

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 952**

51 Int. Cl.:

**C07D 239/42** (2006.01)  
**C07D 239/48** (2006.01)  
**C07D 401/10** (2006.01)  
**C07D 403/10** (2006.01)  
**C07D 413/10** (2006.01)  
**C07D 487/10** (2006.01)  
**C07D 491/107** (2006.01)  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2012 PCT/US2012/063729**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2016 WO2013070620**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2012 E 12846926 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2776404**

54 Título: **Análogos heterocíclicos de inhibidores enlazados a propargilo de la dihidrofolato reductasa**

30 Prioridad:

**07.11.2011 US 201113290741**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.01.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CONNECTICUT (100.0%)  
400 Farmington Avenue, MC6400  
Farmington, CT 06032, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, AMY C.;  
WRIGHT, DENNIS L.;  
FREY, KATHLEEN M.;  
PAULSEN, JANET L.;  
SCOCCHERA, ERIC W. y  
VISWANATHAN, KISHORE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 595 952 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

Análogos heterocíclicos de inhibidores enlazados a propargilo de la dihidrofolato reductasa

5 Declaración relativa a la investigación patrocinada por el gobierno federal

La presente invención se realizó con el apoyo del Gobierno con las subvenciones n.º GM067542, AI073375 y AI0165143 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo técnico

Se refiere a compuestos que inhiben la dihidrofolato reductasa (DHFR) y a procedimientos de uso de los compuestos para tratar infecciones patógenas y neoplasias.

15 Antecedentes de la invención

Especies de Bacillus, incluyendo *B. anthracis* y *B. cereus*, presentan importantes riesgos para la salud. *B. anthracis* es la bacteria grampositiva, altamente patógena, que es responsable de la enfermedad grave y a menudo mortal, carbunco. Se clasifica como un patógeno de tipo A por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas. Los tratamientos actuales para las infecciones por *B. anthracis* tienen limitaciones graves incluyendo el gasto, la resistencia y las contraindicaciones en niños. *B. anthracis* y *B. cereus* están estrechamente relacionadas, de hecho, pruebas bioquímicas y genéticas sugieren que se deben considerar una sola especie. La exposición a *B. cereus*, normalmente como contaminante alimentario, provoca una serie de infecciones incluyendo endoftalmítis, bacteremia, septicemia, endocarditis, neumonía y meningitis, de las que algunas han demostrado ser mortales.

25 Criptosporidio y toxoplasma son protozoos parásitos apicomplejos que provocan una enfermedad grave en la población mundial. La criptosporidiosis, provocada por *C. hominis*, se caracteriza por una enfermedad consuntiva y afecta con mayor frecuencia a pacientes inmunodeprimidos, ancianos y niños de guardería, aunque se han producido brotes epidémicos en otras poblaciones sanas. El tratamiento eficaz para la criptosporidiosis es difícil de encontrar. En este momento, existe un único agente terapéutico aprobado, nitazoxanida, contra el criptosporidio, aunque la aplicación de este fármaco se limita a pacientes inmunodeprimidos y los efectos no se han estudiado en niños menores de 12 años de edad. La toxoplasmosis, cuando se transmite de forma congénita como *T. gondii*, puede provocar la muerte neonatal y, cuando se transmite a través de la ingestión de carne o agua contaminada, puede provocar fiebre e irritación de garganta, o inflamación cerebral en pacientes inmunodeprimidos. Ambos de estos protozoos parásitos se han clasificado como agentes de biodefensa de categoría B.

Las infecciones fúngicas sistémicas son una causa significativa y creciente de muerte y enfermedad grave en todo el mundo. Las tasas de mortalidad debida a infecciones por *Candida* spp. fueron de un 38 % entre 1983 y 1986 y de un 49 % entre 1997 y 2001. La incidencia de estas infecciones ha aumentado debido al incremento en el número de pacientes inmunodeprimidos. Hasta la década de 1980, *Candida albicans* fue la causa principal de infección por candidemia sistémica y se pudo tratar con tratamientos tradicionales incluyendo derivados azoles y amfotericina B. Sin embargo, el cambio en la epidemiología establece que mientras que las infecciones por *C. albicans* aún representan la mayoría (~50 %), otras especies de *Candida*, principalmente *C. glabrata*, provocan ahora un número significativo (~20 %) de las septicemias.

45 *Staphylococcus aureus* es una bacteria grampositiva anaerobia facultativa que es una causa principal de infecciones intrahospitalarias, asociadas más frecuentemente con el torrente circulatorio, piel y tejido blando, neumonía asistida con ventilador y catéteres. La frecuencia creciente de infecciones provocadas por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es de particular preocupación. La SARM extrahospitalaria (SARM-EH), genótipicamente distinta de SARM-IH, también ha convertido en una amenaza para los pacientes sin factores de riesgo tradicionales. Además de *S. aureus*, la bacteria grampositiva *Streptococcus pyogenes* es una causa principal de infecciones del tegumento común complicadas (SSTI). La distinción de forma fiable entre infecciones provocadas por *S. aureus* y *S. pyogenes* es difícil debido a las interferencias en el cuadro clínico inicial.

55 La dihidrofolato reductasa (DHFR) ha sido un fármaco validado para el tratamiento de infecciones bacterianas y protozoicas durante décadas. La DHFR es una enzima esencial y desempeña un papel principal en la vía biosintética de folato. Se produce como proteína bifuncional con la timidilato sintasa (DHFR-TS) en los protozoos apicomplejos, la DHFR utiliza el cofactor NADPH para catalizar la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato, realizando de este modo una reacción clave en la única síntesis de *nov*o de monofosfato de desoxitimidina (dTMP). Puesto que la DHFR es una enzima esencial para todas las células, los inhibidores que se dirigen a organismos patógenos deben ser selectivos así como potentes para evitar las complicaciones resultantes de la inhibición de la enzima humana. La dificultad de lograr tanto potencia como selectividad para la DHFR de *criptosporidio* se puso de relieve por un estudio de Nelson y Rosowsky (Antimicrob Agents Chemother (2001) Dec; 45(12): 3293-303) en el que examinaron 96 inhibidores de DHFR estructuralmente diversos y no pudieron identificar los compuestos que eran tanto potentes como selectivos para la DHFR de *C. hominis*. La DHFR se ha conservado ampliamente a lo largo de la evolución. Sin embargo, existen varias diferencias residuales en los sitios activos de las diferentes

especies que hacen posible que se logre la selectividad para la forma patógena de la enzima.

El inhibidor de la DHFR pirimetamina (es decir, 5-(4-clorofenil)-6-etilpirimidin-2,4-diamina) se ha usado eficazmente para tratar la toxoplasmosis así como la malaria, provocada por otro parásito apicomplejo, *Plasmodium* (tal como contra *Plasmodium falciparum*). Sin embargo, muchos pacientes han tenido reacciones graves a pirimetamina, limitando su eficacia.

Los documentos WO2009/025919 y US2009/105287 divulgan compuestos que actúan como inhibidores de la DHFR, incluyendo la estructura básica de estos compuestos un anillo 2,4-diaminopirimidina con un enlazador propargilo a otro anillo arilo, biciclo o heteroarilo sustituido.

Trimetoprim (es decir, 5-(3,4,5-trimetoxibencil)pirimidin-2,4-diamina) se ha usado eficazmente en el ámbito clínico como agente antibacteriano desde la década de 1960. Por ejemplo, se ha usado contra *E. coli* y especies de *Streptococcus*. Posee características similares a fármacos excelentes incluyendo un peso molecular relativamente bajo (PM = 290 Dalton). Sin embargo, trimetoprim también presenta una alta afinidad solo por un pequeño grupo de especies de DHFR de organismos patógenos tales como *Escherichia coli*. Esto limita su aplicación generalizada. Además, trimetoprim presenta solo potencia *in vitro* moderada contra la DHFR de *C. hominis* (ChDHFR) y *T. gondii* (TgDHFR). Trimetoprim es menos potente contra la DHFR de *criptosporidio* y *toxoplasma*, dos protozoos apicomplejos.

Tradicionalmente, se han usado anfotericina B y derivados azoles para tratar infecciones por *C. albicans*. Sin embargo, otras especies de *Candida*, principalmente *C. glabrata* tienen una menor susceptibilidad hacia compuestos azoles, en especial el agente usado comúnmente, fluconazol. El margen terapéutico para tratar *C. glabrata* es aún más estrecho puesto que las cepas de *C. glabrata* también son a menudo resistentes a anfotericina B.

Aunque la vancomicina es el tratamiento preferente para la infección por SARM en los hospitales, se ha informado en los EE. UU. desde 2002 de cepas aisladas de *S. aureus* intermedios a vancomicina (VISA) y de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina. Adicionalmente, muchas cepas de *S. aureus*, incluyendo cepas nuevas de SARM-EH, muestran sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMZ). Se ha observado resistencia a TMP/SMZ entre los estafilococos en Australia y los Estados Unidos desde principios de los años ochenta. Los estudios de una colección de cepas muestran que un 28 % de las cepas aisladas de SARM son resistentes a TMP y un 35 % son resistentes a SMZ. Asimismo, el espectro de agentes que pueden ser eficaces tanto contra *S. aureus* como *S. pyogenes* está limitado por la resistencia: *S. pyogenes* puede ser resistente a macrólidos y *S. aureus* es frecuentemente resistente a antibióticos betalactámicos. Los tratamientos con actividad contra SARM y *S. pyogenes* serían agentes ideales para tratar SSTI. Por tanto, el desarrollo de un agente antibacteriano eficaz que se dirija a ambos organismos una prioridad alta.

Durante el desarrollo de fármacos, a menudo se aprecia que durante el procedimiento de optimización de la molécula de partida, los incrementos en la potencia se correlacionan con los incrementos en el peso molecular. Sin embargo, el peso molecular adicional con frecuencia representa un inconveniente ya que compromete las propiedades similares a fármacos de la molécula de partida. El compromiso necesario entre el incremento en el peso molecular y en incremento en la afinidad se puede examinar cuantitativamente con el concepto de eficacia de ligando. La eficacia de ligando se define como la energía de unión total por átomo distinto de hidrógeno; una eficacia de ligando mayor define un compuesto superior. De forma interesante, aunque el metotrexato (es decir, ácido (S)-2-(4-(((2,4-diaminopteridin-6-il)metil)metilamino)benzamido)pentanedioico o MTX) es un compuesto mucho más potente (los valores de  $CI_{50}$  contra ChDHFR y TgDHFR son de 23 nM y 14 nM, respectivamente) que trimetoprim, tiene la misma eficacia de ligando que trimetoprim, lo que implica que el incremento en la potencia depende en gran medida del incremento en el peso molecular más que de una posición más óptima de los elementos farmacóforos.

Por lo tanto, lo que se necesita son composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de peso molecular relativamente bajo que sean específicos y eficaces para el tratamiento de varias infecciones patógenas.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La descripción que sigue está sometida a esta limitación. Todos los aspectos y modos de realización que no están cubiertos por las reivindicaciones son simplemente aspectos de la presente divulgación y no forman parte de la invención.

Se proporcionan compuestos, composiciones, procedimientos de preparación de compuestos y procedimientos de tratamiento de individuos que padecen infecciones bacterianas, fúngicas y protozoicas usando los compuestos y composiciones descritos en el presente documento. También se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo que está padeciendo cáncer, o enfermedad neoplásica, por los compuestos descritos en el presente documento.

Se han estudiado varios sistemas con pirimidina, tales como sistemas de anillo pirido[2,3-d]pirimidina, debido a su implicación en la inhibición de la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La estructura de la

enzima DHFR de *Cryptosporidium hominis* y *Toxoplasma gondii* se describe en un artículo en el Journal of Medicinal Chemistry (2007) 50: 940-950, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

5 Los compuestos divulgados en el presente documento son derivados de pirimidina que funcionan como una nueva clase de inhibidores de DHFR. Estos compuestos se han sometido a prueba como inhibidores de DHFR de organismos bacterianos, fúngicos y protozoicos tales como *B. anthracis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. hominis*, *C. albicans*, y *C. glabrata*, y los resultados indican que estos compuestos son potentes y selectivos para la inhibición de estos tipos de organismos patógenos y el tratamiento de infección bacteriana, fúngica y protozoica.

10 Además, se han desarrollado las relaciones de estructura-actividad para una serie de inhibidores de DHFR en base al modelo de homología de la enzima de *B. anthracis*. En resumen, de entre los compuestos más potentes sometidos a prueba previamente para DHFR de *B. anthracis* y *B. cereus* fue un anillo de 2,4-diaminopirimidina anillado con un enlazador alquilo unido a un anillo fenilo sustituido. Sin embargo, los compuestos de la presente invención son inhibidores más genéricos y más potentes. Por ejemplo, parece que el trimetoprim usado clínicamente (que tiene un enlazador metileno) no coloca el anillo fenilo sustituido lo suficientemente profundo en la cavidad hidrófoba, lo que puede explicar la disminución en la potencia.

20 De forma importante, los compuestos proporcionados en el presente documento son agentes antifúngicos y antibacterianos eficaces *in vitro* usando cultivos de organismos (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. neoformans*). Aunque la mayoría de los inhibidores antipatógenos descritos en el presente documento no son tóxicos para las células de mamífero, al menos uno de los inhibidores recientemente desarrollados presenta toxicidad en células de mamífero y, por lo tanto, es útil como agente antineoplásico.

25 Los inhibidores de DHFR basados en propargilo de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento son buenos candidatos a fármaco que tienen un peso molecular bajo, por ejemplo, de aproximadamente 500 Dalton o menos, en algunos modos de realización de aproximadamente 400 Daltons o menos, y, por lo tanto, con suficiente capacidad para una funcionalidad añadida. Las modificaciones de los compuestos proporcionados en el presente documento son relativamente sencillas de sintetizar, se pueden minimizar los costes, y los compuestos pueden tener puntos de partida para colecciones específicas para una diversidad creciente. Como inhibidores de *B. anthracis*, los compuestos descritos en el presente documento presentan una oportunidad para la disminución de los efectos secundarios. Como inhibidores de *S. aureus* y *S. pyogenes*, estos compuestos proporcionan una alternativa urgentemente necesaria con actividad frente a ambos organismos. Como inhibidores antifúngicos, los compuestos descritos en el presente documento inhiben de forma potente y selectiva la DHFR de varias especies fúngicas, lo que presenta la oportunidad de desarrollar un inhibidor de amplio espectro que se puede administrar sin diagnosticar la infección fúngica exacta. Como inhibidores antiprotozoicos, los compuestos proporcionados en el presente documento son de primera clase (tal como para *Cryptosporidium*) y/o pueden ofrecer una oportunidad para reducir los efectos secundarios (tal como para *Toxoplasma*).

40 Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La descripción detallada se entenderá más plenamente en vista de los dibujos, en los que:

45 La FIG. 1 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos entre ChDHFR y TgDHFR (códigos PDB: AAB00163 y XP665866, respectivamente) en la que las flechas representan los aminoácidos en los sitios activos.

La FIG. 2 es un modelo molecular que muestra el metotrexato (MTX) en el sitio activo de ChDHFR.

50 Las FIGS. 3A y 3B son modelos moleculares que muestran, en la figura 3A, el trimetoprim (TMP) modelado en el sitio activo de ChDHFR; y en la figura 3B, la 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina modelada en el sitio activo de ChDHFR.

Las FIGS. 4A y 4B son modelos moleculares que muestran la (R)-6-metil-5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina unida a ChDHFR en la figura 4A y unida a TgDHFR en la figura 4B.

55 Las FIGS. 5A y 5B son modelos moleculares que muestran el anillo bicíclico con puente aza ocupando la cavidad hidrófoba "central" con la posición apical apuntando hacia "arriba" en la figura 5A y apuntando hacia "abajo" en la figura 5B.

60 La FIG. 6 muestra un modelo del sistema de anillo oxabíclico en el sitio activo de BaDHFR (azul). Ambos sustituyentes endo y exo del puente de carbono 3 se alojan fácilmente en la cavidad "superior".

La FIG. 7 muestra un modelo del sistema bicíclico con puente carbono en el sitio activo de BaDHFR.

65 Las FIGS. 8A y 8B son modelos moleculares vistos desde la misma vista con ligandos cocrystalizados en el sitio activo (fig. 8A: ChDHFR (verde) y fig. 8B hDHFR (azul) (códigos PDB: 1SEJ y 1KMV, respectivamente)), demostrando la diferencia sustancial en la abertura del sitio activo. Los residuos de bucle PEKN están marcados en

hDHFR, con Asn64 indicado en la cara interior del bucle.

Las FIGS. 9A-C son modelos moleculares de UCP111A también denominado en el presente documento compuesto X, (rosa)(9A), UCP111D (amarillo)(9B) y UCP111F (blanco)(9C) acoplado en ChDHFR en su orientación de acoplamiento computacionalmente preferente. ChDHFR se muestra como una superficie cartografiada con lipofilicidad que cambia de lipófila (rojo) a neutra (verde) a hidrófila (azul).

Las FIGS. 10A-C son modelos moleculares que muestran UCP111A (compuesto X) (rosa), serie UCP111D (amarillo) y serie UCP111F (UCP111F y UCP111F2Me blanco, UCP111F26Me azul) acoplados en el miembro de conjunto hDHFR con la abertura más amplia. La superficie de hDHFR está coloreada en base a su lipofilicidad, que cambia de lipófila (rojo) a neutra (verde) a hidrófila (azul).

Las FIGS. 11A y 11B son modelos moleculares que muestran la estructura de CgDHFR unido a NADPH y al compuesto 11. La figura 11A muestra la estructura global de CgDHFR (NADPH y el ligando cristalizado se muestran en rojo); y en la figura 11B, se muestra CgDHFR (violeta) superpuesto con CaDHFR (cian). Se indican la inserción de CgDHFR y el bucle próximo al sitio activo.

Las FIGS. 12A y 12B son modelos que muestran las interacciones del compuesto 11 con CgDHFR (figura 12A), mostrando la figura 12B una comparación de CgDHFR (violeta) y hDHFR (salmón) (solo se muestran los residuos clave en hDHFR en el sitio activo por motivos de claridad).

La FIG. 13 es una representación de superficie de CgDHFR en el sitio activo con el compuesto 11 unido. La superficie está coloreada usando un gradiente que se extiende de lipófila (rojo) a neutra (verde) a hidrófila (azul). La vista es la misma que se muestra en la figura 11A. Los residuos próximos a la posición 5' del anillo arilo están marcados.

Las FIGS. 14A y 14B son representaciones de un compuesto antifolato enlazado a propargilo bifenílico y un modelo molecular de un complejo de ese compuesto con SaDHFR y NADPH.

Las FIGS. 15A-15C son modelos moleculares que muestran la estructura de DHFR de *S. aureus* unida a NADPH (fucsia) y (16A) compuesto 142 (violeta), (16B) compuesto 148 (verde), y (16C) una superposición de los compuestos 148 (azul) y 140 (verde).

La FIG. 16 es una estructura cristalina de CgDHFR unida al compuesto 139 y a NADPH.

#### Descripción detallada

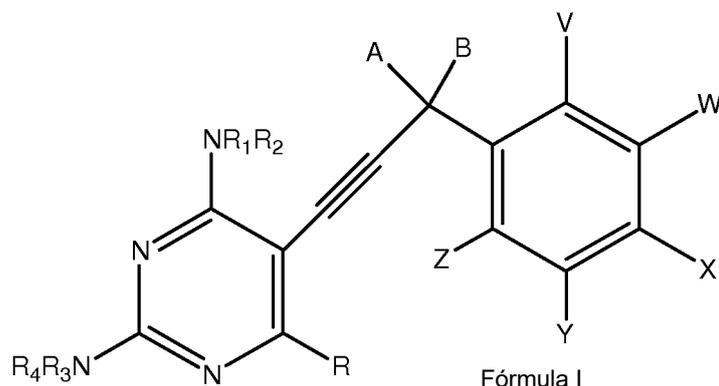
Se proporcionan compuestos, composiciones que contienen los compuestos, y procedimientos de uso de los compuestos y composiciones como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoicos y antineoplásicos. Los compuestos descritos en el presente documento incluyen un anillo 2,4-diaminopirimidina con un enlazador propargilo a un anillo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. Los compuestos son derivados de pirimidina que funcionan como una nueva clase de inhibidores de DHFR.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento son compuestos de peso molecular bajo, novedosos, que actúan como inhibidores de DHFR y presentan una potencia buena contra la DHFR de una pluralidad de especies. Las estructuras de las enzimas guiarán el diseño de compuestos derivados adicionales. Estos compuestos permiten la incorporación de una funcionalidad adicional para la selectividad sin exceder los límites del peso molecular.

La DHFR como parte de su mecanismo molecular reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato. Por tanto, la inhibición de DHFR priva a la célula de tetrahidrofolato, sin el que la célula no puede producir el 5,10-metilentetrahidrofolato. El 5,10-metilentetrahidrofolato es esencial para el crecimiento celular. La inhibición de DHFR por los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, descritos en el presente documento da como resultado la inhibición de la síntesis de ADN y da lugar a la muerte celular. Por tanto, los compuestos proporcionados en el presente documento son útiles como agentes anticancerosos, o antineoplásicos.

Además del mecanismo molecular indicado anteriormente, los compuestos derivados de pirimidina descritos en el presente documento también funcionan como inhibidores de la timidilato sintasa (TS). La TS, junto con DHFR, forma parte del sistema responsable de la síntesis de desoxitimidilato (dTMP) a partir de desoxiuridilato (dUMP). La TS cataliza la única síntesis *de novo* de dTMP a partir de dUMP. La inhibición de TS, por lo tanto, priva a la célula de timidina, que es un constituyente esencial del ADN. En consecuencia, esta inhibición quiere decir que los compuestos descritos en el presente documento son útiles para dirigirse a cualquiera de varios organismos, tales como bacterias implicadas en infecciones bacterianas, hongos y protozoos. Además, esta inhibición también proporciona un mecanismo molecular alternativo para actuar selectivamente sobre varios cánceres.

Un modo de realización de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se refiere a compuestos de fórmula I, en la que la fórmula I es



en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub> e hidroxil;

5

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo (por ejemplo, ciclohexilo), alcoxilquilo (por ejemplo, --C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), alcoxilalcoxilquilo (por ejemplo, --C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), arilalquilo (por ejemplo, fenilmetilo o 2-piridilmetilo), alquilcarbonilo, [por ejemplo, --(C=O)CH<sub>3</sub>, --(C=O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, --(C=O)C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>], cicloalquilcarbonilo (por ejemplo, ciclohexilcarbonilo), alcoxicarbonilo [por ejemplo, --(C=O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], alcoxilalquilcarbonilo [por ejemplo, --(C=O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], alcoxilalcoxilalquilcarbonilo [por ejemplo, --(C=O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], arilcarbonilo (por ejemplo, benzoilo), piridinilcarbonilo (por ejemplo, 3-piridinilcarbonilo), ariloxilquilo [por ejemplo, --C(=O)CH<sub>2</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>], haloalquilcarbonilo [por ejemplo, --C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F], y cianoalquilcarbonilo [por ejemplo, --C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CN];

10

15

en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxil, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxil, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxil, fenilo, fenoxil, arilalcoxi, y ariloxilalcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxil, arilalcoxi y ariloxilalcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

20

25

en la que, A y B junto con el carbono al que están conectados pueden formar un anillo de desde 3 a 7 miembros en el que los miembros de anillo se seleccionan del grupo que consiste en alquilenil, alquilenileno y alquinileno, en la que cualquiera de los grupos alquilenil, alquilenileno y alquinileno puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos del grupo que consiste en O, N, S y Se. En una variación de este modo de realización, el alquilenil o alquilenileno puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxil, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxil, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxil, fenilo, fenoxil, arilalcoxi, y ariloxilalcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxil, arilalcoxi y ariloxilalcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

30

35

en la que V, W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxil, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxil, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxil, fenilo, fenoxil, arilalcoxi, y ariloxilalcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxil, arilalcoxi y ariloxilalcoxi pueden ellos mismos estar independiente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

40

45

En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo alcoxi. En una variación de este modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxil. En otra variación de este modo de realización, al menos uno de W, X e Y es un grupo metoxil.

50

En un modo de realización alternativo, al menos dos de V, W, X, Y y Z son grupos alcoxi. En una variación de este modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxil. En otra variación de este modo de realización, al menos uno de W, X e Y es un grupo metoxil.

En otro modo de realización, al menos tres de V, W, X, Y y Z están sustituidos con un sustituyente distinto de

hidrógeno y al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo alcoxi. En una variación de este modo de realización, el grupo alcoxi es un grupo metoxi.

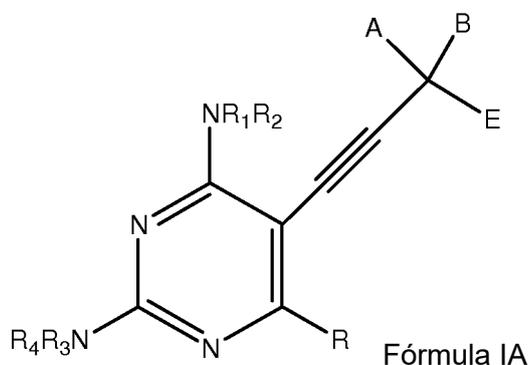
5 En otro modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z no es hidrógeno o halógeno. En una variación de este modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z no es hidrógeno, fluro o cloro.

10 En un modo de realización, al menos uno de A y B no es alquilo C<sub>1-5</sub> y al menos uno de V, W, X, Y y Z no es hidrógeno o halógeno. En una variación de este modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z no es hidrógeno, fluro o cloro. En una variación de este modo de realización, ninguno de V, W, X, Y y Z es fluro o cloro.

15 En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z no es un hidrógeno, fluro, cloro, trifluorometilo, metilsulfonilo, o un sustituyente 4-clorofeniloxi. En una variación de este modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z no es un hidrógeno, fluro, cloro, trifluorometilo, metilsulfonilo, o un sustituyente 4-clorofeniloxi o es un sustituyente que contiene un carbonilo.

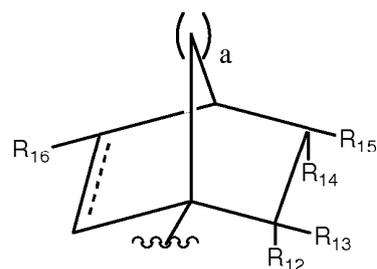
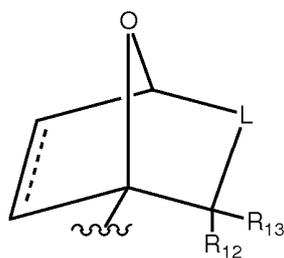
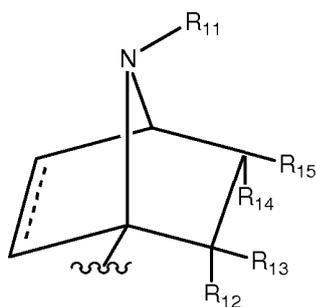
20 En un modo de realización, A y/o B es un hidrógeno, grupo metilo o etilo.

En un modo de realización alternativo, los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento están englobados por la fórmula IA



en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, y A y B se definen como anteriormente cuando son sustituyentes en la fórmula I;

25 en la que E puede ser un grupo fenilo, que está sustituido con V, W, X, Y y Z como en la fórmula I; de forma alternativa, E puede ser un sustituyente azabíciclo, oxabíciclo o con puente carbono como se muestra en las fórmulas IIIA, IIIB y IIIC, respectivamente.



30 en la que a es 1 o 2;

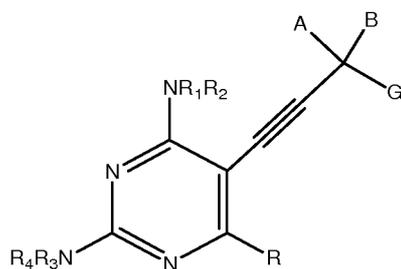
35 en la que el enlazador propargilo como se muestra en la fórmula IA está unido al carbono de cabeza de puente en cada una de las fórmulas IIIA, IIIB y IIIC;

40 en la que R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, --C(O)-alquilo C<sub>1-3</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxiinferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquylcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los

grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que L es un grupo alquileo C<sub>1-2</sub> o alquenileno C<sub>1-2</sub> opcionalmente e independientemente sustituido con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, --C(O)-alquilo C<sub>1-3</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsiloxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; y en la que la línea discontinua en las fórmulas anteriores IIIA, IIIB y IIIC representa un enlace sencillo o doble.

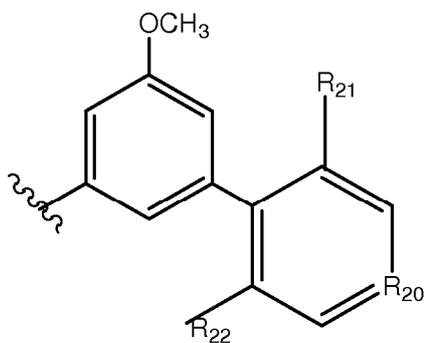
En un modo de realización alternativo, los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento están englobados por los compuestos de fórmula II:



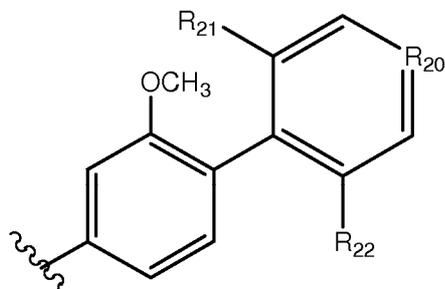
Fórmula II

en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, y A y B se definen como anteriormente cuando son sustituyentes en la fórmula I;

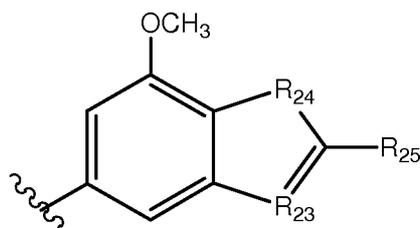
en la que G se selecciona del grupo que consiste en fórmula IVA, fórmula IVB, fórmula IVC, fórmula IVD, fórmula IVE y fórmula IVF;



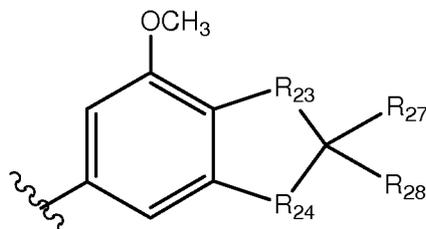
Fórmula IVA



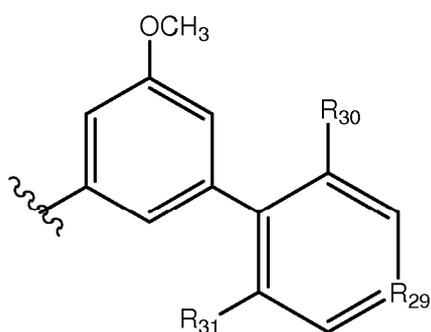
Fórmula IVB



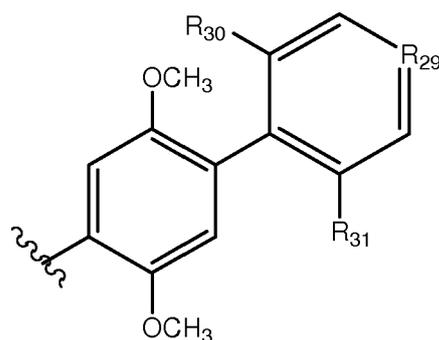
Fórmula IVC



Fórmula IVD



Fórmula IVE

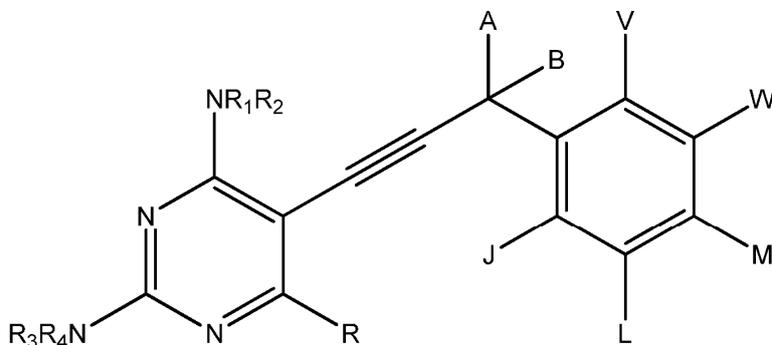


Fórmula IVF

5 en la que  $R_{20}$ ,  $R_{23}$ ,  $R_{24}$  y  $R_{29}$  se selecciona del grupo que consiste en CH,  $CH_2$ , O, N y NH de modo que la valencia para cada uno de estos sustituyentes es neutra (es decir, estos sustituyentes no están cargados ni positivamente ni negativamente);

10 en la que  $R_{21}$ ,  $R_{22}$ ,  $R_{25}$ ,  $R_{27}$ ,  $R_{28}$ ,  $R_{30}$  y  $R_{31}$  se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno,  $C_{1-5}$ alquilo, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínico inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo  $C_1$  a  $C_6$ .

15 En un modo de realización alternativo, los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento están englobados por los compuestos de fórmula V



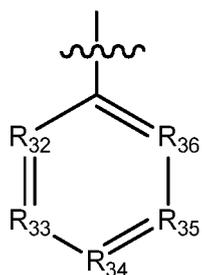
Fórmula V

20 en la que R,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , A, B, V y W se definen como anteriormente para la fórmula I; y en la que dos de J, L y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínico inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , y el otro de J, L y M es un sustituyente heterocíclico en la que al menos un heteroátomo es N, y en la que el propio sustituyente heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínico inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo  $C_1$  a  $C_6$ .

