



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 690 082**

⑮ Int. Cl.:

C07D 473/34 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
C07D 473/16 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/EP2012/072090**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068438**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12784574 (1)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2776439**

⑮ Título: **Derivados de purina para el tratamiento de infecciones virales**

⑩ Prioridad:

09.11.2011 EP 11188511

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.11.2018

⑦ Titular/es:

JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (100.0%)
Eastgate Village, Eastgate
Little Island, County Cork, IE

⑦ Inventor/es:

BONFANTI, JEAN-FRANÇOIS;
DOUBLET, FRÉDÉRIC MARC MAURICE;
EMBRECHTS, WERNER;
FORTIN, JÉRÔME MICHEL CLAUDE;
MC GOWAN, DAVID CRAIG;
MULLER, PHILIPPE y
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD

⑦ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 690 082 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de purina para el tratamiento de infecciones virales

5 Esta invención se refiere a derivados de purina, procedimientos para su preparación, composiciones farmacéuticas y su uso para tratar infecciones virales.

10 La presente invención se refiere al uso de derivados de purina en el tratamiento de infecciones virales, trastornos inmunitarios o inflamatorios, de ese modo está implicada la modulación, o agonismo, de receptores de tipo Toll (TLRs). Los receptores de tipo Toll son proteínas transmembranarias primarias caracterizadas por un dominio rico 15 en leucina extracelular y una extensión citoplásmica que contiene una región conservada. El sistema inmunitario innato puede reconocer patrones moleculares asociados a patógenos a través de estos TLRs expresados sobre la superficie celular de ciertos tipos de células inmunitarias. El reconocimiento de patógenos extraños activa la producción de citocinas y la regulación al alza de moléculas coestimulantes sobre fagocitos. Esto conduce a la modulación del comportamiento de células T.

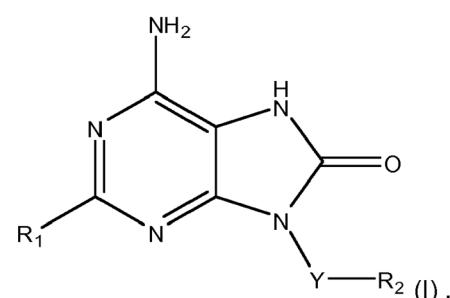
15 20 25 Se ha estimado que la mayoría de las especies de mamíferos tienen entre diez y quince tipos de receptores de tipo Toll. Se han identificado treinta TLRs (nombrados de TLR1 a TLR13) en seres humanos y ratones conjuntamente, y se han encontrado formas equivalentes de muchos de estos en otras especies de mamífero. Sin embargo, no están presentes en todos los mamíferos equivalentes de ciertos TLR encontrados en seres humanos. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína análoga a TLR10 en seres humanos está presente en ratones, pero parece haberse dañado en algún punto en el pasado por un retrovirus. Por otra parte, los ratones expresan TLRs 11, 12 y 13, ninguno de los cuales están representados en seres humanos. Otros mamíferos pueden expresar TLRs que no se encuentran en seres humanos. Otras especies no mamíferas pueden tener TLRs distintos a los mamíferos, según se demuestra por TLR14, que se encuentra en el pez globo Takifugu. Esto puede complicar el proceso de usar animales experimentales como modelos de inmunidad innata humana.

Para una revisión sobre los receptores de tipo Toll, véase por ejemplo el siguiente artículo de revista: Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p33-38, 2003.

30 Compuestos que indican la actividad sobre receptores de tipo Toll se han descrito previamente, tales como derivados de purina en el documento WO 2006/117670, derivados de adenina en los documentos WO 98/01448 y WO 99/28321 y pirimidinas en el documento WO 2009/067081.

35 40 La bibliografía anterior sobre derivados de purina incluye el documento US 6376501, que se refiere a un inhibidor de la respuesta inmunitaria selectiva para células T cooperadoras de tipo 2, un regulador de la respuesta inmunitaria y un agente antialérgico. El documento US 2007/0225303 divulga un compuesto de 8-oxoadenina como un inmunomodulador. Además, el documento WO 2011/049825 trata de derivados de purina como moduladores de TLRs, incluyendo TLR7. Otras referencias anteriores que se refieren a derivados de purina para la modulación de TLR7 son los documentos WO 2009/005687, WO 2008/114008, EP 2138497 y EP 1939198. Sin embargo, existe una gran necesidad de nuevos moduladores de receptores tipo Toll que tengan selectividad preferida, potencia superior, estabilidad metabólica superior, solubilidad superior y un perfil de seguridad mejorado en comparación con los compuestos de la técnica anterior.

45 Según la presente invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo de los mismos, en donde

Y es alquíleno (C_{1-4}),

50 R₁ es un heteroarilo¹ y

R₂ un arilo² o un heterociclico, en donde heteroarilo¹ significa imidazolilo, pirimidilo, pirrolilo, pirazolilo, furilo, oxazolilo, oxadiazolilo o isoxazolilo. El heteroarilo¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₄, cicloalquilo C₃₋₆ o halógeno,

5 El término arilo² incluye fenilo, naftilo, antracenilo y fenantrenilo y es preferiblemente fenilo. El arilo² está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₄, trifluorometilo, CO₂R₃, halógeno, hidroxil-alquilo(C₁₋₄), NR₆R₇, C(O)R₆, C(O)NR₆R₇, alquil(C₁₋₄)-dietoxifosforilo o ácido alquil(C₁₋₄)-fosfónico.

R₃ se selecciona de H y alquilo C₁₋₆.

10 R₆ y R₇ se selecciona cada uno independientemente de H, alquilo C₁₋₆ o alcoxi C₁₋₄.

El término "heterociclico" se refiere a tetrahidropirano y heteroarilo².

15 El término heteroarilo² incluye piridilo, tetrahidroisoquinolinilo, imidazopiridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, piracínilo, pirimidilo, naftiridinilo, piridacínilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, pirazolilo, tiazolilo, imidazolilo, indazolilo. El heteroarilo² está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₄, oxi-alquil(C₁₋₄)-amina o pirrolidinilmetanona.

20 En una realización adicional, esta invención abarca un compuesto de fórmula (I) en la que R₁ se selecciona del grupo que comprende un imidazolilo o un pirazolilo cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₄ o cicloalquilo C₃₋₆.

25 Compuestos preferidos según la invención son los compuestos listados en la Tabla 1 y la Tabla 2, respectivamente, bajo el encabezamiento de los siguientes números: 1, 4, 9, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 48, 49, 50, 51 y 54.

30 Por otra parte, pertenece a la invención una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 Parte de la invención también es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo o una composición farmacéutica mencionada anteriormente para el uso como un medicamento.

40 El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o cadena ramificada que contiene el número de átomos de carbono especificado.

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

50 El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico que contiene el número de átomos de carbono especificado.

55 El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo (cadena de carbono e hidrógeno) singular unido a oxígeno, como por ejemplo un grupo metoxi o etoxi.

60 Sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen las sales por adición de ácido y de base de los mismos. Sales por adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales atóxicas. Sales de base adecuadas se forman a partir de bases que forman sales atóxicas.

65 Los compuestos de la invención también pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas. El término "solvato" se usa en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol.

70 El término "polimorfo" se refiere a la capacidad del compuesto de la invención para existir en más de una forma o estructura cristalina.

75 Los compuestos de la invención pueden estar presentes en la llamada formación de "tautómero(s)" que se refiere a isómeros de compuestos orgánicos que se interconvierten fácilmente mediante una reacción química llamada

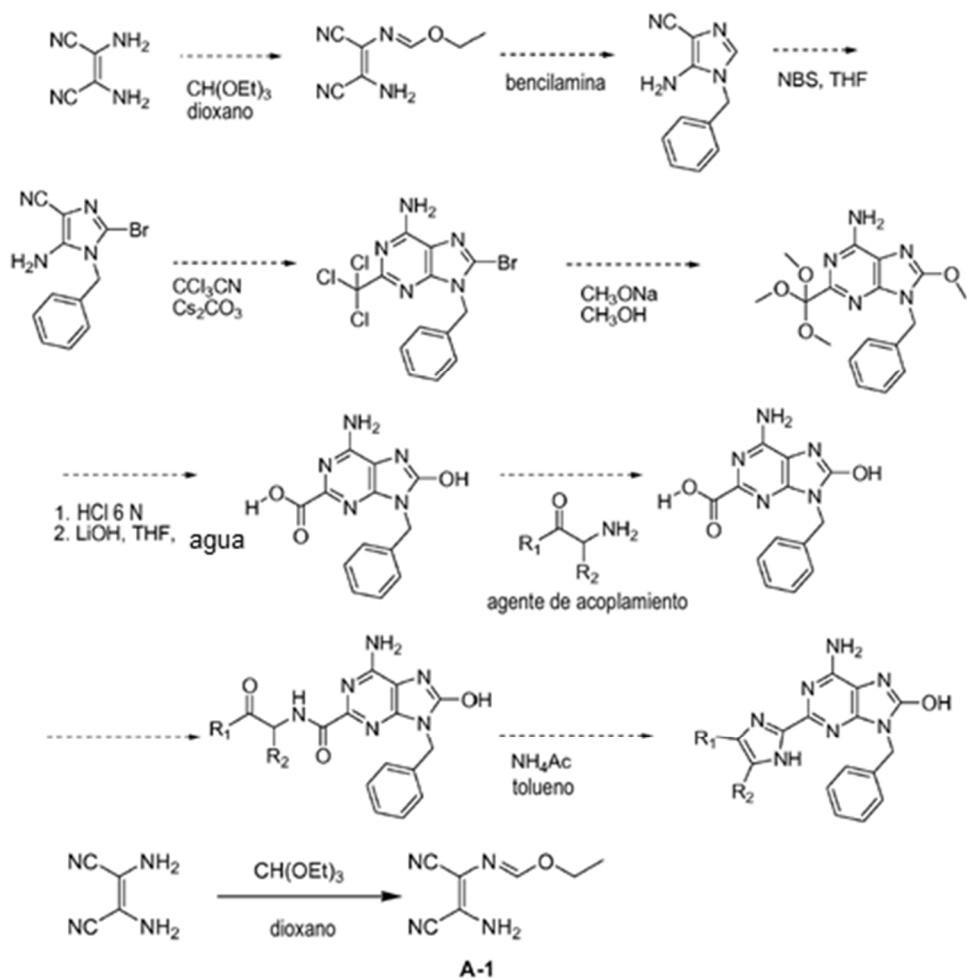
tautomerización. Esta reacción da como resultado la migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañada por un cambio de un enlace sencillo y un doble enlace adyacente.

- 5 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como productos cristalinos o amorfos. Se pueden obtener, por ejemplo, como tacos sólidos, polvos o películas mediante métodos tales como precipitación, cristalización, liofilización, secado por pulverización o secado evaporativo. Se pueden administrar solos o en combinación con uno o más de otros compuestos de la invención o en combinación con uno o más de otros fármacos. Generalmente, se administrarán como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente 10 distinto al compuesto o los compuestos de la invención. La elección del excipiente depende en gran parte de factores tales como el modo de administración particular, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación.
- 15 Los compuestos de la presente invención o cualquier subgrupo de los mismos se pueden formular en diversas formas farmacéuticas con propósitos de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las 20 composiciones habitualmente empleadas para administrar fármacos sistémicamente. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal por adición, como el ingrediente activo, se combina en una mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, por ejemplo, para la administración oral, rectal o percutánea. Por ejemplo, al preparar las 25 composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad en la administración, los comprimidos y las cápsulas 30 representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. También se incluyen preparaciones en forma sólida que se pueden convertir, poco antes del uso, en formas líquidas. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, 35 opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no introducen un efecto perjudicial significativo sobre la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de diversos modos, p. ej., como un parche transdérmico, como una pipeta o como una pomada. Los compuestos de la 40 presente invención también se pueden administrar a través de inhalación o insuflación por medio de métodos y formulaciones empleados en la técnica para la administración a través de este modo. Así, en general, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a los pulmones en la forma de una solución, una suspensión o un polvo seco.
- 45 Es especialmente ventajoso formular las susodichas composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria según se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, que contiene cada una una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de estas formas de dosificación unitarias son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o revestidos), cápsulas, píldoras, bolsitas de polvos, obleas, supositorios, soluciones o suspensiones inyectables y múltiples segregados de los mismos.
- 50 Los expertos en el tratamiento de enfermedades infecciosas serán capaces de determinar la cantidad eficaz a partir de los resultados de prueba presentados aquí posteriormente. En general, se contempla que una cantidad diaria eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 1 a 1000 mg y en particular de 5 a 200 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.
- 55 La dosificación y la frecuencia de administración exactas dependen del compuesto de fórmula (I) particular usado, la afección particular que se trate, la gravedad de la afección que se trate, la edad, el peso y la condición física general del paciente particular así como otra medicación que pueda estar tomando el individuo, como es muy conocidos por los expertos en la técnica. Por otra parte, es evidente que la cantidad eficaz se puede disminuir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de esta invención. Por lo tanto, los intervalos de cantidad eficaz mencionados anteriormente solamente 60 son directrices y no están destinados a limitar el alcance o el uso de la invención en ningún grado.

Sección experimental

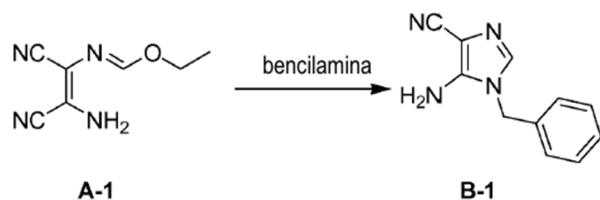
Solo los compuestos que se encuentran dentro de las reivindicaciones se han de considerar parte de la invención.

5 Esquema global en la preparación de los compuestos finales (Método 1).



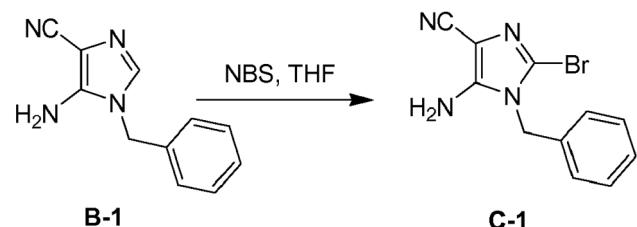
Preparación del producto intermedio A-1.

10 Se combinaron diaminomaleononitrilo (6 g, 55 mmol) y ortoformiato de trietilo (9,2 ml, 55 mmol) en 1,4-dioxano (95 ml) y se calentaron bajo condiciones de destilación hasta que se habían recogido 65 ml de 1,4-dioxano/etanol. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de éter de petróleo a acetato de etilo al 25% en éter de petróleo para dar 5 g de A-1.

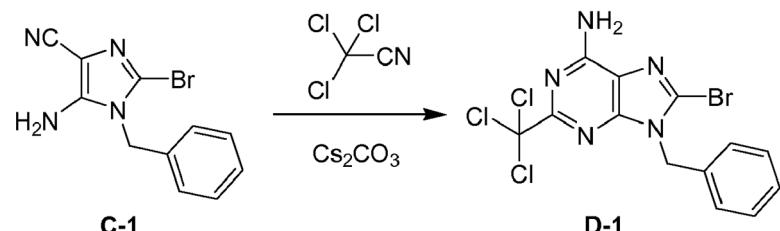


Preparación del producto intermedio **B-1**.

