 90 % de ACN/ TFA al 0,1 %
F	0	100	3	4	220	Luna 4,6 x 30 mm S10	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	95 % de ACN - 5 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM
G	0	100	4	0,8	220	fenomenex-Luna, 2,0 x 50 mm, 3u	90 % de H ₂ O - 10 % de ACN - TFA al 0,1 %	10 % de H ₂ O - 90 % de ACN - TFA al 0,1 %
I	0	100	3	4	220	Luna 3,0 x 50 mm S10	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	95 % de ACN - 5 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM
L	0	100	2	4	254	fenomenex-Luna 4,6 x 50 mm S10	10 % de MeOH - 90 % de H ₂ O - TFA al 0,1 %	90 % de MeOH - 10 % de H ₂ O - TFA al 0,1 %
M	0	100	2	4	254	fenomenex-Luna 4,6 x 50 mm S10	90 % de Agua / 10 % de ACN / TFA al 0,1 %	10 % de Agua / 90 % de ACN / TFA al 0,1 %
O	0	95	15	1,2	220	Ascentis C-18, 4,6 x 150 mm	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	95 % de ACN - 5 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM
Q	0	100	10	2	220	Waters Xbridge C-18 4,6 x 50 mm	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM
R	20	95	7	3	220	Ascentis C-18, 4,6 x 50 mm	5 % de ACN - 95 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	95 % de ACN - 5 % de H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM
U	30	95	15	20	220	Waters Xbridge C-18 150 x 19 mm, 5u	H ₂ O - NH ₄ Ac 10 mM	ACN - NH ₄ Ac 10 mM

HPLC preparativa: cuando se describe como realizada en "condiciones estándar", las muestras (aprox. 20 mg) se disolvieron en metanol (10 mg/ml) y se purificaron en una columna Vydac C18 de 25 mm x 50 mm con un gradiente de 5 minutos de elución de un 10 % a un 100 % de tampón B en tampón A (tampón A: agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 %, tampón B: 10 % de agua, 90 % de acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 %) a 10 ml/minuto.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mel-Temp II y son sin corregir. Los espectros IR se obtuvieron en un espectrómetro de haz individual Nicolet Nexus FT-IR usando 16 acumulaciones con una resolución de 4,00 cm⁻¹ en muestras preparadas en un disco sometido a presión de KBr o en forma de una película sobre placas de KBr. Los espectros de RMN de protón (300 MHz, referenciados con respecto al tetrametilsilano) se obtuvieron en un espectrómetro Varian INOVA 300, Bruker Avance 300, Avance 400, o Avance 500. Los datos se refirieron al disolvente de bloqueo. Los experimentos de ionización por electronebulización (ESI) se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de cuadrupolo individual Micromass II Platform, o en un espectrómetro de masas Finnigan SSQ7000.

15 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIOS

Ácido-A. Ácido 3-(2-metoxifenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico

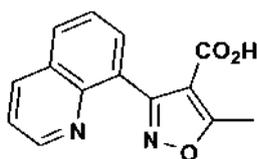


20 **Etapa A1.** Se sintetizó 3-(2-metoxifenil)-5-metilisoxazol-4-carboxilato de etilo a partir de 2-metoxibenzaldehído como se describe en [Zamponi, G. W.; Stotz, S. C.; Staples, R. J.; Andro, T. M.; Nelson, J. K.; Hulubei, V.; Blumenfeld, A.; Natale, N. R. J. Med. Chem. 2003, 46, 87-96].

25 **Etapa A2.** La mezcla de reacción de 3-(2-metoxifenil)-5-metilisoxazol-4-carboxilato de etilo (12,85 g, 49,2 mmol) e hidróxido sódico (9,84 g, 246 mmol) en MeOH (100 ml) y agua (10 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 ml se agitó a 65 °C durante 20 horas. El MeOH se retiró al vacío, y a continuación la mezcla de reacción concentrada se transfirió a un embudo de decantación de 500 ml con 150 ml de agua y 100 ml de éter. La fase orgánica se descartó, la fase acuosa se acidificó por adición de HCl concentrado (26 ml). El producto precipitó y se separó por filtración y se secó a alto vacío para dar 10,63 g (93 %, rendimiento teórico de 11,47 g). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 2,69 (s, 3H, CH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 7,00-7,07 (m, 2H, arilo), 7,32-7,34 (m, ¹H, arilo), 7,43-7,48 (m, ¹H, arilo).

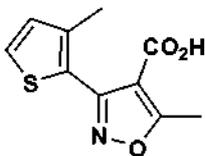
Los siguientes ácidos se sintetizaron de forma análoga al Ácido-A, sustituyendo el aldehído apropiado por 2-metoxibenzaldehído.

35 **Ácido-N: ácido 5-metil-3-(quinolin-8-il)isoxazol-4-carboxílico**



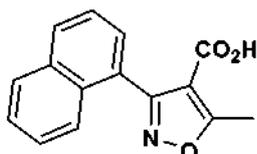
40 RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ 8,85 (1H, s), 8,17 (1H, dd, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz), 8,14 (1H, dd, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz), 7,82 (1H, m), 7,69 (1H, s), 7,58 (1H, m), 2,73 (3H, s).

Ácido-S: ácido 5-metil-3-(3-metiltiofen-2-il)isoxazol-4-carboxílico



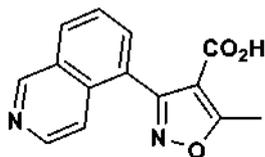
5 RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ 7,49-7,74 (dd, 1H), 6,96-7,24 (dd, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,13 (s, 3H). m/e 224 (M+1)⁺.