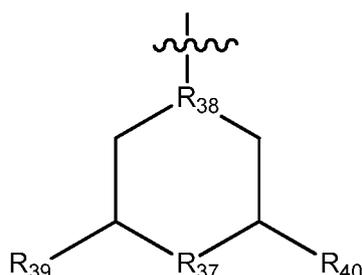
35

En algunos modos de realización, dos de J, L, y M, se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol e imidazol, en la que la piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol por sí mismo puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En algunos modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquilo, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

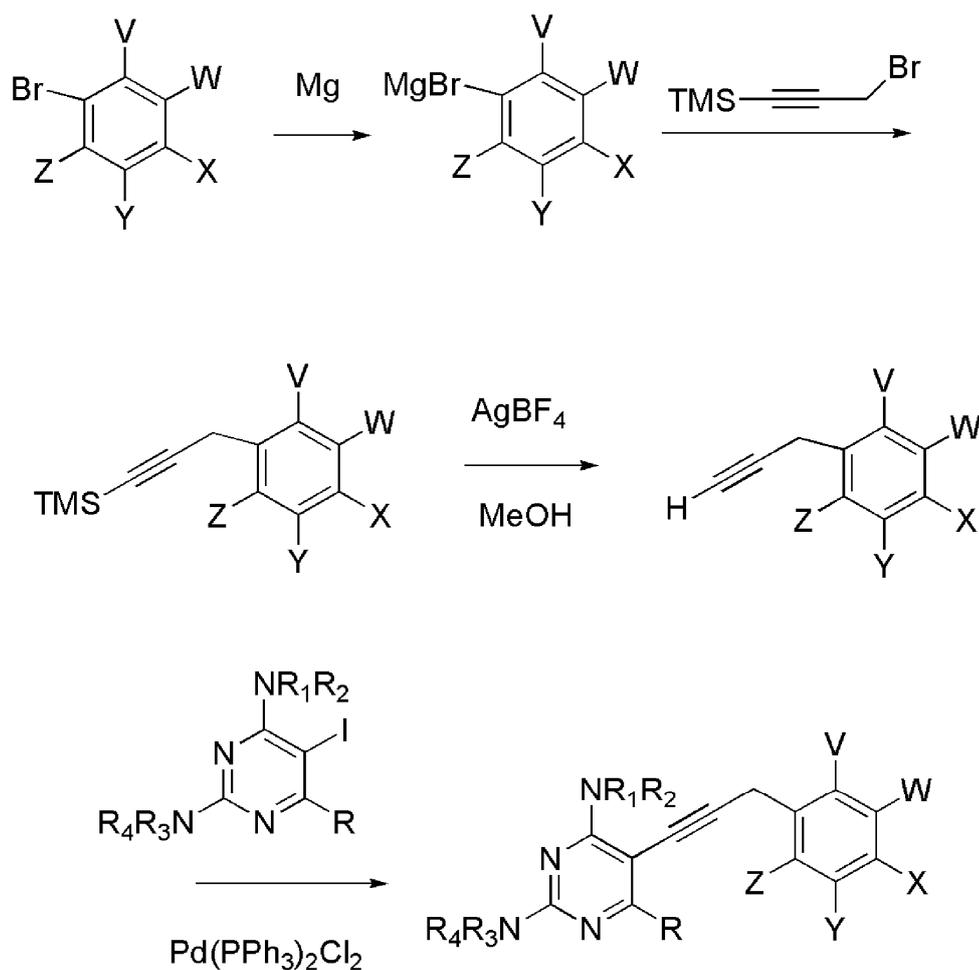
En otro modo de realización, cualquiera de cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.

En otro modo de realización, R es CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno; uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es CH<sub>3</sub>; y V y W son cada uno independientemente hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>.

En otro modo de realización, uno de V y W es metoxi y el otro es hidrógeno. En una variación de este modo de realización, V es metoxi y W es hidrógeno.

En otro modo de realización, al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub>, y R<sub>36</sub> son N y los otros son CH.

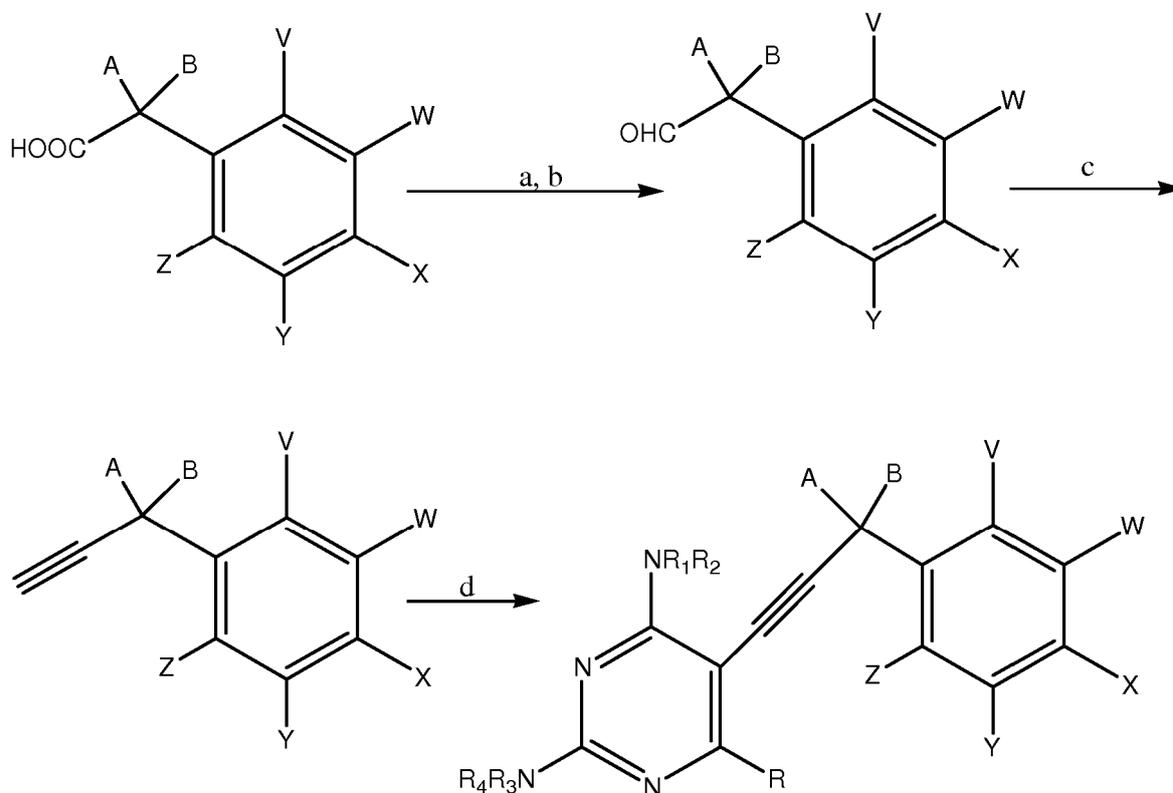




Esquema I

5 En el esquema I, se debe reconocer que puede ser necesario usar grupos protectores dependiendo de los sustituyentes que están representados por V, W, X, Y y Z. Además, se debe reconocer que se puede añadir A y/o B al esquema anterior I (como se muestra en la fórmula I) para colocar un sustituyente en la funcionalidad metileno adyacente al triple enlace carbono-carbono.

10 Otro esquema de reacción posible que se puede usar para generar los compuestos de la fórmula I se muestra a continuación en el esquema II.



- a) LAH, Et<sub>2</sub>O  
 b) peryodinato de Dess-Martin, DCM  
 c) (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato de dimetilo, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH  
 d) derivado pirimidinilo, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, DMF

### Esquema II

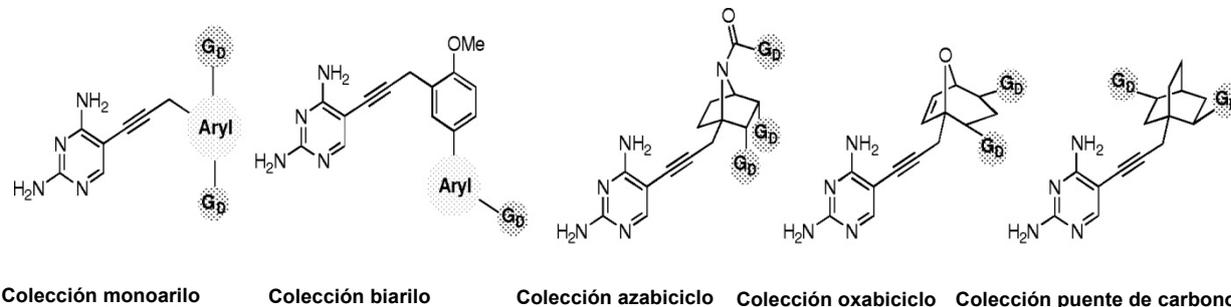
- Se debe entender que puede ser necesario usar grupos protectores y desprotectores apropiados dependiendo de los diversos sustituyentes representados por A, B, V, W, X, Y y Z en el esquema II. Asimismo, se debe reconocer que puede ser necesario usar grupos protectores y desprotectores apropiados dependiendo de los diversos sustituyentes que pueden estar presentes en los nitrógenos en la posición 2 y 4 del derivado pirimidinilo que están representados por R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. También se debe reconocer que el carbono que contiene los sustituyentes A y B en el esquema anterior puede ser quiral (y puede estar presente un enantiómero en gran exceso sobre el otro isómero). En consecuencia, en el esquema II, se mantendrá cualquier exceso enantiomérico cuando se sigue el esquema II para generar el compuesto de pirimidinilo-propargilo-arilo (tal como se muestra en la fórmula I). De forma alternativa, los sustituyentes A y B se pueden incorporar durante el procedimiento sintético. Por ejemplo, en el esquema II, los sustituyentes A y B se pueden añadir después de que se lleven a cabo las etapas a) y b) pero antes de que se lleve a cabo la etapa c).
- Algunos de los compuestos se pueden preparar por los procedimientos que se muestran en la referencia Pelphrey *et al.* (J. Med. Chem., 2007, 50, pp. 940-950), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

- Además, se debe reconocer que los esquemas de reacción anteriores I y II se pueden modificar fácilmente para preparar cualquiera de los compuestos de fórmula IA; por ejemplo, los compuestos en los que E en la fórmula IA es cualquiera de las fórmulas IIIA, IIIB o IIIC.

- Se cree que se pueden lograr niveles de potencia aún mayores aprovechando las regiones de espacio que aún están por explorar por los compuestos que se han preparado en este momento. El análisis de inhibidores representativos unidos a BaDHF<sub>R</sub> ha sugerido cinco tipologías de colecciones distintas que pueden dar lugar a un

incremento en la potencia frente a la enzima bacteriana. Estas cinco colecciones se pueden agrupar en líneas generales en dos superfamilias principales, dos que proyectan un anillo aromático plano en la cavidad hidrófoba central y tres que presentan una estructura bicíclica con puente no aromática en la misma región general. Véanse los compuestos enumerados a continuación.

5



Las familias anteriores muestran la topología general de las colecciones de inhibidores de DHFR. En las representaciones anteriores de los componentes de colecciones, arilo representa un grupo diverso de aromáticos benzenoides o no benzenoides y  $G_D$  representa una colección diversa de sustituyentes añadidos sobre una región de núcleo conservada.

10

#### Colección puente aza

15

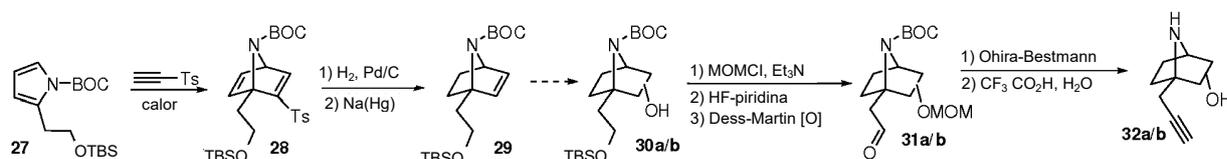
En un modo de realización, la estructura se basa en un núcleo de azabiciclo[2.2.1]heptano. El acoplamiento del análogo con puente aza original al sitio activo de BaDHFR sugiere que la funcionalidad que se proyecta desde la posición apical se adapta bien para ocupar la cavidad "superior" o "inferior" dependiendo de qué estado rotámero esté unido a la enzima (véase la fig. 5). En cualquier caso, una vez que esta funcionalidad se coloca en una cavidad, la cavidad opuesta es directamente accesible desde la funcionalidad que se proyecta desde los sustituyentes *endo* del sistema bicíclico. Se han explorado varios rotámeros diferentes y se ha descubierto que manteniendo uno de los dos puentes de carbono no sustituido para evitar conflictos estéricos con Ile 51 genera un buen ajuste. El diseño con puente aza de primera generación se originará a partir de dos estructuras isómeras, conteniendo cada una dos puntos de diversidad, el nitrógeno de puente y un grupo hidroxilo *endo* que es proximal o bien distal al enlazador propargilo.

20

25

30

Un enfoque de Diels-Alder a la estructura azabiciclo[2.2.1]heptano (véase la fórmula IIIA) puede afrontar el problema de competición de la sustitución electrófila o la reactividad generalmente baja debido a una estabilización de resonancia apreciable del núcleo pirrol. Sin embargo, se ha demostrado que los dienófilos acetilénicos tales como dicarboxilato de dimetilacetileno y tosilacetileno se añaden eficazmente a pirroles tanto no sustituidos como 2,5-disustituidos. Los pirroles monosustituidos pueden tener problemas de regiocontrol. Estas estructuras pueden tener utilidad más allá de la de la presente solicitud ya que existen pocas vías de preparación para esta clase de compuestos a pesar del interés general en sistemas de anillos condensados. (véase el esquema 5).



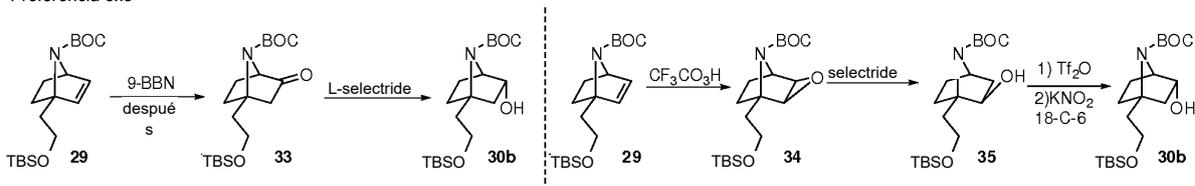
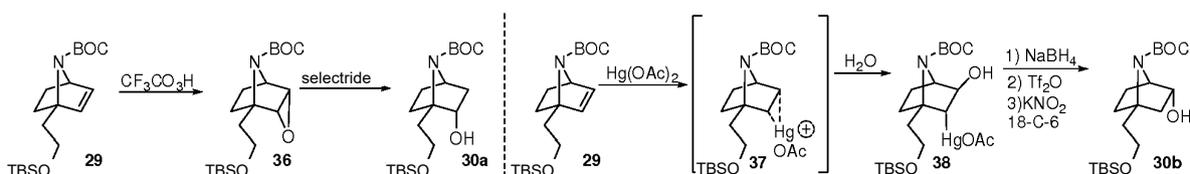
**Esquema 5.** Vía de Diels-Alder para estructuras con puente

35

40

45

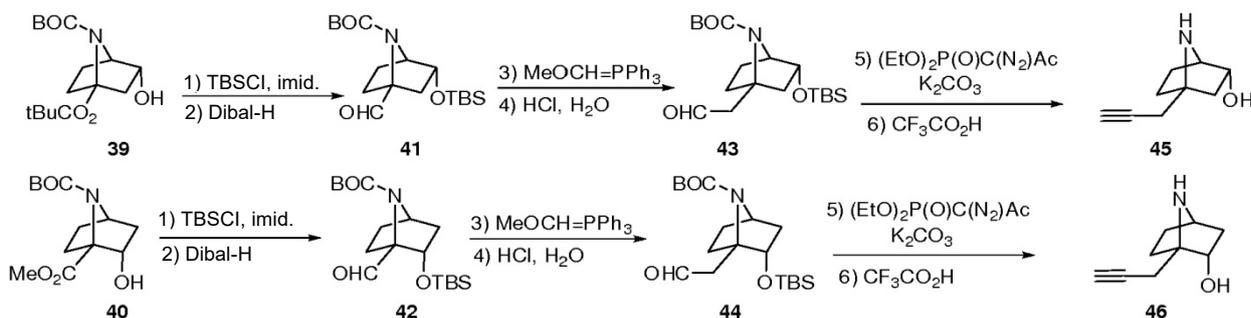
El pirrol-2-etanol protegido 27 se ha preparado previamente para estudios no relacionados. Se espera que la cicloadición de Diels-Alder con tosilacetileno proporcione el regioisómero 28 basándose en consideraciones electrónicas sencillas. Siguiendo un precedente bien conocido para el sistema original, la olefina no sustituida y el resto tosilato se reducen secuencialmente para dar el alqueno 29. El intermedio común 29 se procesará a los alcoholes regioisómeros 30a y 30b como se indica a continuación. Los ajustes para el grupo protector y la oxidación a los aldehídos 31a y 31b se seguirán por la homologación y una desprotección global para dar las estructuras comunes 32a y 32b. En el sistema azabicíclico original relacionado con 29 sin sustitución de cabeza de puente, se sabe que la adición a la olefina (epoxidación, dihidroxilación) tiene lugar exclusivamente desde el lado *exo*. Sin embargo, la presencia de la sustitución en la cabeza de puente puede proporcionar una impedancia estérica adicional alrededor de la olefina y cambiar la selectividad a un ataque en modo *endo*. Las vías alternativas del intermedio 29 basadas en el control facial intrínseco se muestran en el esquema 6.

Preferencia *exo*Preferencia *endo***Esquema 6.** Elaboración del intermedio con puente aza común

Si se prefiere el ataque con orientación *exo* en la olefina, el etanol de la cadena lateral debe servir como elemento de control de modo que los grupos voluminosos se añaden al carbono distal de la olefina. En consecuencia, se espera que la hidrobioración seguida de oxidación del organoborano intermedio suministre 33, que se puede reducir fácilmente al alcohol 30b. Asimismo, la epoxidación debe dar 34 donde se debe producir una abertura reductora con un dador de hidruro voluminoso extremo menos impedido para dar 35. Se sabe que en un compuesto altamente relacionado, el grupo hidroxilo *exo* se puede invertir fácilmente al alcohol *endo* a través del triflato derivado. Un protocolo similar dará 30b.

Si domina el modo *endo* alternativo, entonces la epoxidación debe dar 36 donde la abertura reductora del epóxido estaría controlada por el grupo de cabeza de puente para dar 30a. El otro isómero estaría disponible usando elementos de control similares. La mercuración en el lado *endo* estaría seguida por el ataque de agua en el lado menos impedido del ion mercurinio 37 para dar 38. La reducción del organomercúrico resultante y la inversión a través del triflato daría el isómero alternativo 30b.

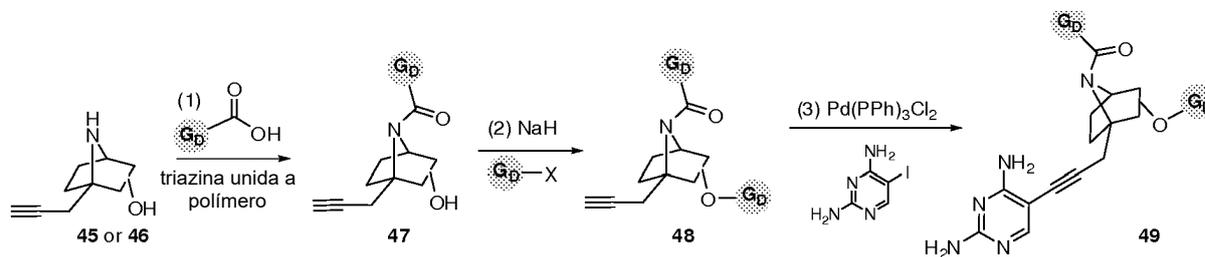
El enfoque sintético a las tres estructuras bicíclicas divulgadas en la presente solicitud hace uso de química de cicloadición clave para ensamblar los compuestos con puentes. Aunque existe un precedente excelente del uso amplio de furanos y ciclohexadienos en procedimientos de cicloadición similares, las reacciones de cicloadición que usan pirroles son bien conocidas por ser un procedimiento más sensible. Para garantizar que se obtiene un acceso a todas las estructuras de partida, se puede preparar una vía alternativa a los compuestos con puentes aza clave a partir de intermedios conocidos a través de vías distintas a la cicloadición (véase el esquema 7).

**Esquema 7.** Vía alternativa a estructuras con puentes aza

Los alcoholes *endo* 39 y 40 son conocidos y ambos se pueden preparar a través de secuencias cortas y de forma tanto racémica como enantiómera pura. Se pueden usar compuestos racémicos para preparar los compuestos específicos como enantiómeros individuales. La protección inicial del grupo hidroxilo libre como un éter silílico se seguirá de la semirreducción del éster de cabeza de puente a los correspondientes aldehídos 41 y 42. La clave para la preparación de las estructuras es la capacidad para homologar el aldehído. A continuación, se realizará una extensión de la cadena empleando el reactivo de Wittig de metoxi bien conocido que generará los aldehídos 43 y 44 tras una hidrólisis ácida sencilla. Una vez que está disponible el aldehído, se seguirá una segunda homologación para el acetileno terminal usando el protocolo de Ohira-Bestmann y una desprotección simultánea final de los grupos BOC y TBS en condiciones ácidas dará las dos estructuras clave 45 y 46 para la construcción de la colección.

Aunque la preparación de estas estructuras con puentes requiere varias etapas, la diversidad no se introduce hasta el final mismo de la síntesis, lo que significa que se necesitan realizar en paralelo muy pocas transformaciones o

purificaciones. Síntesis en paralelo de la colección quiere decir que los compuestos de la colección se pueden generar en tres etapas a partir de las estructuras (véase el esquema 8).



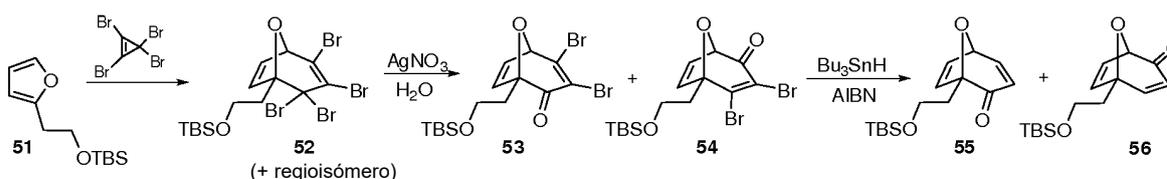
**Esquema 8.** Elaboración de estructuras azabíclicas para dar las colecciones de inhibidores

5 Las estructuras 45 y 46 contienen ambas dos sitios de diversificación. Se espera que el nitrógeno del puente reaccione mucho más rápido que el alcohol *endo* de modo de se lleve a cabo en paralelo una acilación inicial usando un reactivo de acoplamiento en fase sólida para dar las amidas 47. Se puede lograr una segunda diversificación en el alcohol tal como una alquilación directa para formar un conjunto diverso de éteres, ésteres u otros compuestos que contienen oxígeno 48. La fase final de la construcción de la colección implicará el acoplamiento de Sonagashira estándar con la yodopirimidina para dar la colección final 49.

#### Colección con puente oxo

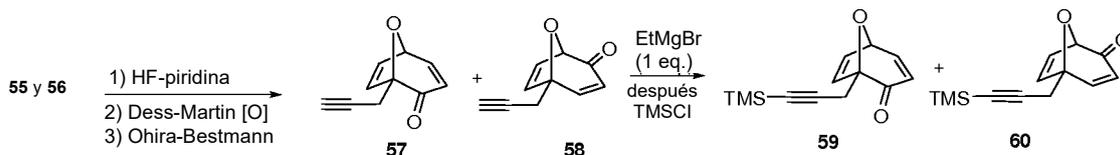
15 Otra estructura atractiva se basa en el esqueleto de oxabicyclo[3.2.1]octano (véase la fórmula IIIB). Esta estructura parece solo ligeramente diferente del sistema azabíclico previamente descrito. Sin embargo, el cambio en el tamaño de los puentes parece que altera el modo de unión de la estructura bicíclica. El puente de carbono 3 más largo y más flexible, con sustituciones variables forma contactos de van der Waals buenos con residuos en la cavidad "superior" (véase la figura 5). El puente de dos carbonos cuando está no sustituido y en el estado de oxidación de alqueno proporciona compuestos que se acoplan bien ya que limitan las interacciones estéricas potenciales con I1e 51.

25 Existe una variedad de procedimientos para la preparación de estos tipos de sistemas de anillo. Se ha demostrado que los furanos no sustituidos, 2-monosustituidos y 2,5-disustituidos sufren una reacción de ciclocondensación con terabromociclopropeno (TBCP) para dar un núcleo oxabicyclo[3.2.1]octadieno altamente funcionalizado. El alto grado de funcionalidad alrededor de este sistema compacto permite la introducción sencilla y estereoselectiva de grupos sobre el puente de tres carbonos. También se han desarrollado metodologías para preparar versiones enantiopuras de estos tipos de derivados. Para estas estructuras, se puede emplear la reacción de TBCP con un 3-furiletanol protegido, un compuesto que se ha preparado previamente (véase el esquema 9).



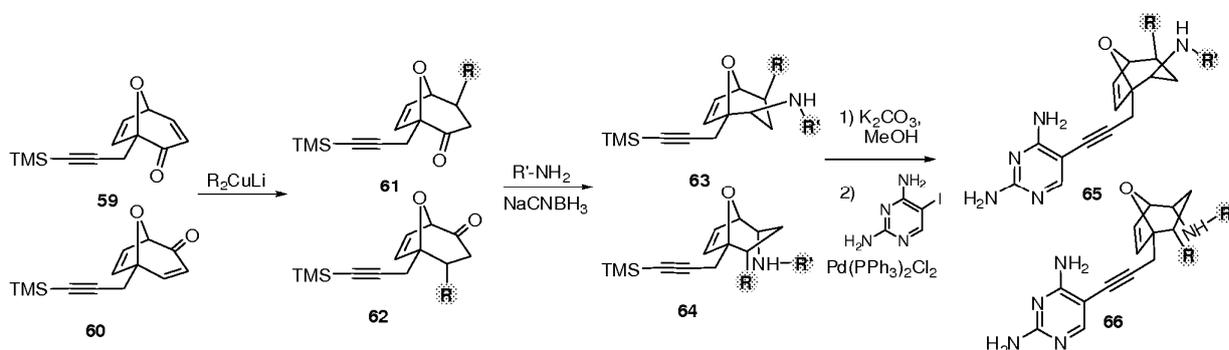
**Esquema 9.** Síntesis de oxabíclicos a partir de cicloadición de TBCP/furano

35 La ciclocondensación de TBCP y 51 dará dos tetrabromuros regioisómeros 52 que se convertirán en un intermedio dibromoenona a través de una hidrólisis mediada por plata. Previamente, se ha demostrado que el ataque de un nucleófilo pequeño como agua en un supuesto intermedio catiónico alílico da una mezcla (~2:1 cuando el metilo es una cabeza de puente, ~5:1 cuando está un fenilo en la cabeza de puente) de las cetonas regioisómeras que se puede separar típicamente por cromatografía sencilla. Se espera que ambas cetonas 53 y 54 se puedan preparar a escala. También se sabe que el derivado original se puede obtener fácilmente por desbromación de radicales en condiciones estándar. La dibromoenona da bastantes opciones para una derivatización en paralelo. Por ejemplo, se pueden generar las enonas 55 y 56. La conversión de estos dos intermedios regioisómeros a las estructuras de partida clave se seguirá por analogía a los sistemas con puente aza (véase el esquema 10).



**Esquema 10.** Elaboración de intermedios con puentes oxo

La retirada del grupo sililo, oxidación y formación de alquino da lugar a los acetilenos 57 y 58 (véase el esquema 10). En esta serie, se pueden emplear organocupratos para permitir una etapa de diversificación. Si el acetileno ácido terminal no es compatible con los reactivos usados en la(s) etapa(s) previa(s), se puede añadir TMS para proteger este hidrógeno ácido. De forma alternativa, si el alquino no protegido no necesita protección, entonces se eliminará la incorporación de TMS. El modelado de estos compuestos en el sitio activo de BaDHFDR mostró que el puente de tres carbonos es altamente flexible y que ambos sustituyentes *endo* y *exo* probablemente proporcionen contactos con la enzima. Se pueden explorar ambos isómeros (véase el esquema 11).



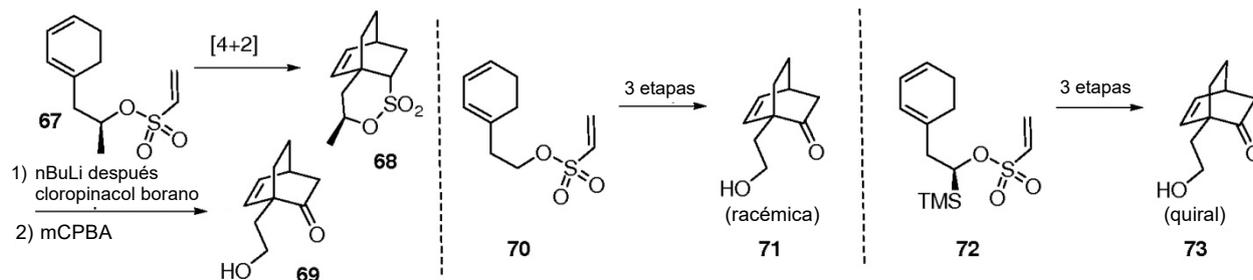
**Esquema 11.** Diversificación de estructuras con puente oxo

La adición de un reactivo cuprato a la posición  $\beta$  de la enona se controlará por el entorno estérico local de modo que la adición a 59 esté favorecida en el lado *exo* generalmente más accesible mientras que en 60, la adición está guiada por la interferencia del sustituyente de cabeza de puente de modo que se pueda observar un modo *endo*. Una segunda etapa de diversificación en paralelo a través de la aminación reductora de la cetona se controla por los mismos factores para dar los intermedios 63 y 64 en los que la diversidad se sitúa en lados opuestos del puente de tres carbonos. La conversión final a los análogos se puede lograr por desbloqueo del acetileno seguido del acoplamiento de Sonagashira estándar para suministrar la serie principal ejemplificada por 65 y 66.

#### Colección con puente de carbono

En un modo de realización, se puede generar el biciclo[2.2.2]octano. Este sistema bicíclico relativamente rígido y compacto posee un grado de simetría interna mayor que las estructuras bicíclicas previas. Los estudios de modelado sugieren que un puente puede permanecer no sustituido, mientras que los otros dos puentes pueden estar sustituidos con patrones variables (fig. 7).

Se pueden preparar tres estructuras relacionadas a partir de un derivado ceto común que esté disponible por la modificación leve de vías conocidas (véase el esquema 12).

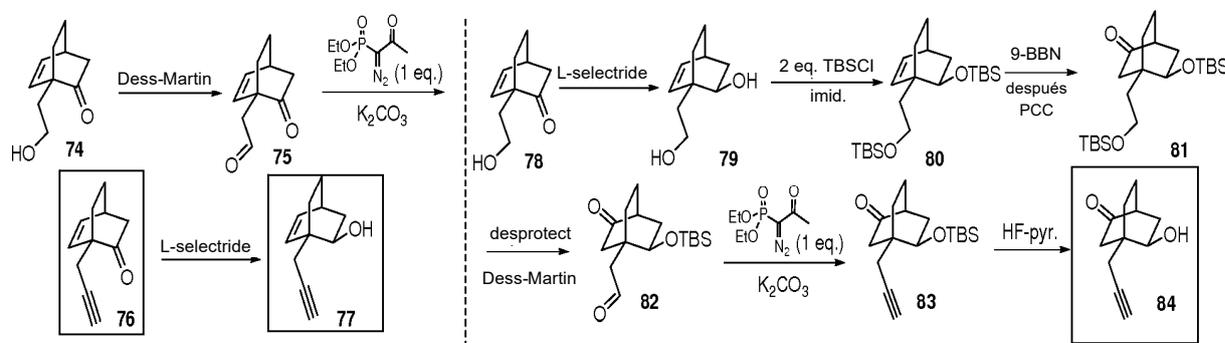


**Esquema 12.** Síntesis de estructuras de núcleo de

El sulfato de vinilo en 67 puede funcionar como un equivalente de ceteno en una reacción Diels-Alder intramolecular. La cicloadición térmica da 68 que se puede convertir en la cetona 69 a través de una secuencia de boración/oxidación en dos etapas. La cetona bicíclica racémica 71 se puede preparar a través de una vía análoga a partir de 70, disponible por sulfonación del ciclohexadieno etanol. También puede resultar posible extender esta

preparación racémica a una vía enantiómera usando un grupo TMS en 72 para imitar el diastereocontrol ejercido por el grupo metilo relacionado en 67. La preparación del alcohol  $\alpha$ -silílico enantiopuro se puede lograr por reducción de CBS del correspondiente acilsilano. Con una vía para el bloque básico racémico y posiblemente quiral 71, se podrán preparar tres estructuras complementarias a partir de este intermedio común (véase el esquema 13).

5

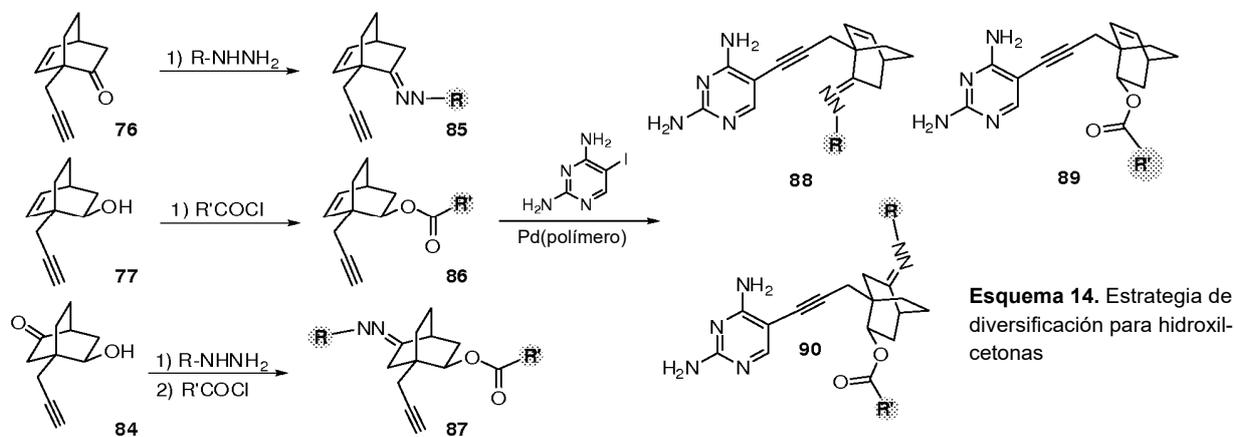


Esquema 13. Síntesis de estructuras con puente de carbono

La oxidación de 74 dará el cetoaldehído 75 que se puede convertir en 76 por reacción del aldehído más reactivo con el reactivo de Ohira-Bestmann para dar la estructura 76. Se sabe que la reducción de las cetonas bicíclicas tales como 76 se produce con altos niveles de diastereoselectividad ya que el agente reductor se aproxima desde el lado menos impedido con el puente olefínico. En consecuencia, la segunda estructura 77 se debe formar tras la reducción con una fuente de hidruro voluminosa. De forma alternativa, la reducción directa de 78 debe dar diol 79 con un estereocontrol similar que se convertirá en el sistema protegido en *bis* 80. Una secuencia de hidroboración/oxidación regioselectiva controlada por el grupo etanol de cabeza de puente debe dar la cetona 81. La estructura 84 se generará a través de una secuencia análoga como 76. Estas tres estructuras clave permitirán la generación de pequeñas colecciones focalizadas de nuevos inhibidores usando procedimientos de diversificación más breves (véase el esquema 14).