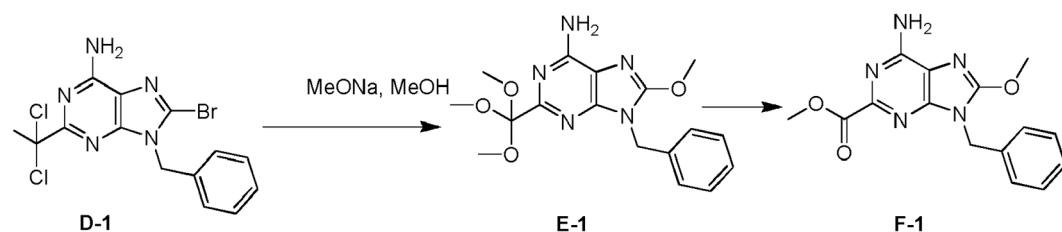
Se añadió gota a gota bencilamina (2,86 ml, 26,3 mmol) a una solución de **A-1** (4,1 g, 25 mmol) e hidrocloruro de anilina (50 mg) en etanol (80 ml), agitando a 10°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a NaOH 1 M (50 ml), agitando a 10°C, y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El sólido se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó a vacío. Se obtuvo el compuesto del epígrafe como un sólido blancuzco, **B-1** (4 g).

Preparación del producto intermedio **C-1**.

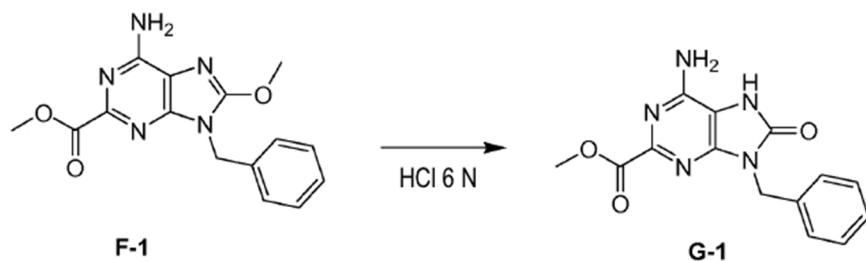
Se añadió en porciones N-bromosuccinimida (4 g, 22 mmol) a una suspensión de **B-1** (4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se extrajo de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) con acetato de etilo (300 ml), se secó sobre Na₂SO₄, los sólidos se retiraron mediante filtración y los disolventes del filtrado se retiraron bajo presión reducida. El residuo se purificó a través de cromatografía en columna usando un gradiente de diclorometano a metanol al 5% en diclorometano. Las mejores fracciones se reunieron, los disolventes se retiraron bajo presión reducida para proporcionar un sólido rosa, **C-1** (3 g).

Preparación del producto intermedio **D-1**.

Se añadió tricloroacetonitrilo (4,8 g, 17,3 mmol) a una suspensión de **C-1** (4 g, 14,4 mmol) y Cs₂CO₃ (9,4 g, 29 mmol) en tolueno (50 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla se vertió en agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, los sólidos se retiraron mediante filtración y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se suspendió en etanol (20 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El sólido resultante se recogió mediante filtración y se lavó con metanol para dar un sólido blancuzco, **D-1** (2,7 g).

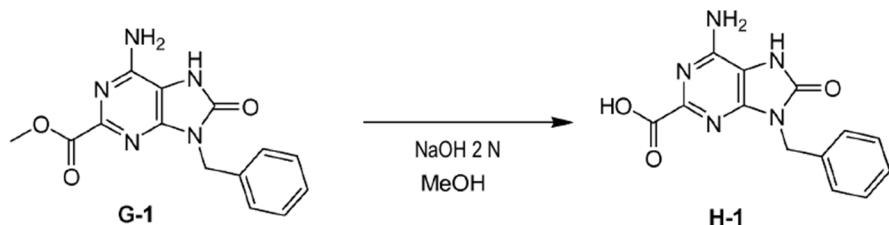
25 Preparación del producto intermedio **F-1**

Se añadió metóxido sódico (2,4 g, 0,06 mol) a una suspensión de **D-1** (5 g, 12 mmol) en metanol (100 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla se enfrió en un baño de agua de hielo y se desactivó con agua. El metanol se evaporó a vacío y el residuo se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se concentró para proporcionar **F-1** (4,6 g, bruto).



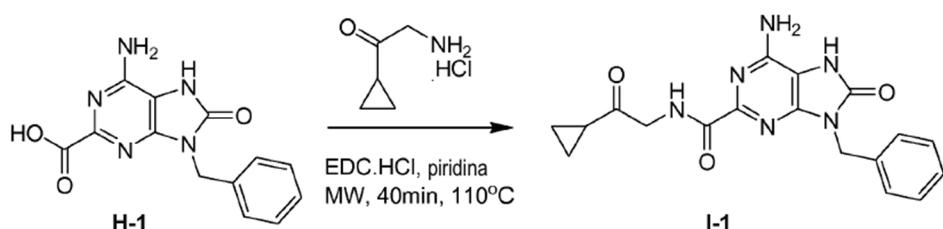
Preparación del producto intermedio **G-1**.

El producto intermedio **F-1** (4,6 g, 15 mmol) se suspendió en HCl 6 N (ac.) (75 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 32 horas a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con amoníaco y el precipitado resultante se recogió mediante filtración y se lavó con agua para proporcionar **G-1** (3,2 g).



Preparación del producto intermedio **H-1**.

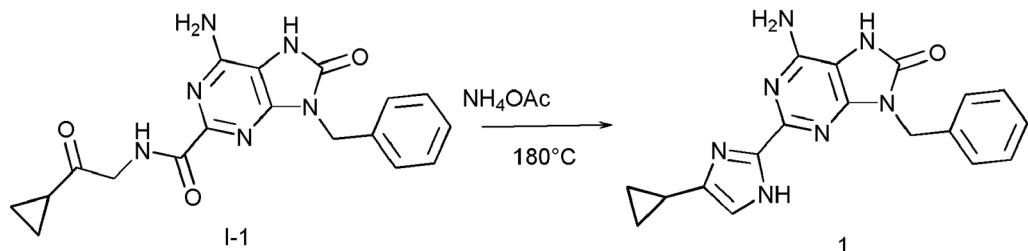
Se añadió NaOH 2 N (ac.) a una solución de **G-1** (1 g, 3,34 mmol) en metanol (50 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El metanol se retiró bajo presión reducida y la mezcla de reacción se acidificó hasta pH 2 con HCl 2 N (ac). El precipitado resultante se recogió mediante filtración y se lavó con agua para proporcionar **H-1** (0,95 g).



Preparación del producto intermedio **I-1**.

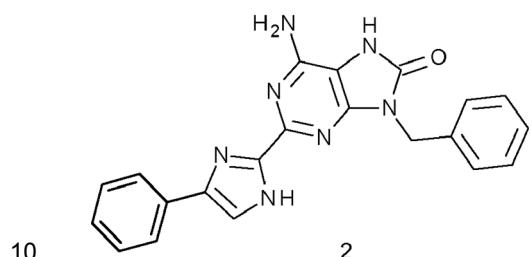
Una mezcla de **H-1** (500 mg, 1,4 mmol), aminocetona **2** (284 mg, 1,6 mmol) y EDCI (460 mg, 2,4 mmol) en piridina (10 ml) se calentó en el microondas hasta 110 grados C durante 0,5 horas. La mezcla se concentró para dar el producto en bruto que se lavó con acetonitrilo (10 ml) y agua fría para dar el producto intermedio **I-1**, como un sólido blancuzco (0,5 g).

Compuesto 1



5 Se añadió NH_4OAc (5g) a un vial y se calentó en un baño de aceite hasta que se fundió. A continuación, se añadió I-1 (100 mg) y la mezcla de reacción se calentó en el microondas durante 1 hora a 180°C . La mezcla se vertió en agua y se extrajo con un disolvente orgánico mixto (dclorometano:isopropanol 3:1, 2 x 60 ml), se secó y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar un sólido amarillo, 1 (105 mg).

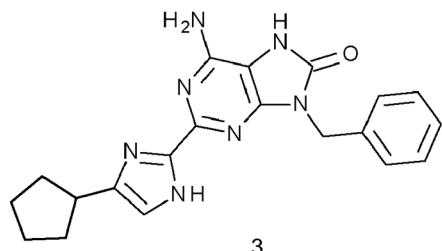
Compuesto 2



10

El compuesto 2 se sintetizó según el procedimiento para sintetizar el compuesto 1 (230 mg).

Compuesto 3

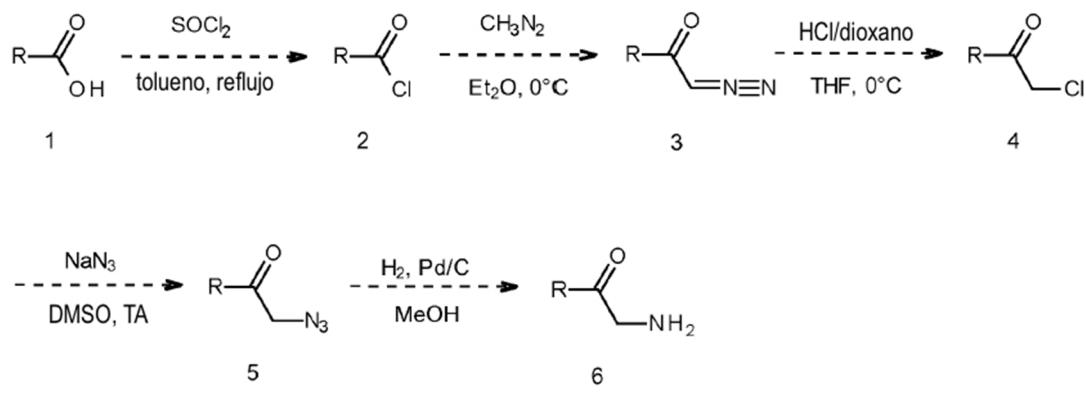


15

Compuesto 3 se sintetizó según el procedimiento para sintetizar el compuesto 1 (205 mg).

Procedimiento general para la preparación de aminocetonas

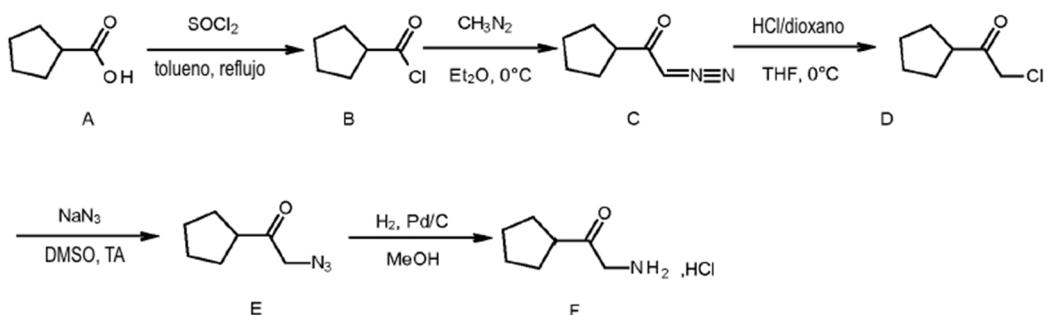
Esquema químico general



Un ácido carboxílico (1) se convierte en el correspondiente cloruro de ácido (2) a través de cloruro de tionilo. También es posible emplear otros agentes de cloración, por ejemplo cloruro de oxalilo u oxicloruro de fósforo). El cloruro de ácido (2) se trata con diazometano a temperatura inferior para proporcionar una diazocetona (3). La diazocetona (3) se convierte en su alfa-clorocetona (4) a través de la adición de ácido clorhídrico a baja temperatura. El cloro de la alfa-clorocetona (4) se desplaza mediante una azida, a partir de una fuente de azida apropiada como azida sódica, en presencia de, habitualmente, un disolvente aprótico dipolar, por ejemplo DMSO.

Preparación de la aminocetona 1

Esquema de reacción



15 Etapa 1. Se añadió SOCl_2 (15 ml) a una solución de **A** (15 g, 0,13 mol) en tolueno (50 ml). La mezcla de reacción se sometió a refluxo durante 3 h. El tolueno se retiró bajo presión reducida. El producto de cloruro de ácido se obtuvo como un líquido pardo (16 g) y se usó en la siguiente etapa directamente.

20 Etapa 2. Se añadió CH_3N_2 (200 ml) a 0°C a una solución de **B** (16 g, 0,12 mol) en éter dietílico (100 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a esta temperatura. El éter se retiró a vacío a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (gel de sílice, eluyente: éter de petróleo:acetato de etilo 10:1) para dar **C** (12 g).

^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 5.18 (s a, 1H), 2.65 (s a, 1H), 1.45 - 1.81 (m, 8H)).

25 Etapa 3. Se añadió HCl 4 N/dioxano gota a gota a 0°C a una solución de **C** (12 g, 0,096 mol) en THF (65 ml). La reacción se comprobó mediante TLC. La reacción se neutralizó con NaHCO_3 (ac. sat.). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml), se secó y se concentró para dar **D** (11 g). Este producto se usó en la siguiente etapa inmediatamente.

30 ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 4.10 (s, 2H), 3.04 (quin, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 1.54 - 1.87 (m, 8H)

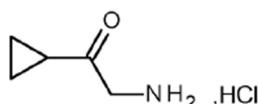
Etapa 4. Se añadió NaN_3 (3,9 g, 0,06 mol) a una solución de **D** (7,3 g, 0,05 mol) en DMSO (30 ml). La reacción se agitó durante la noche y se comprobó mediante TLC. La reacción se vertió en agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100ml), se secó sobre sulfato sódico, los sólidos se retiraron mediante filtración y los disolventes del filtrado se retiraron bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de éter de petróleo a acetato de etilo para proporcionar **E** (5,28 g).

5 ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 3.93 (s, 2H), 2.83 (quin, $J=7.3$ Hz, 1H), 1.56 - 1.84 (m, 8H)

10 Etapa 5. Una mezcla de **E** (3,28 g, 0,02 mol), HCl conc. (1,8 ml, 0,02 mol) y 1 g de Pd/C (10%) en 30 ml de metanol se agitó durante la noche bajo 0,34 MPa (50 psi) de atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para dar la aminocetona - 1 (2 g).

^1H RMN (MeOD , 400MHz): δ (ppm) 4.03 (s, 2H), 3.01 - 3.12 (quin, $J=7.3$ Hz, 1H), 1.67 - 1.98 (m, 8H)

Aminocetona 2

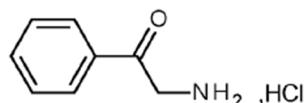


Aminocetona 2

15

La aminocetona 2 se preparó según el procedimiento para preparar la aminocetona 1.