Ácido-X: ácido 5-metil-3-(naftalen-1-il)isoxazol-4-carboxílico



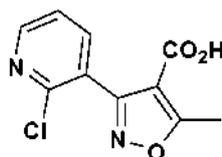
10 RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ 7,83-8,22 (m, 3H), 7,4-7,7 (m, 4H), 3,5 (2H, s a), 2,74 (3H, s). m/e 253,97 (M+1)⁺.

Ácido-Z: ácido 3-(isoquinolin-5-il)-5-metilisoxazol-4-carboxílico



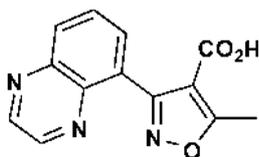
15 RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ 9,14-9,49 (1H, m), 8,37-8,47 (1H, m), 8,24-8,37 (1 H, m), 7,76-7,98 (2H, m), 7,52-7,72 (1H, m), 2,82 (3H, s). m/e 254,80 (M+1)⁺.

20 **Ácido-AH: ácido 3-(2-cloropiridin-3-il)-5-metilisoxazol-4-carboxílico**

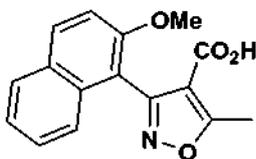


25 RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 8,52-8,44 (1H, m), 7,92-7,83 (1H, m), 7,53-7,44 (1H, m), 2,76 (3H, s).

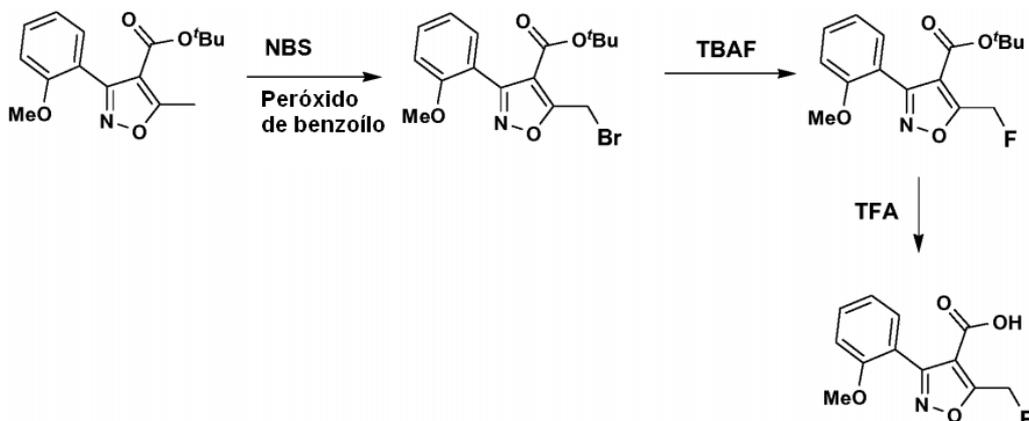
Ácido-AI: ácido 5-metil-3-(quinoxalin-5-il)isoxazol-4-carboxílico



30 RMN ¹H (DMSO, 500 MHz): δ 12,62 (1H, s), 9,01 (1H, d, J = 1,8 Hz), 8,91 (1H, d, J = 1,5 Hz), 8,28-8,21 (1H, m), 7,99-7,92 (2H, m), 2,74 (3H, s).

Ácido-AJ: ácido 3-(2-metoxinaftalen-1-il)-5-metilisoxazol-4-carboxílico

- 5 RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ 12,60 (1H, s), 8,09 (1H, d, *J* = 9,0 Hz), 7,93 (1H, d, *J* = 7,8 Hz), 7,55 (1H, d, *J* = 9,0 Hz), 7,46-7,33 (3H, m), 3,84 (3H, s), 2,77 (3H, s).

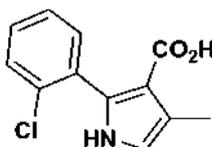
Ácido-AK: ácido 5-(fluorometil)-3-(2-metoxifenil)isoxazol-4-carboxílico

10

- Etapa AK1.** Una solución de 3-(2-metoxifenil)-5-metilisoxazol-4-carboxilato de terc-butilo (0,795 g, 2,75 mmol), NBS (0,978 g, 5,50 mmol) y peróxido de benzoilo (0,033 g, 0,137 mmol) en CCl₄ (10 ml) se agitó a 90 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a TA y el sólido se retiró por filtración. El disolvente se retiró al vacío. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM, *f_R* 0,56) para dar 0,44 g (44 % de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,49-7,37 (2H, m), 7,04 (1H, t, *J* = 7,5 Hz), 6,96 (1H, d, *J* = 8,3 Hz), 4,79 (2H, s), 3,79 (3H, s), 1,38 (9H, s).

- Etapa AK2.** Se preparó 5-(fluorometil)-3-(2-metoxifenil)isoxazol-4-carboxilato de terc-butilo a partir de 5-(bromometil)-3-(2-metoxifenil)isoxazol-4-carboxilato de terc-butilo mediante el método que se describe en Sun, H.; DiMagno, S. G., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2050-2051. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,49-7,37 (2H, m), 7,08-7,01 (1H, m), 6,97 (1H, d, *J* = 8,3 Hz), 5,72 (2H, d, *J* = 47,2 Hz), 3,79 (3H, s), 1,35 (9H, s).

- Etapa AK3.** El tratamiento de 5-(fluorometil)-3-(2-metoxifenil)isoxazol-4-carboxilato de terc-butilo con TFA/DCM (1:1) a temperatura ambiente durante una hora seguido de evaporación de DCM/TFA al vacío proporcionó el compuesto del título. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,53-7,44 (1H, m), 7,42-7,35 (1H, m), 7,13-6,98 (2H, m), 5,74 (2H, d, *J* = 47,2 Hz), 3,78 (3H, s).