10

15

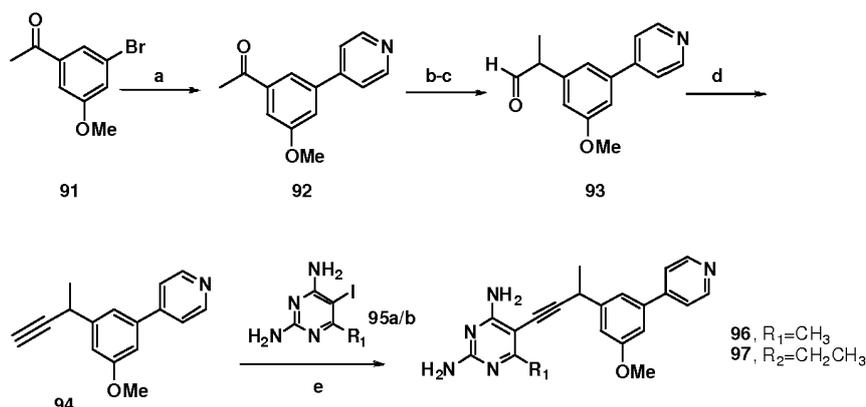


Esquema 14. Estrategia de diversificación para hidroxil-cetonas

20

La diversificación de estas estructuras se puede lograr usando la ortogonalidad de los grupos hidroxilo y ceto. La diversificación del grupo ceto se producirá por condensación con diversas hidrazinas, sulfonilhidrazinas y acilhidrazinas usando una captura de resina para retirar el exceso de reactivos. Se usarán procedimientos de acilación estándar para elaborar la funcionalidad alcohol. La unión final a la diaminopirimidina completa la vía para familias análogas 88-90.

25



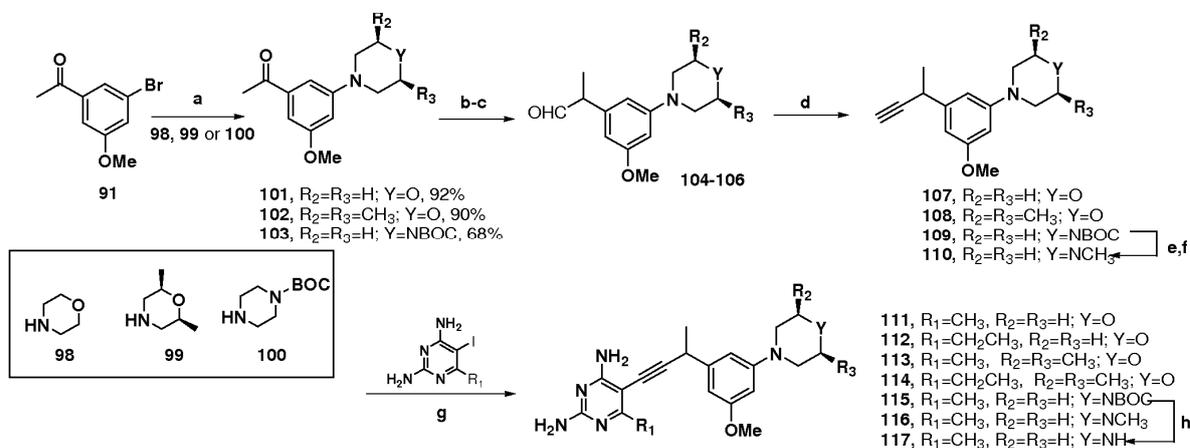
El esquema 15 muestra la vía asimétrica para los inhibidores de bifene basados en piridina.

Esquema 15: Síntesis de inhibidores de bifene basados en piridina. (a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ácido 4-piridinborónico, dioxano, 80 °C, 89 %; (b) Ph<sub>3</sub>P=CHOMe, THF; (c) Hg(OAc)<sub>2</sub>, KI, THF/H<sub>2</sub>O, 85 % durante dos etapas; (d) (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato de dimetilo, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 81 %; (e) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, DMF, 79-85 %

El derivado acetofenona 91, preparado fácilmente a partir de 3,5-dibromoanisol comercial se acopló se forma cruzada con ácido piridin-4-borónico para dar 92. La homologación del grupo acetilo se logró por tratamiento inicial con cloruro de metoximetilfosfonio para dar el éter enólico que se llevó sobre el aldehído en condiciones hidrolíticas leves (Hg(OAc)<sub>2</sub>/KI) que se demostró superior a las condiciones prácticas usadas en la serie de bifene original. Fue decisivo excluir de manera estricta el aire de la reacción ya que el aldehído 93 es algo inestable y tras la exposición al oxígeno atmosférico se vuelve a degradar a 92, muy probablemente por un procedimiento que implica la enolización de la posición bencílica seguido de la reacción con oxidación y escisión. El tratamiento del aldehído 93 con el reactivo de Ohira-Bestmann produjo directamente el alquino 94 que se llevó sobre un acoplamiento de Sonagashira con las yodopirimidinas 95a/b para producir los inhibidores deseados 96 y 97 con un rendimiento global bueno (esquema 15).

Se pudo usar una modificación de esta vía que implica la aminación de los bromuros de arilo para introducir heterociclos saturados sobre el anillo aromático central (esquema 16). Se añadieron tres heterociclos saturados diferentes 98-100 sobre el anillo aromático central a través de acoplamiento de Buchwald con la bromoacetofenona 91 para dar los derivados morfolina y piperazina 101-103 con un buen rendimiento. La homologación del grupo acetilo avanza como se describe previamente para suministrar finalmente los acetilenos terminales 107-109. Se preparó una unidad de N-metilpiperazina adicional 110 a partir de 109 a través de desprotección y aminación reductora con formaldehído. El acoplamiento de Sonagashira final de los cuatro alquinos con las correspondientes yodopirimidinas 95a/b dio los inhibidores de morfolina 111-114 y el análogo de N-metilpiperazina 116. Se preparó una variante de piperazina no sustituida 117 por escisión del grupo protector BOC. Con un pequeño panel de análogos heterocíclicos, se pudieron evaluar los efectos de la sustitución sobre propiedades físicas y biológicas clave.

El esquema 16 muestra una vía sintética para inhibidores de bifene basados en morfolina y piperazina.



Esquema 16: Síntesis de inhibidores de bifene basados en morfolina y piperazina. (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (2-

bifenil)di-terc-butil-fosfino, benceno, 80 °C, 92-82 %; (b)  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHOMe}$ , THF; (c)  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ , KI, THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 85-90 % durante dos etapas; (d) (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato de dimetilo,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 88-55 %; (e)  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ; (f) formaldehído,  $\text{NaCNBH}_3$ , 58 % durante dos etapas; (g)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , CuI,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, 88-60 %; (h)  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ; cuant.

- 5 En un modo de realización, los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen los compuestos como se muestra a continuación en la tabla 1. En un modo de realización, los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen los compuestos de los análogos de proparagilo de tercera generación como se muestra en la tabla 1, compuestos 147-159.

10

Tabla 1

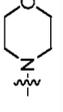
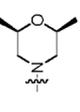
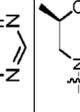
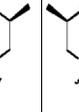
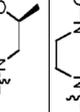
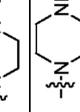
The chemical structure shows a pyrimidopyridine core. The pyrimidine ring has substituents NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> at position 2 and R at position 4. The pyridine ring has substituents R<sub>4</sub>R<sub>3</sub>N at position 3 and R at position 6. An ethynyl group connects the 4-position of the pyrimidine ring to a quaternary carbon atom. This quaternary carbon is also bonded to substituents A and B, and is attached to a benzene ring. The benzene ring has substituents V, W, X, Y, and Z at various positions.

N.º compuesto	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	A	B	V	W	X	Y	Z
14	H	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
16	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
20	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
21	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
24	H	H	H	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
25	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
127	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
128	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
137(R)	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
138(S)	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
15	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
17	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
18	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
6	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
7	n-propil	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
8	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

(continuación)

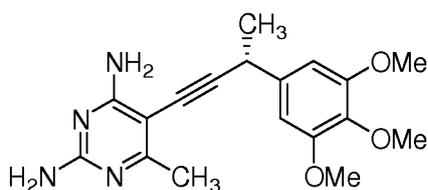
N.º compuesto	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	A	B	V	W	X	Y	Z
9	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
10	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	fenil	H
11	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	2-Mefenil	H
12	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	2,6-Mefenil	H
13	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	Br	H
116	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	fenil,	OCH <sub>3</sub>
139	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	fenil	H
140	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	3,5-metil, fenil	H
141	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	4-metil, fenil	H
142	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	fenil	H
143	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	H	H	fenil	H
144	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	fenil	H
145	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	fenil	H
146	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	fenil	H
147	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
148	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
149	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H		H
150	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H

(continuación)

N.º compuesto	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	A	B	V	W	X	Y	Z
151	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	H	H		H
152	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
153	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
154	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	H	H		H
155	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	H	H	H		H
156	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
157	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
158	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H
159	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		H

En el presente documento se proporcionan datos de síntesis y datos experimentales para los compuestos enumerados anteriormente.

5 En otros modos de realización de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se refieren a compuestos que poseen actividad protozoica. En base a la estructura de la enzima DHFR de *C. hominis*, se desarrolló una estructura novedosa que dio lugar al descubrimiento de inhibidores potentes y eficaces de la enzima DHFR. El desarrollo inicial de un enfoque del diseño de fármacos basado en estructuras comenzó con la determinación de estructuras cristalinas de ChDHFR a una resolución de 2,7 Å. En base a la estructura de ChDHFR, se desarrolló una serie principal de compuestos que mantenían buenas características de tipo fármaco y accesibilidad sintética, definidos por un enlazador propargilo entre un anillo 2,4-diaminopirimidina y un anillo arilo. Un modo de realización de un ligando altamente eficaz con una constante de inhibición ( $CI_{50}$ ) de 38 nM y peso molecular de 342 Da es el compuesto X (también denominado en el presente documento UPC111A).



Compuesto X:

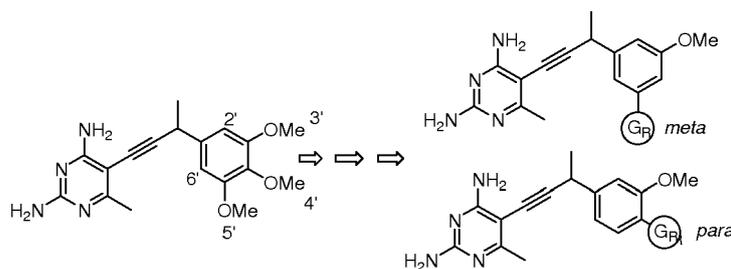
15 Posteriormente se desarrolló una segunda generación de análogos de propargilo inspirada por análisis estructural que no solo mantuvo niveles altos de potencia contra la enzima parasitaria como se observó con la primera serie de compuestos sino que también presentó niveles extremadamente altos de selectividad.

20 La inspección de las estructuras de ChDHFR y DHFR humana (hDHFR) reveló que los sitios activos son altamente homólogos y las diferencias de residuos que existen mantienen las mismas propiedades químicas. Una diferencia llamativa entre las dos enzimas se sitúa en la abertura del sitio activo. En hDHFR, el acceso al sitio activo se restringe eficazmente por un bucle de cuatro residuos (Pro 61, Glu 62, Lys 63, Asn 64 o bucle PEKN) que particularmente está ausente en ChDHFR (véase la figura 8). Aprovechando las diferencias estructurales entre las dos enzimas, se diseñaron los ligandos con selectividad para ChDHFR.

30 El análisis estructural inicial con los inhibidores de propargilo de primera generación mostró que el compuesto principal X no parecía aprovechar las diferencias estructurales anteriores. De hecho, el compuesto X solo mostró una preferencia de 8 veces por la enzima parasitaria sobre la enzima humana (véase la tabla 4). El examen de las estructuras de ChDHFR y hDHFR dio lugar a dos series bifenilo de derivados en las que el segundo anillo arilo se instaló en la posición 5' o 4' del anillo arilo proximal.

35 La inspección de los complejos acoplados del compuesto principal en ChDHFR y hDHFR sugirió que la funcionalidad que se proyecta desde la posición 3' o 4' del núcleo aromático del compuesto X se colocaba correctamente para interactuar con una región del espacio rellena por el bucle PEKN en hDHFR. La estrategia global para añadir las sustituciones estéricas a las posiciones 3' o 4' del compuesto principal inicial se muestra en el esquema 17. Al predecir las sustituciones estéricas en estas posiciones fue posible estabilizar o desestabilizar específicamente las interacciones con la región de bucle. En consecuencia, se descubrió que las interacciones estéricas particulares desestabilizan la unión a la enzima humana, mantienen una potencia alta contra la forma protozoica, mientras que también exploran el grado de flexibilidad de los residuos en el sitio activo. Los análogos recién diseñados mantuvieron tres restos: uno, el metilo en C6 de la pirimidina, que se prevé que interactúe con Phe 36, Leu 33 y Leu 25; dos, el metilo del propargilo, que se prevé que interactúe favorablemente con los residuos Thr 58 y Ile 62; y tres, el grupo metoxi en 3', que se prevé que interactúe tanto con el esqueleto como con la cadena lateral de Leu 25 en el sitio activo.

45



Esquema 17.

El análisis computacional de la serie bifeneol dio lugar a la síntesis de ocho nuevos compuestos, de los que todos presentaron una mejora en la potencia y en la selectividad (véase la tabla 3). El análogo de 5'-bifeneol racémico fue el más potente y selectivo de los compuestos racémicos, con siendo el enantiómero R individual el compuesto más potente y selectivo de todos. Además, al combinar elementos adicionales en el compuesto principal inicial dio como resultado el desarrollo de compuestos altamente selectivos.

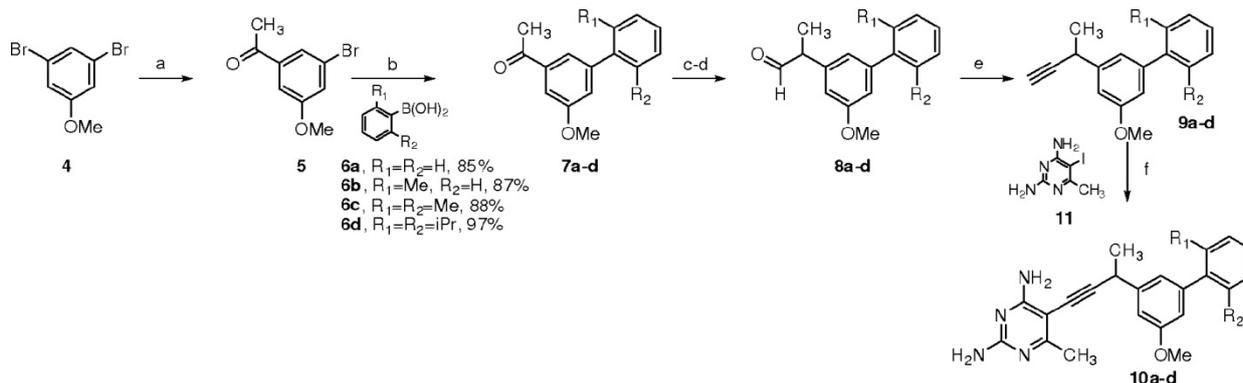
En un modo de realización, las composiciones y procedimientos en el presente documento se refieren a compuestos que poseen actividad antibacteriana. Una serie meta bifeneol de la segunda generación de los análogos de propargilo descritos en el presente documento muestra actividad contra un conjunto expandido de enzimas de patógenos importantes. La clase se inspiró por análisis estructural de alta resolución y los compuestos en la serie presentaron una inhibición potente de DHFR de SARM natural y del mutante con resistencia crítica F98Y, conocido por introducir insensibilidad a TMP. Por ejemplo, el compuesto 140 de la tabla 1 tiene un valor de  $CI_{50}$  de 42 nM contra SaDHFR natural y de 190 nM contra *S. pyogenes*. El compuesto Y muestra un nivel moderado de actividad antibacteriana (valor CIM de 5,8 mg/ml para *S. aureus* y de 0,1 para *S. pyogenes*). Además, la toxicidad en mamíferos contra células MCF-10 muestra una selectividad de ocho veces y de 484 veces para SARM y *S. Pyogenes*, respectivamente.

Se requirió un procedimiento directo para introducir un volumen estérico sobre la región del núcleo aromático para la síntesis de los inhibidores de DHFR de segunda generación. Se utilizó un tipo de estructura de biarilo en la que se introduce el volumen estérico en forma de un anillo aromático adicional. La estructura de biarilo proporcionó flexibilidad y versatilidad ofrecidas por el acoplamiento cruzado de Suzuki para la preparación de una amplia gama de inhibidores potenciales.

Se crearon virtualmente familias análogas que variaban tanto en el patrón de disposición como de sustitución del segundo anillo arilo y se acoplaron tanto en ChDHFR como en hDHFR usando el programa, Surflex (Tripos, Inc) en el entorno de Sybyl. Surflex-Dock bloquea de forma flexible los ligandos para una representación ProtoMol del sitio activo, creada explorando el sitio activo con fragmentos moleculares pequeños. Los ligandos se fragmentan y se incorporan en el ProtoMol basándose en una función de puntuación empírica que incluye términos hidrófobos, polares, repulsivos, entrópicos y de solvatación. Para explorar la flexibilidad proteica, se crearon conjuntos de estructuras de receptores basándose en instantáneas conformacionales minimizadas a través de una evolución temporal de dinámica molecular; las puntuaciones se promediaron sobre el conjunto. Las puntuaciones de acoplamiento se devuelven con un "valor de choque" asociado que aproxima en gran medida la penetración del ligando en el receptor. Son preferentes "valores de choque" que sean próximos a 0.

Al emplear estos procedimientos computacionales, se evaluó una serie de ocho inhibidores potenciales. Cuatro de los inhibidores potenciales estaban en la serie 5' de los inhibidores y cuatro estaban en la serie 4' (véase la figura 10). Cada serie comprendía derivados que incorporaban un volumen estérico creciente en las posiciones *orto* del segundo anillo arilo. El análisis computacional predijo que los valores de choque contra hDHFR para estos inhibidores se volvió negativo de forma creciente a medida que el volumen estérico del segundo anillo arilo se incrementó con un cambio mínimo en ChDHFR. Por ejemplo, un compuesto con un anillo arilo no sustituido proporcionó un valor de choque de -1,31 en ChDHFR y de -2,79 en hDHFR. Un compuesto análogo con grupos isopropilo en ambas posiciones *orto* proporcionó un incremento en los valores de choque de -4,08 y -12,76 en ChDHFR y hDHFR, respectivamente.

La selección de una estructura basada en biarilo en inhibidores de segunda generación se realizó parcialmente por la fiabilidad del acoplamiento de Suzuki en el montaje de bifeneoles estéricamente complicados. Se accedió a los análogos de bifeneol enlazados en 5' por funcionalización selectiva de 3,5-dibromoanisol 4 comercialmente disponible (véase el esquema 18).



- 5 a) nBuLi, -78 °C después CH<sub>3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 71 %; b) Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxano; c) Ph<sub>3</sub>P=CHOMe, THF; d) HCl conc., THF, reflujo 57-82 % durante dos etapas; e) (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato de dimetilo, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH 64-99 %; f) Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, DMF 67-94 %.

Esquema 18.

10 El intercambio metal-halógeno seguido de la adición de N,N-dimetilacetamida dio el derivado acetofenona 5 que se acopló de forma cruzada con cuatro derivados de ácido arilborónico 6a-d dando como resultado los correspondientes derivados bifene 7a-d. El ácido diisopropilborónico 6d no se tenía previamente pero se preparó fácilmente a partir de 2,6-diisopropilanilina por diazotización, yodación y conversión final a ácido borónico por medio de litación/boración. La homologación del resto acetilo por condensación con un iluro de fósforo sustituido con metoxi y la hidrólisis del éter enólico resultante dio los aldehídos 8a-d con un rendimiento muy bueno. La condensación con el reactivo de Ohira-Bestmann dio los correspondientes acetilenos terminales 9a-d que se convirtieron en los inhibidores 10a-d por un acoplamiento de Sonagashira final con yodopirimidina 11.

20 Se accedió a los análogos de bifene enlazados en 4' a través de una vía similar a partir del derivado de ácido benzoico 12 comercialmente disponible. La conversión del ácido a cloruro de acilo y el tratamiento del material en bruto con el reactivo de Gilman produjo un rendimiento excelente de la acetofenona 13. El grupo acetilo se homologó a través de una serie de reacciones idénticas como se indicó previamente para llegar a la serie de inhibidores. La funcionalidad de bifene se instaló a través de un acoplamiento de Suzuki al igual que para la serie enlazada en 5'.

25 Posteriormente, se desarrolló una tercera generación de inhibidores enlazados a propargilo que poseen una actividad significativa. Se determinaron las regiones del compuesto Y para su modificación potencial a través del análisis de una estructura cocrystalina de SaDHFR:NADPH:Compuesto Y. Por ejemplo, se determinó que los contactos hidrófobos entre el sustituyente de C6 y el anillo pirimidina y Val 31 y Leu 28 así como las interacciones potenciales entre los sustituyentes del anillo B y Ser 49 o la ribosa de NADPH se pudieron optimizar. También se consideraron los efectos estéricos, por ejemplo, el amontonamiento provocado por el grupo metilo propargílico, así como los efectos de afinidad y solubilidad.

35 En lugar de un bifene, los compuestos de la tercera generación son análogos heterocíclicos. Además de un anillo heterocíclico en lugar de un anillo fenilo, los análogos heterocíclicos difieren del compuesto Y al menos en uno de cuatro modos. En algunos modos de realización, el metilo C6 se extiende a etilo. En algunos modos de realización, el metilo del propargilo se reemplazó por hidrógeno. En algunos modos de realización, sustituyente del anillo B se movió de la posición 3' a la 2'. Y en algunos modos de realización, el grupo metilo del anillo C se retiró.

40 Se diseñaron tres clases de análogos en los que el anillo distal de la subestructura bifene se reemplazó por un heterociclo nitrogenado -- un derivado de morfolina, piperizina, o piridina. Estos análogos se sintetizaron y se evaluaron para determinar la solubilidad así como la inhibición enzimática y de crecimiento celular. Se demostró que la sustitución de piridilo era óptima y presentaba los niveles más potentes de actividad antifúngica (menos de 1 mg/ml) para cualquiera de los antifolatos en esta serie.

45 Las figuras 15A-C son modelos moleculares que muestran la estructura de DHFR de *S. aureus* unida a NADPH (fucsia) y (16A) compuesto 142 (violeta), (16B) compuesto 148 (verde), y (16C) una superposición de los compuestos 148 (azul) y 139 (verde).

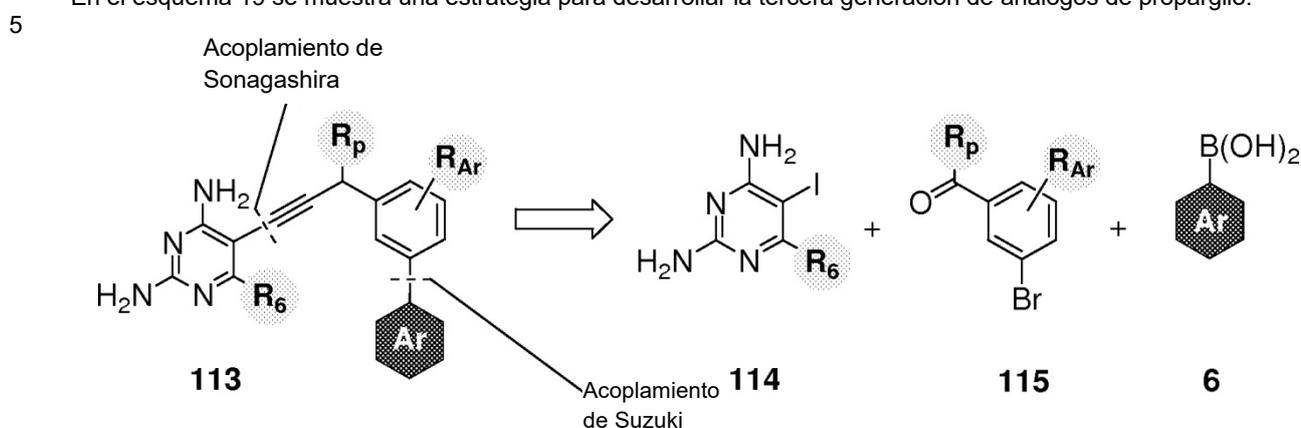
50 La figura 16 es una estructura cristalina de CgDHFR (representación de superficie) unida al compuesto 139 (forma de barra) y NADPH. El anillo bifene está expuesto en gran parte a la abertura del sitio activo y por tanto, al disolvente. La presencia de heteroátomos en este anillo distal reduce la hidrofobicidad de los compuestos e incrementa significativamente la solubilidad de los compuestos (véase la tabla 2).

Tabla 2: Valores de logD calculado y solubilidad medida.

ID del compuesto	LogD <sub>7,4</sub>	Solubilidad (µg/ml) <sup>a</sup>
139	3,89	20
147	2,39	40
148	3,44	40
152	1,85	80
153	2,90	80
159	1,11	60

<sup>a</sup> Las medidas se realizaron en 200 mcg/ml de HPMC y DMSO al 0,2 %

En el esquema 19 se muestra una estrategia para desarrollar la tercera generación de análogos de propargilo.



Esquema 19

10 Se desarrolló un enfoque sintético modular para estos antifolatos enlazados a propargilo 112 que se basa en dos reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio versátiles para ensamblar eficazmente los inhibidores de tres fragmentos variables (compuestos **113-115**). Cada uno de los tres dominios contiene uno o más sitios para la diversificación en la región clave identificados a través de análisis de estructura. La síntesis comienza con 3-bromobenzaldehídos (propargilo no sustituido) de fácil acceso o 3-bromoacetofenonas **114** (metilo en la posición de propargilo) que contienen una sustitución variable adicional en el anillo aromático. El acoplamiento cruzado de Suzuki del bromuro con ácidos aril y heteroarilborónicos **115** proporciona un procedimiento directo y conveniente para introducir niveles altos de diversidad en la región de anillo C. La posterior extensión de la funcionalidad aldehído/acetilo en un grupo propargilo lateral precede al acoplamiento de Sonogashira final a yodopirimidinas **113** que poseen grupos variables en la posición C6. Esta estrategia es tolerante para una amplia gama de funcionalidad y permite la preparación de varios análogos nuevos para su evaluación.

25 En otro modo de realización, las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se refieren a compuestos que poseen actividad antifúngica. Se preparó una serie de compuestos principales analizando la estructura de DHFR de un protozoo parasitario, *Cryptosporidium hominis* (ChDHFR), y se caracterizan por un enlazador basado en propargilo entre la pirimidina y el anillo arilo sustituido. El enlazador de propargilo se extiende la distancia entre los anillos pirimidina y arilo, con relación a trimetoprim, permitiendo que el anillo arilo se ajuste más óptimamente en la cavidad hidrófoba de la enzima DHFR.

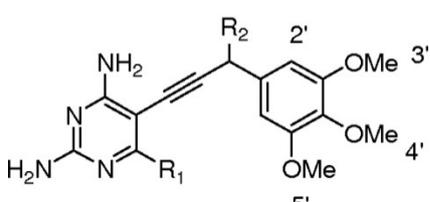
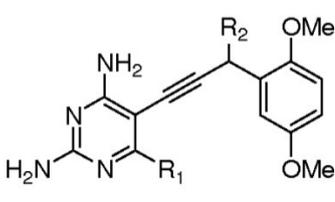
30 Aunque la estructura de DHFR de *C. glabrata* (CgDHFR) aún no se ha determinado, una comparación de un modelo de homología de CgDHFR, en base a la estructura de *C. albicans* (CaDHFR) y ChDHFR sugirió que los inhibidores enlazados a propargilo también pueden servir como compuestos principales antifúngicos potenciales. De hecho, en un modelo de homología de CgDHFR, la cavidad hidrófoba ocupada por el anillo arilo se desplaza 2 Å adicionales del anillo pirimidina, lo que sugiere que los compuestos extendidos pueden ser incluso más eficaces en CgDHFR que en ChDHFR.

35 El análisis de la estructura reveló el detalle de las interacciones entre el ligando y la enzima y también reveló una región hidrófoba flanqueada por residuos en un bucle próximo al sitio activo donde las interacciones de unión adicionales se pueden explotar para incrementar la potencia y selectividad del inhibidor. Después de expresar y purificar la CgDHFR, se midieron las constantes de inhibición (CI<sub>50</sub>) para once compuestos enlazados a propargilo

en base a dos estructuras diferentes, en ensayos enzimáticos (tabla 3). Muchos de los compuestos fueron inhibidores muy potentes de CgDHFR con valores de  $Cl_{50}$  menores de 100 nM; cuatro inhibidores (compuestos 5, 6, 9, 11) tienen valores de  $Cl_{50}$  iguales a o menores de 25 nM. Además, cuando los compuestos de propargilo se sometieron a ensayo con DHFR humana, se observaron proporciones de selectividad tan altas como de 156 veces (tabla 3).

5

Tabla 3. Resultados de inhibición enzimática y ensayos antifúngicos para inhibidores enlazados a propargilo

		Estructura A		Estructura B			
							
Compuesto	Tipo de estructura	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	CgDHFR $Cl_{50}$ (nM)	hDHFR $Cl_{50}$ (nM)	Selectividad (h/CgDHFR)	Actividad antifúngica, CIM (µg/ml)
1	A	H	H	33	1460	44	Inact*
2	A	H	CH <sub>3</sub>	36	1460	40,6	Inact
3	A	H	OH	2700	14300	5,3	328
4	A	H	OMe	450	1160	2,6	Inact
5	A	CH <sub>3</sub>	H	17	400	23,5	20
6	A	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	25	1380	55,2	21
7	A	CH <sub>3</sub>	OH	39	5710	146	Inact
8	A	CH <sub>3</sub>	OMe	30	1220	40,7	Inact
9	B	H	H	21	3200	152	71
10	B	CH <sub>3</sub>	H	32	1300	40,6	56
11	B	Et	H	8,2	1280	156	78

\*Inact: no activo a 2 mM (~ 600 µg/ml)

10 A continuación, los compuestos se sometieron a prueba como agentes antifúngicos en un ensayo antifúngico contra *C. glabrata*. Varios de los compuestos, en particular los compuestos 5 y 6 de la tabla 3, presentaron propiedades antifúngicas.

15 Usando la información estructural anterior, se diseñó una segunda generación de inhibidores de CgDHFR que dio como resultado una potencia subnanomolar y niveles muy altos de selectividad hacia la enzima de *C. glabrata*. También se descubrió que la segunda generación de inhibidores de CgDHFR destruía *C. glabrata* en cultivo a concentraciones que imitaban a las de los agentes antifúngicos usados clínicamente.

20 Los análogos heterocíclicos de tercera generación descritos previamente también se sometieron a prueba como agentes antifúngicos. Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir CgDHFR y DHFR humana (hDHFR) y su capacidad para inhibir el crecimiento de *C. glabrata*. Estos compuestos presentan una inhibición enzimática ligeramente más débil en comparación con la serie de bifenilo de segunda generación, pero muestran una solubilidad significativamente potenciada e inhiben potencialmente el crecimiento de *C. glabrata* mientras que presentan valores de selectividad muy altos. Se descubrió que algunos derivados tienen una potencia comparable a los agentes antifúngicos usados clínicamente.

25

#### Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos como se divulga anteriormente

combinados con uno o más diluyentes, excipientes, vehículos o sistemas de administración farmacéuticamente aceptables. Se pueden preparar uno o más de los compuestos en una formulación fisiológicamente aceptable, tal como en un vehículo farmacéuticamente aceptable, usando técnicas conocidas. Por ejemplo, el compuesto se combina con un excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición terapéutica.

En otro modo de realización, las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden administrar junto con, o además de, sulfamidas para formar composiciones farmacéuticas terapéuticas. Se reconoce en la técnica que las sulfamidas presentan una actividad alta contra bacterias patógenas. Los ejemplos no limitantes de sulfamidas y los procedimientos por los que se preparan las sulfamidas se proporcionan en la patente de los EE. UU. 3.091.610, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden administrar en forma de un sólido, líquido o aerosol. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen pastillas, cremas y unidades de dosificación implantables. Las pastillas se pueden administrar por vía oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables se pueden administrar por vía local, o se pueden implantar para una liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para inyección por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, y formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones de aerosol incluyen formulaciones de inhalador para su administración a los pulmones.

Las composiciones se pueden administrar por vías de administración estándar. En general, la composición se puede administrar por vías tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en una matriz o matrices de liberación mantenida tales como polímeros biodegradables, estando implantados los polímeros en la proximidad de donde se desea la administración. El procedimiento incluye la administración de una única dosis, administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y administración mantenida durante un periodo de tiempo predeterminado.

Una matriz de liberación mantenida, como se usa en el presente documento, es una matriz fabricada de materiales, normalmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o ácida/básica o por disolución. Una vez insertada en el organismo, la matriz se ve afectada por enzimas y fluidos corporales. De forma deseable, la matriz de liberación mantenida se elige por materiales biocompatibles tales como liposomas, poliláctidos (poli(ácido láctico)), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poli(láctido-co-glicólido) (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhidridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferente es una matriz de uno o cualquiera de poliláctido, poliglicólido, o poli(láctido-co-glicólido) (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Se debe entender que además de los ingredientes mencionados anteriormente de forma particular, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

La dosificación de la composición dependerá de la progresión de la infección o cáncer, la composición particular usada, y otros factores clínicos tales como peso y afección del paciente, y la vía de administración.

#### Procedimientos de tratamiento

Se proporcionan procedimientos de tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y protozoicas y cáncer usando los compuestos descritos en el presente documento. De acuerdo con los procedimientos, una o más de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, que contienen una concentración terapéuticamente eficaz de compuesto, se administra a un individuo que necesita el tratamiento.

Los compuestos inhibidores de DHFR descritos en el presente documento son potentes y selectivos para muchos organismos patógenos diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, la enzima DHFR de bacterias tales como *Bacillus anthracis* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilina y *Streptococcus pyogenes*, hongos tales como *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y protozoos tales como *Cryptosporidium hominis* y *Toxoplasma gondii*. Estos compuestos y otros compuestos similares también son potentes contra la enzima de mamífero y pueden ser útiles como tratamientos antineoplásicos. En otras palabras, se ha demostrado que los compuestos de la presente invención tienen una fuerte actividad *in vitro* contra la enzima de mamífero y se ha demostrado que algunos de los compuestos de la presente invención tienen actividad contra líneas celulares de mamífero. Específicamente, se ha demostrado que el compuesto inhibidor 5-[3-(3-metoxi-2'6'-diisopropilbifenil-4-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina presenta toxicidad en células de mamífero y puede ser útil como tratamiento antineoplásico.

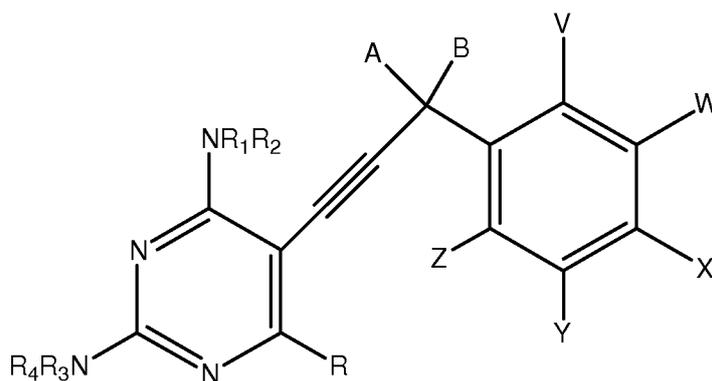
El tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad bacteriana, fúngica y protozoica o cáncer se puede llevar a cabo administrando al paciente una composición farmacéuticamente aceptable que contiene uno o más de los

compuestos descritos, como se describe en el presente documento, a una dosificación eficaz. Se pueden obtener resultados eficaces con una única dosis. Pueden ser necesarias múltiples dosis para lograr beneficios óptimos y mantenidos. Los compuestos se pueden proporcionar como composiciones sustancialmente purificadas o se pueden disponer en formulaciones farmacéuticamente aceptables o suministrarse por liberación mantenida usando formulaciones y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica como se describe anteriormente. Estas formulaciones se pueden administrar por vías estándar. En general, las composiciones se pueden administrar por varias vías (por ejemplo, intravenosa, transdérmica, intraperitoneal, intraespinal, subcutánea o intramuscular) como se describe anteriormente.