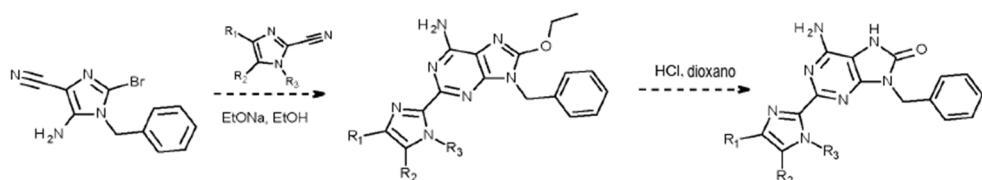
Aminocetona 3



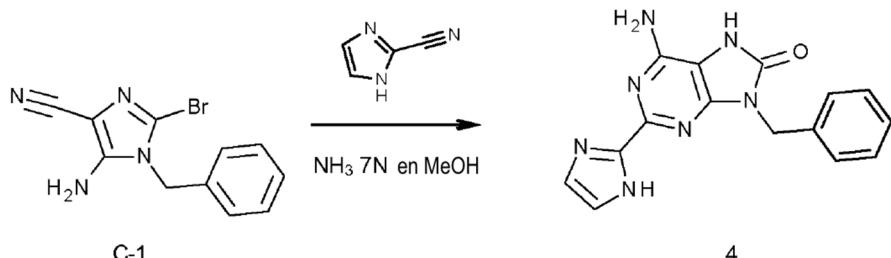
Aminocetona 3

20 La aminocetona 3 se preparó según el procedimiento para preparar la aminocetona 1.

Esquema global en la preparación de productos finales (Método 2)

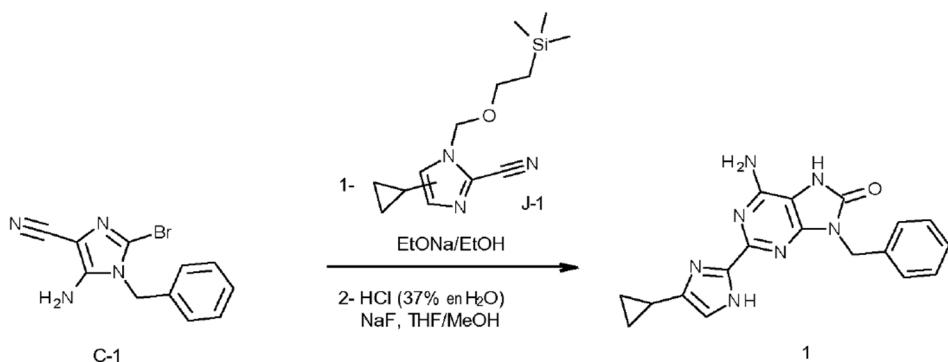


Preparación del compuesto 4



Una mezcla de **C-1** (1,6 g, 5,78 mmol) (su síntesis es tal como se describe en el documento WO20060117670 en las páginas 59-60: "Preparación 6, 7 y 8", respectivamente, para obtener 5. Se agitaron amino-1-bencil-2-bromo-1H-imidazol-4-carbonitrilo y 2-ciano-imidazol (592 mg, 6,35 mmol) en NH₃/MeOH (7 N) (60 ml) a 140°C durante 48 horas en un reactor de recipiente a presión. El disolvente se evaporó. El compuesto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice (15-40 µm, 40 g), en DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,5 → 95/5/0,5 para dar el compuesto **4** (78 mg, 4,4% de rendimiento).

10 Síntesis alternativa del compuesto 1



Etapa 1

Se añadió EtONA (904 mg; 13,3 mmol) a una solución del 2-cianoimidazol **I-1** (0,7 g; 2,66 mmol) y el producto intermedio **C-1** (736 mg; 2,66 mmol) en EtOH (30 ml). La mezcla se agitó a 90°C durante 16 h. El disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 45 g Merck, fase móvil 97/3/0,1 a 95/5/0,5) para dar 0,51 g del producto intermedio etoxilado protegido con SEM como un sólido ligeramente amarillo (38% de rendimiento).

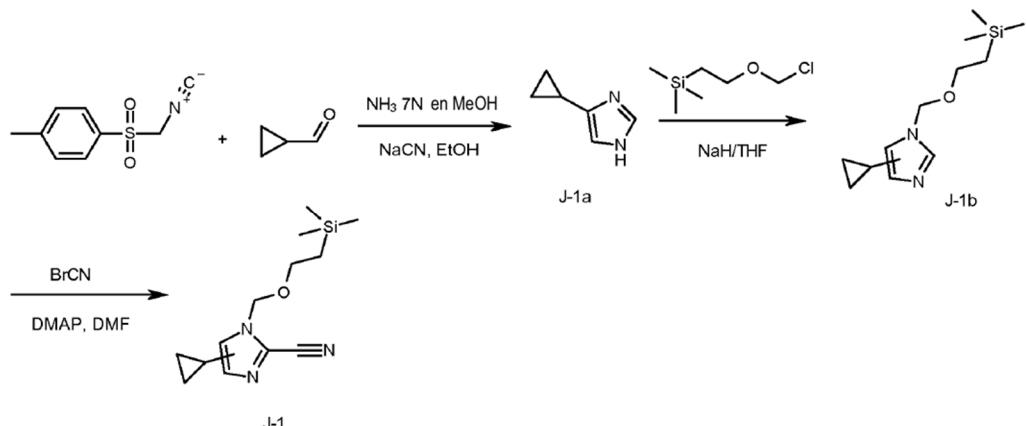
HPLC TR (min) = 7.45 ; MS M+ (H⁺): 506 método (v2003v2002)

20 Etapa 2

Se añadió NaF (170 mg; 4,05 mmol) a una solución de producto intermedio etoxilado protegido con SEM (0,41 g; 0,811 mmol) en THF (28 ml), HCl (37% en H₂O) (28 ml) y MeOH (10 ml). La mezcla se agitó a 40°C durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta TA y se añadió una solución al 10% de K₂CO₃ hasta que el pH de la solución fuera básico. La capa acuosa se saturó con polvo de K₂CO₃ y el producto se extrajo con DCM/MeOH (5%) (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 µm, fase móvil DCM/MeOH/NH₃ ac. 95/5,0,5 a 90/10/0,5) para dar 120 mg del compuesto **1** como un polvo blanco (43% de rendimiento).

Síntesis de los productos intermedios de 2-ciano-imidazol

Síntesis del producto intermedio J-1



- 5 Se añadió NaCN (360 mg; 7,35 mmol) a una suspensión de ciclopropanocarboxaldehído (5 g; 71,3 mmol) e isocianuro de tosilmetilo (13,7 g; 69,9 mmol) en EtOH (200 ml). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a TA. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se lavó con una mezcla de heptano/éter (1:1). El polvo seco beige se agitó en NH_3/MeOH 7N (480 ml; 3,36 mol) y la mezcla se agitó a 100°C en una bomba de acero durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta TA y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. Se añadió al residuo iPr_2O y el sólido se filtró. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el producto en bruto se purificó mediante LC preparativa sobre (SiOH irregular 20-45 μm 1000 g DAVISIL). Fase móvil (NH_4OH al 0,5%, DCM al 94%, MeOH al 6%). La fracción pura se recogió y se evaporó para dar 4,9 g del producto intermedio **J-1a** como un aceite pardo (65% de rendimiento). $^1\text{H RMN}$ (DMSO-d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 8.60 (s a, 1H), 7.58 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 1.85 (m, 1H), 0.86 (m, 2H), 0.71 (m, 2H).
- 10 15 Se añadió gota a gota **J-1a** (4,84 g; 44,8 mmol) en THF (60 ml) a una suspensión de NaH (1,97 g; 49,2 mmol) en THF (200 ml) a 0°C bajo N_2 . La mezcla se agitó a TA durante 30 min y se añadió gota a gota a 0°C SEM-Cl (9,9 ml; 55,9 mmol) en THF (20 ml). La mezcla se agitó a TA bajo N_2 durante 16 h. Se añadió agua y el producto se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 20-45 μm , 150 g Merck, gradiente de la fase móvil de DCM al 50%, heptano al 50% hasta DCM al 100%). Las fracciones que contenían compuesto puro se combinaron y el disolvente se retiró bajo presión reducida para dar 6,6 g de **J-1b** como un aceite amarillo (62%).

Mezcla de 2 regiosómeros: 70/30

25 Regiosómero minoritario:

$^1\text{H RMN}$ (DMSO-d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 7.64 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 3.45 (t, J = 8.08 Hz, 2H), 1.73-1.78 (m, 1H), 0.80-0.86 (m, 2H), 0.72-0.74 (m, 2H), 0.52-0.57 (m, 2H), -0.04 (s, 9H).

30 Regiosómero mayoritario:

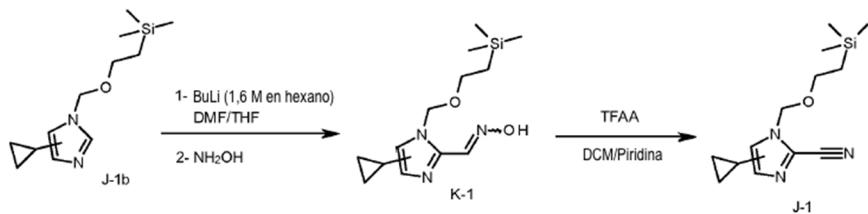
$^1\text{H RMN}$ (DMSO-d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 7.56 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 3.43 (t, J = 8.08 Hz, 2H), 1.73-1.78 (m, 1H), 0.80-0.86 (m, 2H), 0.72-0.74 (m, 2H), 0.56-0.62 (m, 2H), -0.04 (s, 9H).

35 40 Se añadió BrCN (6,11 g; 57,7 mmol) a una solución de DMAP (7,05 g; 57,7 mmol) en DMF (60 ml) a 10°C. La reacción era exotérmica hasta 35°C y se formaba un precipitado amarillo claro. La mezcla se enfrió hasta 10°C y se añadió **J-1b** (5,5 g; 23,1 mmol). La mezcla se agitó a 40°C durante 6 h. Se añadió agua y el producto se extrajo con Et_2O (2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida.

45 El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm 220 g Grace, fase móvil heptano/DCM 50/50 hasta 10/90) para dar 2,2 g de **J-1** impuro, que se purificó adicionalmente mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm 90 g Merck, fase móvil heptano/DCM 30/70) para dar 0,94 g de **J-1** como una mezcla de dos regiosómeros (15% de rendimiento).

HPLC TR (min) = 6.11 ; MS M⁺ (H^+): 264 (método V1004V1012)

Síntesis alternativa del producto intermedio J-1:



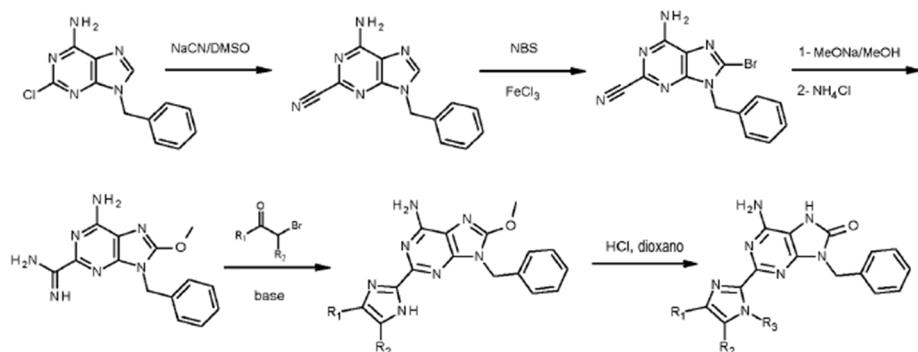
5 Se añadió BuLi (1,6 M en hexano) (11 ml; 17,6 mmol) a una solución de **J-1b** (3,5 g; 14,7 mmol) en THF (60 ml) a -50°C. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min y se añadió DMF (1,7 ml; 22 mmol). La mezcla se calentó lentamente hasta TA en 1 h y se añadió NH₂OH, HCl (970 mg; 29,4 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Se añadió agua y el producto se extrajo con DCM (3 veces), se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se retiró bajo presión reducida para dar 4,1 g (rendimiento cuantitativo) de la mezcla de isómeros **K-1** como un aceite amarillo.

10 HPLC TR (min) = 5.30, 5.41 y 5.90 ; MS M+ (H⁺): 282 (método V2002V2002)

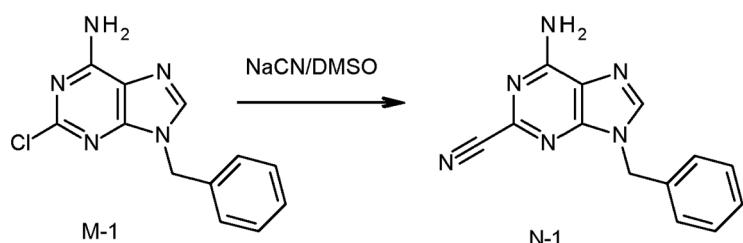
15 Se disolvió **K-1** (3,1 g; 11 mmol) en DCM (18 ml) y piridina (19 ml) a TA. La mezcla se enfrió hasta 0°C y se añadió TFAA (4,6 ml; 33 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 24 h. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en AcOEt. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 µm 90 g Merck, fase móvil heptano/DCM 30/70 hasta DCM 100%) para dar 2,14 g de producto intermedio **J-1** (73%) como una mezcla de dos isómeros.

HPLC TR (min) = 6.51 ; MS M+ (H⁺): 264 (método V2002V2002)

20 Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 3)



Síntesis del producto intermedio N-1

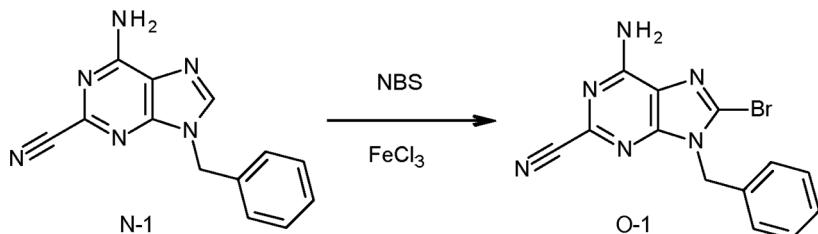


25 En un horno de microondas CEM, una mezcla de **M-1** (su síntesis tal como se describe en el documento WO2006117670 páginas 57-58 "Preparación 1-4", respectivamente, para obtener 6-amino-9-bencil-2-cloro-7,9-dihidro-purin-8-ona) (9,7 g, 37,351 mmol), NaCN (3,11 g, 63,50 mmol) en DMSO (100 ml) se agitó a 150°C durante 4

h. La mezcla se vertió en agua y el precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó bajo vacío a 60°C para dar 8,6 g del producto intermedio **N-1**.

HPLC TR (min) = 5.23 ; MS M⁺ (H⁺): 251 (método V2003V2002)

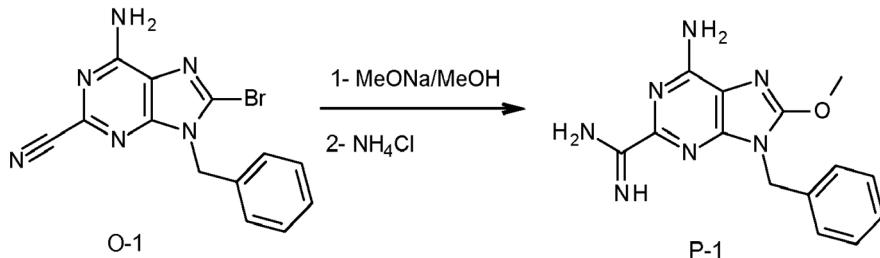
5 Síntesis del producto intermedio **O-1**.



10 Se añadió FeCl₃ (punta de espátula) a una mezcla de **N-1** (3,70 g, 147,84 mmol) y NBS (26,2 g, 147,845 mmol) en CHCl₃ (60 ml). La mezcla se agitó y se sometió a refluxo durante 3 h y a continuación se enfrió hasta TA. El precipitado se separó por filtración. El filtrado se evaporó y se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (15-40 μm, 120 g, CH₂Cl₂/CH₃OH 99-1) para dar 4,5 g de producto intermedio **O-1** impuro. La fracción se recogió en CH₂Cl₂ y el precipitado se separó por filtración para dar 1,8 g del producto intermedio **O-1**.