Ácido-AO: ácido 2-(2-clorofenil)-4-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

30

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía: Grigg, R.; Savic, V. Chem. Commun. 2000, (10), 873-874. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,52-7,63 (1H, m), 7,41-7,48 (2H, m), 7,28-7,32 (1H, m), 6,8-6,85 (1H, m), 2,17 (3H, s).

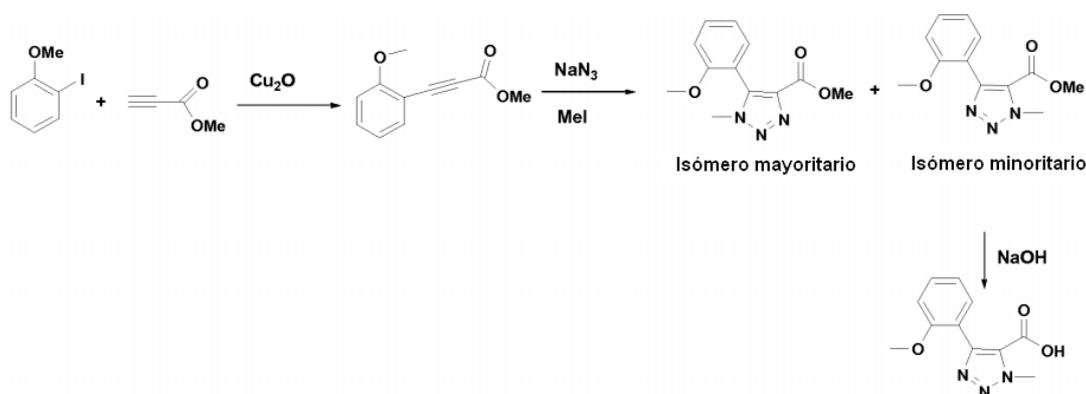
35

Ácido-AT: ácido 5-(2-metoxifenil)-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico

5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía: El Kaim, L.; Lacroix, S. Synlett, 2000, 3, 353-354. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,28-7,40 (1H, m), 7,17-7,25 (1H, m), 6,90-7,08 (2H, m), 2,38 (3H, s). m/e 233,23 (M+1)⁺.

Ácido-AU: ácido 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-1,2,3-triazol-5-carboxílico

10



Etapa AU1. Referencia: Liliebris, C.; Larsen, S.D; Ogg, D.; Palazuk, B.J; y Pleasdale, J.E. J. Med. Chem., 2002, 45, 1785.

15

A una suspensión de propiolato de metilo (**2**, 1,314 ml, 15,41 mmol) y óxido de cobre(I) (1,086 g, 7,59 mmol) en DMF (20 ml) se añadió 1-yodo-2-metoxibenceno (**1**, 1,262 ml, 9,48 mmol). La mezcla resultante se calentó en un reactor de microondas hasta 110 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de gel de sílice y se lavó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con HCl 1 M, solución salina saturada y NaHCO₃ saturado, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dejar un aceite como producto en bruto, que se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO₂, EtOAc/Hexano, 1:2) para proporcionar 3-(2-metoxifenil)propiolato de metilo **3** (932 mg, 4,66 mmol, rendimiento del 49,1 %). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ: 7,54 (1H, dd), 7,44 (1H, td), 6,98-6,92 (m, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (s, 3H).

20

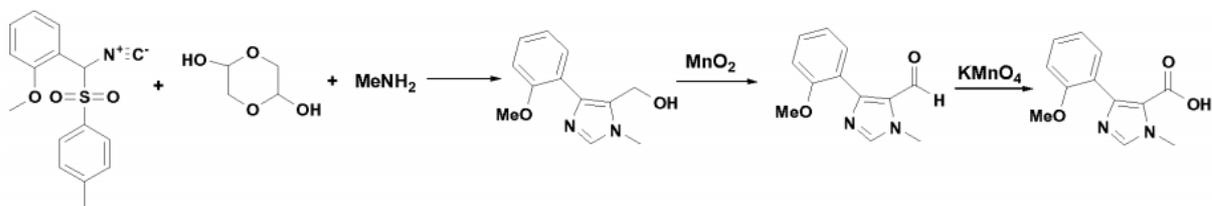
Etapa AU2. Una mezcla de 3-(2-metoxifenil)propiolato de metilo (**3**, 932 mg, 4,90 mmol), azida sódica (478 mg, 7,35 mmol), y yodometano (0,458 ml, 7,35 mmol) en agua (7 ml) y DMF (3 ml) se calentó a 100 °C en un reactor de microondas durante 6 h. Se purificó mediante HPLC preparativa (Varían, 15-90 B en min, B = 90 % de MeOH/10 % de H₂O) para proporcionar 5-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato de metilo (701 mg, 2,69 mmol, rendimiento del 55,0 %), RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD), δ: 7,52-7,56 (m, 1H), 7,30 (dd, 1H), 7,12, (td, 1H), 7,06, (d, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), y 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-1,2,3-triazol-5-carboxilato de metilo (185 mg, 0,711 mmol, rendimiento del 14,51 %), RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD), δ: 7,49-7,46 (m, 2H), 7,10-7,07 (m, 2H), 4,32 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,78 (s, 3H).