La dosificación eficaz de una o más de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento dependerá del estado de enfermedad o afección que se está tratando y otros factores clínicos tales como peso y afección del animal o humano y la vía de administración. Dependiendo de la semivida del compuesto en el animal o humano particular, se puede administrar de entre varias veces al día a una vez al mes o menos. Los procedimientos descritos en el presente documento contemplan administraciones individuales o múltiples, dadas simultáneamente o bien durante un periodo de tiempo prolongado.

Se debe entender que los procedimientos proporcionados en el presente documento tienen aplicaciones tanto para uso humano como mamífero y veterinario. También se debe entender que el término "individuo" como se usa en el presente documento se refiere a un animal, humano, mamífero o paciente que necesita el tratamiento usando los compuestos descritos en el presente documento.

En un modo de realización para el tratamiento de una infección bacteriana, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula I es



Fórmula I

en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub> e hidroxilo;

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo, alcoxilquilo, arilalquilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, alcoxilquilcarbonilo, alcoxilcoxilquilcarbonilo, arilcarbonilo, piridinilcarbonilo, ariloxialquilo, haloalquilcarbonilo, y cianoalquilcarbonilo;

en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que A y B junto con el carbono al que están conectados pueden formar un anillo de desde 3 a 7 miembros en la que los miembros de anillo se seleccionan del grupo que consiste en alquilenilo, alquilenileno, y alquinileno, en la que cualquiera de los grupos alquilenilo, alquilenileno y alquinileno puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos del grupo que consiste en O, N, S y Se y el alquilenilo o alquilenileno puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos

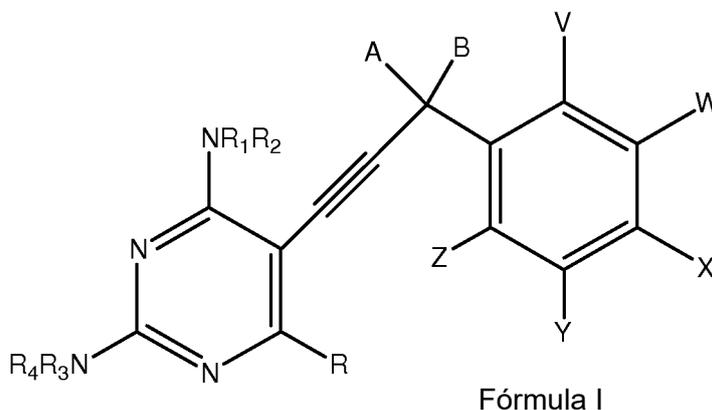
anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que V, W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfino inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior,

en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxi. En otro modo de realización, todos los W, X e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de V e Y es un grupo metoxi. En otro modo de realización, ambos V e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de A y B no es alquilo C<sub>1-5</sub>.

En un modo de realización para el tratamiento de una infección fúngica, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula I es



en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub> e hidroxilo;

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, alcoxialquilcarbonilo, alcoxialcoxialquilcarbonilo, arilcarbonilo, piridinilcarbonilo, ariloxialquilo, haloalquilcarbonilo, y cianoalquilcarbonilo;

en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfino inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que A y B junto con el carbono al que están conectados pueden formar un anillo de desde 3 a 7 miembros en la que los miembros de anillo se seleccionan del grupo que consiste en alquilenilo, alquilenilo, y alquilenilo, en la que cualquiera de los grupos alquilenilo, alquilenilo y alquilenilo puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos del grupo que consiste en O, N, S y Se y el alquilenilo o alquilenilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfino inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

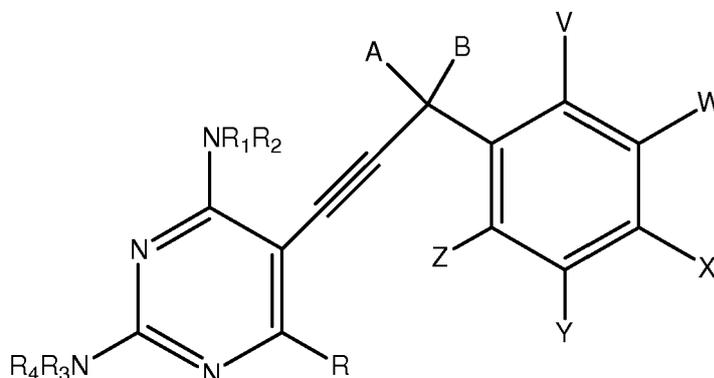
en la que V, W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo

5 C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior,

en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

10 En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxi. En otro modo de realización, todos los W, X e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de V e Y es un grupo metoxi. En otro modo de realización, ambos V e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de A y B no es alquilo C<sub>1-5</sub>. 28.

15 En un modo de realización para el tratamiento de una infección protozoica, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula I es



Fórmula I

20 en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub> e hidroxilo;

25 en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, alcoxialquilcarbonilo, alcoxialcoxialquilcarbonilo, arilcarbonilo, piridinilcarbonilo, ariloxialquilo, haloalquilcarbonilo, y cianoalquilcarbonilo;

30 en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

35 en la que A y B junto con el carbono al que están conectados pueden formar un anillo de desde 3 a 7 miembros en la que los miembros de anillo se seleccionan del grupo que consiste en alquilenilo, alquenileno, y alquinileno, en la que cualquiera de los grupos alquilenilo, alquenileno y alquinileno puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos del grupo que consiste en O, N, S y Se y el alquilenilo o alquenileno puede estar sustituido  
40 opcionalmente con uno o más de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior,  
45 alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

50 en la que V, W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi,

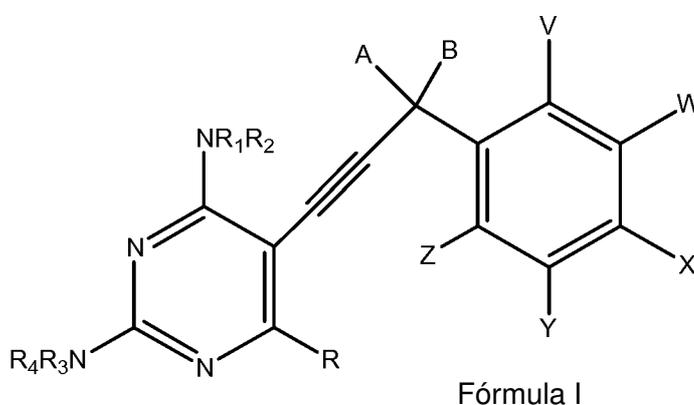
fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior,

5 en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxi. En otro modo de realización, todos los W, X e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de V e Y es un grupo metoxi. En otro modo de realización, ambos V e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización al menos uno de A y B no es alquilo C<sub>1-5</sub>.

En un modo de realización para el tratamiento de una infección protozoica, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula I es como se indica anteriormente.

15 En un modo de realización para el tratamiento de cáncer, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula I es



20 en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, e hidroxilo; en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, alcoxialquilcarbonilo, alcoxialcoxialquilcarbonilo, arilcarbonilo, piridinilcarbonilo, ariloxialquilo, haloalquilcarbonilo, y cianoalquilcarbonilo;

25 en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

35 en la que A y B junto con el carbono al que están conectados pueden formar un anillo de desde 3 a 7 miembros en la que los miembros de anillo se seleccionan del grupo que consiste en alquilenilo, alquilenileno, y alquinielilo, en la que cualquiera de los grupos alquilenilo, alquenieleno y alquinielilo puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos del grupo que consiste en O, N, S y Se y el alquilenilo o alquenieleno puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

45 en la que V, W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior,

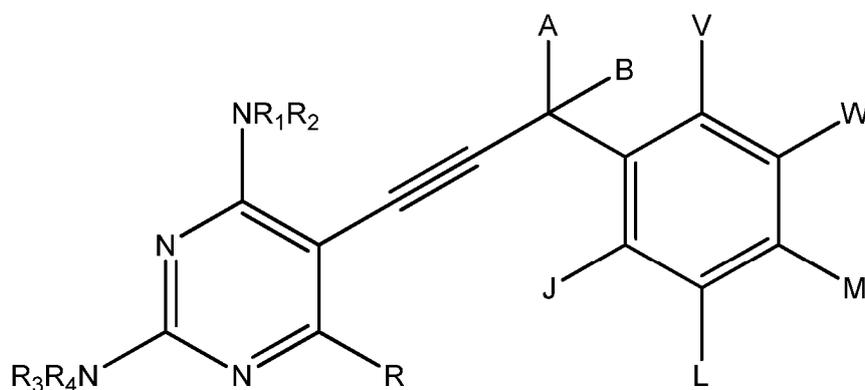
50

en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En un modo de realización, al menos uno de V, W, X, Y y Z es un grupo metoxi. En otro modo de realización, todos los W, X e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización, al menos uno de V e Y es un grupo metoxi. En otro modo de realización, ambos V e Y son grupos metoxi. En otro modo de realización al menos uno de A y B no es alquilo C<sub>1-5</sub>.

Las composiciones y procedimientos se ilustran adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes, que no se deben interpretar en modo alguno como limitaciones impuestas sobre el alcance de los mismos. Por el contrario, debe entenderse claramente que se puede recurrir a otros diversos modos de realización, modificaciones y equivalentes de los mismos que, tras leer la descripción en el presente documento, se les puedan ocurrir a los expertos en la técnica sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En un modo de realización para el tratamiento de una infección bacteriana, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula V es



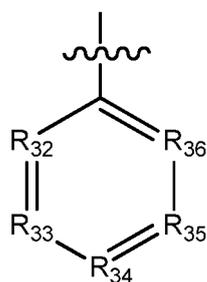
Fórmula V

en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, A, B, V y W se definen como anteriormente para la fórmula I; y en la que dos de J, L y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcóxialquilo inferior, carboxi, alcóxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcóxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L y M es un sustituyente heterocíclico en la que al menos un heteroátomo es N, y en la que el propio sustituyente heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcóxialquilo inferior, carboxi, alcóxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcóxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

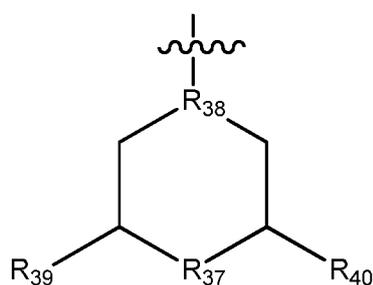
En algunos modos de realización, dos de J, L, y M, se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcóxialquilo inferior, carboxi, alcóxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcóxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol e imidazol, en la que la piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol por sí mismo puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcóxialquilo inferior, carboxi, alcóxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo

inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En algunos modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquilo, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

En otro modo de realización, cualquiera de cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.

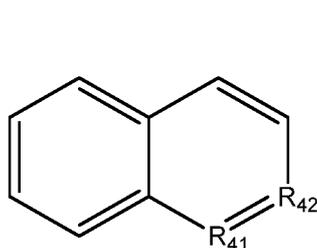
En otro modo de realización, R es CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno; uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es CH<sub>3</sub>; y V y W son cada uno independientemente hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>.

En otro modo de realización, uno de V y W es metoxi y el otro es hidrógeno. En una variación de este modo de realización, V es metoxi y W es hidrógeno.

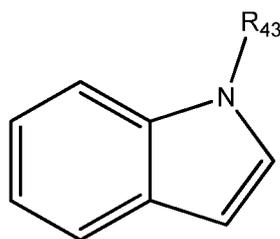
En otro modo de realización, al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub>, y R<sub>36</sub> son N y los otros son CH.

En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es O y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son iguales y son hidrógeno o CH<sub>3</sub>. En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub> y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son hidrógeno.

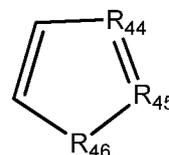
En otros modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIC, fórmula VID y fórmula VIE



Fórmula VIC



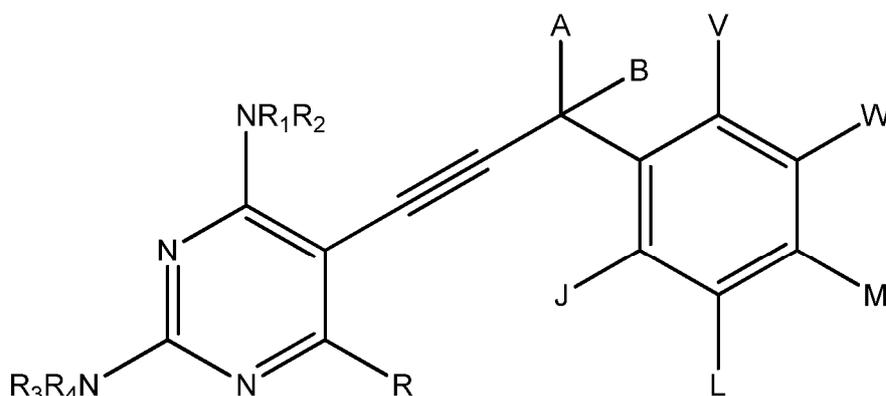
Fórmula VID



Fórmula VIE

5 en la que uno de  $R_{41}$  y  $R_{42}$  es N y el otro es CH; en la que  $R_{43}$  es H o alquilo  $C_1$ - $C_6$ ; en la que uno de  $R_{44}$ ,  $R_{45}$  y  $R_{46}$  es N, un segundo de  $R_{44}$ ,  $R_{45}$  y  $R_{46}$  es O, S, NH, o N(alquilo  $C_1$  a  $C_6$ ), y el tercero de  $R_{44}$ ,  $R_{45}$  y  $R_{46}$  es CH; y en la que cualquier carbono de metino en el grupo heterocíclico puede servir como punto de unión del grupo heterocíclico al compuesto de fórmula V.

10 En un modo de realización para el tratamiento de una infección fúngica, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula V es



Fórmula V

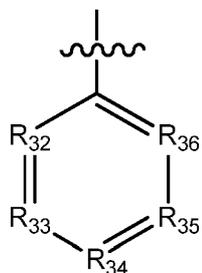
15 en la que R,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , A, B, V y W se definen como anteriormente para la fórmula I; y en la que dos de J, L y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , y el otro de J, L y M es un sustituyente heterocíclico en la que al menos un heteroátomo es N, y en la que el propio sustituyente heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo  $C_1$  a  $C_6$ .

30 En algunos modos de realización, dos de J, L, y M, se seleccionan de hidrógeno, alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con

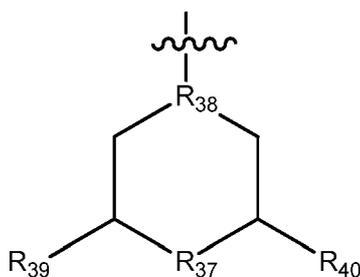
35

5 halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol e imidazol, en la que la piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol por sí mismo puede estar  
 10 opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

15 En algunos modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquilo, y el otro de J, L, y M se  
 20 selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

25 en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

35 en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

40 En otro modo de realización, cualquiera de cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.

En otro modo de realización, R es CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno; uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es CH<sub>3</sub>; y V y W son cada uno independientemente hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>.

45 En otro modo de realización, uno de V y W es metoxi y el otro es hidrógeno. En una variación de este modo de realización, V es metoxi y W es hidrógeno.

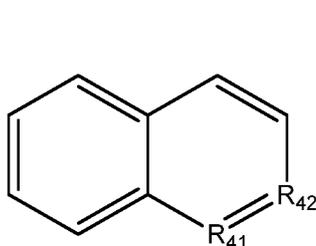
En otro modo de realización, al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub>, y R<sub>36</sub> son N y los otros son CH.

50 En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es O y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son iguales y son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

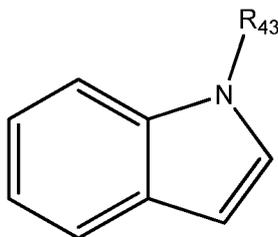
En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub> y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son hidrógeno.

En otros modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo,

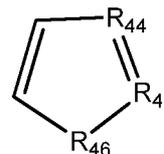
haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIC, fórmula VID y fórmula VIE



Fórmula VIC



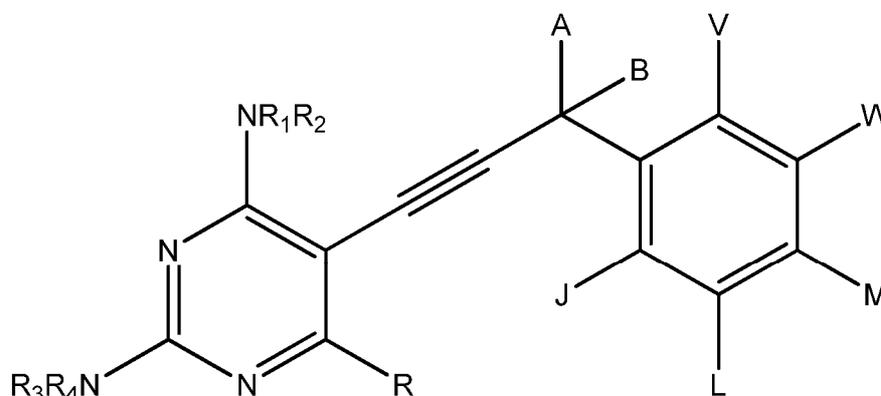
Fórmula VID



Fórmula VIE

en la que uno de R<sub>41</sub> y R<sub>42</sub> es N y el otro es CH; en la que R<sub>43</sub> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; en la que uno de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es N, un segundo de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es O, S, NH, o N(alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>), y el tercero de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es CH; y en la que cualquier carbono de metino en el grupo heterocíclico puede servir como punto de unión del grupo heterocíclico al compuesto de fórmula V.

En un modo de realización para el tratamiento de una infección protozoica, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula V es



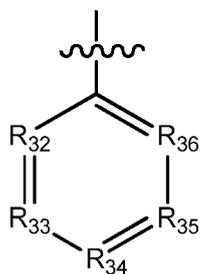
Fórmula V

en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, A, B, V y W se definen como anteriormente para la fórmula I; y en la que dos de J, L y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L y M es un sustituyente heterocíclico en la que al menos un heteroátomo es N, y en la que el propio sustituyente heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfínilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores

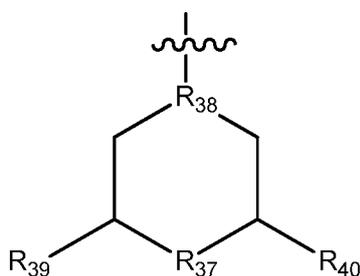
quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En algunos modos de realización, dos de J, L, y M, se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol e imidazol, en la que la piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol por sí mismo puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

En algunos modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquilo, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

En otro modo de realización, cualquiera de cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.

En otro modo de realización, R es CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno; uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es CH<sub>3</sub>; y V y W son cada uno independientemente hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>.

En otro modo de realización, uno de V y W es metoxi y el otro es hidrógeno. En una variación de este modo de realización, V es metoxi y W es hidrógeno.

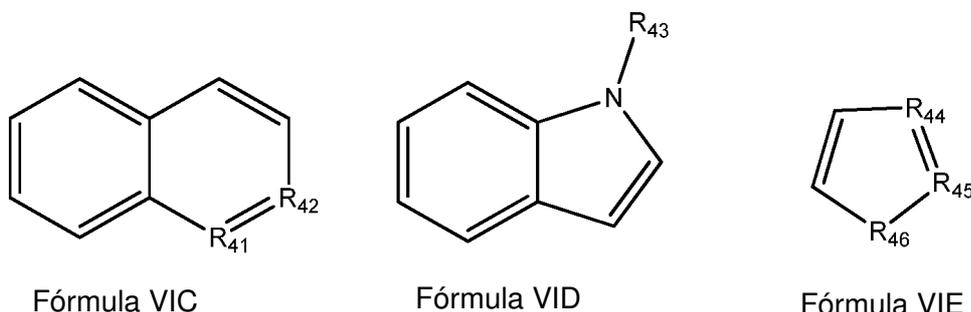
En otro modo de realización, al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub>, y R<sub>36</sub> son N y los otros son CH.

En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es O y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son iguales y son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

5 En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub> y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son hidrógeno.

En otros modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIC, fórmula VID y fórmula VIE

15

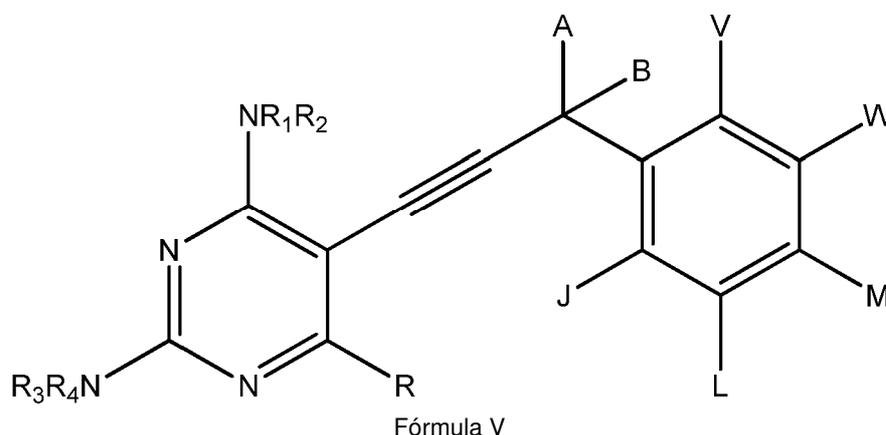


en la que uno de R<sub>41</sub> y R<sub>42</sub> es N y el otro es CH; en la que R<sub>43</sub> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; en la que uno de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es N, un segundo de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es O, S, NH, o N(alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>), y el tercero de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es CH; y en la que cualquier carbono de metino en el grupo heterocíclico puede servir como punto de unión del grupo heterocíclico al compuesto de fórmula V.

20

En un modo de realización para el tratamiento de cáncer, una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un individuo, en el que fórmula V es

25



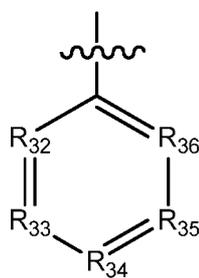
en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, A, B, V y W se definen como anteriormente para la fórmula I; y en la que dos de J, L y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L y M es un sustituyente heterocíclico en la que al menos un heteroátomo es N, y en la que el propio sustituyente heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi

40

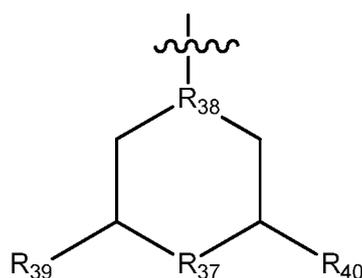
pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

- 5 En algunos modos de realización, dos de J, L, y M, se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol e imidazol, en la que la piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol por sí mismo puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

- En algunos modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

- 35 en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores es C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

- 45 en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

- 50 En otro modo de realización, cualquiera de cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.

En otro modo de realización, R es CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno; uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es CH<sub>3</sub>; y V y W son cada uno independientemente hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>.

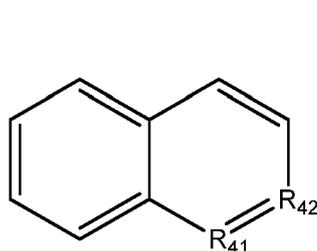
En otro modo de realización, uno de V y W es metoxi y el otro es hidrógeno. En una variación de este modo de realización, V es metoxi y W es hidrógeno.

En otro modo de realización, al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub>, y R<sub>36</sub> son N y los otros son CH.

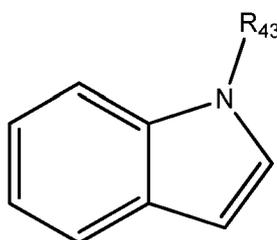
En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es O y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son iguales y son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

En otro modo de realización, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub> y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son hidrógeno.

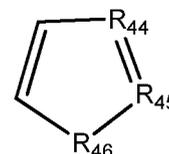
En otros modos de realización, dos de J, L, y M se seleccionan de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxilquilo inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcocarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIC, fórmula VID y fórmula VIE



Fórmula VIC



Fórmula VID



Fórmula VIE

en la que uno de R<sub>41</sub> y R<sub>42</sub> es N y el otro es CH; en la que R<sub>43</sub> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; en la que uno de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub>, y R<sub>46</sub> es N, un segundo de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub>, y R<sub>46</sub> es O, S, NH, o N(alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>), y el tercero de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub>, y R<sub>46</sub> es CH; y en la que cualquier carbono de metino en el grupo heterocíclico puede servir como punto de unión del grupo heterocíclico al compuesto de fórmula V.

### Ejemplo 1

#### Expresión, purificación y ensayos enzimáticos

ChDHFR: Se expresó ChDHFR-TS en *E. coli* y se purificó usando una columna de metotrexato-agarosa (Sigma).

hDHFR: Se amplificó el gen para hDHFR usando PCR de ADNc obtenido a partir de ATCC. Se insertó el gen en un vector pET41 con una marca histidina C-terminal para cromatografía de afinidad. Se verificó la construcción resultante por secuenciación. Se expresó la proteína hDHFR en *E. coli* y se purificó usando una columna de afinidad de níquel.

TgDHFR: Se determinó que la DHFR clonada de DHFR-TS de *T. gondii* era insoluble después del replegado a concentraciones de proteína relativamente bajas (>1 mg/ml). Se predijo que la presencia de una región de bucle no estructurada (residuos 43-70) que no está presente en otras proteínas DHFR volvía a la proteína insoluble. Se retiraron estos residuos, dejando una región de bucle de cinco residuos característica de otras especies diversas de DHFR. La retirada de esta región de bucle no estructurada proporcionó una preparación soluble de TgDHFR a concentraciones en exceso de 18 mg/ml, una única especie por electroforesis en gel natural y con un nivel de actividad igual a DHFE-TS de *T. gondii* y característico de otras proteínas DHFR después del replegado.

CgDHFR: Se amplificó el gen que codifica CgDHFR por PCR a partir de ADN genómico de *C. glabrata* obtenido a partir de ATCC. Se insertó el gen en un vector pET41 que incluye una marca histidina C-terminal para cromatografía de afinidad de níquel. Se transformaron células de *E. coli* y se verificó el plásmido resultante por secuenciación. Se expresó la proteína en células BL21 (DE3) de *E. coli* con inducción de isopropil-β-D-tiogalactósido. Después del crecimiento, se lisaron las células con BugBuster (Novagen) y se centrifugaron; se cargó el sobrenadante en una columna Ni-NTA. Se lavó la columna con Tris 20 mM (pH 8,0)/NaCl 0,4 M y se eluyó la proteína usando un gradiente de Tris 20 mM (pH 8,0), NaCl 0,3 M, glicerol al 20 %, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, imidazol 250 mM. Se identificaron las fracciones que contenían CgDHFR por SDS-PAGE, se combinaron y se desalaron usando una columna PD-10 con un tampón que contenía Tris 20 mM pH 8,0, glicerol al 20 %, EDTA 0,1 mM y DTT 2 mM. Se concentró la proteína a 13 mg/ml.

Se realizaron ensayos de actividad enzimática a 25 °C realizando un seguimiento del cambio en la absorbancia UV a

340 nm en una solución que contenía ácido tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 75  $\mu$ M, 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, dihidrofolato 1 mM (Eprova), y fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) 100  $\mu$ M (Sigma) y concentraciones limitantes de enzima. Se dejó que la enzima y el inhibidor se incubaran durante 5 min antes de añadir dihidrofolato para iniciar la reacción. Se realizaron ensayos enzimáticos al menos cuatro veces. Se calcularon los valores de  $CI_{50}$  y sus desviaciones estándar en presencia de concentraciones variables de inhibidor próximas a la concentración de  $CI_{50}$ . Las desviaciones estándar están dentro del 10 % del valor informado.

Se realizaron ensayos antifúngicos usando *C. glabrata* como una suspensión en glicerol al 50 % a - 78 °C. Para la prueba de susceptibilidad, se realizó una tanda de cultivo de reserva en agar SDA y se hizo crecer a 30 °C durante 48 h. Se recuperó una colonia pura del organismo de prueba de la placa, se suspendió en medio apropiado en un cultivo en matraz de agitación de 5 ml. Se diluyó una muestra del cultivo en matraz de agitación a  $1 \times 10^5$  células/ml en el medio y se añadió a placas de prueba de 96 pocillos (100  $\mu$ l por pocillo) que contenían los compuestos de prueba dosificados en DMSO (1  $\mu$ l). Se usaron anfotericina y cetoconazol como controles. Después de un periodo de incubación determinado a partir del tiempo de duplicación específico para la cepa, se añadió Alamar Blue (10  $\mu$ l), se dejó incubar; se puntuó cada pocillo para la reducción de colorante. Se tomó el valor de CIM como la menor concentración del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento de modo que se observe una reducción de menos de un 1 % del componente de resazurina azul ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  570 nm) del Alamar Blue a la resorufina rosa ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  600 nm).

#### Cálculo de la eficacia de ligando

La eficacia de ligando se expresa como la energía de unión por átomo distinto de hidrógeno ( $\phi G/N$  átomos distintos de hidrógeno) donde  $\Delta G = -RT \ln K_d$ , aunque los valores de  $CI_{50}$  se pueden sustituir por  $K_d$ . Por lo tanto, se calcularon las eficacias de ligando usando el cociente de  $\phi G$  ( $1,99 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )(300 K) ( $\ln CI_{50}$ )(0,001 kcal/cal) y el número de átomos distintos de hidrógeno.

#### Modelado computacional

Se crearon todos los ligandos en Sybyl (Tripos, Inc.) y se comprobaron para corregir las geometrías. Estos se protonaron selectivamente en el N1 del anillo 2,4-diaminopirimidina. Las cargas formales se calcularon automáticamente.

Se usaron conjuntos de receptores para modelar la flexibilidad proteica. Se prepararon los receptores añadiendo hidrógenos, retirando aguas y calculando las cargas formales. Se crearon grupos de conjuntos tomando instantáneas conformacionales de 500 fs a través de un ciclo de dinámica molecular de 10000 fs a 300 K usando el Amber Force Field en Sybyl. A continuación, se llevaron todas las estructuras a su mínimo de energía local con un gradiente de cambio de energía de 1000 iteraciones, bajo el supuesto de que no es probable que las conformaciones de energía alta sean las bioactivas. La movilidad se limitó a un sitio activo específico, como se define por todos los átomos que entran dentro de una esfera de un radio específico alrededor del ligando cocrystalizado. Para ChDHFR, se usó la estructura 1SEJ con una esfera de 6 Å alrededor del núcleo tricíclico del ligando que define el sitio activo. Se usó 1KMV como la estructura de hDHFR. Se construyeron las cadenas laterales no resueltas Asp 21 y Lys 62 usando los ángulos de cadenas laterales más comunes de un diccionario Lovell. Se confinó el movimiento de 1KMV a una esfera de 6Å alrededor del ligando y los residuos de la región de bucle PEKN 59 - 68. El residuo ácido conservado (Glu 30) se mantuvo rígido en todo el MD para preservar el contacto de unión de hidrógeno a N1H esencial. No fue necesario mantener el residuo ácido conservado rígido en el caso de ChDHFR ya que el contacto se preservó a lo largo de la evolución temporal.

El acoplamiento se llevó a cabo usando un Surflex-Dock implementado por Sybyl 7.3. Debido a la orientación conservada del resto 2,4-diaminopirimidina en el sitio activo, se pudo determinar la colocación correcta del ligando. Las puntuaciones informadas son las posturas de puntuación superior con su orientación conservada, determinada por el N1H que entra dentro de la distancia de unión a hidrógeno del residuo ácido conservado y el  $NH_2$  de C2 que entra dentro de los 4,3 Å del oxígeno de Thr conservado para preservar la orientación plana del anillo monocíclico. Las puntuaciones se promediaron en el conjunto.

#### Ejemplo 2

##### Química, modelado y evaluación biológica

##### Análisis estructural de DHFR de *C. hominis* y *T. gondii*.

Se ha informado previamente de la estructura cristalina de ChDHFR con diferentes ligandos, sin embargo, hasta la fecha, no se ha determinado experimentalmente la estructura de TgDHFR. Se han creado modelos de homología de TgDHFR en base a la estructura estrechamente relacionada de DHFR de *Mus musculus* (PDB ID: 1U7014). Se minimizó el modelo de TgDHFR, y un análisis de Ramachandran mostró una buena conservación de la morfología de modo que la geometría del esqueleto caiga fuera de las regiones permitidas para solo seis residuos en regiones de bucle. El modelo se validó adicionalmente acoplando once inhibidores con valores de  $CI_{50}$  determinados en el

sitio activo y logrando una correlación de un 50,2 % con las constantes de inhibición medidas.

Las superposiciones de la estructura cristalina de ChDHFR y el modelo de homología de TgDHFR muestran que las dos enzimas son muy similares, tanto en el pliegue general como en la identidad y disposición de muchos residuos del sitio activo. Rodeando el sistema de anillo de pteridina de metotrexato, un inhibidor potente modelado en ambos sitios, están residuos que se conservan entre las dos especies: un residuo de ácido aspártico (aminoácido 32 en Ch, y aminoácido 31 en Tg) forma una interacción electrostática con el N1 protonado y un enlace de hidrógeno con el grupo amino en la posición, así como Thr (aminoácido 134 en Ch, y aminoácido 172 en Tg), Val (aminoácido 9 en Ch, y aminoácido 8 en Tg) y Phe (aminoácido 36 en Ch y aminoácido 35 en Tg) que forman interacciones de van der Waals. El enlazador entre la pteridina y el ácido para-aminobenzoico (pABA) está rodeado por un Thr conservado (aminoácido 58 en Ch y aminoácido 83 en Tg) Thr y un residuo no conservado: Cys 113 en Ch y Val 151 en Tg. El anillo de pABA se une en una cavidad hidrófoba menos bien conservada compuesta de Ile 62 en Ch (Met 87 en Tg), Leu 67 en Ch (Leu 94 en Tg) y Leu 33 en Ch (Phe 32 en Tg).

En ambas especies, los modelos de TMP muestran interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno entre el N1 protonado y el grupo amino en la posición C2 del anillo de pirimidina y el Asp conservado en el sitio activo. Esta interacción entre el 2,4-diaminopirimidina y un residuo ácido en el sitio activo se conserva en muchas especies de DHFR. Sin embargo, la región de enlazador de TMP parece que es demasiado corta para extender el anillo trimetoxifenilo completamente en la cavidad hidrófoba ocupada normalmente por el anillo pABA de MTX, lo que explica posiblemente la menor potencia *in vitro* de TMP contra estas especies. En base a estos análisis estructurales, surgió una estrategia relativamente simple para incrementar la potencia de TMP para los dos organismos diana extendiendo la longitud del enlazador entre los dos anillos aromáticos.