HPLC TR (min) = 5.77 ; MS M⁺ (HCH₃CN⁺): 370-372 (método V2003V2002)

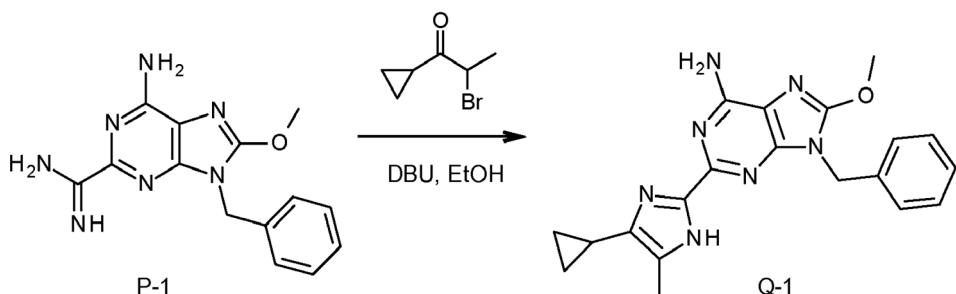
15 Síntesis del producto intermedio **P-1**.



20 Una mezcla de **O-1** (0,82 g, 2,491 mmol), MeONa/MeOH (solución al 30% en peso) (1,15 ml, 6,228 mmol) en MeOH (15 ml) se agitó a 50°C durante 2 h. Se añadió NH₄Cl (333 mg, 6,228 mmol) y la mezcla se agitó y se sometió a refluxo durante 2 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (15-40 μm, 90 g, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH: 85-14-1). Las fracciones puras se recogieron y se concentraron bajo presión reducida para dar 0,55 g del producto intermedio **P-1** (74% de rendimiento).

HPLC TR (min) = 4.46 ; MS M⁺ (H⁺): 298 (método V2003V2002)

25 Síntesis del producto intermedio **Q-1**

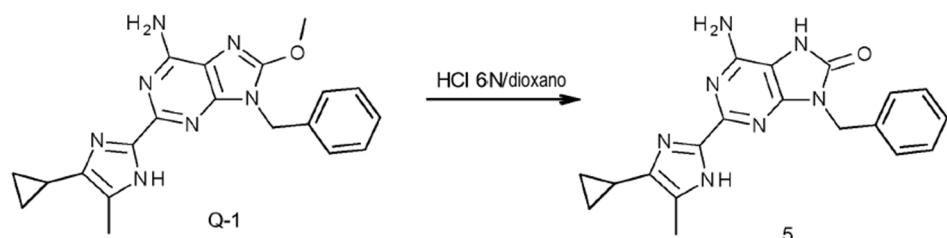


Se añadió gota a gota 2-bromo-1-ciclopropil-propan-1-ona (104 mg, 0,589 mmol) a una mezcla de **P-1** (175 mg, 0,589 mmol) y DBU (0,264 ml, 1,766 mmol) en EtOH (5 ml). La mezcla se agitó y se sometió a refluxo durante 5 h. El disolvente se concentró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo

rápido sobre gel de sílice (15-40 μ m, 40 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 95/5/0,1). Las fracciones puras se recogieron y se concentraron bajo presión reducida para dar 40 mg del producto intermedio **Q-1**. El compuesto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

5 HPLC TR (min) = 5.35 ; MS M⁺ (H⁺): 376 (método V1005V1012)

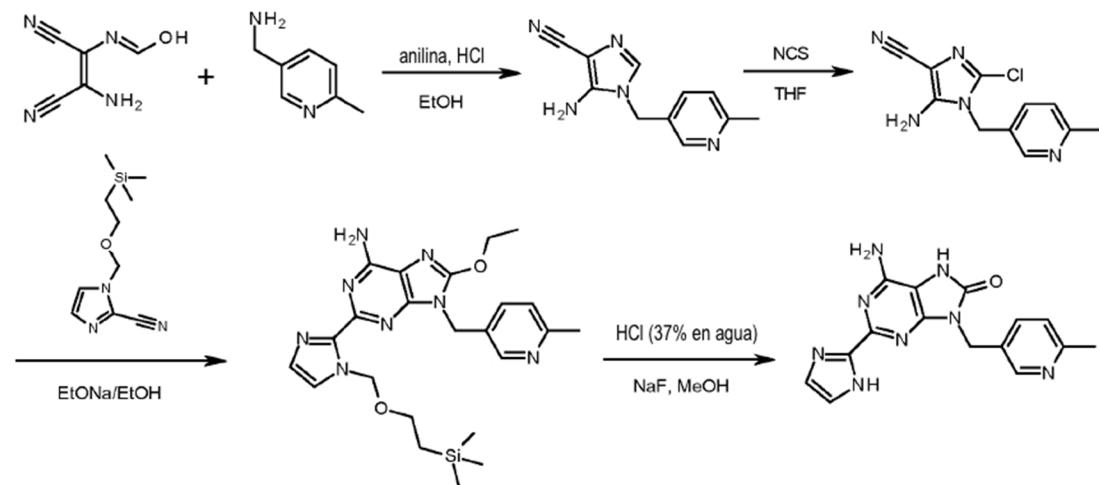
Síntesis del compuesto final 5



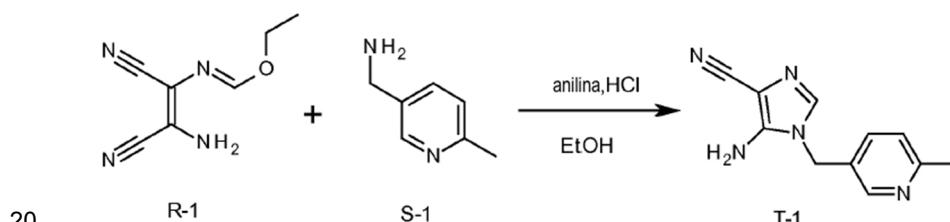
Una mezcla de Q-1 (40 mg, 0,107 mmol) en HCl 6 N (1 ml) y dioxano (1 ml) se agitó a TA durante 6 h. La mezcla se semievaporó bajo presión reducida. La solución se enfrió hasta 0°C, se basificó con NaHCO_3 y se extrajo con $\text{EtOAc-CH}_3\text{OH}$ (90-10). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (15-40 μ m, 10 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 88-12-0,5). Las fracciones puras se recogieron y se concentraron bajo presión reducida. El sólido resultante (35 mg) se cristalizó en Et_2O para proporcionar 25 mg del compuesto 5 (64% de rendimiento, PF > 260°C).

15

Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 4)



Síntesis del producto intermedio T-1

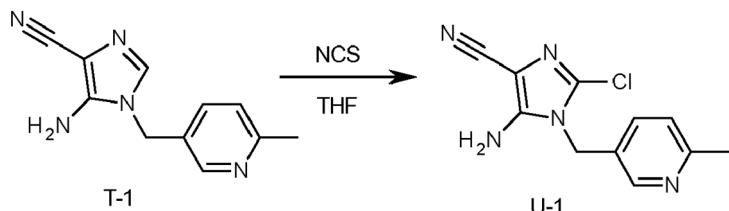


Se añadió gota a gota **S-1** (síntesis descrita en *J. Med. Chem.* 1996, 39, 13, 2586-2593) (1,14 g; 9,33 mmol) a una solución de **R-1** (síntesis descrita en WO2006/117670) (1,46 g; 8,89 mmol) y anilina, HCl (18 mg; 0,14 mmol) en EtOH (30 ml) a 10°C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 h. Una solución acuosa de NaOH 3 M (30 ml)

se añadió gota a gota a la solución a 10°C y la mezcla resultante se agitó a TA durante 1 h. La capa acuosa se extrajo con DCM (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío para dar 1,20 g de **T-1** como un sólido pardo (63% de rendimiento). **T-1** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. HPLC TR (min) = 4.45 ; MS M⁺ (H⁺): 214 (método V1010V1012)

5

Síntesis del producto intermedio U-1



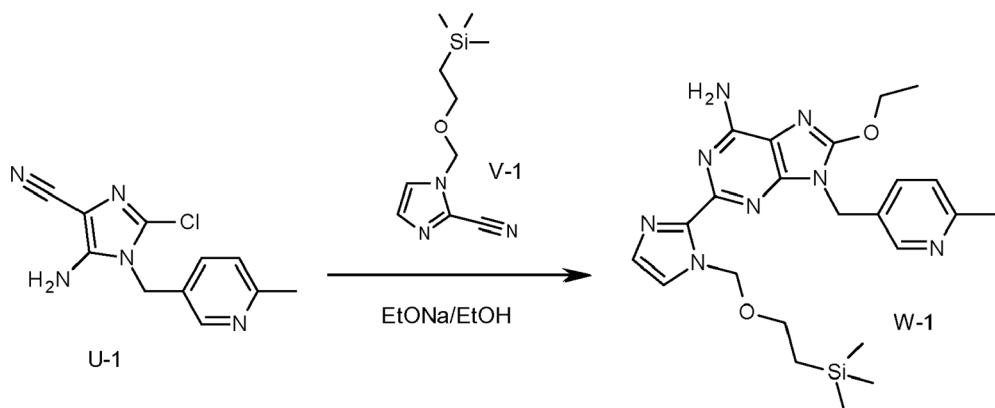
Una solución de NCS (475 mg; 3,56 mmol) en THF (10 ml) se añadió gota a gota a una solución de **T-1** (690 mg; 3,24 mmol) en THF (35 ml). La solución se agitó a TA durante 20 h bajo un flujo de N₂. Una solución de NCS (260 mg; 1,94 mmol) en THF (5 ml) se añadió gota a gota a la solución. La solución se agitó a TA durante 16 h bajo un flujo de N₂. La mezcla se recogió con DCM, se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a vacío para dar 950 mg de un sólido pardo. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm, 40 g Grace, muestra líquida, fase móvil: DCM al 98%, MeOH al 2% a DCM al 90%, MeOH al 10%). Las fracciones que contenían compuesto puro se combinaron y el disolvente se retiró a vacío para dar 200 mg de **U-1** como un sólido pardo (25% de rendimiento).

10

15

HPLC TR (min) = 5.13 ; MS M⁺ (H⁺): 248-250 (método V2012V2002)

Síntesis del producto intermedio W-1

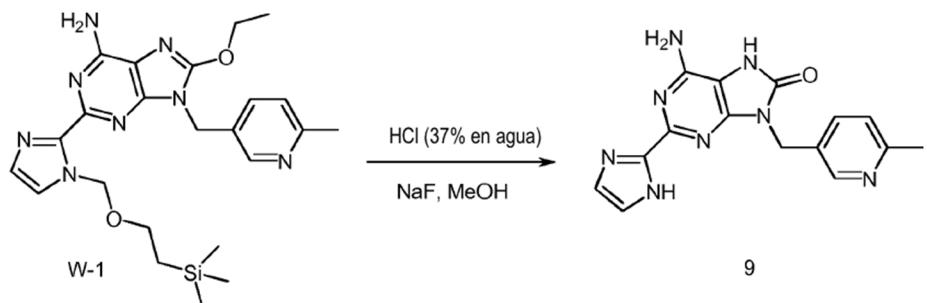


Se añadió EtONa (398 mg; 5,85 mmol) a una solución de **U-1** (290 mg; 1,17 mmol) y **V-1** (270 mg; 1,21 mmol) en EtOH (15 ml). La mezcla se agitó a 90°C durante 16 h. El disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm, 50 g Merck, muestra sólida, fase móvil 97/3/0,1). Las fracciones que contenían compuesto puro se combinaron y el disolvente se retiró para dar 210 mg de **W-1** como un sólido ligeramente amarillo (37% de rendimiento). HPLC TR (min) = 6.68 ; MS M⁺ (H⁺): 248-250 (método V1010V1012)

20

25

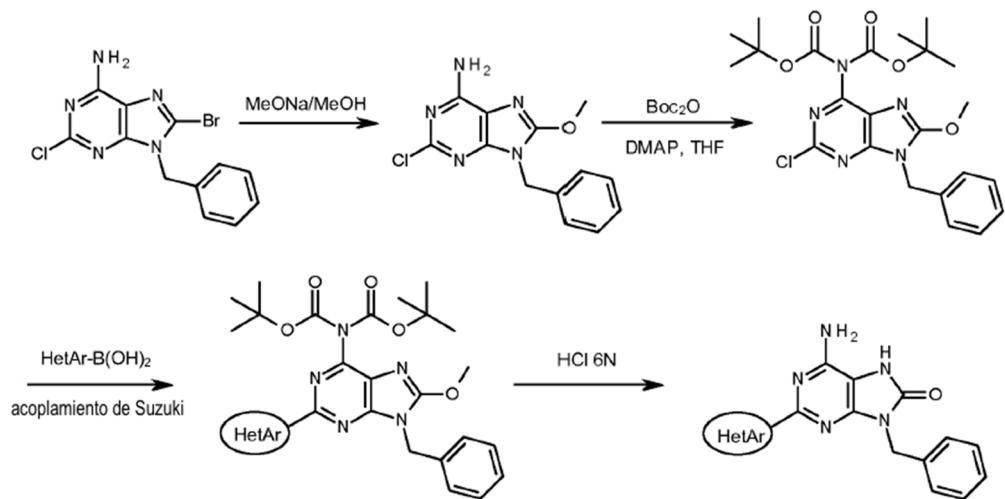
Síntesis del Compuesto 9



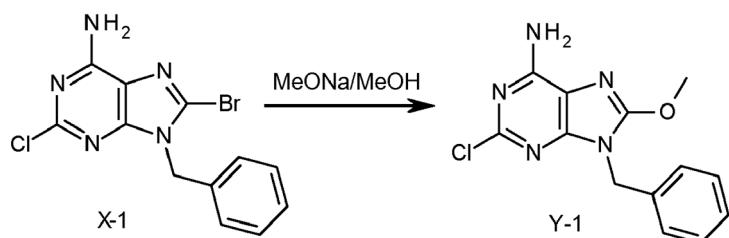
5 Se añadió NaF (91 mg; 2,18 mmol) a una solución de **W-1** (210 mg; 0,44 mmol) en HCl al 37% en agua (15 ml) y MeOH (10 ml). La mezcla se agitó a 40°C durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta TA y se añadió una solución acuosa al 10% de K_2CO_3 hasta pH básico. La capa acuosa se saturó con polvo de K_2CO_3 y el producto se extrajo con DCM/MeOH (95/5) (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μ m, Merck 10 g, fase móvil DCM/MeOH/NH₃ ac. 93/3/0,1 a 85/15/1). Las fracciones que contenían compuesto puro se combinaron, el disolvente se retiró a vacío y el compuesto del epígrafe se secó a vacío durante 16 h a 60°C para dar 9,8 mg del compuesto **9** (6%) como un sólido pardo claro. p. f. > 260°C.

10

Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 5)



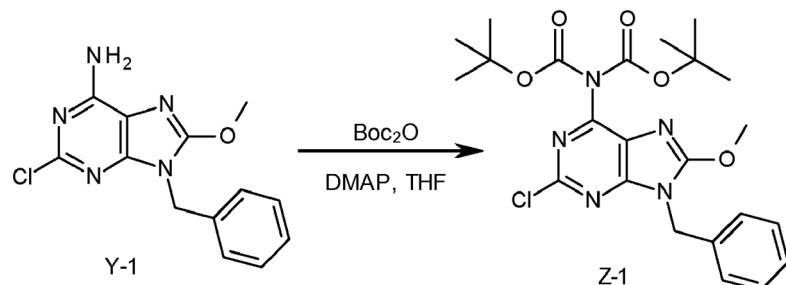
15 Síntesis del producto intermedio Y1



20 Se añadió gota a gota metóxido sódico (30% en peso en MeOH) (15,6 ml, 84,172 mmol) a una mezcla de X1 (síntesis descrita en Bioorg. Med. Chem., 11, 2003, 5501-5508) (5,7 g, 16,834 mmol) en MeOH (150 ml) a TA. La mezcla se agitó a 60°C durante 6 h y a continuación se enfrió hasta TA. El precipitado se separó por filtración y se secó, para dar 3,25 g de Y1. El compuesto en bruto se usó en la siguiente etapa.