30

Etapa AU3. A una solución de 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-1,2,3-triazol-5-carboxilato de metilo (183 mg, 0,74 mmol) en MeOH (5 ml) se añadió hidróxido sódico (1,3 ml, solución acuosa 3 M). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h, y a continuación se concentró al vacío. El residuo se recogió en agua, y se lavó con éter (3 x) para retirar las posibles impurezas. La fase acuosa se acidificó con HCl 6 M hasta pH 3, y se extrajo con EtOAc (4 x). La fase orgánica combinada se secó y se evaporó para proporcionar el compuesto del título (164 mg, 0,703 mmol, rendimiento del 95 %). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD), δ: 7,46-7,42 (m, 2H), 7,09-7,05 (m, 2H), 4,32 (s, 3H), 3,73 (s, 3H).

35

40

Ácido-AV: ácido 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-imidazol-5-carboxílico

5 Referencia: Luke, R.W.A.; Jones, C.D.; McCoull, W; Hayter, B.R. Documento de Patente WO 2004013141, 2004.

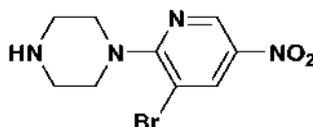
Etapa AV1. A una solución de 1,4-dioxano-2,5-diol (120 mg, 0,995 mmol) en THF (8 ml) se añadió metilamina (2,8 ml, 0,664 mmol) a t.a. La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 75 min.

10 A continuación se añadió 1-(isociano(tosil)metil)-2-metoxibenceno (200 mg, 0,664 mmol) mientras se mantenía la mezcla de reacción a < 30 °C mediante un baño de agua. La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante una noche. Se evaporó para dejar un sólido de color blanco, se disolvió en DMF, y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar (4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il)metanol (84 mg, 0,377 mmol, rendimiento del 38,6 %) en forma de un aceite incoloro. RMN ¹H (MeOD), δ: 8,97 (1H, s), 7,55 (1H, t, J = 7,5 Hz), 7,47 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,22 (1H, d, 8,0 Hz), 7,15
15 (1H, t, J = 7,5 Hz), 4,67 (2H, s), 4,05 (3H, s), 3,89 (3H, s).

Etapa AV2. A una solución de (4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il)metanol (84 mg, 0,385 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml) se añadió MnO₂ (147 mg, 1,693 mmol). La mezcla se calentó a 90 °C durante 4 h o hasta que LC/EM mostró la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y se evaporó para proporcionar 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-imidazol-5-carbaldehído (78 mg, 0,325 mmol, rendimiento del 84 %), que se usó para la
20 siguiente reacción sin purificación.

Etapa AV3. A una solución de 4-(2-metoxifenil)-1-metil-1H-imidazol-5-carbaldehído (78 mg, 0,361 mmol) en acetona (5 ml) y agua (1 ml) se añadió carbonato potásico (100 mg, 0,721 mmol). Después de que se disolviera el carbonato potásico, se añadió KMnO₄ (123 mg, 0,776 mmol) a t.a. La mezcla se agitó durante 24 h. LC/EM mostró la finalización. La mezcla se filtró a través de Celite, y se lavó con agua. La acetona se evaporó del filtrado que se extrajo con EtOAc (2 x). La fase acuosa se acidificó con HOAc hasta pH = 5, el volumen se redujo a la mitad, se congeló y se liofilizó para dejar un sólido, que se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título (41 mg, 0,173 mmol, rendimiento del 48 %). RMN ¹H (MeOD), δ: 8,06 (s, 1H), 7,41-7,36 (m, 2H), 7,05-6,99 (m, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,80 (s, 3H).
30

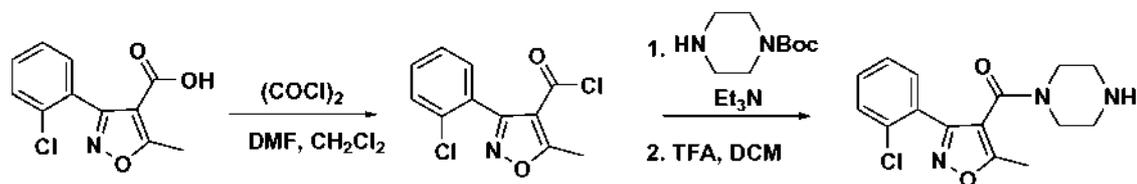
Se preparó 1-(2-clorofenil)-4-metil-1H-1,2,3-triazol-5-carboxilato de metilo (éster de metilo del **Ácido-AX**) como se describe en [Bell, M. G. *et al.* PCT Int. Appl. 2007, documento de Patente WO 2007140174]. El éster de metilo se hidrolizó (NaOH/ H₂O/ MeOH, TA) para proporcionar el compuesto del título. RMN para el éster de metilo del **Ácido-AX**: RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,67-7,58 (2H, m), 7,55-7,51 (2H, m), 3,77 (3H, s), 2,61 (3H, s).
35 RMN para el **Ácido-AX**: RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,65-7,50 (4H, m), 2,61 (3H, s).

Amina-B: 1-(3-bromo-5-nitropiridin-2-il)piperazina

40 **Etapa B1.** Una solución de 3-bromo-2-cloro-5-nitropiridina (0,475 g, 2,000 mmol), piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (0,373 g, 2 mmol), y trietilamina (0,405 g, 4,00 mmol) en DCM (10 ml) se agitó a TA durante una noche. Se purificó mediante una columna de gel de sílice con un 5 % de EtOAc en DCM para dar 4-(3-bromo-5-nitropiridin-2-il)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (0,68 g, 1,756 mmol, rendimiento del 88 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 9,02 (1H, s), 8,55 (1H, s), 3,59-3,65 (8H, m), 1,50 (9H, s).