### Ejemplo 3

#### Diseño y síntesis de análogos de TMP extendidos

Para probar la hipótesis de que la extensión de la distancia entre los anillos diaminopirimidina y fenilo de TMP lograría una mayor potencia contra ChDHFR y TgDHFR, se exploró el uso de un enlazador de dos carbonos en lugar del puente de metileno individual que se encuentra en TMP. Se ha informado previamente de la síntesis de varios derivados de 5-etinilpirimidina con restos no bencílicos y parece que estos compuestos inhiben *T. gondii* y dos especies de DHFR fúngica. Se acoplaron derivados de TMP que contienen enlazadores saturados alifáticos, cis y trans olefínicos, o acetilénicos en la estructura cristalina de ChDHFR, elegida porque se determinó a partir de datos experimentales. Los análogos de TMP con enlazadores olefínicos y acetilénicos rígidos permitieron que la diaminopirimidina se acoplara en la orientación apropiada pero estos enlazadores impidieron que el anillo trimetoxifenilo ocupara la cavidad hidrófoba biológicamente relevante. Sin embargo, parece que el alto grado de flexibilidad permitido por un puente de etileno saturado permitía que ambos anillos ocuparan sus respectivas cavidades. Se desarrolló una vía sintética directa y de alto rendimiento para un compuesto de pirimidinilo con un enlazador de etileno que permitía casualmente la preparación de toda la serie de análogos de TMP de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento.

La diaminopirimidina comercialmente disponible 4 se pudo yodar directamente en la posición C5 para dar 5-yodopirimidina-2,4-diamina. La conversión directa al derivado toiano de 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)etinil]pirimidin-2,4-diamina se logró a través de una reacción de acoplamiento de reacción de acoplamiento de Sonagashira catalizada con paladio con trimetoxifenilacetileno, preparado por extensión de Corey-Fuchs del correspondiente aldehído. La hidrogenación catalítica de 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)etinil]pirimidin-2,4-diamina se empleó a continuación para preparar el análogo totalmente saturado (es decir, 5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]pirimidina-2,4-diamina). De forma interesante, en condiciones de hidrogenación estándar, se descubrió que la segunda reducción era muy lenta, y el enlazador Z olefínico se pudo aislar y purificar. La equilibración para el isómero E termodinámicamente más estable se llevó a cabo por tratamiento con yodo y permitió un fácil acceso a toda la serie de puentes de dos carbonos. El examen de estos TMP extendidos en ensayos de inhibición enzimática estándar reveló que los análogos eran inactivos. Se esperaba que los análogos que contenían un enlazador etinilo o grupo etenilo E o Z etenilo mostraran una actividad escasa de los estudios de acoplamiento, pero se esperaba lo contrario para el derivado totalmente saturado. Sin embargo, el enlazador de etileno totalmente saturado no mostró una buena actividad.

### Ejemplo 4

#### Diseño y síntesis de la serie unida a propargilo

Se supuso que el fracaso en la obtención de compuestos activos que contienen un enlazador etinilo, un enlazador de grupo etenilo E o Z, o un enlazador etileno se debía a una mezcla de efectos entrópicos y conformacionales. Aunque un compuesto que contiene un enlazador etileno puede adoptar fácilmente una conformación que permita que ambos anillos aromáticos ocupen sus respectivas cavidades de unión, lo hace con una penalización entrópica significativa inducida por la organización alrededor del enlazador altamente flexible (existe un incremento de dos enlaces rotables en TMP a tres). Los otros tres compuestos de esta serie (es decir, el enlazador etinilo y enlazador de grupo etenilo E o Z) tienen una menor entropía interna pero no pueden llegar a las conformaciones que son productivas para la unión. El rediseño de esta serie apuntó hacia análogos con un número limitado de enlaces

rotables pero más libertad para que los dos anillos aromáticos encuentren cavidades de unión apropiadas. El uso de un éter propargílico de tres carbonos parecía un diseño potencial, ya que mantiene el mismo número de grados de libertad que TMP, pero permite que los dos anillos exploren el espacio más estructural independiente entre sí. El acoplamiento de las dos estructuras enlazadas a propargilo alternativas reveló que sería preferente la unión del grupo trimetoxifenilo al carbono de metileno en lugar del carbono de alquino. El derivado de alquino homologado (5-etinil-1,2,3-trimetoxibenceno) usado para la síntesis se preparó en tres etapas a partir del ácido comercialmente disponible ácido (3,4,5-trimetoxifenil)acético. La reducción de ácido (3,4,5-trimetoxifenil)acético al alcohol, seguido de la oxidación de Dess-Martin, produjo el aldehído correspondiente que se condensó con el reactivo de Ohira-Bestmann para suministrar directamente el acetileno terminal 5-etinil-1,2,3-trimetoxibenceno. Este alquino participó en las reacciones de acoplamiento de Sonagashira con los derivados pirimidinilo para dar los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. Se descubrió que 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina inhibió ChDHFR con un valor de  $CI_{50}$  mejor que  $100 \mu M$  y TgDHFR con un valor de  $CI_{50}$  también mejor que  $100 \mu M$ . La extensión del anillo fenilo pareció incrementar las interacciones con la cavidad hidrófoba, específicamente con Ile 62 y Leu 67, como se predijo. Sin embargo, la extensión del fenilo también provocó una pérdida de interacciones lipófilas con Leu 25, Leu 33, y Phe 36 y creó una cavidad próxima a la posición C6 del anillo pirimidina. Esta área está ocupada normalmente por condensaciones de anillos secundarios en inhibidores potentes tales como MTX. Un análisis adicional del TMP acoplado y 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina también reveló un segundo espacio vacío próximo a Cys 113 dentro del sitio de unión.

Para los procedimientos de acoplamiento usando Flo98, se definieron los sitios activos de ambas proteínas como todos los residuos con un átomo que entra dentro de la esfera de  $11 \text{ \AA}$  alrededor del ligando cocrystalizado. El protocolo de cartografía ProtoMol automático dentro de Surflex-Dock exploró todo el sitio activo y se usó para fines de acoplamiento. El NADPH cocrystalizado se incluyó en la definición del sitio activo. Se acoplaron colecciones de los análogos usando Flo98 como se analizó previamente y también usando Surflex-Dock como un módulo Sybyl. Todos los resultados de acoplamiento se comprobaron para corregir la orientación como se define por las interacciones de enlaces de hidrógeno conservados entre el N1 protonado de la 2,4-diaminopirimidina y Asp 32. Las energías conformacionales resultantes también se comprobaron para conflictos estéricos y geometrías poco realistas.

### Ejemplo 5

#### Análisis y propiedades de los compuestos

##### HPLC

Las muestras (0,1 mg/ml en  $CHCl_3$  al 14 %,  $Na_2HPO_4$  10 mM, pH 6) se analizaron isocráticamente ( $CH_3CN$  al 4 %,  $Na_2HPO_4$  10 mM pH 6, 1,5 ml/min) usando una columna Chiral-AGP Chrom Tech (4,0 mm X 100 mm) y un Beckman Coulter System Gold HPLC con detector PDA.

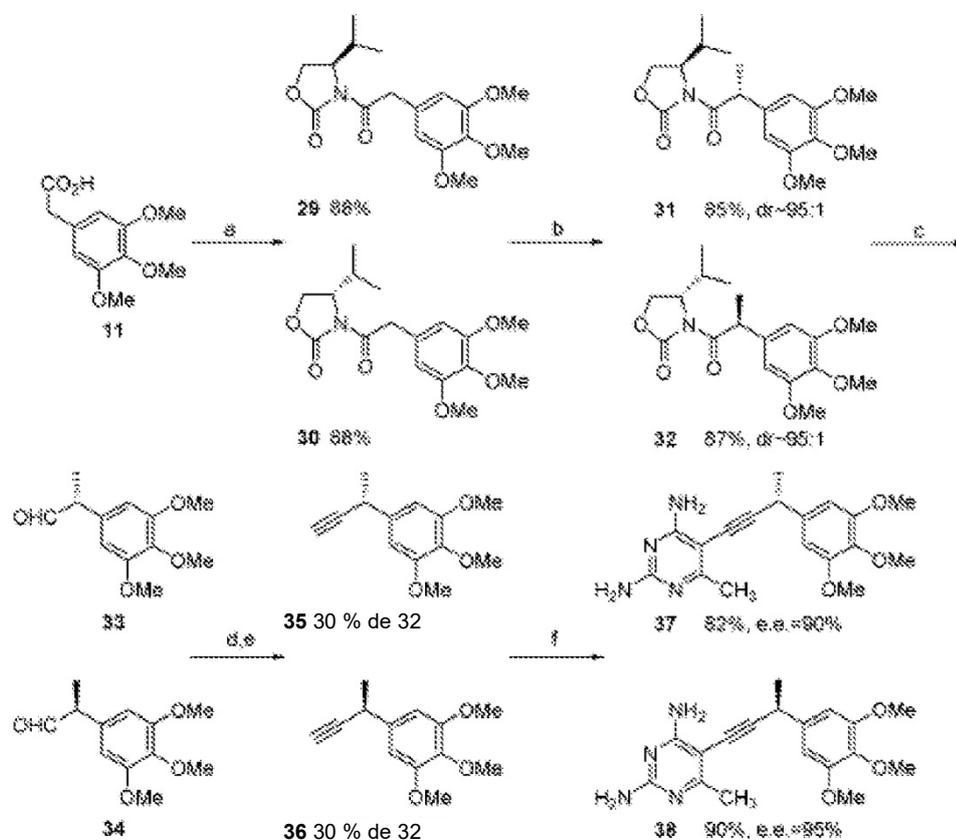
Se usó una combinación de Flo98 y Surflex-Dock con el entorno Sybyl para evaluar las puntuaciones de acoplamiento para sustituciones de metilo en la posición 6 del anillo pirimidina y ubicaciones propargilo en la 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina. Flo98 realiza una búsqueda de Monte Carlo para las mejores posturas de acoplamiento en una diana flexible y guarda un conjunto de complejos proteína: ligando con puntuaciones de energía asociadas. Surflex-Dock no se acopla en el sitio de unión sino que una diana de ProtoMol que se crea por sondeo del sitio activo con fragmentos moleculares pequeños. A continuación, los ligandos se fragmentan y se incorporan en el ProtoMol basándose en una función de puntuación empírica que representa los términos hidrófobos, polares, repulsivos, entrópicos y de solvatación.

La puntuación de acoplamiento de 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina con grupos metilo en las dos cavidades indicadas fue mayor que la del compuesto no sustituido 5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina. Debido a que Surflex-Dock no puede evaluar un compuesto racémico, se evaluaron ambos enantiómeros R y S del compuesto con un metilo en la posición de propargilo. Ambos aparecen igualmente viables en el análisis visual y tenían muchas de las mismas interacciones con los residuos cercanos. Todos los complejos presentaron el posicionamiento de 2,4-diaminopirimidina "correcto" dentro del sitio de unión, con enlaces de hidrógeno para Val 9, Val 10, Asp 32 y Thr 134.

La estructura de propargilo parecía ser superior a TMP para la colocación de los sustituyentes en estas cavidades, así como para el impacto sintético en la distribución conformacional mientras que se mostró computacionalmente que las interacciones entre la sustitución en C6 y el anillo arilo en la serie propargilo no eran significativas. Resultó posible extender el éxito anterior de las reacciones de acoplamiento de Sonagashira para instalar la sustitución en C6 de los inhibidores extendidos. El acoplamiento cruzado del derivado de acetileno 5-etinil-1,2,3-trimetoxibenceno con el derivado de yodopirimidina conocido 5-yodo-6-metilpirimidin-2,4-diamina (preparado a partir de 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina comercialmente disponible por aminación y yodación) proporcionó el derivado con metilo en C6 (es decir, 6-metil-5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina). Como se predijo tanto por el análisis visual del compuesto acoplado como por las puntuaciones de acoplamiento, este compuesto se mostró bueno contra ambas enzimas con valores de  $CI_{50}$  mejores de  $100 \mu M$  contra ChDHFR y TgDHFR, respectivamente.

La segunda cavidad vacante próxima al residuo Cys 113 en ChDHFR también se exploró empleando sustituciones en el puente de metileno de TMP. El TMP con metilo en C7 (rac) tiene un valor de  $CI_{50}$  de 340  $\mu$ M, y TMP con etilo en C7 (rac) mostró una mejora sobre TMP, con un valor de  $CI_{50}$  de 4 mM. La modificación de la estructura extendida de propargilo parecía ser una vía mejor para explotar esta cavidad, ya que la sustitución formaría potencialmente interacciones de mayor afinidad con Cys 113. También se exploraron tres sustituyentes diferentes (metilo, hidroxilo y metoxi) en la posición propargílica. Se prepararon los nuevos acetileno terminales para estos derivados, como racematos, de manera directa. La trimetoxiacetofenona comercialmente disponible se homólogo con el correspondiente aldehído a través de la condensación de Wittig e hidrólisis del éter enólico resultante.

Una homologación de Corey-Fuchs modificada proporcionó el acetileno racémico que se acopló con varios derivados de yodopirimidina (tales como 5-yodopirimidina-2,4-diamina y 5-yodo-6-metilpirimidina-2,4-diamina) para producir los análogos correspondientes. La instalación de un sustituyente hidroxilo o metoxi se pudo lograr de manera directa a partir del aldehído correspondiente (es decir, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído). Este se convirtió en el alcohol propargílico a través de la adición de acetileno, y a continuación los acoplamientos de Sonagashira estándar dieron los análogos 3-(2,4-diamino-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-in-1-ol y 3-(2,4-diamino-6-metilpirimidin-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-in-1-ol con un alto rendimiento. De forma alternativa, el alcohol se puede convertir en el correspondiente éter metílico (es decir, 1,2,3-trimetoxi-5-(1-metoxiprop-2-in-1-il)benzeno) en condiciones estándar y acoplarse de forma cruzada de manera análoga para suministrar pirimidinas 5-[3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina y 5-[3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina. De nuevo, como se predijo a partir de los complejos acoplados, el compuesto de propargilo sustituido con metilo, 6-metil-5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina, presentó una potencia muy buena con valores de  $CI_{50}$  mejores de 100  $\mu$ M contra ChDHFR y TgDHFR, respectivamente. Los compuestos de propargilo sustituidos en hidroxilo y metoxi también presentaron valores de  $CI_{50}$  mejores de 100  $\mu$ M. Ambos enantiómeros del derivado doblemente metilado 6-metil-5-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-in-1-il]pirimidin-2,4-diamina se exploraron en ensayos de inhibición de ChDHFR y TgDHFR. Para llevar a cabo la síntesis de los dos análogos enantiómeros, se realizó una alquilación asimétrica mediada por oxazolidinona de Evans (véase el esquema 20). La adición de dos oxazolidinonas de litio diferentes al anhídrido mixto derivado del ácido dio lugar a las imidas 29 y 30 que se pudieron alquilar para producir 31 y 32 con una diastereoselectividad bastante alta. Era lógico examinar los isómeros individuales en el centro estereogénico para determinar si uno de los enantiómeros era más activo que el otro.



Esquema 20

El diastereómero menor no se pudo retirar completamente durante la purificación y se llevó a las siguientes etapas. La reducción parcial de la imida con DIBAL-H produjo los aldehídos 33 y 34 que se homologaron de inmediato como

se describe en la síntesis racémica para dar los alquinos terminales 35 y 36. El acoplamiento cruzado con el derivado de yodopirimidina 5-yodo-6-metilpirimidina-2,4-diamina dio los dos enantiómeros 37 y 38 en un 90 y 95 % de ee, respectivamente, como se determinó por análisis de HPLC usando una columna de fase estacionaria quiral. Los dos enantiómeros presentaron ambas afinidades por las enzimas protozoicas con valores de  $CI_{50}$  inferiores a 100  $\mu$ M.

Los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento presentan una mejora en la potencia, así como una mejora en la eficiencia de ligando. El valor óptimo de  $CI_{50}$  para los compuestos anteriores fue de 13 nM dando todos los compuestos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento valores de  $CI_{50}$  mejores que 100  $\mu$ M.

#### Análisis general

Los espectros de  $^1H$  y  $^{13}C$  se registraron a 500 y 125 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Inova 500 de Varian. Todos los puntos de fusión están sin corregir. La espectrometría de masas de alta resolución se realizó en un espectrómetro Kratos MS-50 por el laboratorio de espectroscopía de masas de la Universidad de Washington. Los análisis elementales se proporcionaron por Atlantic Microlabs, Inc. Todos los reactivos se usaron directamente a partir de fuentes comerciales a menos que se indique de otro modo.

#### Procedimiento general para acoplamientos de Sonagashira

A un tubo sellado se le añadió la yodopirimidina (1,0 mmol). Se añadió DMF (5,0 ml) y la mezcla se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se añadió Pd-(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (49,0 mg, 0,07 mmol) seguido de CuI (13,3 mg, 0,07 mmol), Et<sub>3</sub>N (5,0 ml), y el arilacetileno (2,0 mmol). Se selló el tubo y se dispuso en un baño de aceite a 100 °C. La reacción se agitó a 100 °C durante 2 h y se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se retiró y el residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 30 g) usando MeOH al 2 % en CHCl<sub>3</sub> como eluyente para proporcionar los productos acoplados. Las muestras analíticas se prepararon por recristalización a partir de MeCN.

2,4-Diamino-5-yodopirimidina. A un matraz de fondo redondo de 100 ml secado a la llama se le añadió 2,4-diaminopirimidina (1,0 g, 9,08 mmol) en MeOH (30 ml) seguido de la adición gota a gota de ICl (30 ml, 29,06 mmol). La solución se agitó a 25 °C durante 15 h y después el disolvente se retiró a presión reducida. El aceite viscoso resultante se agitó en Et<sub>2</sub>O (40 ml) durante 45 min. El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 X 10 ml) para proporcionar la sal de HCl en forma de un sólido amarillo (3,14 g). La sal en bruto se suspendió en NaOH 1,0 N (100 ml) y se agitó a 25 °C durante 2 h. Los sólidos se filtraron, se lavó con agua (2 X 10 ml) y se secó para proporcionar 2,4-diamino-5-yodopirimidina como un polvo marrón (1,71 g, 80 %). Se preparó una muestra analítica por recristalización en MeCN para dar 2,4-diamino-5-yodopirimidina en forma de cristales incoloros: R<sub>f</sub> = 0,25 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); p<sub>f</sub> = 212-214 °C; RMN de  $^1H$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,92 (s, 1H), 6,40 (s, 2H), 6,10 (s, 2H); RMN de  $^{13}C$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  162,8, 162,7, 162,0, 61,2; HREI[M<sup>+</sup>] 235,9559 (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>IN<sub>4</sub> calculado: 235,9559); Anal. (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>IN<sub>4</sub>) C, H, N.

5-Etínil-1,2,3-trimetoxibenceno. A un matraz de fondo redondo de 50 ml secado a la llama se le añadió CBr<sub>4</sub> (2,54 g, 7,65 mmol). Se añadió DCM (20 ml) y se enfrió la solución a 0 °C. Se añadió Ph<sub>3</sub>P (4,01 g, 15,30 mmol) y se agitó la solución a 0 °C durante 15 min. Se añadió gota a gota 3,4,5-trimetoxibenzaldehído (1,0 g, 5,10 mmol) en DCM (6,0 ml). Se agitó la solución a 0 °C durante 5 min. Se retiró el disolvente a presión reducida, y se filtró el aceite resultante a través de un tapón de sílice y se lavó con Hex:EtOAc (9:1, 500 ml; 4:1, 500 ml). Se concentraron las capas orgánicas combinadas para dar la dibromo-olefina en bruto (2,31 g, 128 %), que se disolvió en THF (60 ml) y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota n-BuLi (13,1 ml, 19,68 mmol, 1,5 M) y se agitó la solución a -78 °C durante 30 min. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl saturado (10 ml) y se calentó la solución a temperatura ambiente. Se separaron las capas y se lavaron las capas orgánicas con salmuera (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 80 g) usando EtOAc al 10 % en hexanos como eluyente para proporcionar 5-etínil-1,2,3-trimetoxibenceno como un aceite incoloro (0,770 g, 79 %): R<sub>f</sub> = 0,30 (4:1, Hex:EtOAc); RMN de  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6,71 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,83 (s, 6H), 3,03 (s, 1H); RMN de  $^{13}C$  (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  153,1, 117,1, 109,4, 103,3, 83,8, 76,4, 61,0, 56,2, 56,1; HRFAB [M + Li] 199,0952 (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>Li calculado: 199,0946).

2,4-Diamino-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etínil)pirimidina Se dejó que 2,4-diamino-5-yodopirimidina (236 mg) reaccionara con 5-etínil-1,2,3-trimetoxibenceno (384 mg) como para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etínil)pirimidina como un polvo blanco (270 mg, 90 %): R<sub>f</sub> = 0,28 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); p<sub>f</sub> = 202-204 °C; RMN de  $^1H$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,94 (s, 1H), 6,90 (s, 2H), 6,37 (s, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,67 (s, 3H); RMN de  $^{13}C$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  163,4, 162,2, 159,4, 159,2, 152,8, 137,6, 118,6, 108,3, 108,2, 94,7, 89,8, 83,4, 60,2, 60,1, 56,0, 55,9; Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

(Z)-2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxistiril)pirimidina. (300 mg, 1,00 mmol) se dispuso en un matraz de agitación de 100 ml. Se añadió EtOH (30 ml), y la mezcla se agitó hasta que todos los sólidos se disolvieron. Se añadió Pd al 5 %/C (50 mg), y se dispuso la suspensión en un aparato de hidrogenación. Se dejó que la reacción se desarrollara a 45 psi H<sub>2</sub> durante 5 h. La mezcla se filtró a través de Celite y se lavó con EtOAc (15 ml). El disolvente se retiró y el residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 30 g) usando MeOH al 5 % en CHCl<sub>3</sub> como eluyente para

proporcionar (Z)-2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxiestiril)pirimidina en forma de un polvo blanco (100 mg, 33 %, 81 % borsm) que se recristalizó a partir de MeCN: Rf = 0,33 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH) ; pf = 175-177 °C; RMN de <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>) δ 7,69 (s, 1H), 6,63 (s, 2H), 6,47 (d, J) 11,9 Hz, 1H), 6,27 (d, J) 11,9 Hz, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,49 (s, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,67 (s, 6H); RMN de <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) δ 163,5, 163,3, 156,2, 154,3, 138,6, 134,0, 133,0, 122,6, 107,3, 106,4, 61,1, 56,4; HRESI [M + H] 303,1446 (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> calculado: 303,1457).

(E)-2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimetoxiestiril)pirimidina (45,0 mg, 0,149 mmol) se suspendió en THF seco (1,5 ml). Se añadió I<sub>2</sub> (4,0 mg, 0,0149 mmol) y la reacción se dejó en agitación a 23 °C durante 30 min, después de este tiempo todo el material estaba en solución. La solución roja se diluyó con THF (5,0 ml), y se añadió Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1,0 ml). Las capas se separaron y las capas orgánicas se lavaron con agua (5,0 ml) y salmuera (5,0 ml) y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se retiró y el residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 5,0 g) usando MeOH al 5 % en CHCl<sub>3</sub> como eluyente para proporcionar (E)-2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxiestiril)pirimidina en forma de un polvo amarillo (36 mg, 80 %) que se recristalizó a partir de MeCN: Rf = 0,28 (9:1, CHCl<sub>3</sub>: MeOH) ; pf = 182-184 °C; RMN de <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>) δ 8,09 (s, 1H), 7,07 (d, J ) 15,9 Hz, 1H), 6,85 (s, 2H), 6,82 (d, J) 15,9 Hz, 1H), 5,94 (s, 2H), 5,51 (s, 2H), 3,83 (s, 6H), 3,71 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 161,6, 161,3, 154,7, 153,4, 138,0, 132,9, 129,1, 119,8, 107,0, 103,4, 60,9, 56,1; HRESI [M + H] 303,1446 (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> calculado: 303,1457).

2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimetoxifenetil)pirimidina. (100 mg, 0,333 mmol) se dispuso en un matraz de agitación de 100 ml. Se añadió MeOH (20 ml), y la mezcla se agitó hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió Pd al 10 %/C (100 mg), y se dispuso la suspensión en un aparato de hidrogenación. Se dejó que la reacción se desarrollara durante 10 horas a 50 psi H<sub>2</sub>. El residuo sólido se filtró a través de Celite y se lavó con metanol (10 ml). El disolvente se retiró y el residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 10 g) usando MeOH al 10 % en CHCl<sub>3</sub> como eluyente para proporcionar 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxifenetil)pirimidina en forma de un polvo blanco (88,0 mg, 87 %) : Rf = 0,06 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 155-157 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,46 (s, 1H), 6,56 (s, 2H), 6,22 (s, 2H), 5,65 (s, 2H), 3,74 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,65-2,62 (m, 2H), 2,52-2,49 (m, 2H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 162,3, 162,0, 155,0, 152,6, 137,5, 135,5, 105,8, 105,8, 60,0, 55,6, 35,0, 29,1; Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

1,2,3-Trimetoxi-5-(prop-2-inil)benceno. A un matraz de 1 l secado a la llama se le añadió LiAlH<sub>4</sub> (3,85 g, 101,4 mmol). Se añadió Et<sub>2</sub>O (250 ml) y se enfrió la suspensión a 0 °C. Se añadió gota a gota ácido trimetoxifenilacético (15,3 g, 67,6 mmol) en Et<sub>2</sub>O (50 ml) y la reacción se dejó en agitación a 0 °C durante 1 h. Se añadió agua (50 ml) y la solución se calentó a temperatura ambiente. Los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con Et<sub>2</sub>O (3 X 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (25 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró para dar el alcohol en bruto (13,4 g, 93 %). El alcohol en bruto (13,3 g, 62,7 mmol) se disolvió en DCM (125 ml). Se añadió peryodinano de Dess-Martin (39,8 g, 94,0 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> saturado:Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturado (1:1, v:v, 20 ml) y se agitó la reacción durante 30 min. Se lavó la capa orgánica con salmuera (25 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró para dar aldehído 12 (13,1 g, 96 %). Los espectros fueron idénticos a los valores de la literatura.

El reactivo de Ohira-Bestmann (15,1 g, 78,6 mmol) se disolvió en MeOH (260 ml) y la reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió I<sub>2</sub> (11,0 g, 52,3 mmol) seguido de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15,9 g, 115,0 mmol). La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante 1 h y se calentó a temperatura ambiente, y se filtraron los sólidos. Las capas orgánicas se concentraron y el residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 500 g) usando EtOAc al 10 % en hexano como eluyente para proporcionar 1,2,3-trimetoxi-5-(prop-2-inil)benceno como un aceite incoloro (5,61 g, 52 %) : Rf = 0,20 (10 % EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,58 (s, 2 H), 3,86 (s, 6 H), 3,83 (s, 3H), 3,55 (s, 2 H), 2,22 (s, 1 H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 153,28, 136,75, 131,70, 104,89, 81,87, 70,69, 60,80, 56,06, 24,99; HREI[M+] 206,0943 (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> calculado: 206,0943).

2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)pirimidina. Se dejó que 2,4-Diamino-5-yodopirimidina (236 mg) reaccionara con 1,2,3-trimetoxi-5-(prop-2-inil)benceno (412 mg) al igual que para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)pirimidina como un polvo blanco (251 mg, 80 %) : Rf = 0,23 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = descompuesto por encima de 190 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,84 (s, 1H), 6,71 (s, 2H), 6,26 (s, 2H), 3,80 (s, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,63 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163,8, 162,2, 158,7 152,8, 136,0, 132,8, 105,2, 93,1, 90,1, 76,5, 60,1, 55,8, 25,6; Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

2,4-Diamino-5-yodo-6-metilpirimidina. A un recipiente a presión de acero de 100 ml se le añadió 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (4,00 g, 28,00 mmol). Se añadió una solución saturada de NH<sub>3</sub> en MeOH (40 ml) y se selló el recipiente. El recipiente a presión se dispuso en un baño de aceite a 160 °C y se calentó durante 15 h. El recipiente se enfrió a 0 °C y se abrió y el disolvente se retiró para dar la diaminopirimidina en bruto (4,4 g) como la sal de HCl. La sal en bruto se disolvió en MeOH (82,5 ml), y se añadió gota a gota ICl (82,5 ml) durante 50 min. La reacción se agitó a 25 °C durante 14 h y se retiró el disolvente. El aceite viscoso se agitó en Et<sub>2</sub>O (300 ml) durante 30 min. El sólido resultante se filtró y se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 X 20 ml) para dar la pirimidina yodada en bruto como un sólido amarillo (10,1 g). Los sólidos se suspendieron en NaOH 1,0 N (300 ml) y se agitó a 25 °C durante 2 h. Los sólidos se filtraron, se lavaron con agua (2 X 20 ml), y se dejó que se secaran para proporcionar 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina como un polvo blanco (5,6 g, 80 %). Se preparó una muestra analítica por recristalización en MeCN para dar 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina en forma de cristales incoloros: Rf = 0,25 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 154-156 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,38 (s, 2H), 6,09 (s, 2H), 2,24 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166,7,

163,0, 162,3, 63,8, 28,4; HREI[M+] 249,9715 (C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>IN<sub>4</sub> calculado: 249,9715); Anal. (C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>IN<sub>4</sub>) C, H, N.

5 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)-6-metilpirimidina. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con 1,2,3-trimetoxi-5-(prop-2-inil)benzeno (412 mg) al igual que para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)-6-metilpirimidina como un polvo blanco (280 mg, 85 %): Rf = 0,31 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 164-166 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,72 (s, 2H), 6,42 (s, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,76 (s, 6H), 3,63 (s, 3H), 2,24 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165,0, 164,3, 159,7, 152,8, 135,9, 132,8, 105,0, 96,3, 89,3, 75,8, 60,0, 55,8, 25,7, 21,7; HRFAB [M + Li] 335,1679 (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Li calculado: 335,1695).

10 5-(But-3-in-2-il)-1,2,3-trimetoxibenceno. A un matraz de fondo redondo de 250 ml secado a la llama se le añadió bromuro de metoximetiltrifenilfosfonio (10,28 g, 30,0 mmol). Se añadió THF (100 ml) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota n-BuLi (14,0 ml, 30,0 mmol, 2,2 M) y la solución se agitó a 0 °C durante 30 min. Se añadió gota a gota 3,4,5-trimetoxiacetofenona (5,26 g, 25,0 mmol) en THF (25 ml). La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min, y después se añadió agua (30 ml). Las capas se separaron, y la capa acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 X 20 ml).  
 15 Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, 50 g) usando EtOAc al 5 % en hexanos como eluyente para proporcionar el éter enólico (4,35 g, 73 %). El éter enólico (4,35 g, 18,26 mmol) se disolvió en THF (37,0 ml). Se añadió HCl concentrado (3,0 ml) y la solución se calentó a reflujo. La solución se agitó a reflujo durante 3 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua (10 ml), y las capas orgánicas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 50 g) usando EtOAc al 20 % en hexanos como eluyente para proporcionar 2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanal (3,82 g, 93 %): Los espectros fueron idénticos a los valores de la literatura. Se disolvió CBR<sub>4</sub> (8,47 g, 25,55 mmol) en DCM (150 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió Ph<sub>3</sub>P (13,4 g, 51,09 mmol) y se agitó la solución a 0 °C durante 5 min. Se añadió gota a gota 2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanal (3,82 g, 17,03 mmol) en DCM (20 ml). La  
 20 reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y después se vertió en Et<sub>2</sub>O enfriado con hielo (500 ml). Los sólidos se filtraron a través de Celite y se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 X 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron. El residuo se filtró a través de un tapón de sílice y se lavó con hexanos (100 ml) seguido de EtOAc al 10 % en hexanos (5 X 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron para dar el dibromuro intermedio (4,86 g, 75 %) que se usó directamente para la siguiente reacción. Se suspendió Mg (0,621 g, 25,57 mmol) en THF (2,0 ml). Se añadió 1,2-dibromoetano (0,442 ml, 5,12 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante 30 min. Se añadió gota a gota el dibromuro (4,86 g, 12,79 mmol) en THF (11,0 ml) y la solución se calentó a reflujo donde se agitó durante 1 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 150 g) usando EtOAc al 10 % en hexanos como eluyente para proporcionar 5-(but-3-in-2-il)-1,2,3-trimetoxibenceno como un aceite incoloro (1,97 g, 70 %): Rf = 0,29 (4:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,62 (s, 2H), 3,88 (s, 6H), 3,84 (s, 3H), 3,74-3,69 (m, 1H), 2,29 (d, J ) 2,7 Hz, 1H), 1,52 (d, J ) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 153,4, 138,5, 136,9, 104,0, 104,0, 87,2, 70,5, 61,0, 56,3, 32,1, 24,5; HRFAB [M + Li] 227,1243 (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>Li calculado: 227,1259).

40 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-inil)pirimidina. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodopirimidina (236 mg) reaccionara con 5-(but-3-in-2-il)-1,2,3-trimetoxibenceno (440 mg) como para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-3-in-2-il)pirimidina como un polvo amarillo (295 mg, 90 %): Rf = 0,29 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 220-222 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,85 (s, 1H), 6,75 (s, 2H), 6,28 (s, 2H), 3,99 (q, J ) 6,8 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,63 (s, 3H), 1,50 (d, J ) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163,7, 152,8, 139,3, 136,0, 104,2, 104,1, 97,9, 76,2, 60,0, 60,0, 55,9, 55,8, 32,3, 24,3; Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

45 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-inil)-6-metilpirimidina. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con 5-(but-3-in-2-il)-1,2,3-trimetoxibenceno (440 mg) como para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-3-in-2-il)-6-metilpirimidina como un polvo blanco (294 mg, 86 %): Rf = 0,29 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 191-193 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,76 (s, 2H), 6,19 (s, 2H), 4,02 (q, J ) 7,1 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,63 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,51 (d, J ) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167,0, 164,1, 161,0, 152,8, 139,4, 136,0, 104,0, 100,8, 88,6, 76,4, 60,0, 55,8, 32,5, 24,6, 22,5; Anal. (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

55 1-(3,4,5-Trimetoxifenil)prop-2-1-ol. A un matraz de fondo redondo de 250 ml secado a la llama se le añadió 3,4,5-trimetoxibenzaldehído (3,92 g, 20,0 mmol). Se añadió THF (40 ml) y se enfrió la solución a 0 °C. Se añadió gota a gota bromuro de etinilmagnesio (48,0 ml, 24,0 mmol, 0,5 M). La solución se agitó a 0 °C durante 30 min, se calentó a 25 °C, y se agitó durante 30 min. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl saturado (5,0 ml), y se separaron las capas.

60 Se extrajo la capa acuosa con Et<sub>2</sub>O (3 X 5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 100 g) usando EtOAc al 20 % en hexanos como eluyente para proporcionar 1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-in-1-ol como un aceite amarillo (4,22 g, 95 %): Rf = 0,25 (1:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,77 (s, 2H), 5,39 (dd, J ) 5,5, 2,0 Hz, 1H), 3,86 (s, 6H), 3,82 (s, 3H), 2,76 (d, J ) 5,9 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 153,4, 138,1, 135,9, 103,7, 83,6, 74,9, 64,5, 61,0, 56,2; HRFAB [M + Li] 229,1054 (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>- Li calculado: 229,1052).