HPLC TR (min) = 5.53 ; MS M⁺ (H⁺): 290-292 (método V2003V2002)

Síntesis del producto intermedio Z-1

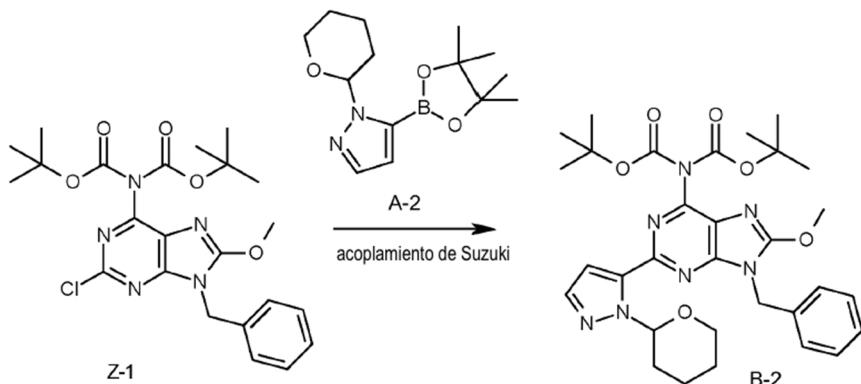


Se añadió Boc₂O (3,0 g, 13,806 mmol) bajo un flujo de N₂ a una mezcla de Y-1 (1,0 g, 3,452 mmol), DMAP (42 mg, 0,345 mmol) en THF (10 ml) a TA. La mezcla se agitó a 80°C durante 2h. La mezcla se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa sobre (SiOH irregular 20-45 µm 450 g MATREX). Fase móvil (gradiente de DCM al 98%, AcOEt al 2% hasta DCM al 95%, AcOEt al 5%) para proporcionar 0,825 g de Z-1 (49% de rendimiento, PF = 159°C).

10

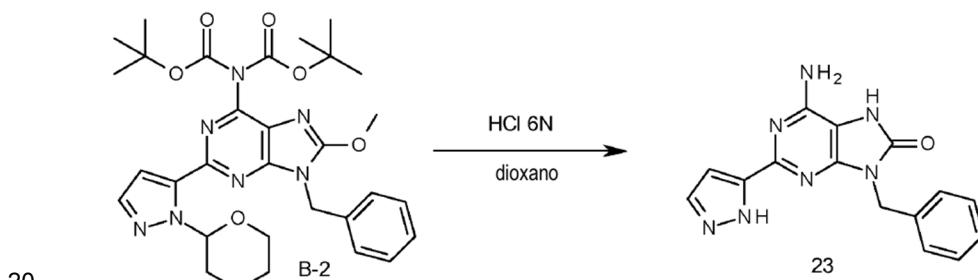
HPLC TR (min) = 4.43 ; MS M⁺ (H⁺): 490-492 (método V2015V2007)

Síntesis del producto intermedio B-2



Una solución de Z-1 (300 mg, 0,612 mmol), A-2 (255 mg, 0,918 mmol) y NaHCO₃ (257 mg, 3,06 mmol) en dioxano/agua (4/1) (3 ml) se desgasificó al burbujeo N₂ durante 10 min. Se añadió tetraakis-(trifenilfosfino)-paladio (142 mg, 0,122 mmol) y la mezcla se agitó a 100°C durante 5 h. Se añadieron agua y EtOAc y las capas se decantaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se evaporó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

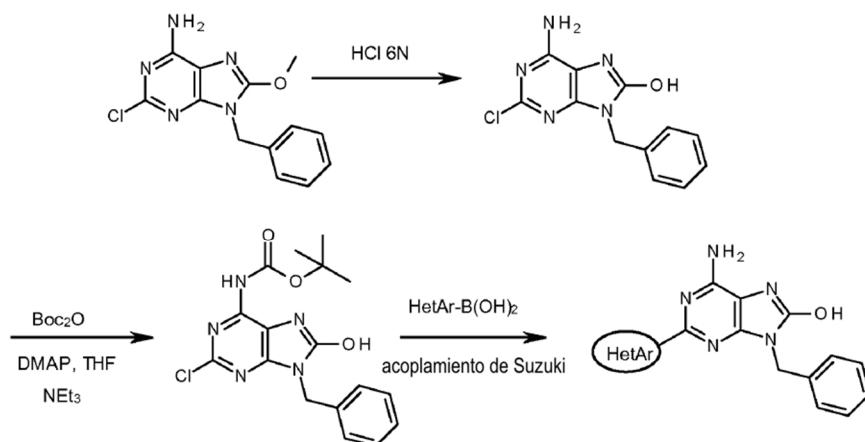
Síntesis del compuesto final 23



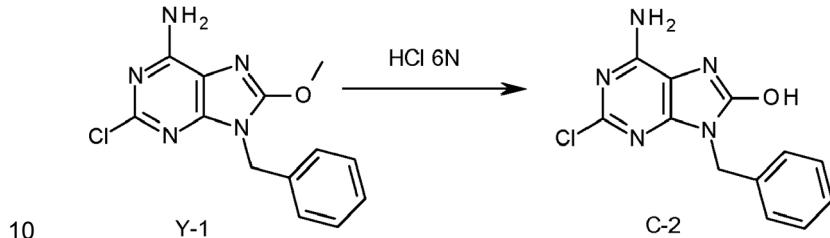
20

5 Se añadió HCl 6 N (10 ml) a una solución de B-2 (0,7 g, 1,15 mmol) en dioxano (7 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a TA durante 12 h y a continuación se enfrió hasta 0°C y se basificó con K₂CO₃. La mezcla se extrajo con EtOAc+CH₃OH (90-10). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa sobre (sílice estable 5 µm 150x30,0 mm). Fase móvil (gradiente desde NH₄OH al 0,3%, DCM al 97%, MeOH al 3% hasta NH₄OH al 1,4%, DCM al 86%, MeOH al 14%), para dar 67 mg del compuesto final 23 después de la cristalización en CH₃OH (19% de rendimiento).

Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 6)



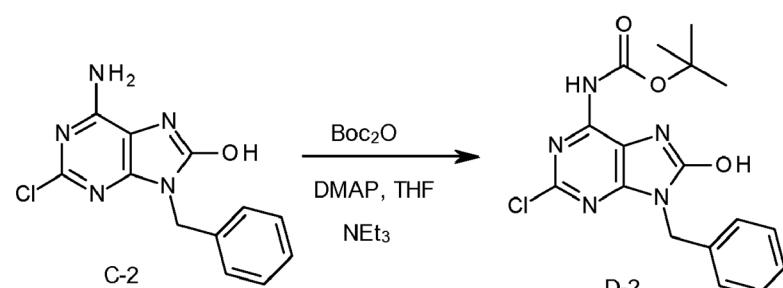
Síntesis del producto intermedio C-2



10 Una mezcla de Y-1 (0,53 g, 1,829 mmol) en HCl 6 N (5 ml) y dioxano (5 ml) se agitó a TA durante 18 h. El precipitado se separó por filtración, se lavó con el mínimo de dioxano frío y se secó para proporcionar 0,28 g de C-2 en bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15 HPLC TR (min) = 4.96 ; MS M⁺ (H⁺): 276-278 (método V2003V2002)

Síntesis del producto intermedio D-2

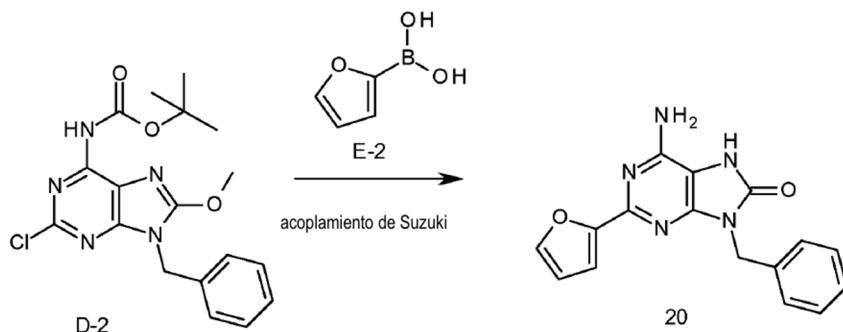


20 Se añadieron NEt₃ (0,187 ml, 1,345 mmol) y a continuación Boc₂O (0,215 g, 0,987 mmol) a una mezcla de C-2 (0,28 g, 0,897 mmol) y DMAP (11 mg, 0,0897 mmol) en THF (3 ml) a TA. La mezcla se agitó a 80°C durante 2 h. Se añadieron agua y EtOAc. Las capas se decantaron. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente

se evaporó para dar 0,18 g del producto intermedio D-2. El compuesto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

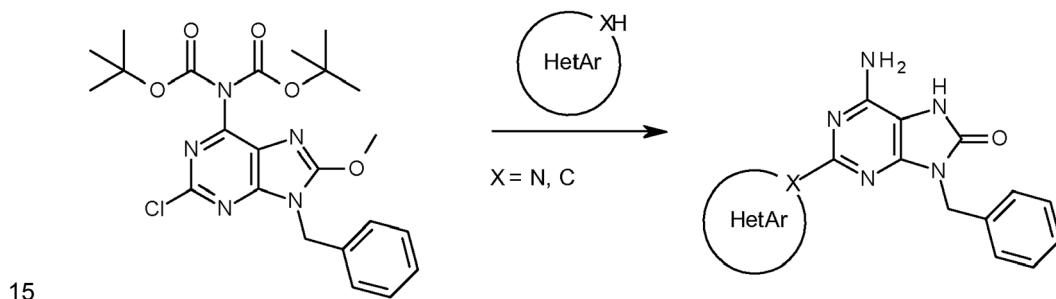
HPLC TR (min) = 6.31 ; MS M⁺ (H⁺): 376-378 (método V2002V2002)

5 Síntesis del compuesto final 20

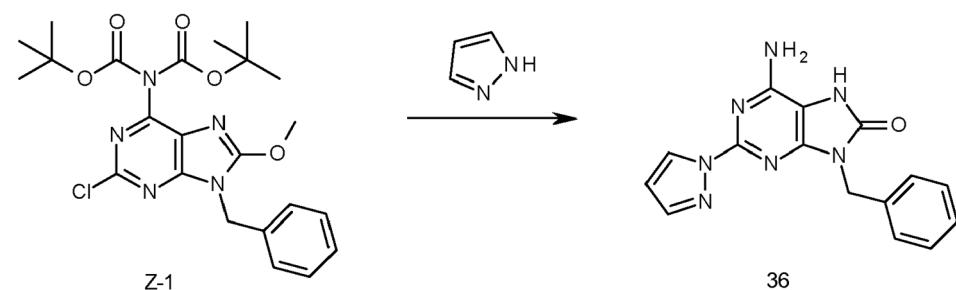


Una solución de D-2 (240 mg, 0,64 mmol), E-2 (107 mg, 0,96 mmol) y NaHCO₃ (269 mg, 3,2 mmol) en dioxano/agua (4/1) (3,2 ml) se desgasificó al burbujear N₂ durante 10 min. Se añadió tetraquis-(trifenilfosfino)-paladio (148 mg, 0,13 mmol) y la mezcla se agitó a 100°C durante 16 h. Se añadieron agua y EtOAc y las capas se decantaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó en fase inversa para dar 13 mg del compuesto final **20** (6% de rendimiento).

Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 7)



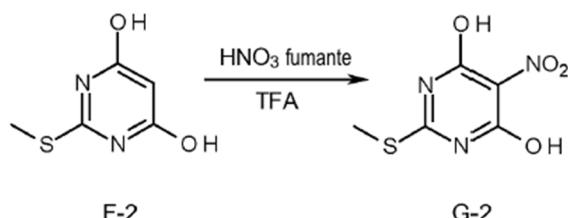
15 Síntesis del compuesto final 36



20 Una mezcla de Z-1 (300 mg, 0,612 mmol) y pirazol (417 mg, 6,123 mmol) se agitó a 180°C durante 1 h (microondas Biotage). El compuesto en bruto se purificó mediante cromatografía sobre una columna de gel de sílice (15-40 µm, 25 g) en CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0,5 para dar, después de la cristalización en éster diisopropílico y el secado bajo presión de vacío a 80°C, 85 mg del compuesto final **36**.

Esquema global en la preparación de productos finales: (Método 8)

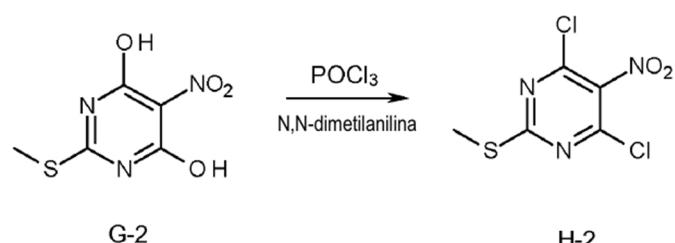
Síntesis del producto intermedio G-2



- 5 Una solución de F-2 (50 g, 316,09 mmol) en TFA (210 ml) se agitó a TA durante 30 min. La mezcla se enfrió hasta 5°C y a continuación se añadió gota a gota a 5°C HNO_3 fumante (19,5 ml, 426,73 mmol). La temperatura se mantuvo a 10-15°C durante la adición. El baño de hielo se retiró y, cuando la temperatura alcanzaba 20°C, se producía un episodio exotérmico violento (de 20°C a 45°C en 5 segundos). La mezcla se agitó a TA durante 16 h. La mezcla se vertió en una mezcla de agua y hielo. El precipitado se separó por filtración y se lavó con agua. El precipitado se secó bajo vacío a 50°C para dar 42 g (65% de rendimiento) del producto intermedio G-2. Este producto intermedio se usó directamente en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

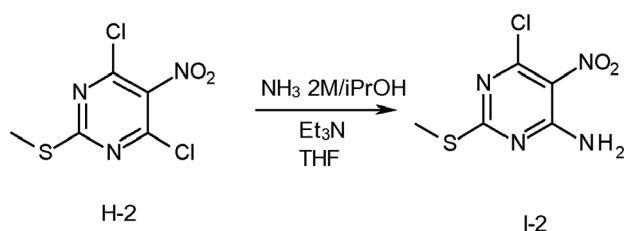
10

Síntesis del producto intermedio H-2:



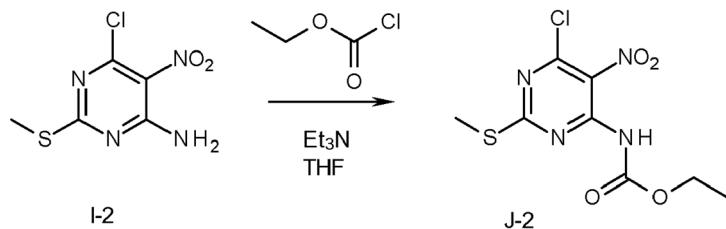
- 15 Se añadió gota a gota N,N-dimetilanilina (76,7 ml, 0,61 mol) a POCl_3 (93,7 ml, 1,01 mol) a 0°C. Se añadió en porciones a 0°C G-2 (41 g, 201,79 mmol) y a continuación la mezcla se calentó hasta 100°C durante 2 h. La solución se concentró bajo vacío y el POCl_3 residual se retiró mediante evaporación azeotrópica con tolueno (3 veces). El aceite resultante se recogió en una solución de CH_2Cl_2 -heptano (70-30) y se filtró a través de un filtro de vidrio de SiO_2 . El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante LC preparativa sobre (SiOH irregular 20-45 μm 1000 g DAVISIL), fase móvil (heptano al 80%, CH_2Cl_2 al 20%). Las fracciones puras se recogieron y se concentraron para dar 37,8 g (78% de rendimiento) del producto intermedio H-2.