Etapa B2. Se trató 4-(3-bromo-5-nitropiridin-2-il)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo con TFA al 30 % en DCM (5 ml) durante 2 horas. Se escurrió y se secó para proporcionar el compuesto del título (0,71 g, 1,770 mmol, rendimiento del 88 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ 9,08 (1H, s), 8,72 (1H, s), 3,85 (4H, m), 3,41 (4H, m).
50

Amina E: (3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-il)(piperazin-1-il)metanona



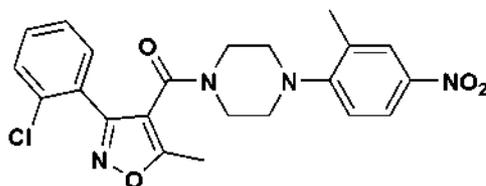
5 **Etapas E1-E2.** A una solución de ácido 3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico (2,376 g, 10,00 mmol) en DCM (70 ml) se añadieron 2 gotas de DMF, y a continuación dicloruro de oxalilo (1,523 g, 12,00 mmol) en porciones. La mezcla se agitó durante 2 horas y la solución se volvió transparente. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria y el residuo se secó al vacío durante 10 min. El residuo se disolvió en DCM (70 ml), a continuación se añadieron trietilamina (3,04 g, 30,0 mmol) y piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (1,862 g, 10,00 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante una noche. Después de que el disolvente se retirara por evaporación rotatoria, el residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice con DCM, y a continuación 10 % de EtOAc en DCM para dar 4-(3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carbonil)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (3,6 g, 8,87 mmol, rendimiento del 89 %).

15 **Etapas E3.** Se trató 4-(3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carbonil)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo con TFA al 50 % en DCM (20 ml) durante 2 horas. Después de que se retirará el disolvente, el residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice con un 10 % de MeOH en DCM para dar (3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-il)(piperazin-1-il)metanona (2,4 g, 7,85 mmol, rendimiento del 79 %). RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ 7,54-7,61 (3H, m), 7,50 (1H, t, J = 7,3 Hz), 3,63 (4H, s), 2,94 (4H, s), 2,58 (3H, s).

20

Ejemplo 1

(3-(2-Clorofenil)-5-metilisoxazol-4-il)(4-(2-metil-4-nitrofenil)piperazin-1-il)metanona

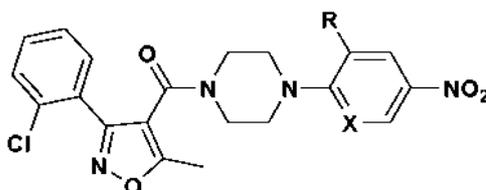


25

Una mezcla de ácido 3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico (0,050 g, 0,210 mmol), 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina (0,071 g, 0,210 mmol) (sal de TFA), EDC (0,048 g, 0,252 mmol) y DMAP (0,051 g, 0,421 mmol) en diclorometano (3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó al vacío. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa (metanol/ agua con TFA al 0,1 %) para dar 41 mg (44 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,08-7,99 (2 H, m), 7,60-7,36 (4 H, m), 6,81 (1 H, d, J = 8,4 Hz), 3,79 (2 H, s a), 3,39 (2 H, s a), 2,89 (2 H, s a), 2,61 (3 H, s), 2,40 (2 H, s a), 2,33 (3 H, s). HPLC/EM (Método U): (ES+) m/z (M+H)⁺ = 441; t_R = 5,67 min.

35

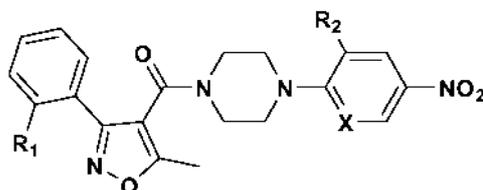
Ejemplo 5



40 El Ejemplo 5 se sintetizó de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo la Preparación RHS apropiada por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina.

Ejemplo	R	X	MH+	TR	Método LC/EM	Preparación RHS
5	Br	N	508	1,60	M	Amina-B

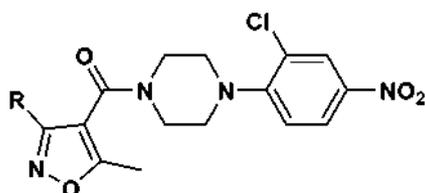
Ejemplos 10 y 18



- 5 Los Ejemplos 10 y 18 se sintetizaron de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo la Preparación RHS apropiada por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina y la Preparación LHS apropiada por ácido 3-(2-clorofenil)-5-metil-isoxazol-4-carboxílico.

Ejemplo	R ₁	R ₂	X	MH+	TR	Método LC/EM	Prep. LHS	Prep. RHS
10	OCH ₃	Br	N	504	2,28	L	Ácido-A	Amina-B
18	OCH ₃	Cl	CH	457	2,92	A	Ácido-A	Comercial

10 Ejemplos 39, 44, 49, 51, 61, 62, 63

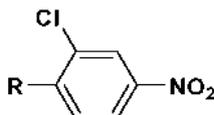


- 15 Estos Ejemplos se sintetizaron de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo 1-(2-cloro-4-nitrofenil)piperazina por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina y la Preparación LHS apropiada por ácido 3-(2-clorofenil)-5-metil-isoxazol-4-carboxílico.