65 3-(2,4-Diaminopirimidin-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-in-1-ol. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodopirimidina (236 mg) reaccionara con 1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-in-1-ol (444 mg) al igual que para el procedimiento general para

proporcionar 3-(2,4-diaminopirimidin-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-in-1-ol como un polvo amarillo (257 mg, 78 %): Rf = 0,12 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 203-205 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,84 (s, 1H), 6,83 (s, 2H), 6,34 (s, 2H), 6,01 (d, J) 5,6 Hz, 1H), 5,50 (d, J) 5,4 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,65 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163,8, 162,3, 158,2, 152,7, 138,3, 136,7, 109,3, 103,6, 96,3, 79,3, 63,4, 60,0, 55,8; Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) C, H, N.

3-(2,4-Diamino-6-metilpirimidin-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-in-1-ol. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con 1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-in-1-ol (444 mg) al igual que para el procedimiento general para proporcionar 3-(2,4-diamino-6-dimetilpirimidin-5-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-in-1-ol como un polvo amarillo (275 mg, 80 %): Rf = 0,12 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 174-176 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,85 (s, 2H), 6,27 (s, 2H), 5,98 (d, J) 5,6 Hz, 1H), 5,53 (d, J) 5,4 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,65 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,51 (d, J) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167,1, 164,3, 161,2, 152,7, 138,3, 136,7, 103,7, 99,1, 87,9, 79,5, 63,6, 60,0, 55,8, 22,5; HRFAB [M + Li] 351,1638 (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Li calculado: 351,1645).

1,2,3-Trimetoxi-5-(1-metoxiprop-2-inil)benceno. A un matraz de fondo redondo de 100 ml secado a la llama se le añadió NaH (0,240 mg, 6,0 mmol) que se había lavado previamente con pentano (3 x 15 ml) y se secó. Se añadió THF (48 ml) y se enfrió la suspensión a 0 °C. Se añadió gota a gota 1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-in-1-ol (1,11 g, 5,0 mmol) en THF (2,0 ml) y la reacción se agitó a 0 °C durante 25 min. Se añadió Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,571 ml, 6,0 mmol) y la reacción se agitó a 0 °C durante 20 min. Se añadió agua (10 ml), y se separaron las capas. Se extrajo la capa acuosa con Et<sub>2</sub>O (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 20 g) usando EtOAc al 10 % en hexanos como eluyente para proporcionar 1,2,3-trimetoxi-5-(1-metoxiprop-2-inil)benceno como un aceite incoloro (1,06 g, 90 %): Rf = 0,18 (4:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,75 (s, 2H), 5,01 (d, J) 2,2 Hz, 1H), 3,88 (s, 6H), 3,84 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 2,68 (d, J) 2,2 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 153,4, 138,2, 133,7, 104,4, 81,3, 76,0, 73,1, 61,0, 56,3, 56,2; HRFAB [M + Li] 243,1208 (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Li calculado: 243,1209).

2,4-Diamino-5-(3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)pirimidina. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodopirimidina (236 mg) reaccionara con 1,2,3-trimetoxi-5-(1-metoxiprop-2-inil)benceno (473 mg) al igual que para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)pirimidina como un polvo naranja (310 mg, 90 %): Rf = 0,31 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 184-186 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,91 (s, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,40 (s, 2H), 5,30 (s, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,66 (s, 3H), 3,35 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163,8, 162,3, 159,7, 152,8, 137,2, 134,8, 104,6, 92,6, 89,1, 81,9, 73,0, 60,0, 55,9, 55,4; Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) C, H, N.

2,4-Diamino-5-(3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)-6-metilpirimidina. Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con 1,2,3-trimetoxi-5-(1-metoxiprop-2-inil)benceno (473 mg) al igual que para el procedimiento general para proporcionar 2,4-diamino-5-(3-metoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-inil)-6-metilpirimidina como un polvo amarillo (335 mg, 93 %): Rf = 0,29 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); pf = 127-129 °C; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,84 (s, 2H), 6,37 (s, 2H), 5,34 (s, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,66 (s, 3H), 3,35 (s, 3H), 2,23 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167,6, 164,3, 161,1, 152,8, 137,2, 134,8, 104,6, 95,7, 87,5, 81,8, 73,1, 60,0, 55,8, 55,3, 22,4; HRFAB [M + Li] 359,1701 (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Li calculado: 359,1719). (R)-4-Isopropil-3-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona. A un matraz de fondo redondo de 100 ml secado a la llama se le añadió ácido 3,4,5-trimetoxifenilacético (2,10 g, 9,29 mmol). Se añadió THF (25 ml) seguido de Et<sub>3</sub>N (1,42 ml, 10,22 mmol). Se enfrió la solución hasta -78 °C. Se añadió gota a gota cloruro de pivaloilo (1,26 ml, 10,22 mmol) y la solución se calentó a 0 °C y se agitó durante 1 h. En un matraz de fondo redondo de 50 ml secado a la llama separado se añadió (R)-4-isopropiloxazolidin-2-ona (1,0 g). Se añadió THF (20 ml) y la solución se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota n-BuLi (6,83 ml, 9,29 mmol, 1,36 M) y la solución se agitó a -78 °C durante 15 min y después se calentó a 25 °C donde se agitó durante 15 min. La solución de organolitio se transfirió a la solución del anhídrido mixto por medio de una cánula a -78 °C. La reacción se agitó a -78 °C durante 15 min, se calentó a 0 °C, y se agitó durante 1 h. Se añadió agua (10 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 X 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 30 g) usando EtOAc al 25 % en hexanos como eluyente para proporcionar trimetoxifenilacetil)oxazolidin-2-ona como un aceite incoloro (2,30 g, 88 %): Rf = 0,28 (1:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,55 (s, 2H), 4,44-4,41 (m, 1H), 4,29-4,24 (m, 2H), 4,19 (dd, J) 9,0, 3,0 Hz, 1H), 4,12-4,07 (m, 1H), 3,82 (s, 6H), 3,80 (s, 3H), 2,36-2,30 (m, 1H), 0,87 (d, J) 6,8 Hz, 3H), 0,78 (d, J) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 171,2, 154,1, 153,2, 129,4, 106,7, 63,4, 60,9, 58,6, 56,2, 41,6, 28,4, 18,0, 14,7, 14,3; HRFAB [M + Li] 344,1686 (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>Li calculado: 344,1686).

(S)-4-Isopropil-3-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona. (S)-4-Isopropil-3-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona se sintetizó de manera análoga a trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona usando (S)-4-isopropiloxazolidin-2-ona. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 30 g) usando EtOAc al 25 % en hexanos como eluyente para proporcionar (S)-4-Isopropil-3-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona como un aceite incoloro (2,30 g, 88 %): Rf = 0,28 (1:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,54 (s, 2H), 4,44-4,41 (m, 1H), 4,29-4,24 (m, 2H), 4,19 (dd, J) 9,0, 3,0 Hz, 1H), 4,12-4,07 (m, 1H), 3,82 (s, 6H), 3,80 (s, 3H), 2,36-2,30 (m, 1H), 0,87 (d, J) 6,8 Hz, 3H), 0,78 (d, J) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 171,2, 154,1, 153,2, 129,4, 106,7, 63,4, 60,9, 58,6, 56,2, 41,6, 28,4, 18,0, 14,6, 14,3; HRFAB [M + Li] 344,1700 (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>Li calculado: 344,1686).

(R)-3-((R)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona. A un matraz de fondo redondo de 200 ml secado a la llama se le añadió trimetoxifenil)acetil)oxazolidin-2-ona (2,77 g, 8,21 mmol). Se añadió THF (85 ml) y se

enfrió la solución a -78 °C. Se añadió gota a gota LHMDs (12,5 ml, 12,32 mmol, 1,0 M), y la reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 1 h. Se añadió Mel (1,54 ml, 24,63 mmol) y la solución se agitó a -78 °C durante 1 h. Después, la solución se calentó a 0 °C durante 1 h y se desactivó con NH<sub>4</sub>Cl sat. (10 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 X 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 25 g) usando EtOAc al 25 % en hexanos como eluyente para proporcionar (R)-3-((R)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona como un aceite incoloro (2,44 g, 85 %, 95:1 d.r): Rf = 0,37 (1:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,56 (s, 2H), 5,07 (q, J) 7,1 Hz, 1H), 4,14-4,13 (m, 2H), 3,81 (s, 6H), 3,77 (s, 3H), 2,42-2,36 (m, 1H), 2,12 (s, 1H), 1,47 (d, J) 7,1 Hz, 3H), 0,88 (t, J) 7,1 Hz, 6H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 174,6, 153,1, 135,8, 105,2, 63,1, 60,8, 59,1, 56,1, 42,8, 28,6, 19,7, 18,0, 14,7; HRFAB [M + Li] 358,1852 (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>Li calculado:358,1842).

(S)-3-((S)-2-(3,4,5-Trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona. Se preparó (S)-3-((S)-2-(3,4,5-Trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona de manera análoga a 31. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 25 g) usando EtOAc al 25 % en hexanos como eluyente para proporcionar (S)-3-((S)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona como un aceite incoloro (2,08 g, 87 %, 95:1 d.r): Rf = 0,37 (1:1, Hex:EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,58 (s, 2H), 5,09 (q, J) 7,1 Hz, 1H), 4,17-4,15 (m, 2H), 3,83 (s, 6H), 3,80 (s, 3H), 2,45-2,39 (m, 1H), 2,15 (s, 1H), 1,49 (d, J) 7,1 Hz, 3H), 0,90 (t, J) 7,1 Hz, 6H); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 174,7, 153,2, 135,9, 105,3, 63,2, 60,9, 59,2, 56,2, 42,9, 28,6, 19,8, 18,1, 14,8; HRFAB [M + Li] 358,1856 (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>Li calculado: 358,1842).

Procedimiento General para la síntesis de R y S 1,2,3-trimetoxi-5-(1-metilprop-2-in-1-il)benzeno. A un matraz de fondo redondo de 200 ml secado a la llama se añadió la oxazolidinona deseada (1,0 equiv). Se añadió DCM (0,1 M), y la solución se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota DIBAL-H (2,0 equiv), y la reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 2 h. Se añadió NH<sub>4</sub>-Cl saturado (20 ml) y la solución se calentó a temperatura ambiente. Los sólidos se separaron por filtración y se lavó con DCM (3 X 5 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 X 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Se tomó una medida de RMN del material en bruto, y el espectro coincidió con el del aldehído racémico (18). El material en bruto se usó sin purificación adicional. Se disolvió CBr<sub>4</sub> (1,5 equiv) en DCM (0,1 M) y se enfrió a 0 °C. Se añadió Ph<sub>3</sub>P (3,0 equiv) y la solución se agitó a 0 °C durante 5 min. Se añadió gota a gota el aldehído en bruto (1,0 equiv) en DCM (5,0 ml). La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante 30 min y después se vertió en Et<sub>2</sub>O enfriado con hielo (200 ml). La reacción se filtró a través de gel de sílice y se lavó con hexanos (100 ml) seguido de EtOAc al 25 % en hexanos (300 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron a presión reducida. El material en bruto se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se suspendió Mg (2,0 equiv) en THF (1,0 ml). Se añadió dibromoetano (0,4 equiv), y la suspensión se agitó a 25 °C durante 30 min. Se añadió gota a gota el dibromuro en bruto (1,0 equiv) en THF (6,0 ml), y la reacción se calentó a reflujo durante 30 min. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para proporcionar los respectivos acetilenos enantioenriquecidos. Se tomaron espectros de RMN, y los espectros coincidieron con el del acetileno racémico (19).

2,4-Diamino-5-((R)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-inil)-6-metilpirimidina. (R)-3-((R)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona (2,44 g, 6,94 mmol) se sometió al procedimiento general para proporcionar R-1,2,3-trimetoxi-5-(1-metilprop-2-in-1-il)benzeno (460 mg, 30 %). Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con R-1,2,3-trimetoxi-5-(1-metilprop-2-in-1-il)benzeno (290 mg) como para el procedimiento de acoplamiento de Sonagashira general para proporcionar 2,4-diamino-5-((R)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-inil)-6-metilpirimidina como un polvo marrón (280 mg, 82 %, 90 % ee): Rf = 0,29 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,76 (s, 2H), 6,19 (s, 2H), 4,02 (q, J) 7,1 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,63 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,51 (d, J) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166,9, 164,1, 160,9, 152,8, 139,4, 135,9, 104,0, 100,7, 88,6, 76,4, 60,0, 55,8, 32,5, 24,7, 22,5; HRFAB [M + Li] 349,1851 (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Li calculado: 349,1851).

2,4-Diamino-5-((S)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)but-1-inil)-6-metilpirimidina (38). (S)-3-((S)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona (1,66 g, 4,72 mmol) se sometió al procedimiento general para proporcionar S-1,2,3-trimetoxi-5-(1-metilprop-2-in-1-il)benzeno (312 mg, 30 %). Se dejó que 2,4-diamino-5-yodo-6-metilpirimidina (250 mg) reaccionara con S-1,2,3-trimetoxi-5-(1-metilprop-2-in-1-il)benzeno (290 mg) como para el procedimiento de acoplamiento de Sonagashira general para proporcionar 38 como un polvo amarillo (308 mg, 90 %, 95 % ee): Rf = 0,29 (9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH); RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,76 (s, 2H), 6,19 (s, 2H), 4,02 (q, J) 7,1 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,63 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,51 (d, J) 7,1 Hz, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167,0, 164,1, 161,0, 152,8, 139,4, 136,0, 104,0, 100,8, 88,6, 76,4, 60,0, 55,8, 32,5, 24,6, 22,5; HRFAB [M+ Li] 349,1851 (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Li calculado: 349,1851).

## Ejemplo 6

### Química y modelado

Análisis estructural de ChDHFR y hDHFR.

Basándose en la estructura de ChDHFR-TS, se desarrolló una serie novedosa de inhibidores de DHFR definidos por

un enlazador de propargilo entre un anillo 2,4-diaminopirimidina y un anillo arilo. A través de estos esfuerzos, se identificó un ligando altamente eficaz (compuesto X) con una constante de inhibición ( $CI_{50}$ ) de 38 nM y peso molecular de 342 Da. Posteriormente se desarrolló y se analizó una serie de análogos de propargilo de segunda generación inspirados por el análisis estructural que no sólo mantuvieron niveles altos de potencia contra la enzima parasitaria sino que también mostraron niveles extremadamente altos de selectividad. También se desarrolló y se analizó una tercera generación de análogos heterocíclicos de inhibidores enlazados a propargilo que presentan niveles altos de actividad y selectividad.

Análisis de las interacciones de los compuestos de bifenilo con ChDHFR.

Las conformaciones acopladas de ambas series de 5' y 4' de los compuestos de bifenilo presentó un incremento sustancial en los contactos lipófilos entre el ligando y el receptor sobre UCP111A. Los resultados mostraron que los análogos no sustituidos y metilsustituidos en ambas familias son más potentes que el compuesto principal inicial, UCP111A, y son más potentes que los análogos de bifenilo con sustituciones de isopropilo.

El análisis computacional de los compuestos acoplados en ChDHFR explica la clara preferencia por los compuestos sustituidos en 5' en lugar de los compuestos sustituidos en 4'. La ubicación preferente del 3'-OMe en el primer anillo bifenilo se dirige hacia arriba en la abertura del sitio activo a la cavidad formada por Leu 25, Gln 24, Gly 23 y Ser 61, con una oportunidad de unión de hidrógeno usando el esqueleto NH de Leu 25. También hay una interacción lipófila con las porciones alquilo de Leu 25 y Gln 24. Con el 3'-OMe en la orientación preferente, el segundo anillo fenilo se proyecta hacia abajo en la abertura en la serie de 5', o bien directamente fuera del sitio activo en la serie de 4' con contactos de ChDHFR mínimos. Como se ve en la figura 9, la región en la abertura del sitio activo es lipófila, y puede tener varios contactos con el segundo fenilo en la serie de 5', pero sólo tendría contacto limitado con el segundo anillo fenilo en la serie de 4'.

Curiosamente, un análisis de acoplamiento de los enantiómeros de UCP111D mostró una tendencia invertida para los resultados del ensayo de ChDHFR. El espacio alrededor de la región sustituida con propargilo está dictada en gran medida por Ile 62, que no explora mucho espacio conformacional a través del conjunto, pero tiene espacio para girar hacia la parte posterior del sitio activo. En la ubicación cristalizada, el grupo iso-metilo se proyecta en el sitio activo, creando una única cavidad lipófila por encima del residuo. En este caso, sólo hay espacio para que el metilo de propargilo se dirija a una región por encima del iso-metilo, dictando así la estereoquímica errónea. Si Ile 62 se hace girar hacia la parte posterior del sitio activo, habría espacio suficiente para que el metilo de propargilo se acople en la conformación hacia arriba o bien hacia abajo. Para probar esta teoría, se alteró Ile 62 usando un diccionario de Lovell de ángulos para volver a proyectar en la cavidad. Esta única estructura se usó para el acoplamiento, y mostró que la configuración *R* en el centro propargílico era preferente.

Análisis de las interacciones de los compuestos de bifenilo con hDHFR.

Los compuestos de bifenilo se acoplaron en DHFR humana usando el miembro del conjunto con la abertura 'más amplia' en el sitio activo, como se define por medidas comparativas en varios puntos. Este miembro del conjunto alcanzó un promedio de 0,25 Å más ancho que la estructura cristalina. Se eligió esta estructura ya que se presentaba el espacio más disponible para sustituciones voluminosas y el caso más difícil para lograr la selectividad. También presentó la oportunidad para explorar la flexibilidad de potencial de esta región.

Se observó una clara tendencia tanto en los resultados de acoplamiento como de ensayo para las series de 5' y 4' en hDHFR. Como se ve en la figura 10, la abertura del sitio activo en hDHFR es sustancialmente más estrecha y menos lipófila que ChDHFR. El bucle PEKN se proyecta perpendicularmente desde el receptor en una conformación de tipo disco, creando una hendidura por debajo del bucle. Esta región es fácilmente accesible a la familia sustituida en 5' en comparación con la familia de sustituida en 4'. UCP111D prefiere una orientación con el primer fenilo situado más arriba de la cavidad que UCP111A, proporcionando contactos lipófilos equivalentes. Al sustituir el segundo anillo fenilo, se desplaza la preferencia hacia la hendidura más lipófila bajo el anillo, produciendo un incremento sustancial de contactos lipófilos. La hendidura es un ajuste estrecho para las sustituciones de metilo pero está equilibrado por un incremento en los contactos lipófilos. Estas orientaciones también preservan el 3'-OMe en la ubicación "superior" ideal, imitando los contactos hechos con UCP111A 3'-OMe.

La serie de 4' presenta un modo diferente de unión. Para que se oriente correctamente la región de pirimidina y propargilo, el resto bifenilo necesita proyectarse directamente fuera de la cavidad, como con ChDHFR. Sin embargo, esta región se ve obstaculizada sustancialmente en hDHFR entre el bucle PEKN y la pared de receptor opuesta. Las orientaciones en la figura 10 son las posturas computacionalmente preferentes, pero presentan impedimento estérico sustancial. El análogo sustituido con di-metilo (mostrado en azul) prefiere una orientación con el 3'-OMe apuntando hacia abajo para limitar la interferencia estérica. Esta orientación también coloca el metilo de propargilo en una orientación más arriba en la cavidad con menores contactos, representando fácilmente la clara tendencia en la disminución de la afinidad. Se exploraron muchas orientaciones en la serie de 4', pero no se descubrió ninguna que se pudiera beneficiar de la hendidura por debajo del bucle PEKN preservando al mismo tiempo el 3'-OMe y la orientación del metilo de propargilo. Es probable que la flexibilidad de hDHFR que puede alojar el volumen estérico creciente de la serie de 5' por debajo del anillo PEKN no se extienda a las regiones en las que se proyectaría la serie

de 4', o al menos no de manera que pudiera alojar las conformaciones necesarias para alta afinidad.

Por sondeo del espacio flexible en la abertura del sitio activo en hDHFR es evidente que existe una flexibilidad claramente para explicar las sustituciones de metilo en la serie de UCP111Dx, especialmente en la región alrededor de y por debajo del bucle PEKN. Sin embargo, esta flexibilidad es limitada, ya que el bucle no se puede mover lo suficiente para alojar el volumen de los grupos di-isopropilo de UCP111D26IPr. Se prevé que esta flexibilidad limitada será importante para explicar los esquemas de diseño de hDHFR en el futuro.

*Análisis de las interacciones de análogos heterocíclicos de análogos enlazados a propargilo con SaDHFR: NADPH.*

La comparación de las estructuras de DHFR de *S. aureus*:NADPH:**142** y DHFR de *S. aureus*:NADPH:**140** muestra cambios mínimos en la orientación de los tres anillos arilo presentes en ambos inhibidores. Sin embargo, una diferencia importante que explica la mejora de 18 veces en la potencia para el compuesto **142** contra DHFR de *S. aureus* es la presencia de un enlace de hidrógeno (3,5 Å) entre el sustituyente 2'-metoxi en el compuesto **142** y el grupo hidroxilo de Ser 49, una interacción que se impide con el 3'-metoxi en el compuesto **140**.

La comparación de las estructuras de DHFR de *S. aureus*:NADPH:**148** y DHFR de *S. aureus*:NADPH:**140** (figura 15C) revela una reorientación considerable de las regiones hidrófobas de la serie piridilo con relación a los análogos de bifenilo originales. De hecho, un enantiómero diferente de piridina **148** cristaliza preferentemente con relación al enantiómero observado con **140**. Esta nueva configuración fuerza un cambio en la conformación para el anillo nicotinamida de NADPH para mantener el apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , así como un cambio en la conformación de Ile 50 que interacciona con el anillo arilo proximal. La solvatación de estabilización del nitrógeno de piridilo en la abertura del sitio activo impulsa la reorientación del compuesto **148** con relación al compuesto **140**. Una consecuencia de esta reorientación es la disminución de contacto entre los anillos B y C y los residuos del sitio activo, que se refleja en la ligera atenuación en la inhibición enzimática.

#### Ejemplo 7

#### Evaluación biológica de ChDHFR y hDHFR

Se evaluaron los compuestos en ensayos enzimáticos espectrofotométricos usando ChDHFR-TS y hDHFR. Se midieron las constantes de inhibición ( $CI_{50}$ ) (véase la tabla 4). El compuesto principal, X, tiene una constante de inhibición de 38 nM y una selectividad modesta (8 veces). Todos los compuestos de bifenilo son más potentes que el compuesto principal inicial X y presentan una mayor selectividad para la enzima patógena. El compuesto racémico más potente, D(*rac*), un derivado de 5'-bifenilo, también es el más selectivo de los compuestos racémicos (944 veces). El enantiómero R individual de este análogo de 5'-bifenilo es el más potente (1,1 nM) y el más selectivo (1273 veces) de todos los compuestos conocidos probados contra la enzima DHFR de *Cryptosporidium*. Las abreviaturas de compuestos en la tabla 4 se refieren a los siguientes compuestos:

111A: Compuesto X; D (*rac*): forma racémica de 5-[3-(5-metoxi-bifenil-3-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; D6M: 5-[3-(5-metoxi-6'-metilbifenil-3-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; D26M: 5-[3-(5-metoxi-2'6'-dimetilbifenil-3-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; D26I: 5-[3-(5-metoxi-2'6'-diisopropilbifenil-3-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; F: 5-[3-(3-metoxi-bifenil-4-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; F2M: 5-[3-(3-metoxi-2'-metilbifenil-4-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; F26M: 5-[3-(3-metoxi-2'6'-dimetilbifenil-4-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; F26I: 5-[3-(3-metoxi-2'6'-diisopropilbifenil-4-il)but-1-in-1-il]-6-metilpirimidin-2,4-diamina; D(R): enantiómero R de D; y D(S): enantiómero S de D.

Tabla 4: Potencia inhibidora y selectividad de los ligandos de DHFR (valores de  $CI_{50}$  en nM)

Compuesto	$CI_{50}$ (ChDHFR) (nM)	$CI_{50}$ (hDHFR) (nM)	Proporción de selectividad ( $CI_{50}$ ChDHFR/ $CI_{50}$ hDHFR)
111A	169 ± 6	1380 ± 20	8
D ( <i>rac</i> )	1,8 ± n.d.	1700 ± 10	944
D6M	2,1 ± 0,3	1360 ± 50	648
D26M	2,1 ± 0,5	1250 ± 6	595
D26I	10 ± n.d.	7200 ± 150	720
F	19 ± 3	1420 ± 12	75
F2M	36 ± 0,6	2770 ± 59	77
F26M	7,4 ± 1,9	3370 ± 15	455
F26I	16 ± n.d.	4200 ± 0,1	262
D (R)	1,1 ± n.d.	1360 ± 26	1273
D (S)	30 ± n.d.	1380 ± 26	46
<i>n.d.</i> - no determinado			

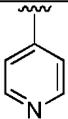
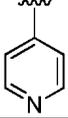
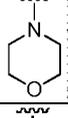
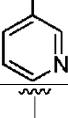
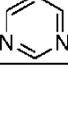
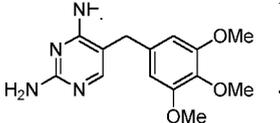
Se evaluaron los análogos heterocíclicos de los inhibidores enlazados a propargilo en los análogos de tercera

generación en ensayos de inhibición enzimática, se evaluaron para la inhibición de *S. aureus* y *S. pyogenes*, y se evaluaron para toxicidad de células de mamífero. Las tablas 5 y 6 resumen la actividad biológica de estos inhibidores enlazados a propargilo heterocíclicos en comparación con análogos de bifenilo y TMP.

5

Tabla 5

Número	Ar	R <sub>6</sub>	R <sub>P</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	Cl <sub>50</sub> /nM			Selectividad	
						Sa <sup>a</sup>	Sp <sup>a</sup>	humano <sup>a</sup>	(h/Sa) <sup>b</sup>	(h/Sp) <sup>b</sup>
140		Me	Me	H	OMe	42 ± 2	190 ± 15	750 ± 6	18	4
141		Me	Me	H	Ome	410 ± 36	350 ± 44	1400 ± 15	3	4
Número	Ar	R <sub>6</sub>	R <sub>P</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	Cl <sub>50</sub> /nM			Selectividad	
						Sa <sup>a</sup>	Sp <sup>a</sup>	humano <sup>a</sup>	(h/Sa) <sup>b</sup>	(h/Sp) <sup>b</sup>
142		Et	H	Ome	H	2,4 ± 0,2	5,9 ± 0,2	300 ± 10	125	51
143		Et	H	H	H	28 ± 1,7	26 ± 1,7	290 ± 36	10	11
144		Et	H	H	Ome	59 ± 2,3	52 ± 1,7	140 ± 1,0	2,4	3
145		Me	Me	Ome	H	75 ± 4	23 ± 1,5	97 ± 10	1,3	4
146		Et	Me	Ome	H	67 ± 5,5	26 ± 2,5	100 ± 10	1,5	4
147		Me	Me	H	Ome	26 ± 2	160 ± 9	1500 ± 8	58	9,4
148		Et	Me	H	Ome	19 ± 1	180 ± 19	1300 ± 11	68	7,2
149		Et	H	Ome	H	21 ± 1,0	19 ± 1,3	330 ± 12	16	17

150		Et	H	H	Ome	12 ± 2,4	28 ± 4,0	61 ± 5,7	5	2
151		Et	H	H	H	20 ± 0,5	30 ± 1,7	520 ± 23	26	17
152		Me	Me	H	Ome	29 ± 2	26 ± 4	400 ± 40	14	15
154		Et	H	H	H	33 ± 0,5	47 ± 4,6	290 ± 15	9	6
155		Et	H	H	H	35 ± 1,1	23 ± 1,2	160 ± 13	5	7
TMP						23	13000	198000	8600	15

Se informa de los valores de  $Cl_{50}$  contra las enzimas DHFR en nM y representan el promedio de al menos tres medidas. <sup>b</sup> Se calcula la selectividad como  $Cl_{50}$  (humano)/ $Cl_{50}$  (patógeno).

Tabla 6: Evaluación de la actividad antibacteriana y de citotoxicidad de antifolatos enlazados a propargilo

N.º comp.	CIM	CIM	$Cl_{50}$	$Cl_{50}$	Selectividad <sup>c</sup>	Selectividad
	SARM <sup>a</sup>	<i>S. pyogenes</i>	MCF-10 <sup>b</sup>	HepG2	SARM	<i>S. pyogenes</i>
140	5,76	0,097	47	ND	8	484
141	0,71	0,024	55	ND	77	2,292
142	0,18	0,006	67	ND	372	11,167
143	0,71	0,04	32	ND	45	842
144	0,08	0,33	199	ND	2500	603
145	0,716	0,04	38	94	53	950
146	0,744	0,08	54	77	72	675
147	0,09	0,012	220	233	2444	18,333
148	0,09	0,012	85	171	944	7083
149	0,01	0,09	217	199	>20.000	3,867
150	0,045	0,04	409	465	9,089	10,225
151	0,041	0,04	475	>500	11,585	11,875
152	2,9	0,024	462	494	159	19,250
154	0,041	0,08	>500	>500	>20.000	>20.000
155	0,15	0,019	>500	ND	3,333	26,316
TMP	0,625	0,6	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup>Se informa de los valores de CIM para SARM y *S. pyogenes* en µg/ml. Se informa de los valores de  $Cl_{50}$  para MCF-10 y HepG2 en µM. Los valores de selectividad se calculan como  $Cl_{50}$  (MCF10)/CIM (patógeno).  
ND: no determinado

## 5 Ensayos de inhibición enzimática

Se realizaron ensayos de inhibición enzimática realizando un seguimiento de la tasa de oxidación de NADPH por la enzima DHFR a una absorbancia de 340 nm. Se realizaron los ensayos en presencia de concentraciones de saturación de NADPH y se iniciaron con dihidrofolato. Se completaron todos los ensayos a 25 °C en un tampón que contenía TES 20 mM pH 7,0, KCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 0,5 mM y 1 mg/ml de BSA. Se midió la inhibición al menos tres veces con concentraciones de inhibidor cercanas al valor de  $Cl_{50}$  y se informa del valor de  $Cl_{50}$  promedio con una desviación estándar.

*Evaluación de la actividad antibacteriana*

Se evaluaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para *S. aureus* 13709 y *Streptococcus pyogenes* usando un enfoque de microvaloración de caldo basado en patrones de CLSI y el uso del indicador colorimétrico Alamar Blue. Para las pruebas de susceptibilidad, se suspendieron 10 µl de solución madre de glicerol en un cultivo en matraz agitador de 10 ml de caldo Isosensitest químicamente definido (Oxoid) complementado con glucosa al 2 % p/v. Se diluyó una muestra del cultivo en matraz de agitación a  $1 \times 10^6$  células/ml en el medio y se añadió a placas de prueba de 96 pocillos (100 µl por pocillo) que contenían los compuestos de prueba dosificados en DMSO (2 µl). Después de un periodo de incubación (30 °C) determinado a partir del tiempo de duplicación específico para la cepa, se añadió una solución acuosa de resazurina al 0,03 % p/v (10 µl) y se dejó que las placas se incubaran; a continuación, se puntuó cada pocillo para reducción del colorante. Se tomó el valor de CIM como la concentración más baja del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento de modo que se observe una reducción de menos de un 1 % de resazurina ( $\lambda_{\text{máx}}$  570 nm) a resorufina ( $\lambda_{\text{máx}}$  600 nm).

15 *Evaluación de la toxicidad de células de mamífero*

Se mantuvieron líneas celulares adherentes en medio esencial mínimo de Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) con glutamina 2 mM y solución salina equilibrada de Earle (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.) ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y suero bovino fetal al 10 %. El suero bovino fetal usado en estos ensayos fue muy coincidente en todo. Se mantuvieron todos los cultivos en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificada a 37 °C, se les renovó el medio dos veces por semana y se subcultivaron por tripsinización y resuspensión en una proporción de 1:5 cada semana. Se realizaron ensayos de toxicidad entre los pasos 10-20. Se midió la toxicidad del compuesto diana incubando el compuesto de prueba con las células durante 4 h, lavando las células y finalmente tratando las células con Alamar Blue. Después de 12-24 h, se midió la fluorescencia del colorante reducido. Se ajustó la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del compuesto de prueba a la ecuación de Fermi, usando análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal, para estimar los valores de CI<sub>50</sub>.

30 *Evaluación de antifolatos con sustituyentes piridilo para actividad antibacteriana*

La evaluación de estos nuevos inhibidores de la serie de antifolato enlazado a propargilo contra los patógenos diana revela que esta serie incluye agentes antibacterianos muy potentes. En concreto, los compuestos que contienen piridilo poseen valores de CIM por debajo de 0,1 µg/ml tanto contra SARM como *S. pyogenes*; varios compuestos poseen actividad superior en comparación con TMP.

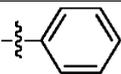
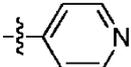
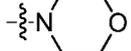
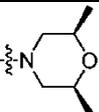
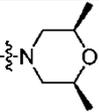
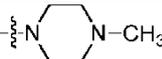
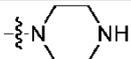
La serie heterocíclica de antifolatos no solo son agentes antibacterianos potentes sino que también poseen una citotoxicidad mínima cuando se evalúan contra dos líneas de células de mamífero, MCF-10 y HepG2. Sorprendentemente, el incremento en la actividad antibacteriana de la serie heterocíclica no está vinculado a la toxicidad de células de mamífero, a pesar de los niveles inferiores de selectividad enzimática (tabla 5) en estos derivados. Aunque el origen de la citotoxicidad reducida no está claro, una posibilidad atractiva es que los compuestos se fijan en el lisosoma. Se ha demostrado que los compuestos débilmente básicos con un valor de clogP mayor que 2 están sujetos a atrapamiento iónico en el entorno ácido del lisosoma. Como los análogos que contienen piridilo poseen un nitrógeno básico adicional relativo a la serie de bifenilo, pueden tener una mayor propensión a acumularse en el lisosoma, minimizando por lo tanto la inhibición de la DHFR de mamífero citosólica. De hecho, los compuestos con un bifenilo en la posición de anillo C muestran un mayor grado de citotoxicidad con valores de CI<sub>50</sub> entre 32 a 67 µM. De forma interesante, previamente se ha informado de la fijación lisosomal de antifolatos como un mecanismo de resistencia en la quimioterapia de cáncer.