20 Síntesis del producto intermedio I-2:



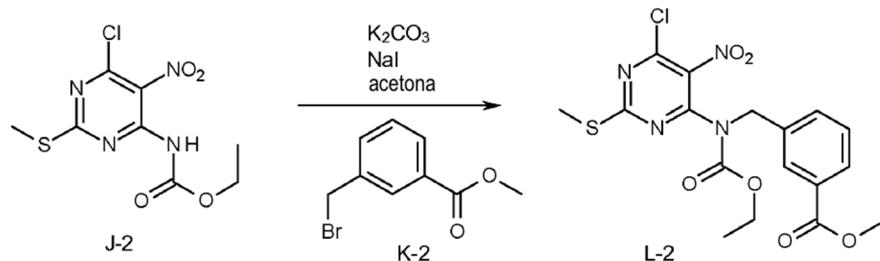
- Una solución de NH₃ 2 M en iPrOH (115 ml, 229,31 mmol) se añadió gota a gota a una solución de H-2 (36,7 g, 152,87 mmol) y Et₃N (23,4 ml, 168,16 mmol) en THF (360 ml) (la temperatura se mantuvo a TA con un baño de agua de hielo durante la adición). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 h. La mezcla se evaporó hasta sequedad. Se añadieron agua y EtOAc al residuo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (dos veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida para dar 34,5 g (100% de rendimiento) del producto intermedio I-2.

Síntesis del producto intermedio J-2



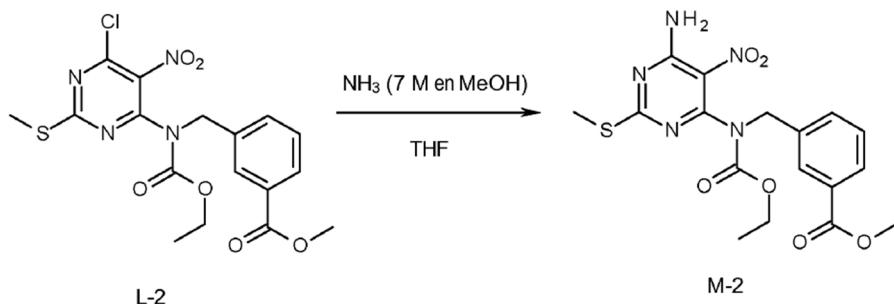
Se añadió cloroformato de etilo (13,5 ml, 138,90 mmol) a una solución de I-2 (39,8 g, 126,27 mmol) y Et_3N (26,5 ml, 189,40 mmol) en THF (1300 ml). La mezcla se agitó a TA durante 6 h y el disolvente se evaporó parcialmente bajo presión reducida. El residuo se recogió en CH_2Cl_2 y agua. Las capas se separaron; la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (dos veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante LC preparativa sobre (SiOH irregular 20-45 μm 1000 g DAVISIL), fase móvil (gradiente de heptano al 85%, AcOEt al 15% hasta heptano al 80%, AcOEt al 20%). Las fracciones puras se recogieron y se concentraron para dar 35 g (95% de rendimiento) del producto intermedio J-2.

10 Síntesis del producto intermedio L-2



Se agitaron a TA durante 18 h J-2 (5 g, 17,0 mmol), K-2 (3,91 g, 17,0 mmol), K_2CO_3 (5,90 g, 42,7 mmol) y NaI (2,56 g, 17,0 mmol) en acetona (130 ml). La solución se filtró y el filtrado se evaporó bajo presión reducida. El compuesto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm , 120 g Merck, muestra sólida, fase móvil: heptano/ EtOAc 100/0 a 80/20) para dar el producto intermedio L-2 como un sólido amarillo claro (69% de rendimiento).

15 Síntesis del producto intermedio M-2



La reacción se realizó en dos partidas de 2,7 g de L-2.

20 Aquí está el protocolo para una partida de 2,7 g:

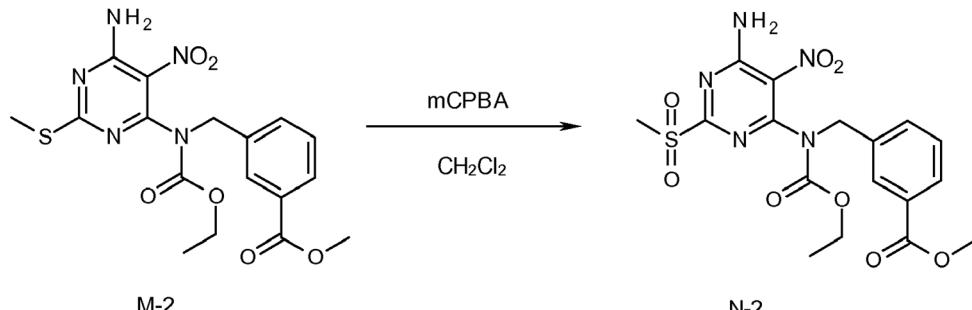
En un tubo sellado, se agitó L-2 (2,70 g, 6,12 mmol) en NH_3 (7 M en MeOH) (50 ml) y THF (50 ml) a TA durante 2 h.

25 Las dos partidas se mezclaron.

La mezcla se evaporó a vacío y el residuo se secó mediante destilación azeotrópica con EtOH (dos veces) para dar un sólido amarillo. Se añadieron agua y EtOAc , las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (dos

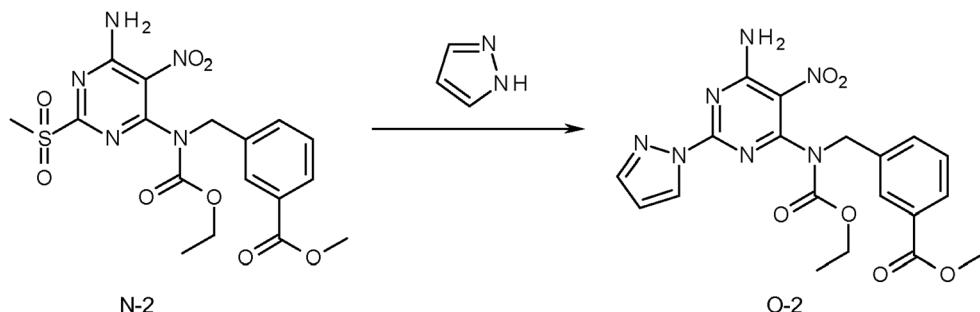
veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron a vacío para dar 4,9 g del producto intermedio M-2 como un sólido amarillo (90% de rendimiento).

Síntesis del producto intermedio N-2



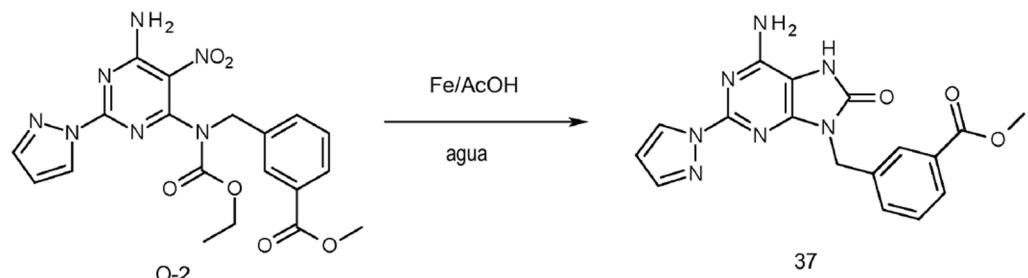
- 5 Se añadió en porciones mCPBA (1,46 g, 5,93 mmol) a una solución de M-2 (1 g, 2,37 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a TA durante 20 h. Se añadió a la mezcla una solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (dos veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 , se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida para dar 980 mg del producto intermedio N-2 como un sólido amarillo (91% de rendimiento). El producto intermedio N-2 se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 10

Síntesis del producto intermedio O-2



- 15 Una mezcla de N-2 (500 mg, 1,10 mmol) y pirazol (750 mg, 11,0 mmol) se agitó a 80°C durante 45 min. La mezcla resultante se recogió con EtOAc y una solución acuosa 1 M de HCl. Las capas se separaron, la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se secó a vacío para dar 550 mg de un sólido amarillo. El compuesto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μm , 25 g Grace, muestra sólida, gradiente de fase móvil: de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ac 97/3/0,03 a 80/20/0,3) para dar 370 mg del producto intermedio O-2 como un sólido blanco (76% de rendimiento).

- 20 Síntesis del compuesto final 37



Se añadió Fe (280 mg, 5,01 mmol) a una mezcla de O-2 (365 mg, 827 μmol) en AcOH (17 ml) y agua (1,8 ml). La mezcla se agitó vigorosamente a TA durante 64 h. La mezcla de reacción se filtró sobre un taco de celita, se

5 concentró a vacío y se coevaporó con tolueno (dos veces) para dar un residuo oscuro. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μ m, 25 g Merck, muestra sólida, gradiente de fase móvil: de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ac. 96/4/0,4 a 80/20/3) para dar 250 mg de un sólido blanco, que se purificó de nuevo mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μ m, 25 g Merck, muestra sólida, gradiente de fase móvil: de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ac. 96/4/0,4 a 80/20/3) para dar 110 mg de la fracción 1 como un sólido blanco (36%) y 25 mg de la fracción 2 como un sólido blanco (8%). Rendimiento global: 45%. 8 mg de la fracción 2 se secaron a vacío durante 16 h a 40°C para dar 6 mg del compuesto final 37 como un sólido blanco.

Síntesis del compuesto final 38



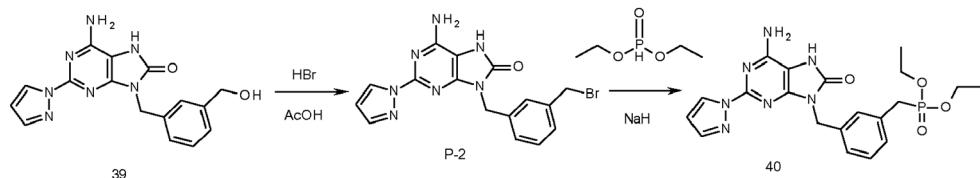
10 10 Se añadió LiOH (9 mg, 123 μ mol) a una suspensión de 37 (15 mg, 41,1 μ mol) en THF (4 ml) y agua (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 h. Se añadió una solución acuosa al 10% de K_2CO_3 hasta pH básico. La capa acuosa se saturó con polvo de K_2CO_3 y el producto se extrajo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida para dar 200 mg. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa sobre (X-Bridge-C18 5 μ m 30*150 mm, fase móvil: gradiente H_2O (ácido fórmico al 0,1%)/MeCN 90/10 a 0/100) para dar 12 mg del compuesto final 38 como un sólido blanco (83%).

Síntesis del compuesto final 39



20 20 Se añadió gota a gota Dibal-H (1,2 M en tolueno) (0,2 ml, 240 μ mol) a una solución de 37 (30 mg, 82,1 μ mol) en THF (3 ml) y tolueno (1 ml) bajo nitrógeno a 0°C. La solución se agitó a 0°C durante 2 h. Se añadió Dibal-H (0,2 ml, 240 μ mol) y la solución se agitó a TA durante 2 h. Se añadió una solución acuosa saturada de tartrato potásico-sódico para neutralizar la reacción. La mezcla se diluyó con EtOAc, seguido por agitación vigorosa durante 30 min. La capa orgánica se separó de la capa acuosa, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar 40 mg. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μ m, 4 g Grace, muestra sólida, gradiente de fase móvil: de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ac. 96/4/0,04 a 80/20/2) para dar un sólido blanco. El sólido blanco producido se secó a vacío durante 16 h a 40°C para dar 8 mg del compuesto final 39 (29%) como un sólido blanco.

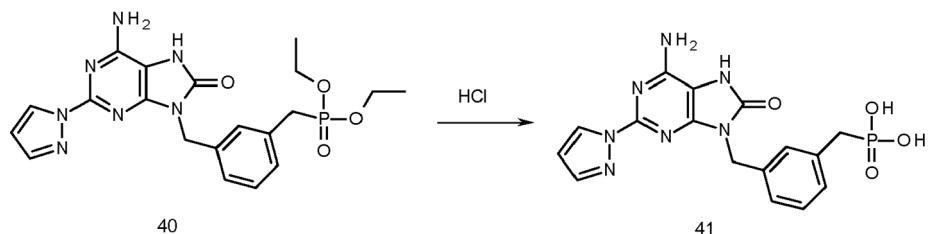
Síntesis del compuesto final 40



30 30 Se solubilizó 39 (45 mg, 133 μ mol) en HBr (30% en AcOH) (10 ml). La mezcla se agitó a TA durante 1 h. El disolvente se evaporó y AcOH se destiló azeotrópicamente con tolueno (dos veces) para dar 75 mg del producto intermedio P-2 como un sólido pardo, que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

5 Se añadió gota a gota fosfito de dietilo (0,130 ml, 1,33 mmol) a TA a una suspensión de NaH (53 mg, 1,33 mmol) en THF (4 ml). La mezcla se agitó a TA durante 1 h. Se añadió a la mezcla una solución de P-2 (64 mg, 133 μ mol) en THF (4 ml). La mezcla se agitó a TA durante 16 h. Se añadió gota a gota fosfito de dietilo (0,130 ml; 1,33 mmol) a TA a una suspensión de NaH (53 mg, 1,33 mmol) en THF (4 ml). La mezcla resultante se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. Se añadieron agua y EtOAc, las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío para dar 75 mg de un aceite transparente. El producto en bruto se purificó mediante LC preparativa (SiOH irregular 15-40 μ m, 25 g Merck, carga en seco, gradiente de fase móvil: de CH₂Cl₂/MeOH 100/0 a 85/15) para dar 38 mg de un sólido blanco, que se trituró en pentano. El sólido resultante se filtró y se secó a vacío durante 16 h a 50°C para dar 28 mg del compuesto final 40 como un sólido blanco (40% de rendimiento).

Síntesis del compuesto final 41

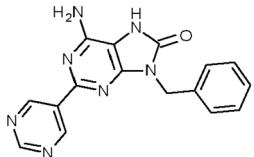
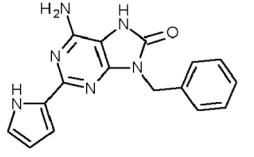
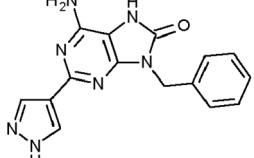
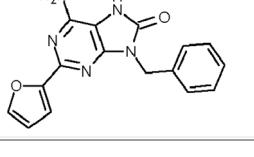
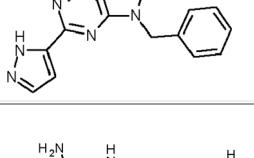
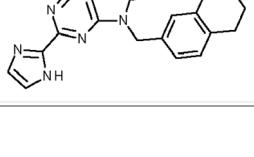
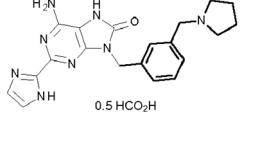
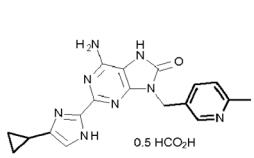


15 Se solubilizó 40 (590 mg, 1,29 mmol) en HCl (37% en agua) (60 ml). La mezcla se agitó a 100°C durante 16 h. El disolvente se evaporó y H₂O se destiló azeotrópicamente con EtOH (dos veces) para dar 605 mg del compuesto final 41 como un sólido blanco (100% de rendimiento).

Tabla 1. Compuestos de fórmula (I).