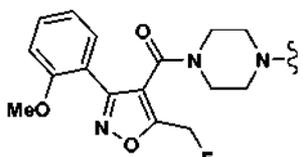
Ejemplo	R	MH+	TR	Método LC/EM	Prep. LHS
39	quinolin-8-ilo	479	8,96	O	Ácido-N
44	3-metiltiofen-2-ilo	447	5,39	Q	Ácido-S
49	naft-1-ilo	477	4,88	Q	Ácido-X
51	isoquinolin-5-ilo	478	4,55	Q	Ácido-Z
61	2-cloropirid-3-ilo	462	2,74	A	Ácido-AH
62	quinoxalin-5-ilo	479	1,76	I	Ácido-AI
63	2-metoxinaft-1-ilo	507	2,48	C	Ácido-AJ

Ejemplo 67

20

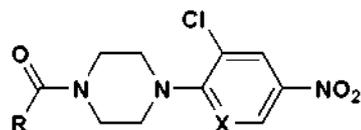


El Ejemplo 67 se sintetizó de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo la Preparación RHS apropiada por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina y la Preparación LHS apropiada por ácido 3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico.

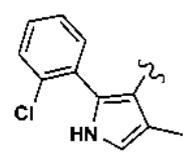
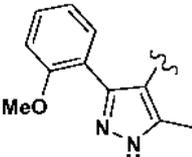
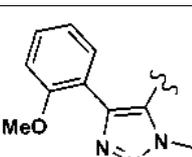
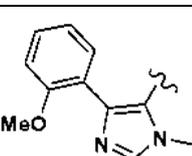
Ejemplo	R	MH+	TR	Método LC/EM	Prep. LHS	Prep. RHS
67		475	2,30	C	Ácido-AK	Comercial

5

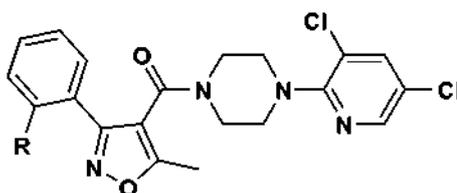
Ejemplos 75, 80, 81, 82



10 Estos Ejemplos se sintetizaron de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo la Preparación RHS apropiada por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina y la Preparación LHS apropiada por ácido 3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico.

Ejemplo	X	R	MH+	TR	Método LC/EM	Prep. LHS	Prep. RHS
75	CH		459	8,09	O	Ácido-AO	Comercial
80	CH		456	3,59	R	Ácido-AT	Comercial
81	CH		457	2,97	G	Ácido-AU	Comercial
82	CH		456	2,24	G	Ácido-AV	Comercial

15 Ejemplo 96 (solo Referencia)



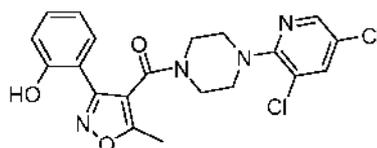
El Ejemplo 96 se sintetizó de forma análoga al Ejemplo 1, sustituyendo 1-(3,5-dicloro-piperidin-2-il)piperazina por 1-(2-metil-4-nitrofenil)piperazina y la Preparación LHS apropiada por ácido 3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico.

Ejemplo	R	MH+	TR	Método LC/EM	Prep. LHS
96	OCH ₃	447	2,20	F	Ácido-A

5

Ejemplo 142 (solo Referencia)

(4-(3,5-Dicloropiridin-2-il)piperazin-1-il)(3-(2-hidroxifenil)-5-metilisoxazol-4-il)metanona



10

Una solución 1,0 M de tribromuro de boro (5,70 ml, 5,70 mmol) se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota una solución de (4-(3,5-dicloropiridin-2-il)piperazin-1-il)(3-(2-metoxifenil)-5-metilisoxazol-4-il)metanona (**Ejemplo 96**, 0,85 g, 1,900 mmol) en DCM (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 3 h y a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió agua lentamente, seguido de la adición de solución saturada de NaHCO₃. El producto se extrajo con DCM (3 X 50 ml). El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (20 % de EtOAc/ DCM fr 0,45) para dar 0,75 g (92 %, rendimiento teórico 0,823 g) del compuesto del título. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 9,31 (1H, s), 8,12 (1H, d, J = 2,2 Hz), 7,62 (1H, d, J = 2,2 Hz), 7,50-7,40 (1H, m), 7,40-7,30 (1H, m), 7,14-7,06 (1H, m), 6,99-6,87 (1H, m), 3,98 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,40 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,35 (2H, s), 3,05 (2H, s), 2,54 (3H, s). HPLC/EM (Método F): (ES+) m/z (M+H)⁺ = 433; t_R = 2,05 min.

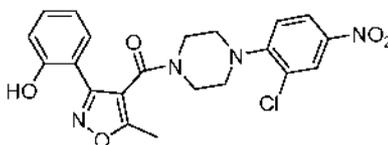
15

20

Ejemplo 147

(4-(2-Cloro-4-nitrofenil)piperazin-1-il)(3-(2-hidroxifenil)-5-metilisoxazol-4-il)metanona

25



El compuesto del título se preparó de forma análoga al **Ejemplo 142**, sustituyendo el **Ejemplo 18** por el **Ejemplo 96**. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 9,20 (1H, s), 8,26 (1H, d, J = 2,7 Hz), 8,10 (1H, dd, J₁ = 9,0 Hz, J₂ = 2,7 Hz), 7,47-7,42 (1H, m), 7,40-7,34 (1H, m), 7,12 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,99-6,90 (2H, m), 4,03 (2H, s), 3,37 (2H, s), 3,23 (2H, s), 2,69 (2H, s), 2,56 (3H, s). HPLC/EM (Método C): (ES+) m/z (M+H)⁺ = 443; t_R = 2,16 min.

30

Materiales y métodos

35 Células y virus

Se obtuvieron células de riñón canino Madin Darby (MDCK) y gripe A/WSN/33 del ATCC. Se obtuvieron gripe A/Islas Salomón/3/06 y gripe A/Brisbane/10/2007 del CDC.