50 *Perfiles contra cepas aisladas clínicas de SARM*

Como SARM ha evolucionado a nivel mundial en una plétora de cepas con fenotipos variables, es importante evaluar los efectos de los compuestos prometedores contra una variedad de cepas clínicamente relevantes. Se seleccionaron seis antifolatos enlazados a propargilo (139, 140, 141, 147, 148, 152, 153, 156-159) con la actividad antibacteriana más fuerte contra *S. aureus* para una evaluación adicional contra nueve cepas aisladas clínicas (tabla 7). De estas cepas aisladas una cepa es resistente a TMP-SXT, dos cepas representan USA300 CA-SARM, tres cepas representan USA100 HA-SARM, una cepa es HA-SARM, y dos cepas son *S. aureus* de intermedio de vancomicina (VISA; Mu3 y Mu50). Los efectos antibacterianos de los compuestos enlazados a propargilo se compararon con los efectos de vancomicina y controles TMP:SMZ. En todas las nueve cepas, la actividad antibacteriana de los antifolatos enlazados a propargilo superó la actividad de vancomicina. En ocho cepas, con la excepción de una cepa USA100 HA-SARM, la actividad antibacteriana de los antifolatos enlazados a propargilo también superó la de TMP:SMZ.

También se evaluaron los análogos heterocíclicos de los inhibidores enlazados a propargilo de los análogos de tercera generación para determinar su capacidad para inhibir CgDHFR y hDHFR y su capacidad para inhibir el crecimiento de *C. glabrata*. La tabla 7 resume la actividad biológica de estos inhibidores enlazados a propargilo heterocíclicos en comparación con inhibidores de bifenilo.

Tabla 7

ID del compuesto	Anillo	R	Cl <sub>50</sub> (CgDHFR) (nM)	Cl <sub>50</sub> (hDHFR) (nM)	Selectividad	CIM (Cg) (µg/ml)
139		Me	7,3 ± 1,8	1700 ± 10	230 ± 60	11
140		Me	0,55 ± 0,3	750 ± 6	1400 ± 750	3,1
141		Me	0,6 ± 0,3	1410 ± 15	2400 ± 1200	1,5
147		Me	97 ± 9	1500 ± 83	15 ± 2	1,4
148		Et	89 ± 8	1300 ± 11	15 ± 1	1,5
152		Me	20 ± 3	400 ± 40	20 ± 4	12
153		Et	22 ± 2	250 ± 4	11 ± 1	12
156		Me	68 ± 5	330 ± 6	4,9 ± 0,4	6,3
157		Et	38 ± 2	200 ± 4,5	5,0 ± 1	13
158		Me	30 ± 3	280 ± 17	9 ± 1	95
159		Me	143 ± 10	270 ± 46	1,9 ± 0,4	Inact

<sup>a</sup> Los valores de CIM para *C. glabrata* se determinaron usando medio YM

- 5 En general, la conversión del anillo fenilo en 139 a heterociclos aromáticos o bien alicíclicos da como resultado una atenuación de la inhibición enzimática que varía de una pérdida de tres veces a veinte veces. De los tres, los análogos de morfolina mantienen la mayor potencia inhibitoria enzimática, mientras que los análogos de piperazina sufren la mayor pérdida. Parece que la sustitución en C6 (R en la tabla 7) tiene un impacto mínimo sobre la potencia enzimática.
- 10 Aunque se había demostrado previamente que los sustituyentes hidrófobos en el anillo fenilo incrementan en gran medida la potencia, las sustituciones de análogos en los sistemas de morfolina y piperazina muestran más variación. La inclusión de sustituyentes metilo en la morfolina para imitar los del compuesto 140 reducen algo la potencia, reflejando posiblemente el posicionamiento de estos grupos metilo en centros hibridados sp<sup>3</sup>. De forma alternativa, el sustituyente de 4-metil piperazina incrementó la inhibición enzimática aproximadamente 5 veces. Los compuestos de piperidina son más selectivos, aproximadamente 15 veces, para la enzima patógena sobre el homólogo humano.
- 15 Ambos análogos de morfolina y piperazina todavía muestran preferencia por la enzima fúngica, aunque con proporciones más modestas de 2-20 veces.
- 20 Los resultados de los ensayos de inhibición del crecimiento celular demuestran que los derivados de piridina, 147 y 148, presentan potencia en un intervalo (1,4-1,5 µg/ml) comparable a los agentes antifúngicos usados clínicamente. Aunque los derivados de piridina son inhibidores enzimáticos más débiles que el comparador directo, el compuesto 139, presentan una actividad antifúngica mejor en orden de magnitud. De hecho, el nivel de actividad mostrada por

los compuestos de piridina es comparable a los bifenilos 140 y 141, que tienen potencia enzimática subnanomolar. Esto sugiere que la actividad antifúngica de esta clase de compuestos se puede optimizar adicionalmente por modulación de las propiedades de compuestos más allá de la potencia enzimática. Esto puede sugerir además que mejorar la afinidad enzimática para estos heterociclos puede producir en última instancia agentes antifúngicos con una actividad superior.

Los derivados de morfolina y piperazina que muestran una mayor potencia contra DHFR que los análogos de piridina funcionan mal por comparación en ensayos antifúngicos (CIM > 12 µg/ml). La atenuación de la actividad contra el organismo puede reflejar el incremento en la solubilidad, lo que puede dar lugar a una reducción en la permeabilidad. En general, estos resultados sugieren la necesidad de un equilibrio óptimo en estas propiedades de los inhibidores.

También se evaluaron varios compuestos representativos en medio empobrecido en timidina. Se ha demostrado que los niveles altos de timidina interfieren con las pruebas de susceptibilidad precisas de antifolatos. Para compensar esto, los antifolatos se evalúan con frecuencia en un medio mínimo controlado con una concentración de timidina baja. Como ha habido pocas investigaciones sobre la actividad de los antifolatos contra *C. glabrata*, se evaluaron compuestos prometedores en medio empobrecido de timidina. Se evaluaron tres análogos heterocíclicos representativos (148, 152 y 156) en medio IsoSensitest complementado con glucosa al 2 % (tabla 8). Además, también se evaluaron los compuestos para determinar la toxicidad en células de mamífero usando las líneas celulares MCF-10 y HepG2. Se informa de la selectividad celular como el valor de CI<sub>50</sub> para la línea celular humana MCF-10 dividido entre el valor CIM (µg/ml) (tabla 8).

Tabla 8

ID del compuesto	CIM <i>C. glabrata</i> (µg/ml) <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> MCF-10 (µM)	CI <sub>50</sub> HepG2 (µM)	Índice de selectividad <sup>c</sup> (µg/ml)
148	0,36	85	171	236
152	1,4	462	ND <sup>b</sup>	330
156	2,9	314	193	108

<sup>a</sup> valores de CIM determinados en medio IsoSensitest  
<sup>b</sup> ND: no determinado  
<sup>c</sup> la selectividad se calcula como  $[CI_{50} (MCF-10) / CIM (C. glabrata)]$

Estos resultados muestran que en presencia de niveles de timidina comparables a los encontrados en sangre y tejido humano, los antifolatos novedosos son inhibidores muy potentes de *C. glabrata* presentando los derivados de piridina valores de CIM de menos de 1 µg/ml. Además, a pesar de los niveles moderados de selectividad enzimática, los compuestos muestran niveles de entre 100 y 300 veces de selectividad a nivel celular. Basándose en la actividad suscitante observada con estos compuestos, se determinaron estructuras cristalinas para caracterizar mejor la interacción de los inhibidores con CgDHFR.

Ejemplo 8

Química y modelado - Estructura B del CgDHFR

SE incubó CgDHFR con NADPH 1,5 mM y compuesto 11 1 mM durante dos horas a 4 °C. Se hicieron crecer cristales adecuados (0,2 mm de cada lado) usando el procedimiento de difusión de vapor de gota colgante y mezclando volúmenes iguales de proteína:ligando con Tris 0,1 M (pH 8,5), PEG 4000 al 30 % y MgCl<sub>2</sub> 0,2 M. Antes del enfriamiento ultrarrápido, se transfirieron los cristales a una solución que contiene la mezcla de cristalización y glicerol al 15 %. Se midieron todos los datos de difracción a 100 K. Se midió el conjunto de datos inicial usando un difractor Oxford Excalibur y se procesó usando el programa informático CrysAlis. Se midió el conjunto de datos de alta resolución a X25A de línea de haz en el Brookhaven National Laboratory usando un detector CCD de ADSC y se procesó con HKL2000. Se informa de las estadísticas de procesamiento y refinamiento de datos en la tabla 9.

Tabla 9. Estadísticas de recogida y refinamiento de datos

Grupo espacial	P4 <sub>1</sub>
Célula unitaria (a,b,c en Å)	a=b=42,69, c=230,4, α=90, β=90, γ=120
Resolución (Å)	40-1,6
Complejidad, % (última corteza*, %)	93 % (92 %)
Reflexiones únicas	47,676

Redundancia (última corteza)	4,7 (2,9)
Rsim, % (última corteza, %)	6,8 (3 8,6)
<l/σ> (última corteza)	12,0 (2,5)
factor R/R <sub>libre</sub> (última corteza)	0,19, 0,23 (0,247, 0,303)
Promedio de factor B, Å <sup>2</sup>	24,8
Número de átomos (proteína, ligandos, disolvente)	4,222
N.º de átomos de proteína distintos de hidrógeno	3684
N.º de átomos de ligando	140
N.º de moléculas de disolvente	388
Desviación MC, longitudes (Å), ángulos (°) de enlace	0,02, 2,2
*corteza de mayor resolución: 1,64-1,60 Å	

Se resolvió la estructura de CgDHFR por reemplazo molecular usando el programa, Phaser, un modelo de DHFR de *C. albicans* (PDB ID: 1M79) como sonda de búsqueda, y los datos obtenidos en el sistema de Oxford. Se usó solución de reemplazo molecular como información de fase inicial para los datos de alta resolución. Se inspeccionaron los mapas de densidad de electrones y se construyeron los modelos usando Coot. Se refinó el modelo usando Refmac5 en el paquete informático CCP4. Se añadieron automáticamente moléculas de agua usando una funcionalidad dentro de Coot. El modelo muestra un buen acuerdo con la representación de Ramachandran (97,3 % de residuos en regiones preferentes, 2,5 % en regiones aceptables, y 0,2 % (1 residuo) en una zona no permitida. Se prepararon las figuras usando Pymol.

Se determinó la estructura cristalina de CgDHFR en un complejo con el compuesto 11 y NADPH usando amplitudes de difracción que se extendieron a 1,6 Å como se describe anteriormente. Los cristales pertenecen al grupo espacial tetragonal P4<sub>1</sub> y hay dos moléculas en la unidad asimétrica. La estructura global de la proteína CgDHFR de 217-residuos consistió en una lámina β de diez hebras y cinco hélices alfa flanqueantes (figura 11a). La marca de histidina de ocho residuos usada para la purificación formó parte de las interacciones de empaquetado cristalino y presentó una densidad electrónica ordenada.

CgDHFR y CaDHFR comparten una homología de secuencia de un 85 % y se pueden superponer con una desviación de MC de 1,62 Å sobre los átomos Cα de CaDHFR (figura 11b). A pesar de alta similitud de secuencia con CaDHFR, existen varias diferencias clave, incluyendo una inserción de 25 residuos (residuos 177-202 en CgDHFR) que añade dos hebras a la lámina beta central. También existen dos diferencias estructurales en el sitio activo: CgDHFR tiene una metionina (Met 33) que interacciona con el anillo pirimidina del inhibidor; CaDHFR tiene una isoleucina en esta posición (Ile 33). El bucle que contiene los residuos 61-66 en CgDHFR se desplaza 2,4 Å más cerca del sitio activo que el mismo bucle (con los residuos 61-66) en CaDHFR.

El compuesto principal inicial, el compuesto 11, se une en el sitio activo con enlaces de hidrógeno entre el anillo pirimidina y Glu 32, Thr 140, Tyr 120, así como los átomos de oxígeno del carbonilo del esqueleto de Ile 9 y Ile 121 (fig. 12a). El grupo etilo en C6 forma interacciones de van der Waals limitadas con Met 33 y Phe 36. El enlazador acetilínico forma interacciones de van der Waals con el anillo nicotinamida de NADPH, Leu 25 e Ile 121. El anillo fenilo 2', 5'-OMe se ajusta en la cavidad hidrófoba compuesta de Ile 62, Leu 69, Phe 66, Pro 63 y Thr 58.

El pliegue global de CgDHFR es similar al de la DHFR humana, sin embargo, existen varias diferencias estructurales en el sitio activo (fig. 12b). Existen cuatro diferencias de residuos: Met 33 (h:Phe 31), cerca del C6 del anillo pirimidina, Phe 66 (h:Asn 64) cerca del anillo arilo, Ile 121 (h:Val 115) cerca del anillo pirimidina y Arg 37 (h:Gln 35) más lejos en la abertura del sitio activo. Las últimas dos diferencias de residuos están más lejos del núcleo del sitio activo. De forma importante, el bucle de CgDHFR que comprende los residuos Thr 58-Phe 66 se desplaza 1,2 Å lejos del sitio activo, en relación con el mismo bucle que comprende Thr 56-Asn 64 en hDHFR. Los residuos en este bucle forman interacciones clave con el anillo dimetoxifenilo del ligando. La selectividad modesta (156 veces) del compuesto 11 resulta potencialmente de las interacciones entre el anillo dimetoxifenilo y Met 33 (Phe 31 en hDHFR) o del anillo dimetoxifenilo y el bucle que contiene Ser 59-Pro 61, que está más cerca del sitio activo en hDHFR que en CgDHFR y puede presentar algunas interacciones de van der Waals de repulsión.

Análogos heterocíclicos de inhibidores enlazados a propargilo

#### 45 *Cristalización y determinación estructural*

Se cocrystalizó la DHFR de *S. aureus* con 140, 142 y 148 usando el procedimiento de vaporización de gota colgante. Se incubó la proteína (12 mg/ml) con el ligando (1 mM) y NADPH (2 mM) durante dos horas en hielo. Un volumen igual del complejo proteína:ligando:NADPH se mezcló con una solución de cristalización optimizada que consistía en

PEG 10000 al 15 %, acetato de sodio 150 mM, MES 100 mM pH 6,5, y butirolactona al 5 % (Sigma Aldrich). Todo el crecimiento de cristales siguió los mismos procedimientos y típicamente proporcionó cristales dentro de 5-7 días. Los cristales se incubaron en un tampón crioprotector que contenía glicerol al 15 %, a continuación se enfrió rápidamente con nitrógeno líquido. Los conjuntos de datos de alta resolución se recogieron en un Brookhaven NSLS en X25 de línea de haz.

Los datos se indexaron y se escalaron usando HKL2000. Las estructuras cristalinas para todos los complejos se resolvieron usando un modelo de DHFR de *S. aureus* unida a folato. Los datos de difracción para el complejo SaDHFR:NADPH:140 y el modelo comparten el mismo grupo espacial hexagonal (P6<sub>1</sub>22) y dimensiones de célula unitaria, por lo tanto, se usaron diferentes procedimientos de Fourier para resolver el problema de fases para estos datos. Los cristales de SaDHFR:NADPH: 142 y SaDHFR:NADPH:148 pertenecen al grupo espacial P6<sub>1</sub> y hay dos moléculas en la unidad asimétrica. Por lo tanto, estas estructuras se determinaron por reemplazo molecular usando Phaser. Los programas COOT y Refmac5 se usaron para construir y refinar la estructura hasta que se logró un R<sub>factor</sub> y R<sub>libre</sub> aceptable. La geometría estructural se evaluó usando las representaciones de proCHECK y Ramachandran. El disolvente no se incluyó en los modelos finales para las estructuras cristalinas de DHFR de *S. aureus* unida a NADPH y los compuestos 140 y 142.

Para dilucidar las interacciones de los compuestos 148 y 153 con CgDHFR, se determinaron dos nuevas estructuras cristalinas ternarias. Los cristales se hicieron crecer con la enzima, NADPH y un inhibidor, 148 o bien 153, usando difusión de vapor de gota colgante. Los cristales obtenidos pertenecen al grupo espacial P4<sub>1</sub> y muestran amplitudes de difracción a la resolución 2,6 y 2,3 Å, respectivamente. Las estructuras se determinaron con procedimientos de reemplazo molecular usando la molécula de sonda 3CSE<sup>7</sup>. La densidad electrónica es evidente para los ligandos, lo que permite la colocación y el refinamiento de todas las coordenadas a los valores de R<sub>libre</sub> de 25,8 y 26,5, respectivamente (tabla 10).

Tabla 10

Parámetro	CgDHFR/148/NADPH	CgDHFR/153/NADPH
PDB ID	3R09	3ROA
Grupo espacial	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>
Célula unitaria (a, b, c en Å)	a = 42,26, b = 42,26, c = 238,69	a = 42,71, b = 42,71, c = 229,47
N.º de monómeros en asu	2	2
Resolución (Å)	41,63-2,60	42,72-2,30
Complejidad, % (última corteza, %)	90,4 (95,9)	97,2 (100)
Reflexiones únicas	10629	16713
Rsim, % (última corteza)	5,1 (13,7)	8,0 (22,2)
I/σ (última corteza)	54,6 (21,9)	46,8 (6,6)
Estadísticas de refinamiento		
factor R/R <sub>libre</sub>	0,2018, 0,2648	0,2042, 0,258
N.º de átomos (proteína, ligandos, disolvente)	3692, 152, 36	3692, 154, 73
Desviación MC, longitudes (Å), ángulos (grados) de enlace	0,006, 1,081	0,009, 1,273
Prom. factor B (Å <sup>2</sup> )	31,756	36,053
Prom. factor B para ligandos (Å <sup>2</sup> )	39,2	37,1
Prom. factor B para moléculas de disolvente (Å <sup>2</sup> )	22,1	31,4
Estadística de representación de Ramachandran		
Residuos en regiones más favorecidas (%)	91,2	93,2
Residuos en regiones permitidas adicionales (%)	8,3	6,3

Residuos en regiones generosamente permitidas (%)	0,5	0,5
Residuos en regiones no permitidas (%)	0	0

Ejemplo 9Química y modelado - Estructura A del CgDHFR

5 Además de las interacciones observadas con los compuestos de estructura B (tabla 3), los derivados de la estructura A también mostraron una inhibición potente y una mayor actividad antifúngica. Específicamente, el compuesto de acoplamiento 6 en la estructura de CgDHFR reveló interacciones potenciales del grupo metilo de propargilo con una cavidad compuesta de Ile 121, Thr 58 y Ile 62. El grupo trimetoxifenilo presenta un grupo 3'-metoxi para interactuar con Ser 61 y Leu 25, un grupo 4'-metoxi que tiene muy pocas interacciones con la proteína y un grupo 5'-metoxi que interactúa con Ile 62, Pro 63, Met 33 y distalmente, Phe 66.

Ejemplo 10Química y modelado de inhibidores de CgDHFR de segunda generación

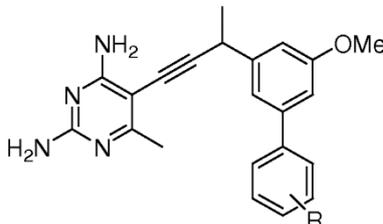
15 Varios restos de los inhibidores de primera generación que incluyen un grupo alquilo pequeño en la posición C6 del anillo pirimidina, el grupo metilo de propargilo del compuesto 6 y el grupo 3'-metoxi en el anillo fenilo proporcionaron interacciones de van der Waals favorables con CgDHFR. Sin embargo, estaban disponibles interacciones adicionales, relativas a las usadas por los compuestos 11 y 6, en la cavidad de unión a ligando. Se sospechó que los grupos lipófilos más grandes en la posición 5' en el anillo arilo, en relación con el grupo metoxi de los compuestos 11 y 6, podrían aprovechar mejor las interacciones hidrófobas disponibles de Ile 62, Pro 63, Met 33 y Phe 66 (figura 13). También se prevé que un grupo hidrófobo voluminoso en esta posición, diseñado para incrementar la potencia contra CgDHFR, disminuya la potencia (e incrementa la selectividad) contra hDHFR. El bucle que contiene los residuos 56-64 en hDHFR está más cerca del sitio activo y el modelado sugirió que sería necesario reubicarlo para acomodar volumen estérico en la posición 5' de un inhibidor de segunda generación.

20 Por lo tanto, usando la estructura de CgDHFR y las características de los compuestos 11 y 6, se diseñaron los inhibidores de segunda generación para que fueran significativamente más potentes y selectivos. La serie de derivados de segunda generación incluyen un grupo metilo en la posición C6 de la pirimidina, un grupo metilo de propargilo y un anillo fenilo en la posición *meta* (5') del anillo arilo, mientras que mantiene el grupo metoxi 3' en el anillo arilo (véase la estructura en la tabla 3). Además de las nuevas interacciones predichas con la enzima, el diseño de los compuestos de bifenilo presenta una ruta fácil para la síntesis. El diseño de propargilo original se aprovecha de un acoplamiento de Sonagashira clave para unirse a una pirimidina yodada con un compañero acetileno. La síntesis de los compuestos de bifenilo se extiende en este diseño modular para incluir un acoplamiento de Suzuki para instalar el segundo anillo arilo. Los sustituyentes en el segundo anillo arilo se concibieron para proyectar volumen hacia la región de bucle e incrementar tanto la potencia como la selectividad, por lo tanto, se sintetizaron y se analizaron derivados de bifenilo con grupos metilo en las posiciones *meta* (compuesto 12) y *para* (compuesto 13) en el segundo anillo (véase la tabla 10).

Ejemplo 11Evaluación biológica de CgDHFR y hDHFR

45 Se sometieron a prueba los compuestos de segunda generación en ensayos enzimáticos usando CgDHFR y DHFR humana, así como en ensayos antifúngicos. No sólo se descubrió que los compuestos son extremadamente potentes, con valores de  $CI_{50}$  en el intervalo subnanomolar contra DHFR, también presentaron una selectividad fuerte (2.350 veces) para la enzima fúngica (véase la tabla 11). Significativamente, estos compuestos de segunda generación también presentaron una actividad antifúngica superior *in vitro* con niveles de inhibición comparables a los tratamientos usados clínicamente.

Tabla 11. Inhibición enzimática y propiedades antifúngicas de los compuestos de segunda generación

					
Compuesto	R	CgDHFR Cl <sub>50</sub> (nM)	hDHFR Cl <sub>50</sub> (nM)	Selectividad (h/CgDHFR)	Actividad antifúngica, CIM (μg/ml)
12	3',5' ( <i>meta</i> ) Me	0,55	750	1364	3
13	4' ( <i>para</i> ) Me	0,6	1410	2350	1,5

5 Se debe entender que anteriormente se ha divulgado una pluralidad de miembros de Markush y condiciones. Se contempla y, por lo tanto, está dentro del alcance de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, que cualquier condición se puede combinar con cualquier otra condición enumerada anteriormente para dar un género de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. Como alternativa, para renunciar a cualquier compuesto descrito en cualquiera de los géneros de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, se puede renunciar a cualquier miembro de cualquiera de los grupos Markush

10 enumerados anteriormente para generar un género.

Aunque la presente invención se ha descrito con detalle específico con referencia a los modos de realización divulgados, se entenderá que se pueden efectuar muchas variaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención.

15

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Universidad de Connecticut

5 <120> Análogos heterocíclicos de inhibidores enlazados a propargilo de la dihidrofolato reductasa

<130> 4002303-191818

<150> US 13/290.741

10 <151> 07/11/2011

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 171

20 <212> PRT

<213> C. hominis

25 <400> 1

ES 2 595 952 T3

Met Ser Glu Lys Asn Val Ser Ile Val Val Ala Ala Ser Val Leu Ser  
1                    5                    10                    15

Ser Gly Ile Gly Ile Asn Gly Gln Leu Pro Trp Ser Ile Ser Glu Asp  
                  20                    25                    30

Leu Lys Phe Phe Ser Lys Ile Thr Asn Asn Lys Cys Asp Ser Asn Lys  
                  35                    40                    45

Lys Asn Ala Leu Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Asp Ser Ile Gly Arg  
                  50                    55                    60

Arg Pro Leu Lys Asn Arg Ile Ile Val Val Ile Ser Ser Ser Leu Pro  
65                    70                    75                    80

Gln Asp Glu Ala Pro Asp Asn Val Val Val Phe Arg Asn Leu Glu Asp  
                  85                    90                    95

Ser Ile Glu Asn Leu Met Asn Asp Asp Ser Ile Glu Asn Ile Phe Val  
                  100                    105                    110

Cys Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Asp Asn Phe Val  
                  115                    120                    125

Asp Arg Ile Tyr Leu Thr Arg Val Ala Leu Glu Asp Ile Glu Phe Asp  
                  130                    135                    140

Thr Tyr Phe Pro Glu Ile Pro Glu Thr Phe Leu Pro Val Tyr Met Ser  
145                    150                    155                    160

Gln Thr Phe Cys Thr Lys Asn Ile Ser Tyr Asp  
                  165                    170

ES 2 595 952 T3

<210> 2

<211> 252

5

<212> PRT

<213> T. gondii

10

<400> 2

Met Gln Lys Pro Val Cys Leu Val Val Ala Met Thr Pro Lys Arg Gly

1

5

10

15

ES 2 595 952 T3

Ile Gly Ile Asn Asn Gly Leu Pro Trp Pro His Leu Thr Thr Asp Phe  
20 25 30

Lys His Phe Ser Arg Val Thr Lys Thr Thr Pro Glu Glu Ala Ser Arg  
35 40 45

Leu Asn Gly Trp Leu Pro Arg Lys Phe Ala Lys Thr Gly Asp Ser Gly  
50 55 60

Leu Pro Ser Pro Ser Val Gly Lys Arg Phe Asn Ala Val Val Met Gly  
65 70 75 80

Arg Lys Thr Trp Glu Ser Met Pro Arg Lys Phe Arg Pro Leu Val Asp  
85 90 95

Arg Leu Asn Ile Val Val Ser Ser Ser Leu Lys Glu Glu Asp Ile Ala  
100 105 110

Ala Glu Lys Pro Gln Ala Glu Gly Gln Gln Arg Val Arg Val Cys Ala  
115 120 125

Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Leu Leu Glu Glu Glu Tyr Lys Asp Ser  
130 135 140

Val Asp Gln Ile Phe Val Val Gly Gly Ala Gly Leu Tyr Glu Ala Ala  
145 150 155 160

Leu Ser Leu Gly Val Ala Ser His Leu Tyr Ile Thr Arg Val Ala Arg  
165 170 175

ES 2 595 952 T3

Glu Phe Pro Cys Asp Val Phe Phe Pro Ala Phe Pro Gly Asp Asp Ile  
180 185 190

Leu Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Pro Ala Glu Ser  
195 200 205

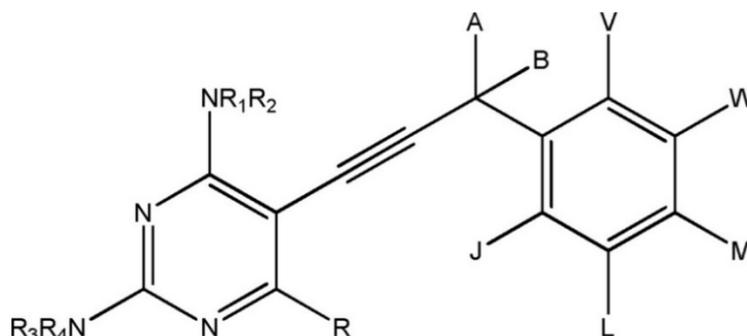
Val Phe Val Pro Phe Cys Pro Glu Leu Gly Arg Glu Lys Asp Asn Glu  
210 215 220

Ala Thr Tyr Arg Pro Ile Phe Ile Ser Lys Thr Phe Ser Asp Asn Gly  
225 230 235 240

Val Pro Tyr Asp Phe Val Val Leu Glu Lys Arg Arg  
245 250

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula V



Fórmula V

5 en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, e hidroxí;

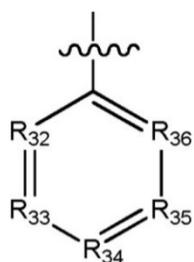
10 en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, cicloalquilo, alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo, arilalquilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, alcoxialquilcarbonilo, alcoxialcoxialquilcarbonilo, arilcarbonilo, piridinilcarbonilo, ariloxialquilo, haloalquilcarbonilo, y cianoalquilcarbonilo;

15 en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden  
20 ellos mismos estar sustituidos opcionalmente con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

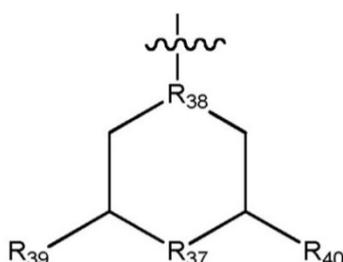
25 en la que uno de V y W es un grupo metoxi y el otro se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden  
30 ellos mismos estar independiente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>,

35 en la que dos de J, L y M, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independiente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior, o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los  
40 grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y

45 en la que (a) el otro de J, L y M es un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, y imidazol, en la que la propia piperidina, perhidropirimidina, morfolina, piridina, pirimidina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, oxazol, tiazol, o imidazol puede estar opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxicarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, o ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi o ariloxialcoxi pueden  
50 ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o (b) el otro de J, L, y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

5 en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

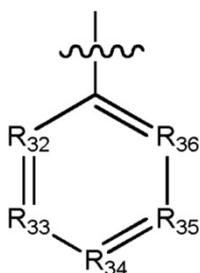
10 en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

15 en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; y

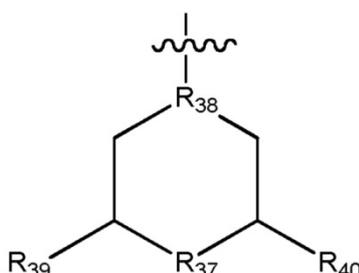
en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>

20 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. El compuesto de la opción (a) en la reivindicación 1, en el que R es metilo o etilo, uno de A y B es hidrógeno y el otro de A y B es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, uno de V y W es metoxi, y el otro de V y W es hidrógeno.
- 25 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el otro de J, L y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIA y fórmula VIB



Fórmula VIA



Fórmula VIB

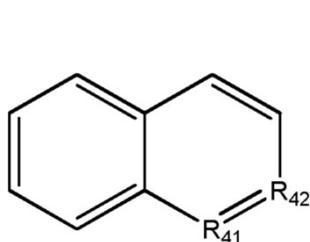
30 en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CR<sub>x</sub>, en la que para cada uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N, R<sub>x</sub> está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxí, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxialquilo inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfinilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos estar independientemente sustituidos opcionalmente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

40 en la que R<sub>37</sub> es O, NH o NCH<sub>3</sub>;

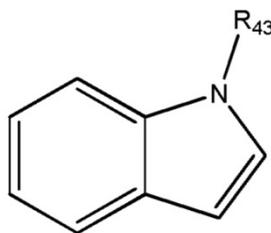
en la que R<sub>38</sub> es N o CH, y cuando R<sub>38</sub> es CH, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>; y

45 en la que R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> independientemente son hidrógeno o CH<sub>3</sub>.