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
1		347.15	348	1.01, B	1,2			¹ H RMN (600 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 0.84 (s a, 2 H), 0.99 (d, J=6.7 Hz, 2 H), 2.00 (s a, 1 H), 3.16 (s a, 1 H), 5.03 (s a, 2 H), 7.08 - 7.21 (m, 2 H), 7.24 - 7.35 (m, 3 H), 7.36 - 7.45 (m, 3 H), 11.51 (s a, 1 H)
2		383.15	384	1.18, B	1			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 5.08 (s, 2 H), 7.04 (s a, 2 H), 7.29 (m, J=7.3 Hz, 1 H), 7.34 (t, J=7.3 Hz, 2 H), 7.40 - 7.48 (m, 3 H), 7.49 - 7.56 (m, 2 H), 7.97 (d, J=7.3 Hz, 2 H), 8.20 (s, 1 H), 11.28 (s, 1 H)
3		375.18	376		1			¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,400MHz): δ ppm 14.45 (s a, 1H), 11.49 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.41 (d, J=8 Hz, 2H), 7.31 (t, J=8 Hz, 2H), 7.28 (t, J=8 Hz, 1H), 7.14 (s a, 2H), 5.06 (s, 2H), 3.15 (m, 1H), 2.08-2.06 (m, 2H), 1.74-1.62 (m, 6H)
4		307.12	308	1.87, V3018V3001	2	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,400MHz): δ ppm 12.34 (s a, 1H), 10.32 (s a, 1H), 7.22 - 7.44 (m, 5H), 7.18 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.48 (s a, 2H), 5.00 (s, 2H)
5		361.16	362	2.35, V3018V3001	3	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 11.89 (s a, 1H), 10.24 (s

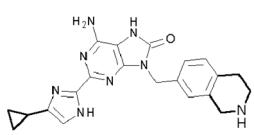
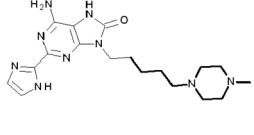
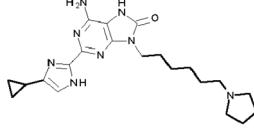
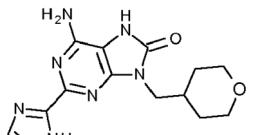
Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
								a, 1H), 7.21 - 7.40 (m, 5H), 6.51 (s a, 2H), 5.01 (s, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.72 - 1.80 (m, 1H), 0.65 - 0.78 (m, 4H)
6		375.18	376	2.52, V3018V3001	3	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11.85 (s a, 1H), 10.26 (s, 1H), 7.21 - 7.39 (m, 5H), 6.51 (s a, 2H), 5.02 (s, 2H), 2.65 (m, 2H), 1.78 (s a, 1H), 1.17 (t, J=6.5 Hz, 3H), 0.65-0.78 (m, 4H)	
7		335.15	336	2.1, V3018V3001	3	230	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11.98 (s a, 1H), 10.27 (s, 1H), 7.20 - 7.40 (m, 5H), 6.40 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 2.10 (s a, 6H)	
8		321.13	322	2.01, V3018V3001	3		¹ H RMN (500 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 12.00 - 12.17 (m, 1H), 10.29 (s, 1H), 7.35 - 7.40 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.41 Hz, 2H), 7.23 - 7.29 (m, 1H), 6.66 - 6.90 (m, 1H), 6.44 (s a, 2H), 5.00 (s a, 2H), 2.10 - 2.26 (m, 3H).	
9		322.13	323	2.47, V3018V3001	4	> 260	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 10.38 (s a, 1H), 8.56 (s a, 1H), 7.71 (d, J = 7.07 Hz, 1H), 7.09 - 7.30 (m, 4H), 6.45 (s a, 2H), 4.99 (s, 2H), 1.25 (s a, 3H).	
10		355.18	356	1.86, V3018V3001	4	> 260	¹ H RMN (500 MHz, MeOD) δ ppm 6.83 (s, 1H), 3.95 (dd, J = 2.84, 11.35 Hz, 2H), 3.87 (d, J = 7.57 Hz, 2H), 3.36 - 3.44 (m, 2H), 2.25 - 2.37 (m, 1H), 1.89 - 1.98 (m, 1H), 1.60 (dd, J = 1.89, 12.93 Hz, 2H), 1.41 - 1.52 (m, 2H), 0.88 - 0.96 (m, 2H), 0.71 - 0.77 (m, 2H).	
11		365.16	366	2.11, V3018V3001	2	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10.47 (s a, 1H), 7.22 - 7.38 (m, 5H), 7.20 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.62 (s a, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.52 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.48 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.10 (s, 3H)	
12		321.13	322	2.06, V3018V3001	2	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 7.16 - 7.33 (m, 5H), 7.10 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.24 (s a, 2H), 4.91 (s, 2H), 3.85 (s, 3H)	
15		319.12	320	2.3, Villa	6		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 10.25 (s a, 1H), 9.47 (s, 2H), 9.23 (s, 1H), 7.40 (t, J=7.2Hz, 2H), 7.34 (t, J=7.2	

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
								Hz, 2H), 7.27 (d, $J=7.2$ Hz, 1H) 6.70 (s, 2H), 5.75 (s, 1H), 5.02 (s, 2H)
18		306.12	307	2.45, Villa	6			¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 11.10 (s a, 1H), 10.20 (s a, 1H), 7.43 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.26 (t, $J=7.1$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.68 (s a, 1H), 6.35 (s, 2H), 6.10 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H)
19		307.12	308	1.82, Villa	6			¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 12.97 (s a, 1H), 10.25 (s a, 1H), 8.02 (s a, 2H), 7.18 - 7.44 (m, 5H), 6.42 (s, 2H), 4.95 (s, 2H)
20		307.11	308	2.57, Villa	6			¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 10.60 (s a, 1H), 7.76 (s a, 1H), 7.19 - 7.40 (m, 5H), 7.00 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.59 (dd, $J=3.3$, 1.8 Hz, 1H), 5.0 (s, 2H)
23		307.12	308	2.03, V3018V3001	5	> 260		¹ H RMN (500 MHz, DMSO-d ₆): δ ppm 12.84 - 13.37 (m, 1H), 10.30 (s a, 1H), 7.23 - 7.76 (m, 6H), 6.70 (s a, 1H), 6.49 (s a, 2H), 4.98 (s, 2H).
24		362.16	363	2.20 V3018V3001	4	240		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ ppm 12.25 (s a, 1H), 7.18 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.99 - 7.14 (m, 4H), 6.50 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.01 - 3.07 (m, 2H), 2.72 (t, $J=5.6$ Hz, 2H)
25		390.19	391	2.47 V3018V3001	4	196		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ ppm 12.13 (s a, 1H), 10.38 (s a, 1H), 8.15 (s a, 0.49 H, forme sal pic), 7.39 (s a, 1H), 7.18 - 7.34 (m, 3H), 7.09 (s a, 2H), 6.50 (s a, 2H), 5.01 (s a, 2H), 3.71 (s a, 2H), 2.50 - 2.61 (m, 4H), 1.67 (s a, 4H)
26		362.16	363	1.90 V3018V3001	4	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz) : δ ppm 12.05 (s a, 1H), 10.27 (s, 1H), 8.56 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.15 (s, 0.59H, forme sal pic), 7.70 (dd, $J = 8.2$, 1.8 Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.93 (s a, 1H), 6.49 (s a, 2H), 4.97 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.78-1.90 (m, 1H), 0.70-0.87 (m, 2H), 0.64-0.70 (m, 2H)

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
27		351.14	352	1.78 V3018V3001	2	260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 10.37 (s, 1H), 7.23 - 7.38 (m, 5H), 7.21 (d, J=0.9 Hz, 1H), 6.91 (d, J=0.9 Hz, 1H), 6.58 (s a, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.81 (t, J=5.7 Hz, 1H), 4.41 (t, J=5.7 Hz, 2H), 3.59 (q, J=5.7 Hz, 2H)
28		363.18	364	2.51 V3018V3001	2	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 11.78 - 12.24 (m, 1H), 10.28 (s, 1H), 7.07 - 7.47 (m, 5H), 6.21 - 6.93 (m, 3H), 5.01 (s, 2H), 1.13 - 1.45 (m, 9H)
29		349.17	350	2.35 V3018V3001	2	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 11.80 - 12.14 (m, 1H), 10.41 (s a, 1H), 7.06 - 7.70 (m, 5H), 6.65 - 6.89 (m, 1H), 6.37 - 6.62 (m, 2H), 4.89 - 5.21 (m, 2H), 2.73 - 3.16 (m, 1H), 1.04 - 1.31 (m, 6H)
30		335.15	336	2.18 V3018V3001	2	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 11.82 - 12.28 (m, 1H), 10.47 (s a, 1H), 7.08 - 7.56 (m, 5H), 6.63 - 7.01 (m, 1H), 6.38 - 6.59 (m, 2H), 4.78 - 5.07 (m, 2H), 2.53 - 2.69 (m, 2H), 0.95 - 1.35 (m, 3H)
31		375.11	376	2.38 V3018V3001	2	> 260		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 13.07 (s a, 1H), 10.46 (s a, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.39 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.32 (t, J=8.2 Hz, 2H), 7.26 (t, J=8.2 Hz, 1H), 6.65 (s a, 2H), 4.98 (s, 2H)
32		308.10	309	2.06 V3018V3001	5			¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 10.44 (s a, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.16 - 7.37 (m, 5H), 6.70 (s a, 2H), 4.96 (s, 2H)
33		323.11	324	2.23 V3018V3001	5	> 250		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 10.72 (s a, 1H), 7.11 - 7.56 (m, 5H), 6.94 (s a, 2H), 5.00 (s a, 2H), 2.41 (s, 3H)
34		367.14	368	2.27 V3018V3001	5	> 250		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 10.71 (s a, 1H), 7.16 - 7.49 (m, 5H), 6.96 (s a, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.72 (t, J=6.3 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.01 (t, J=6.3 Hz, 2H)
35		321.13	322	2.42	7	>		¹ H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz):

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret. Síntesis	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
				V3018V3001			260	δ ppm 10.31 (s a, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.18 - 7.40 (m, 5H), 6.78 (s a, 2H), 4.96 (s, 2H), 2.08 (s, 3H)
36		307.12	308	2.25 V3018V3001	7	> 260		^1H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ ppm 10.33 (s a, 1H), 8.46 (d, <i>J</i> =2.5 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.20 - 7.40 (m, 5H), 6.82 (s a, 2H), 6.48 (d, <i>J</i> =3.8 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H)
37		365.12	366	<u>2.24</u> V3018V3001	8			^1H RMN (DMSO-d ₆ ,400MHz): δ (ppm) 9.80 (s a, 1H), 8.47 (d, <i>J</i> =2.5 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.65 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 7.50 (t, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 6.84 (s a, 2H), 6.43 - 6.63 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.83 (s, 3H)
38		351.11	352	<u>2.27</u> V3014V3001	8	332		^1H RMN (DMSO-d ₆ ,400MHz): δ (ppm) 13.01 (s a, 1H), 10.46 (s a, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.84 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 7.46 (t, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 6.87 (s a, 2H), 6.48 (s, 1H), 5.03 (s, 2H)
39		337.13	338	<u>1.87</u> V3018V3001	8			^1H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ (ppm) 10.28 (s a, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.10 - 7.37 (m, 4H), 6.82 (s a, 2H), 6.35 - 6.57 (m, 1H), 5.17 (t, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.45 (d, <i>J</i> =5.7 Hz, 2H)
40		457.16	458	<u>2.13</u> V3018V3001	8	218		^1H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ (ppm) 10.41 (s a, 1H), 8.46 (s a, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.04 - 7.38 (m, 4H), 6.85 (s a, 2H), 6.47 (s a, 1H), 4.95 (s a, 2H), 3.85 (quin, <i>J</i> =7.0 Hz, 4H), 3.18 (d, <i>J</i> =21.4 Hz, 2H), 1.06 (t, <i>J</i> =7.0 Hz, 6H)
41		401.10	402	<u>5.40</u> V2012V2002	8	101		^1H RMN (DMSO-d ₆ ,400MHz): δ (ppm) 10.43 (s, 1H), 8.46 (d, <i>J</i> =2.5 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.10 - 7.31 (m, 4H), 6.84 (s a, 2H), 6.47 (dd, <i>J</i> =2.5, 1.5 Hz, 1H), 6.29 (s a, 2H), 4.90 (s, 2H), 2.92 (d, <i>J</i> =21.2 Hz, 2H)
42		338.12	339	<u>2.45</u> V3014V3001	7			^1H RMN (DMSO-d ₆ ,500MHz): δ (ppm) 10.20 (s a, 1H), 8.37 (d, <i>J</i> =2.2 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> =6.9 Hz, 1H), 7.19 (t, <i>J</i> =6.9 Hz, 1H), 6.82 - 7.00 (m, 3H), 6.44 (dd, <i>J</i> =2.4, 1.7 Hz, 1H), 4.95 - 5.14 (m, 2H), 2.43 (s, 3H)

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
								(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.65 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.82 (s a, 2H), 6.50 (s a, 1H), 4.95 (s, 2H), 2.39 (s, 3H)
51		347.15	348	<u>2.35</u> V3018V3001	7	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12.36 - 12.99 (m, 1H), 10.33 (s a, 1H), 6.94 - 7.75 (m, 5H), 5.99 - 6.73 (m, 3H), 4.97 (s, 2H), 1.81 - 1.97 (m, 1H), 0.54 - 1.02 (m, 4H)	
52		351.14	352	<u>1.93</u> V3018V3001	7		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 10.23 (s a, 1H), 7.68 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.15 - 7.40 (m, 5H), 6.72 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.46 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.87 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J=5.1$ Hz, 2H), 3.75 (q, $J=5.1$ Hz, 2H)	
53		321.13	322	<u>2.26</u> V3018V3001	7	192	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12.94 (s a, 1H), 10.28 (s, 1H), 7.17 - 7.49 (m, 6H), 6.41 (s a, 2H), 4.97 (s, 2H), 2.28 - 2.39 (m, 3H)	
54		435.21	436	<u>1.32</u> V3018V3001	2	211	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11.90 - 12.42 (m, 1H), 10.14 (s a, 1H), 7.85 - 8.01 (m, 1H), 7.35 - 7.56 (m, 1H), 6.21 - 7.07 (m, 4H), 4.65 - 4.77 (m, 2H), 3.86 - 3.94 (m, 2H), 2.38 - 2.44 (m, 2H), 2.04 (s, 6H), 1.77 - 1.89 (m, 1H), 0.60 - 0.92 (m, 4H)	
55		404.17	405	<u>2.80</u> V3014V3001	2	218	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12.52 (s a, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.46 - 7.51 (m, 1H), 7.34 - 7.45 (m, 2H), 7.12 (s a, 2H), 6.49 (s, 2H), 4.94 - 5.25 (m, 2H), 3.41 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.20 - 3.29 (m, 2H), 1.79 (quin, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.64 (quin, $J=7.1$ Hz, 2H)	
57		396.13	397	<u>1.79</u> V3018V3001	2	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12.47 (s a, 1H), 10.30 (s a, 1H), 8.25 (s a, 1H), 7.84 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.13 (s a, 2H), 6.90 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.50 (s a, 2H), 4.94 (s a, 2H), 4.87 (s a, 2H), 3.63 (s, 3H)	
58		382.11	383	<u>2.00</u> V3014V3001	2	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11.87 - 13.45 (m, 2H), 10.50 (s a, 1H), 8.27 (s a, 1H), 7.83 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.22 (s a, 2H), 6.86 (d, $J=7.6$ Hz, 1H),	