40 Compuestos

Los compuestos de ensayo, a 100x la concentración de ensayo final, se diluyeron en serie en DMSO en etapas de dilución 3 veces. Se añadió un ul de compuesto diluido a cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

45 Ensayos antivirales

Para los ensayos antivirales, se resuspendieron células MDCK en medio de ensayo (MEM con penicilina/estreptomocina más 0,125 % de BA (albúmina bovina) y 1 ug/ml de tripsina tratada con TPCK) a 4,5 x 10⁵ células por ml. El virus se añadió para una multiplicidad de infección (MOI) final de 0,001 unidades formadoras de placa por célula y se añadieron 100 ul a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (1ul de compuesto/pocillo). Para los ensayos de citotoxicidad, se añadieron únicamente células a las placas de ensayo. 48 h después de la infección, se determinó la replicación viral en presencia de inhibidor por medida de la actividad de la neuraminidasa viral (NA)

50

mediante la activación del sustrato inactivado ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (MUNANA). Se añadió una solución de sustrato 5x para producir una concentración final de MUNANA 100 μ M, MES 50 mM, CaCl_2 2 mM y 0,25 % de NP-40. Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C las placas se leyeron en un lector de placas de fluorescencia ajustado a 360 nm para excitación y 460 nm para emisión. La citotoxicidad se determinó mediante tinción con violeta cristal de las células tratadas. Las células se lavaron una vez con PBS, se tiñeron durante 20 min con un 0,5 % de violeta cristal en metanol al 20 %, se lavaron con agua y se sacaron al aire. Se añadieron 50 μ l de metanol a cada pocillo para solubilizar el violeta cristal y se añadieron 50 μ l de PBS antes de que se leyera a la absorbancia a 540 nm.

10 **Referencias**

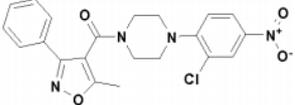
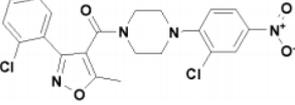
- Chen J, Deng YM. 2009. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemic. *Virology*. Mar 13;6:30.
- 15 Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimov AI, Gubareva LV. 2010. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. Mar;54(3):1102-10.
- Moscona A. 2009. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med*. Mar 5;360(10):953-6.
- 20 Soepandi PZ, Burhan E, Mangunegoro H, Nawas A, Aditama TY, Partakusuma L, Isbaniah F, Malik S, Benamore R, Baird JK, Taylor WR. 2010. Clinical course of H5N1 avian influenza in patients at the Persahabatan Hospital, Jakarta, Indonesia, 2005-2008. *Chest* 09-2644.
- 25 Zimmer SM, Burke DS. 2009. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med*. Jul 16;361(3):279-85.

Tabla de actividad 1

Ejemplo	A/H1N1/WSN	A/H1N1/Isias Salomón	A/H3N2 Brisbane	A/H5N1/Pato MN	A/H5N1/Pato_PA	A/H5N1/Gaviota_PA
	+	+	-	+	+	++
82	++	-	-	+	+	++
18	+++	++	+	++	++	+++
81	+++	+	-	++	++	+++
75	+++	+	-	++	++	+++
61	+++	+	-	++	++	++
63	+++	++	-	++	++	+++

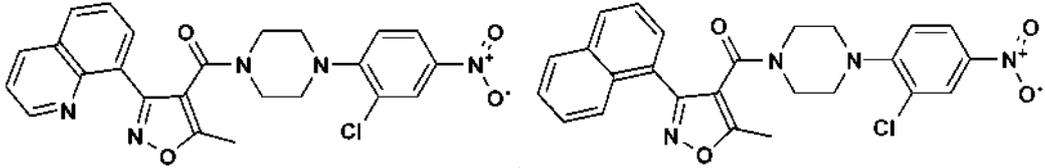
Clave de la tabla: "-" CE₅₀ > 10 uM; "+" = CE₅₀ < 10 uM; "++" = CE₅₀ < 1 uM; "+++ = CE₅₀ < 0,1 uM