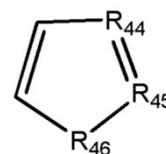
4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que uno de J, L y M es fórmula VIA, y en la que al menos uno de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> es N, y cualquiera de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> que no sea N es CH.
5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que al menos dos de R<sub>32</sub>, R<sub>33</sub>, R<sub>34</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> son N.
6. El compuesto de la reivindicación 3, en el que uno de J, L y M es la fórmula VI B, en la que R<sub>38</sub> es N, R<sub>37</sub> es O, y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son iguales y son hidrógeno o bien CH<sub>3</sub>.
7. El compuesto de la reivindicación 3, en el que uno de J, L y M es la fórmula VI B, en la que R<sub>38</sub> es N, R<sub>37</sub> es NH o NCH<sub>3</sub>, y R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son hidrógeno.
8. El compuesto de la opción (a) de la reivindicación 1, en el que dos de J, L y M se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, halógeno, hidroxilo, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alcoxiinferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, ciano, nitro, aminocarbonilo, alquilsulfonilo inferior, alquilcarbonilamino inferior, alquilsulfonilamino inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, formilo, alcoxycarbonilo inferior, dialquilsililoxi, fenilo, fenoxi, arilalcoxi, y ariloxialcoxi, en la que los sustituyentes fenilo, fenoxi, arilalcoxi y ariloxialcoxi pueden ellos mismos opcionalmente estar sustituidos independientemente una o más veces con halógeno, haloalquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o alquilsulfonilo inferior, en la que "inferior" usado conjuntamente con cualquiera de los grupos anteriores quiere decir alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; y en el que el otro de J, L y M se selecciona del grupo que consiste en fórmula VIC, fórmula VID y fórmula VIE



Fórmula VIC



Fórmula VID



Fórmula VIE

- en la que uno de R<sub>41</sub> y R<sub>42</sub> es N y el otro es CH; en la que R<sub>43</sub> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;
- en la que uno de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es N, un segundo de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es O, S, NH, o N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y el tercero de R<sub>44</sub>, R<sub>45</sub> y R<sub>46</sub> es CH; y en la que cualquier carbono de metino en el grupo heterocíclico puede servir como punto de unión del grupo heterocíclico al compuesto de fórmula V.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en combinación con uno o más diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene una infección bacteriana, una infección fúngica o una infección protozoica.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene una infección de *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, *Streptococcus pyogenes*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium hominis* o *Toxoplasma gondii*.
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad neoplásica.
13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que comprende además un compuesto sulfa que presenta actividad alta contra bacterias patógenas.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección protozoica, una enfermedad neoplásica o cáncer.

```

      ↓                ↓↓                ↓
C.hominis 1 MSEKIVSIVVAASVLSHIGINGQLFWS-IEEDLKFFSKI TNNKCDENKK-----
T.gondii  1 -MQKPVCLVAMTP-KRIGIGINGLPWPHLITDFKHFSRVTKTTPEEASRLNGWLPRKFA
      : * * . 2 *** : . ***** . ↓ * * . : * : * * : : * : . . . : :
C.hominis 50 -----NALIMGRKTWDSIGR--RPLKNRIIVVISSSL-----PQD
T.gondii  59 KTGDSGLPSPSVGKRPNAVUMGRKTWESMPKFRPLVDRENIIVSSSLKEEDIAAEKPCA
      * : : ***** : * : * * * * * : * : * * * * * * *
C.hominis 84 EADPNVVFENLEDSIENLMD--DSIENIFVCGGESIYRDALSDNFVDRIYLFRVALED
T.gondii 119 EQQRVVRVCASLPAALSLLSEFYKDEVDQIFVWVGGAGLYEAALSISVASHLYITRVARE-
      * . : . * * . * . : : * * : : * * * * * . : * . * * . : : : : * * * * *
C.hominis 142 IEPDTYFPEIP-----ETFLFVYMSQTFC
T.gondii 178 PFCDFVFPAPFPHDILSNKSTAAQAAPAESVFVFPFCPELGRKNDNEATYRPIFISKTFP
      : * . : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.hominis 167 TENISYD-----
T.gondii 239 DNGVFPYDFVLEKRR
      : . : . * *

```

Figura 1

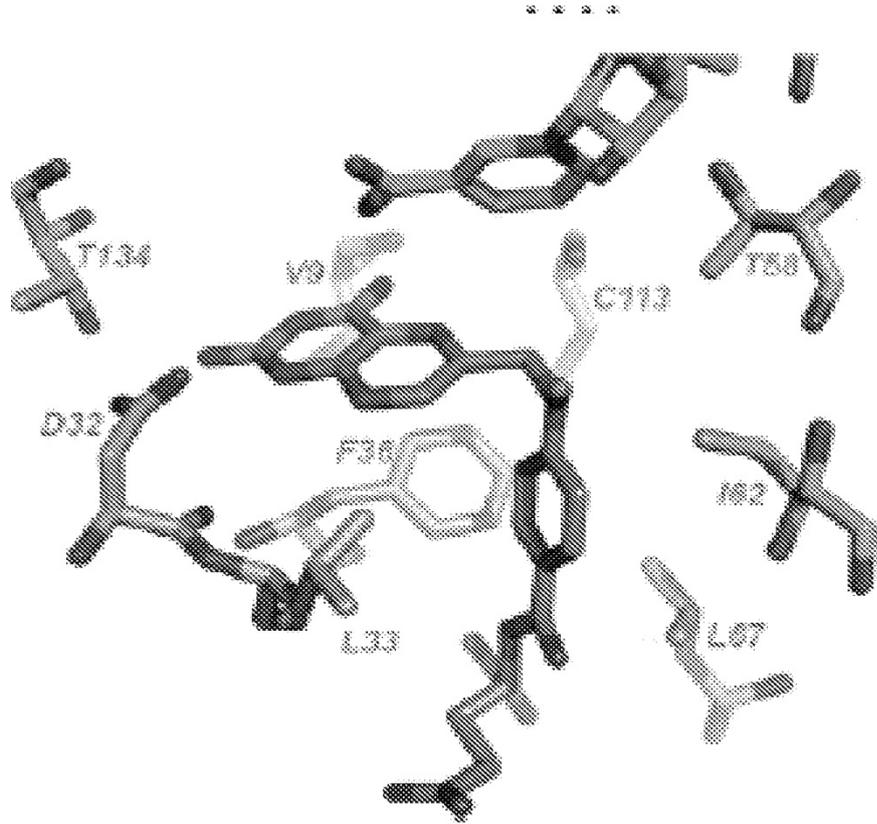
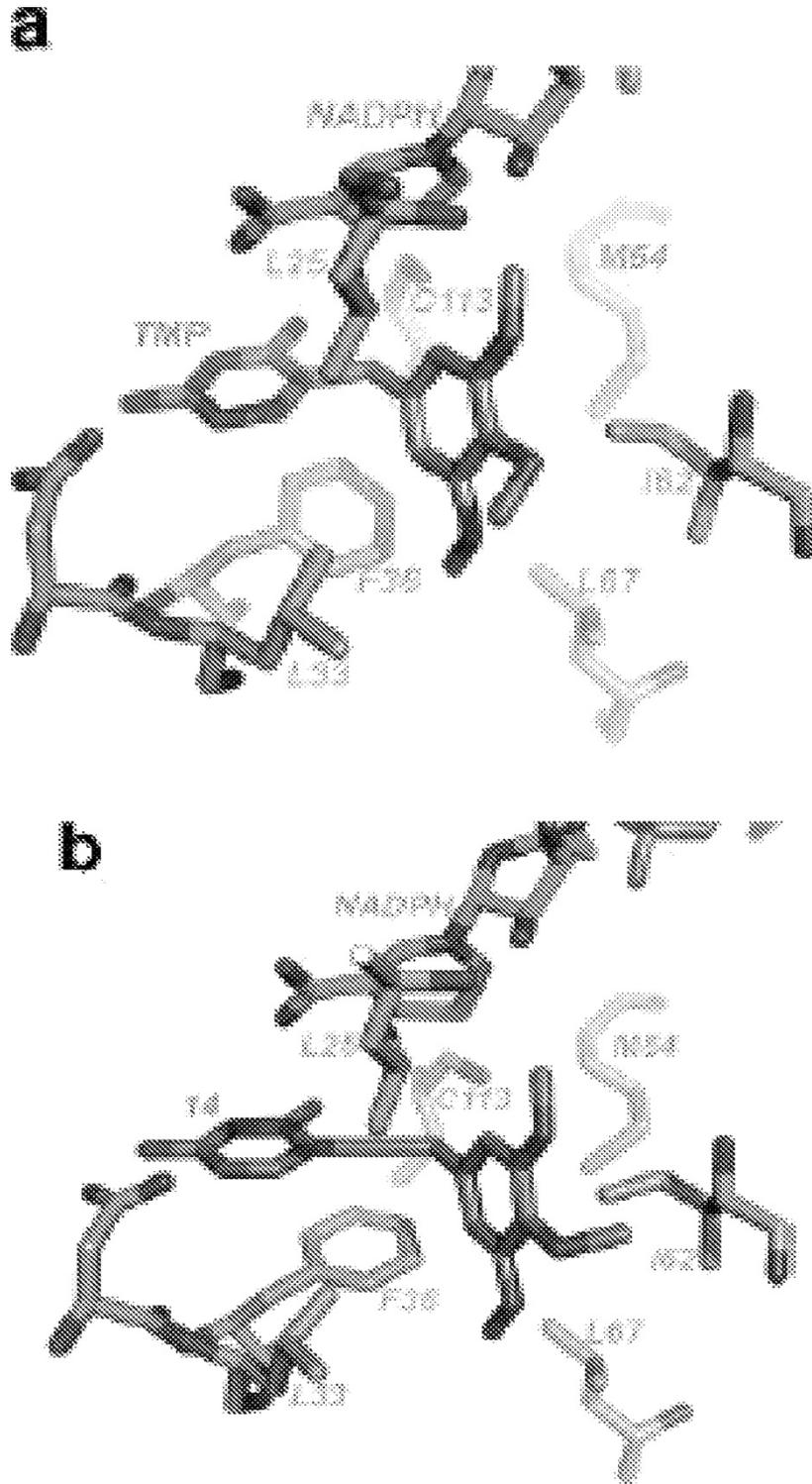
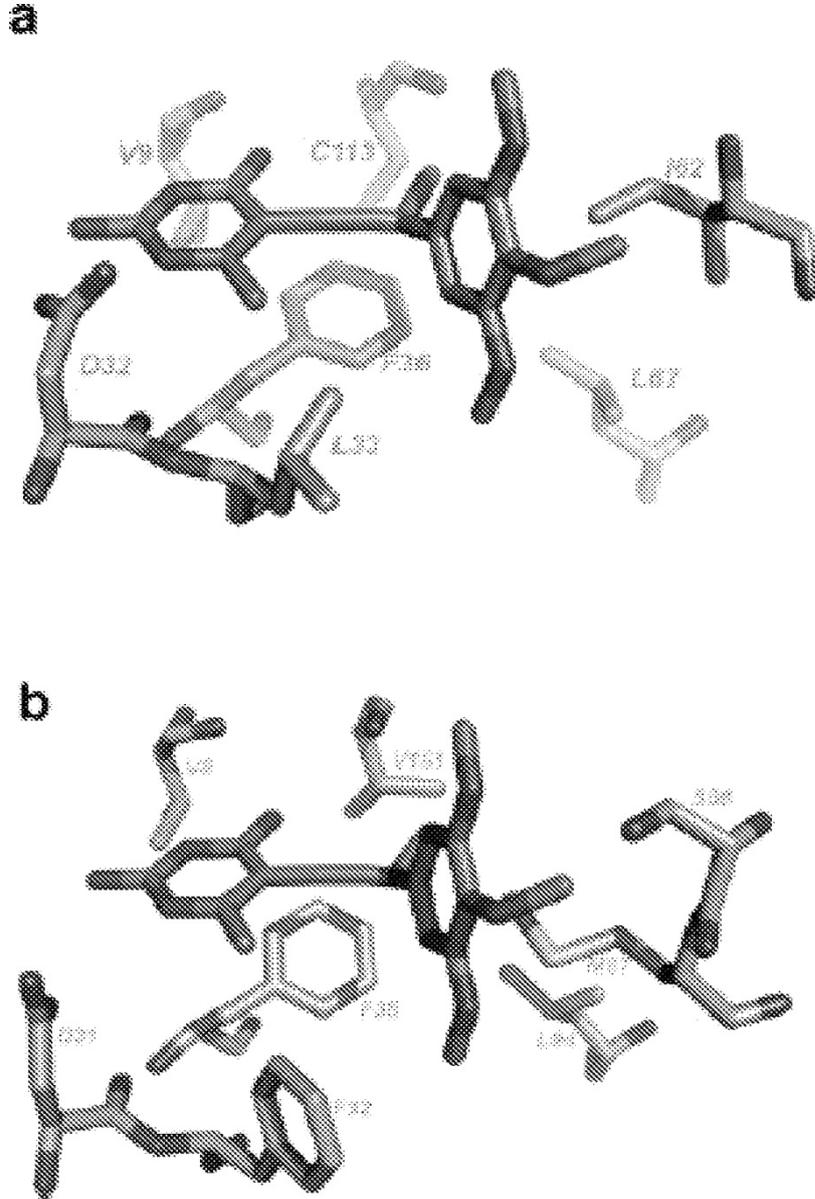


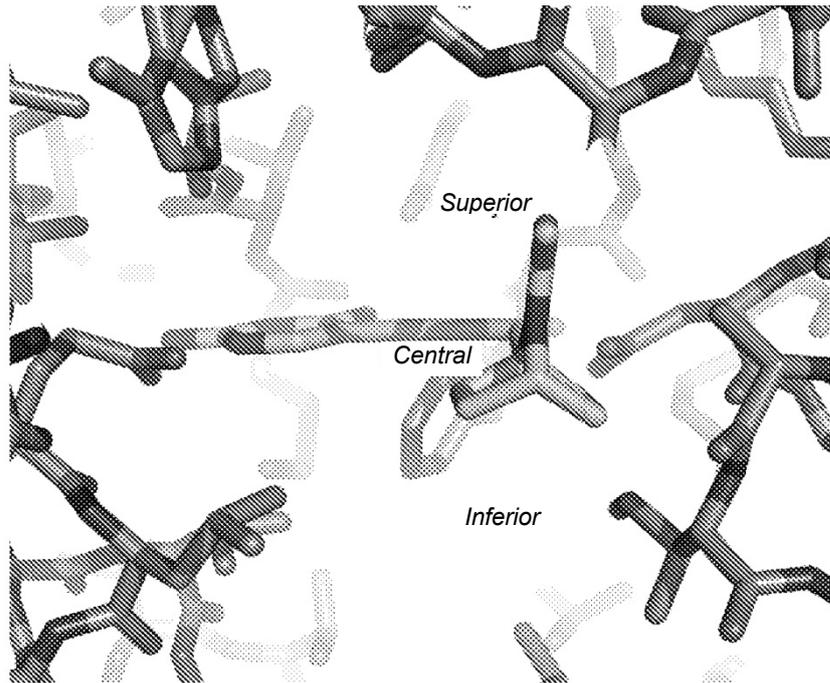
Figura 2



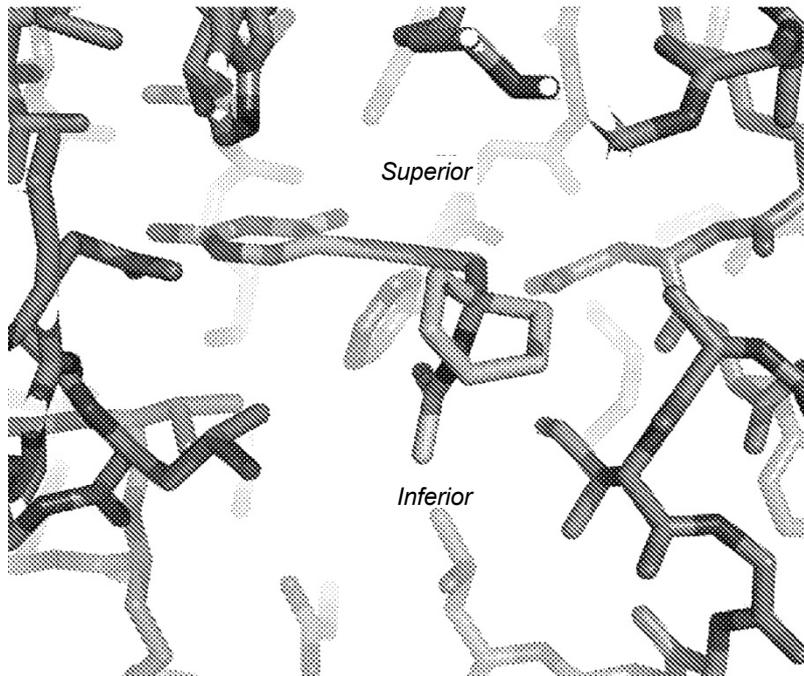
Figuras 3A y 3B



Figuras 4A y 4B



A



B

Figuras 5A y 5B

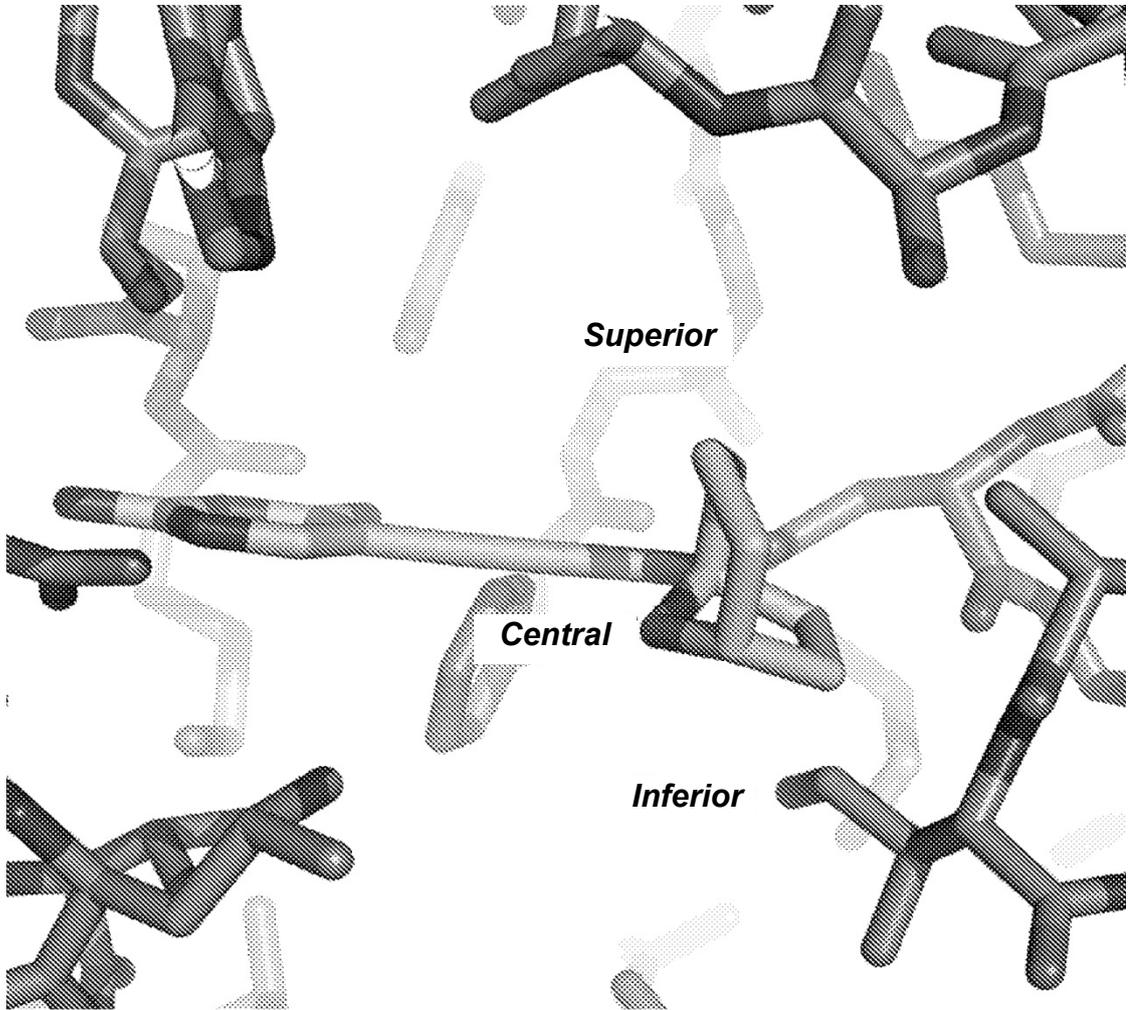


Figura 6

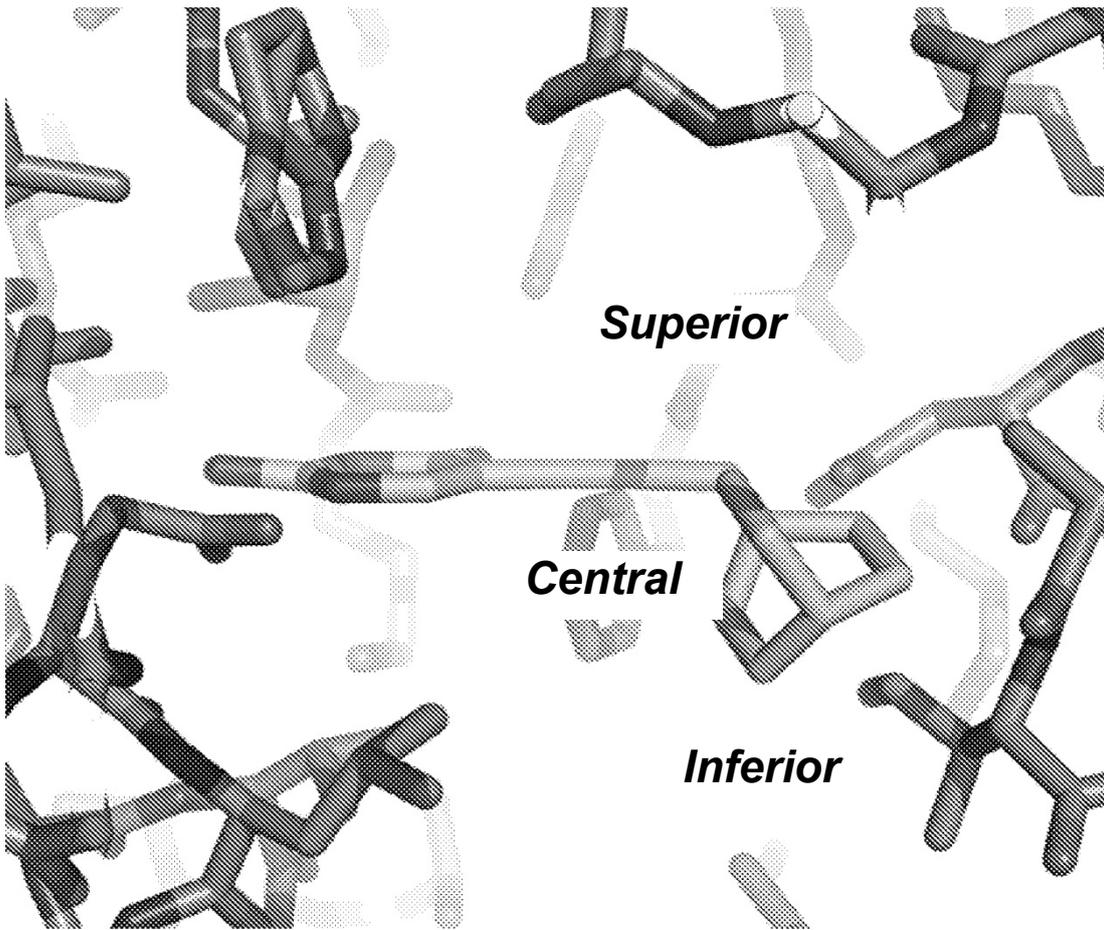
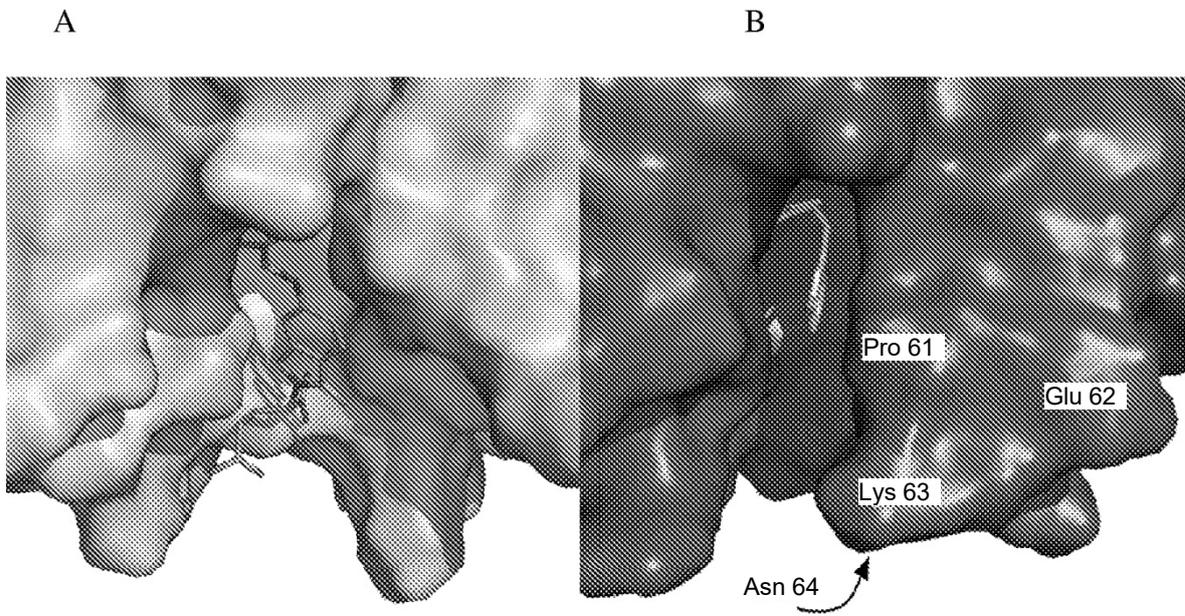
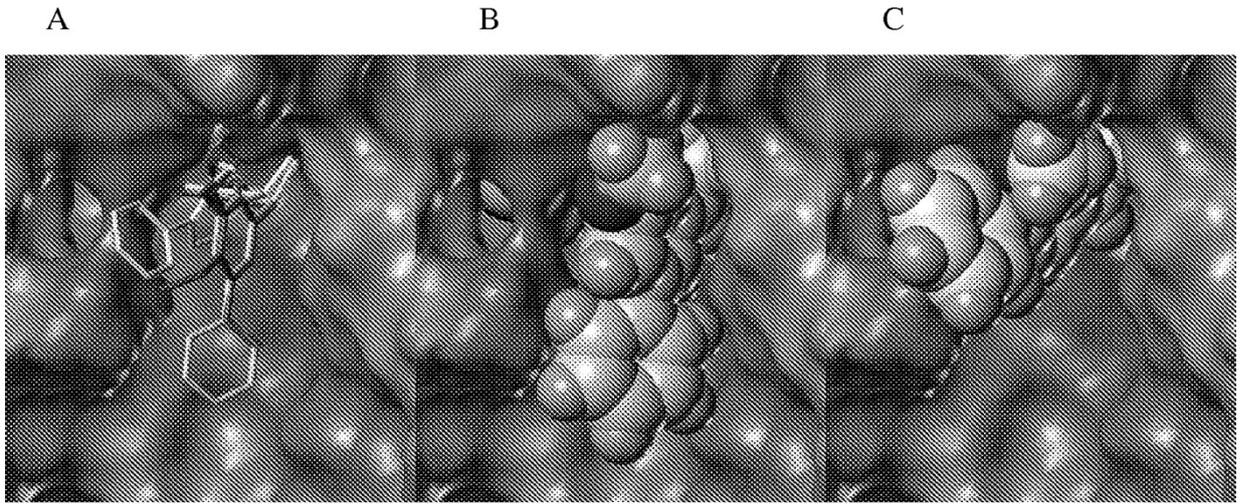


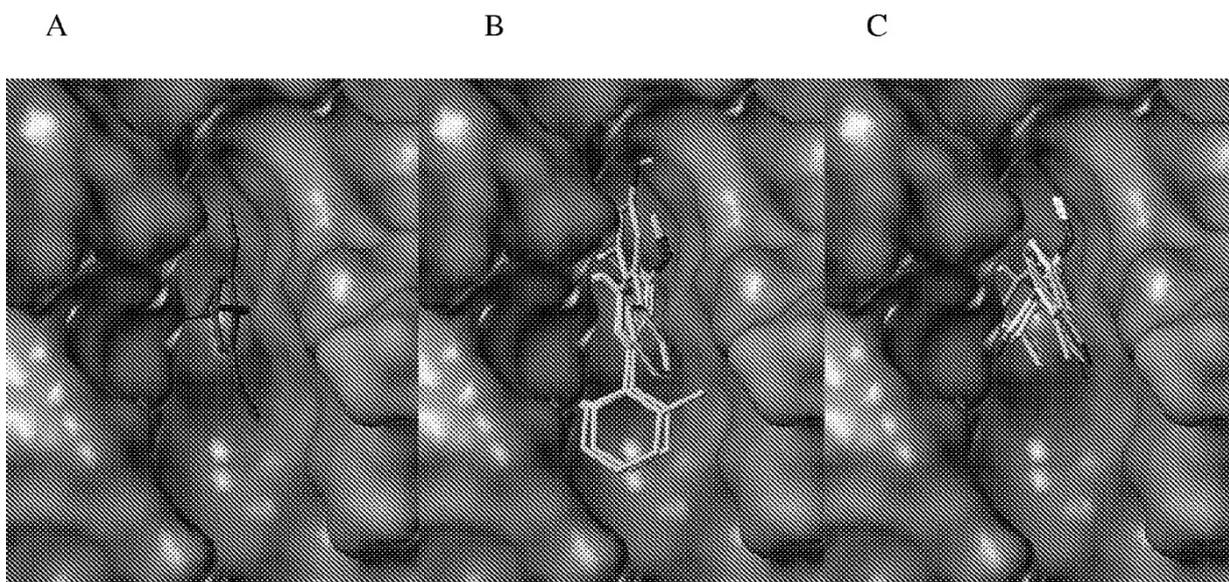
Figura 7



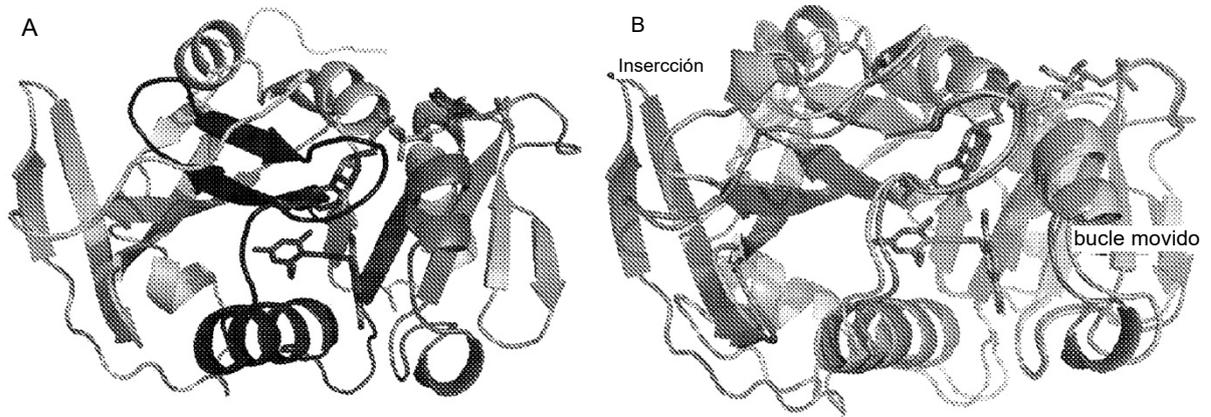
Figuras 8A y 8B



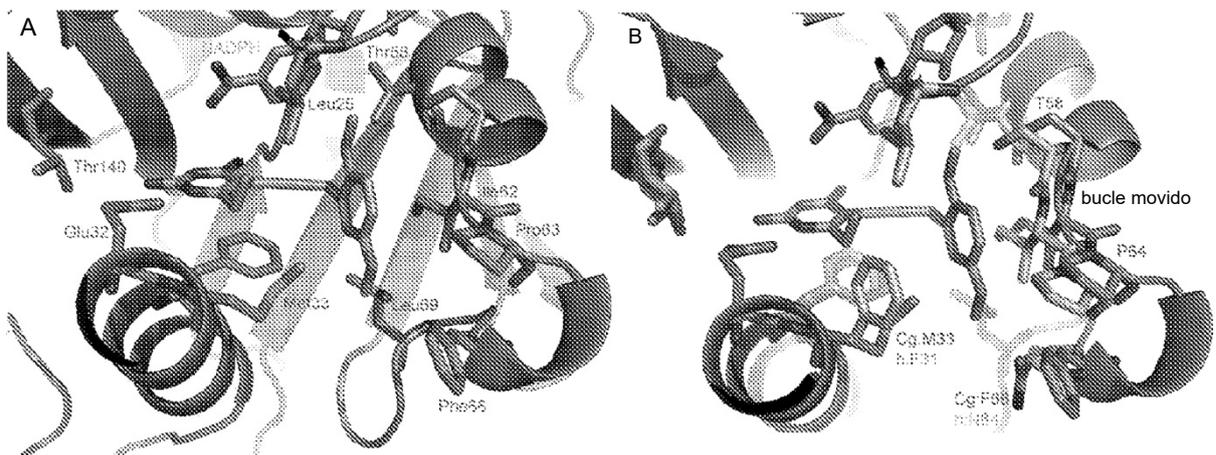
Figuras 9A, 9B y 9C



Figuras 10A, 10B y 10C



Figuras 11A y 11B.



Figuras 12A y 12B.

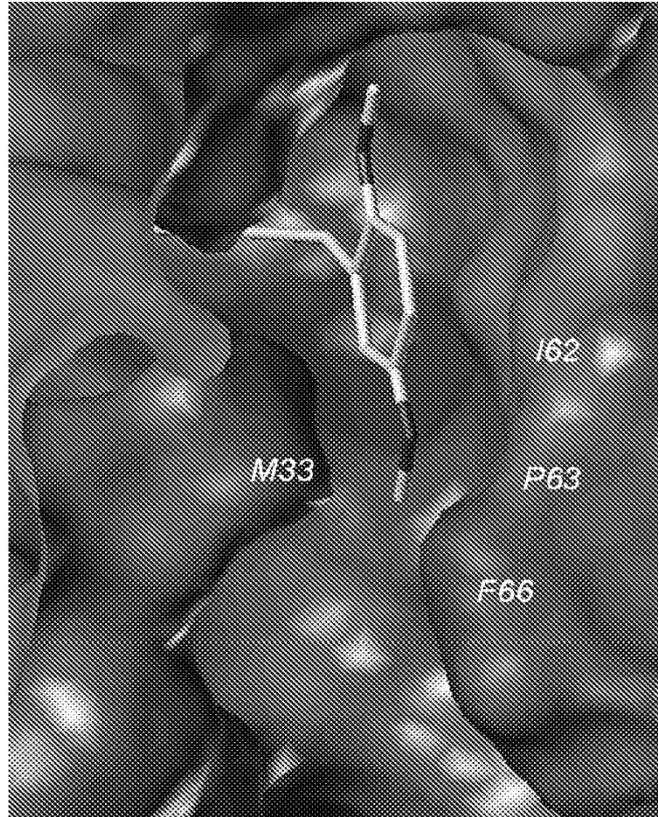


Figura 13

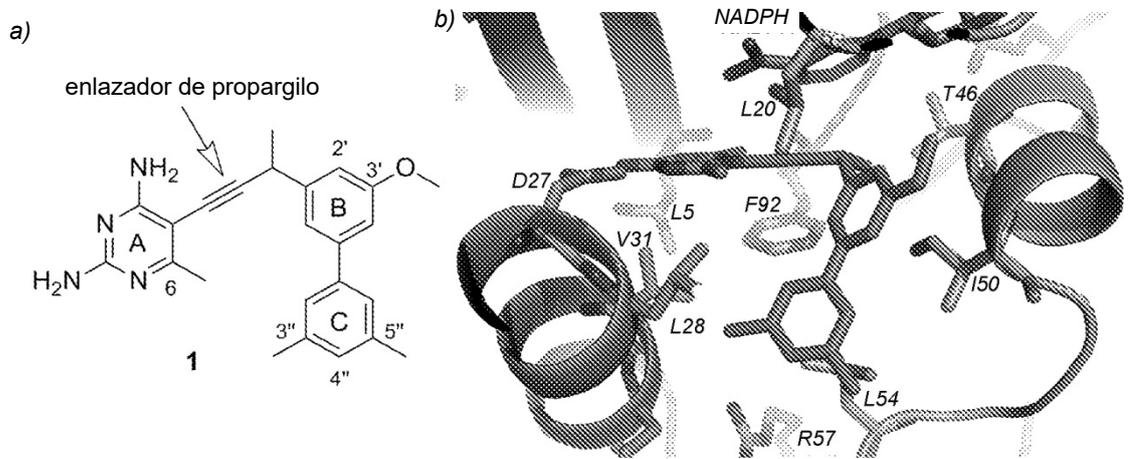


Figura 14

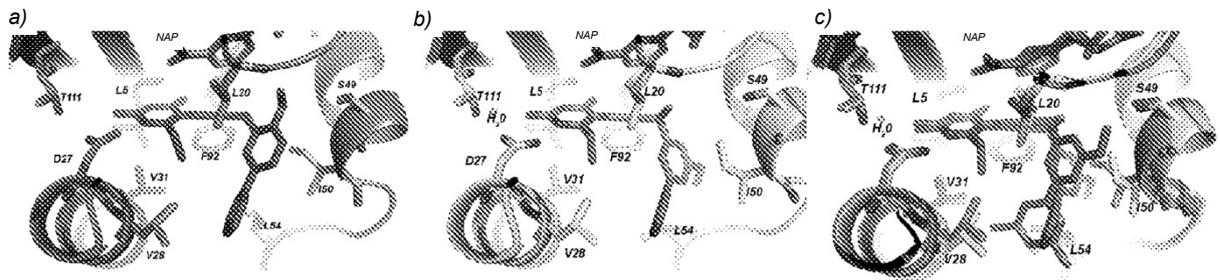


Figura 15

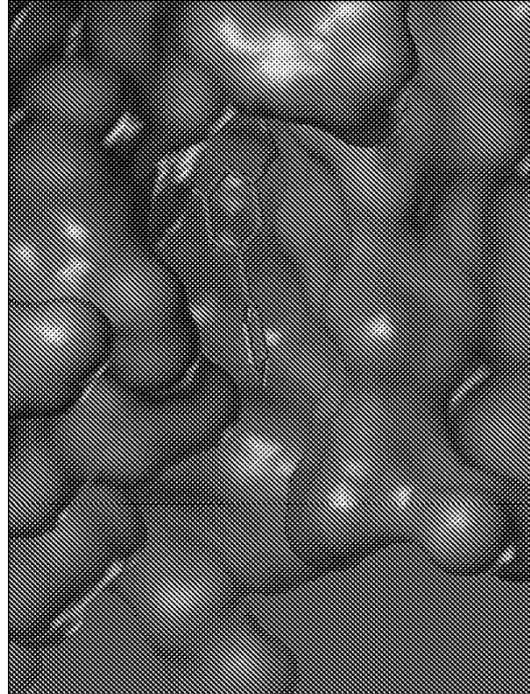


Figura 16