Tabla de actividad 2

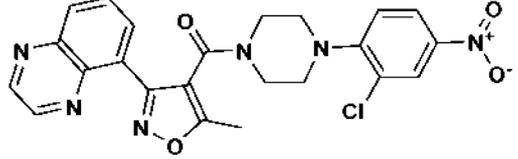
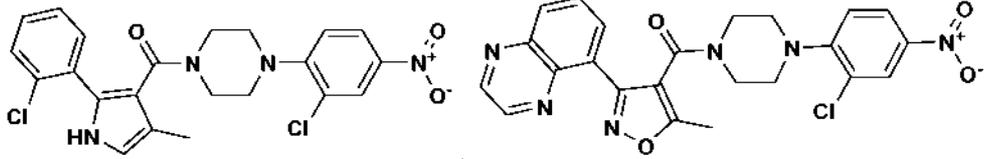
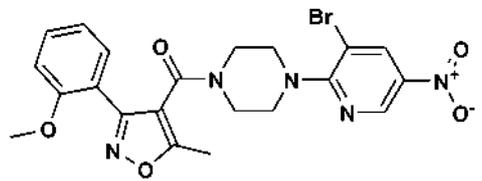
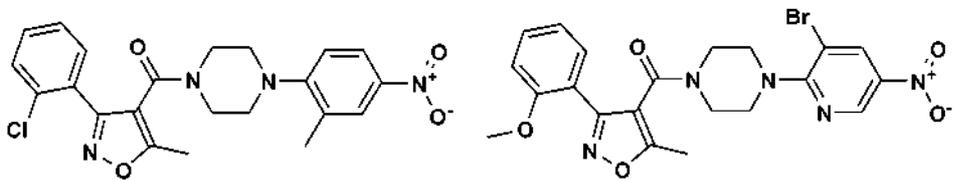
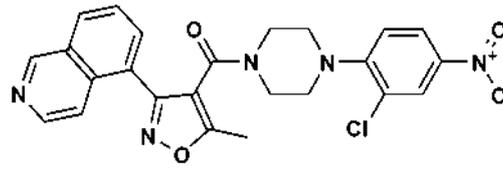
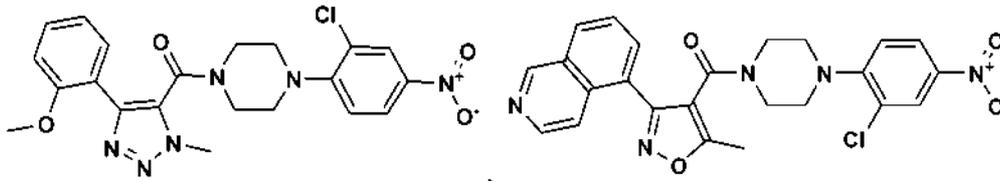
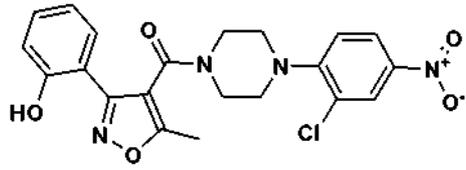
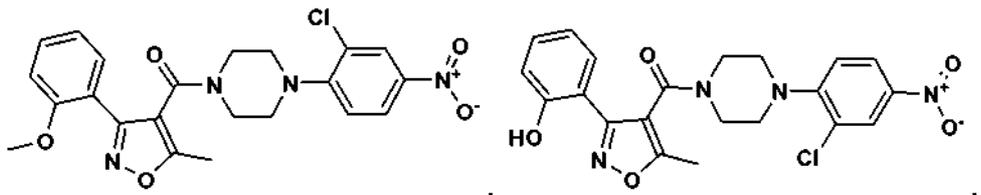
Ejemplo	Estabilidad microsomal hepática humana (% restante después de 10 minutos)	Estabilidad microsomal hepática en ratón (% restante después de 10 minutos)
 (comparativo)	40	20
 (comparativo)	6	0
81	73	45
80	72	65
61	50	18
82	45	43
67	40	29

REIVINDICACIONES

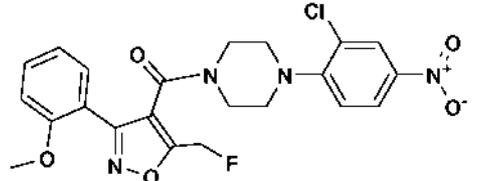
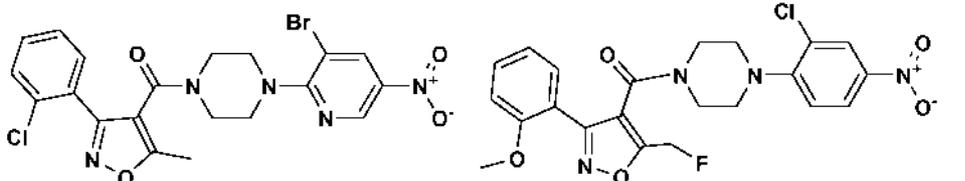
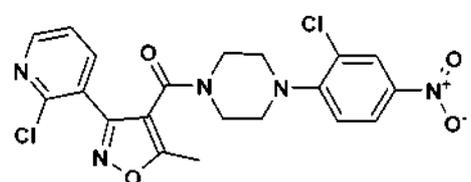
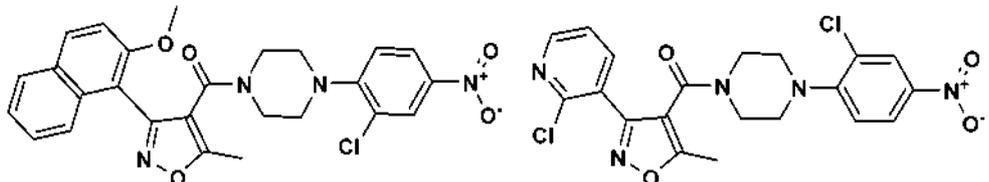
1. Un compuesto que se selecciona entre el grupo que consiste en:

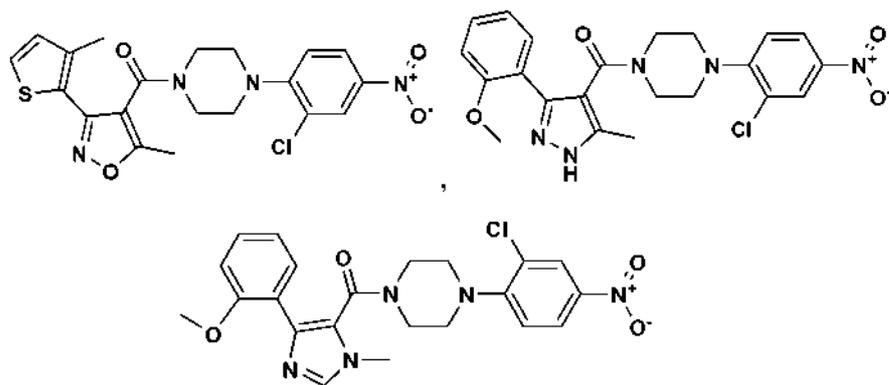


5



10





y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antiviral de uno o más de los compuestos de la reivindicación 1, junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

10

3. Un compuesto de la reivindicación 1 y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de un mamífero infectado con el virus de la gripe.