Nº	ESTRUCTURA	Masa Exacta	Masa Encontrada [M+H]	Tiempo LCMS, Método	Ret.	Método de Síntesis	PF (°C)	H NMR
								6.61 (s a, 2H), 4.94 (s a, 2H), 4.77 (s a, 2H)
60		402.19	403	<u>2.61</u> <u>V3014V3001</u>	2	242	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 8.98 - 12.14 (m, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.04 - 7.47 (m, 6H), 4.95 (s a, 2H), 4.02 (s a, 2H), 3.13 (s a, 2H), 2.79 (s a, 2H), 1.67 - 1.97 (m, 1H), 0.42 - 0.94 (m, 4H)	
61		385.23	386	<u>2.14</u> <u>V3014V3001</u>	2		¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 11.85 (s a, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.09 (s, 2H), 6.46 (s, 2H), 3.81 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.30 - 2.48 (m, 10H), 2.27 (s, 3H), 1.74 (quin, J=7.2 Hz, 2H), 1.49 (quin, J=7.2 Hz, 2H), 1.20 - 1.36 (m, 2H)	
62		410.25	411	<u>1.67</u> <u>V3018V3001</u>	2	174	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11.91 (s a, 1H), 10.29 (s a, 1H), 6.84 (s a, 1H), 6.49 (s a, 2H), 3.79 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.52 - 2.70 (m, 6H), 1.80 - 1.90 (m, 1H), 1.71 (s a, 5H), 1.39-1.52 (m, 2H), 1.17 - 1.38 (m, 5H), 0.51 - 0.91 (m, 4H)	
63		315.14	316	<u>2.37</u> <u>V3014V3001</u>	2	> 260	¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12.35 (s a, 1H), 10.24 (s a, 1H), 7.11 (s a, 2H), 6.44 (s, 2H), 3.78 - 3.87 (m, 2H), 3.70 (d, J=7.1 Hz, 2H), 3.24 (t, J=10.9 Hz, 2H), 1.99 - 2.18 (m, 1H), 1.08 - 1.76 (m, 4H)	

Métodos analíticos

Todos los compuestos se caracterizaron mediante LC-MS. Se usaron los siguientes métodos de LC-MS:

Método VILLA:

- 5 Todos los análisis se realizaron usando un cuadripolo de LC/MSD Agilent 1100 serie LC/MSD acoplado a un sistema de cromatografía de líquidos (LC) serie Agilent 1100 que consistía en una bomba binaria con desgasificador, automuestreador, compartimento de columna termostatizado y detector de serie de diodos. El espectrómetro de masas (MS) se hizo funcionar con una fuente de ionización de electropulverización a presión atmosférica (API-ES) en modo de ion positivo. El voltaje capilar se fijó a 3000 V, el voltaje del fragmentador a 70 V y la temperatura del cuadripolo se mantuvo a 100°C. Los valores del flujo y la temperatura del gas de secado eran 12,0 l/min y 350°C, respectivamente. Se usó nitrógeno como el gas nebulizador, a una presión de 0,24 MPa (35 psig). La adquisición de datos se realizó con el software Agilent Chemstation.
- 10

- 15 Además del procedimiento general, se llevaron a cabo análisis sobre una columna YMC pack ODS-AQ C18 (50 mm de largo x 4,6 mm d. i.; partículas de 3 µm) a 35°C, con un caudal de 2,6 ml/min. Se realizó una elución en gradiente desde (agua + ácido fórmico al 0,1%) al 95% / acetonitrilo al 5% hasta (agua + ácido fórmico al 0,1%) al 5% / acetonitrilo al 95% en 4,80 minutos, a continuación la composición de la fase móvil final se mantuvo durante 1,00 min adicional. El volumen de inyección estándar era 2 µl. Los intervalos de adquisición se fijaron a 190-400nm para el detector de UV-PDA y 100-1400 m/z para el detector de MS.

Método B Sistema de UPLC ACQUITY con detector SQD

Fase móvil: **A**: metanol, **B**: acetato amónico 10 mM en agua al 90% y acetonitrilo al 10%

5 Columna: Columna tipo: Columna Aquity UPLC BEH C18 1,7 μ m 2,1x50 mm (Waters Nº 186002350), Temperatura: 70°C. Programa de gradiente. Flujo: 0,7 ml/min, Final de la adquisición: 1,8 min. Tiempo final: 2 min.

Tiempo (min.)	% A	% B	Flujo (ml/min.)
0.00	5	95	0.7
1.30	95	5	0.7
1.50	95	5	0.7
1.70	5	95	0.7
2.00	5	95	0.7

Vol. inyección: 0,75 μ l. Tipo iny.: Circuito parcial con sobrellenado de aguja

10 Longitud de onda inicial: 210 nm. Longitud de onda final: 400 nm. Resolución: 1,2 nm. Velocidad de muestreo: 20 puntos / s

Método de MS:

Función 1: Modo iónico: ES+, Formato de datos: Centroide

15 Masa inicial: 160. Masa final: 1000

Tiempo de barrido (s): 0,1, Tiempo inicial (min): 0,0, Tiempo final (min): 2,0, Voltaje del cono (V): 30

Función 2:

Modo iónico: ES-, Formato de datos: Centroide, Masa inicial: 160. Masa final: 1000

20 Tiempo de barrido (s): 0,1, Tiempo inicial (min): 0,0, Tiempo final (min): 2,0, Voltaje del cono (V): 30, Flujo en MS: 700 μ l/min

Procedimiento general VDR1 (para los métodos V100xV10xx.olp y V200xV20xx.olp)

25 La medida de HPLC se realizó usando un sistema Alliance HT 2795 (Waters) que comprendía una bomba cuaternaria con desgasificador, un automuestreador, un detector de serie de diodos (DAD) y una columna como la especificada en los respectivos métodos posteriores, la columna se mantiene a una temperatura de 30°C. El flujo procedente de la columna se derivó a un espectrómetro de MS. El detector de MS se configuró con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar era 3 kV y la temperatura de la fuente se mantenía a 100°C en el LCT (espectrómetro de masas Time of Flight Zspray™ de Waters - para los métodos V100xV10xx.olp), y 3,15 kV a 110°C en el ZQ™ (espectrómetro de masa Zspray™ de un solo cuadripolo de Waters - para los métodos V200xV20xx.olp). Se usó nitrógeno como el gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimiento general VDR2 (para los métodos V300xV30xx.olp)

- La medida de LC se realizó usando un sistema de UPLC (cromatografía de líquidos de ultrarresolución) Acquity (Waters) que comprendía una bomba binaria con desgasificador, un automuestreador, un detector de serie de diodos (DAD) y una columna como la especificada en los respectivos métodos posteriores, la columna se mantiene a una temperatura de 40°C. El flujo procedente de la columna se llevó a un detector de MS. El detector de MS se configuró con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar era 3 kV y la temperatura de la fuente se mantenía a 130°C en el Quattro (espectrómetro de masas de triple cuadripolo de Waters). Se usó nitrógeno como el gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.
- 10 Método V1005V1012
- Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Waters X-bridge C18 (3,5 µm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%) para manejar una condición de gradiente de A al 80% y B al 20% (mantenida durante 0,5 minutos) a B al 90% en 4,5 minutos, B al 90% durante 4 minutos y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 5 µl. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.
- 15 Método V1004V1012
- Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Kromasil C18 (3,5 µm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 0,85 ml/min. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%; fase móvil C: ácido fórmico al 0,2% + agua ultrapura al 99,8%) para manejar una condición de gradiente de A al 35%, B al 30% y C al 35% (mantenida durante 1 minuto) a B al 100% en 3 minutos, B al 100% durante 4,5 minutos y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 5 µl. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.
- 20 Método V1010V1012
- Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Waters Atlantis C18 (5 µm, 3,9 x 100 mm) con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%; fase móvil C: ácido fórmico al 0,2% + agua ultrapura al 99,8%) para manejar una condición de gradiente de A al 50% y C al 50% (mantenida durante 1,5 minutos) a A al 10%, B al 80% y C al 10% en 4,5 minutos, mantenida durante 4 minutos, y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 5 µl. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.
- 25 Método V2002V2002 + LCpos_court.olp
- Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Kromasil C18 (3,5 µm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%; fase móvil C: ácido fórmico al 0,2% + agua ultrapura al 99,8%) para manejar una condición de gradiente de A al 35%, B al 30% y C al 35% (mantenida durante 1 minuto) a B al 100% en 4 minutos, B al 100% durante 4 minutos y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 2 minutos. Se usó un volumen de inyección de 10 µl. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.
- 30 Método V2003V2002
- Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna X-Bridge C18 (3,5 µm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%; para manejar una condición de gradiente de A al 80%, B al 20% (mantenida durante 0,5 minutos) a A al 10%, B al 90% en 4,5 minutos, mantenida a A al 10% y B al 90% durante 4 minutos y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 10 µl. El

voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.

Método V2012V2002

5 Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Waters Atlantis C18 (5 μ m, 3,9 x 100 mm) con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%; fase móvil C: ácido fórmico al 0,2% + agua ultrapura al 99,8%) para manejar una condición de gradiente de A al 50%, B al 0% y C al 50% (mantenida durante 1,5 minutos) a A al 10%, B al 80% y C al 10% en 3,5 minutos, mantenida en estas condiciones durante 4 minutos y se reequilibró con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 10 μ l. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.

10

Método V2015V2007

15 Además del procedimiento general VDR1: Se llevó a cabo HPLC en fase inversa en una columna Supelco Ascentis Express C18 (2,7 μ m, 3,0 x 50 mm) con un caudal de 0,7 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 100%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%) para manejar una condición de gradiente de A al 80% y B al 20% (mantenida durante 0,5 minutos) a A al 5% y B al 95% en 2,5 minutos, mantenida durante 4,5 minutos y de nuevo hasta las condiciones iniciales en 1,5 minutos y mantenidas durante 1 min. Se usó un volumen de inyección de 5 ml. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,4 segundos usando un retardo entre barridos de 0,3 segundos.

20 Método V3018V3001

25 Además del procedimiento general VDR2: Se llevó a cabo UPLC en fase inversa en una columna Waters Acuity BEH (híbrido de etoxisilano/sílice con puentes) C18 (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) con un caudal de 0,343 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 95% / acetonitrilo al 5%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%) para manejar una condición de gradiente de A al 84,2% y B al 15,8% (mantenida durante 0,49 minutos) a 10,5% A and 89,5% B in 2,18 minutos, mantenida durante 1,94 min y de nuevo hasta las condiciones iniciales en 0,73 min, mantenidas durante 0,73 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 μ l. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,2 segundos usando un retardo entre barridos de 0,1 segundos.

Método V3014V3001

30 Además del procedimiento general VDR2: Se llevó a cabo UPLC en fase inversa en una columna Waters HSS (sílice de alta resistencia) T3 (1,8 μ m, 2,1 x 100 mm) con un caudal de 0,35 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: acetato amónico 7 mM al 95% / acetonitrilo al 5%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%) para manejar una condición de gradiente de A al 99% (mantenida durante 0,5 minutos) a A al 15% y B al 85% en 4,5 minutos, mantenida durante 2 min y de nuevo hasta las condiciones iniciales en 0,5 min, mantenidas durante 1,5 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 μ l. El voltaje del cono era 20 V para el modo de ionización positivo y negativo. Los espectros de masas se adquirieron al barrer de 100 a 1000 en 0,2 segundos usando un retardo entre barridos de 0,1 segundos.

35

Actividad biológica de los compuestos de fórmula (I)

40 Descripción de ensayos biológicos

45 Ensayos indicadores para la determinación de la actividad de TLR7 (24 h)

La capacidad de los compuestos para activar TLR7 humano se determinó en un ensayo indicador celular usando células HEK293 transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de TLR7 o TLR8 y la construcción indicadora NF κ B-luc. En un caso, la construcción de expresión de TLR expresa la secuencia silvestre respectiva o una secuencia mutante que comprende una eliminación en la segunda repetición rica en leucina (dIIRR2) del TLR. Se ha mostrado previamente que estas proteínas de TLR mutantes son más sensibles a la activación por agonistas (documento US 7.498.409).

Brevemente, las células HEK293 se hicieron crecer en medio de cultivo (DMEM complementado con 10% de FCS y glutamina 2 mM). Para la transfección de células en placas de 10 cm, las células se separaron con tripsina-EDTA, se

transfectaron con una mezcla de plásmido CMV-TLR7 o TLR8 (750 ng), plásmido NFkB-luc (375 ng) y un reactivo de transfección y se incubaron 24 horas o 48 horas, respectivamente, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada. A continuación, las células transfectadas se separaron con tripsina-EDTA, se lavaron en PBS y se resuspendieron en medio hasta una densidad de 1,67 x 105 células/ml. A continuación, treinta microlitos de células se distribuyeron en cada pocillo en placas de 384 pocillos, en los que ya estaban presentes 10 µl de compuesto en DMSO al 4%. Después de 6 horas de incubación a 37°C, CO₂ al 5%, se determinó la actividad de luciferasa al añadir 15 µl de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) a cada pocillo y la lectura se realizó en un aparato de obtención de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Se generaron curvas de respuesta a la dosis a partir de medidas realizadas por cuadruplicado. Se determinaron para cada compuesto los valores de la concentración eficaz inferior (LEC), definida como la concentración que induce un efecto que está al menos dos veces por encima de la desviación estándar del ensayo. La toxicidad del compuesto se determinó en paralelo usando una serie de dilución similar de compuesto con 30 µl por pocillo de células transfectadas con la construcción CMV-TLR7 sola (1,67 x 105 células/ml), en placas de 384 pocillos. La viabilidad celular se midió después de 6 horas de incubación a 37°C, CO₂ al 5%, al añadir 15 µl de ATP lite (Perkin Elmer) por pocillo y leer en un aparato de obtención de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Los datos se presentaron con CC50.

Medida de la producción de interferón en PBMC humanas (PBMC-HUH7_EC50)

La activación de TLR7 humano da como resultado la producción robusta de interferón por células dendríticas plasmacitoides presentes en sangre humana. El potencial de los compuestos para inducir interferón se evaluó al examinar la actividad antiviral en el sistema de replicón de HCV durante la incubación con medio acondicionado procedente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El ensayo del replicón de HCV se basa en una construcción de expresión bicistrónica, según se describe por Lohmann y cols. (Science (1999) 285: 110-113; Journal of Virology (2003) 77: 3007-15 3019) con modificaciones descritas por Krieger y cols. (Journal of Virology (2001) 75: 4614-4624). El ensayo utilizaba la línea celular establemente transfectada Huh-7 luc/neo que aloja un ARN que codifica una construcción de expresión bicistrónica que comprende las regiones NS3-NS5B silvestres de VCH tipo 1b traducidas de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomielitis (EMCV), precedidas por un gen indicador (luciferasa de luciérnaga) y un gen marcador seleccionable (neoR, neomicina fosfotransferasa). La construcción está flanqueada por NTRs (regiones no traducidas) 5' y 3' procedentes de VCH tipo 1b. El cultivo continuado de las células con replicón en presencia de G418 (neoR) depende de la replicación del ARN de VCH. Las células con replicón transfectadas establemente que replican ARN de VCH autónomamente y hasta altos niveles, que codifican entre otras cosas luciferasa, se usaron para perfilar el medio de cultivo celular acondicionado. Brevemente, las PBMCs se prepararon a partir de capas leucocíticas de al menos dos donantes usando un protocolo de centrifugación de Ficoll estándar. Las PBMCs aisladas se resuspendieron en medio RPMI complementado con suero AB humano al 10% y 2 x 105 células/pocillo se distribuyeron en placas de 384 pocillos que contenían compuestos (70 µl de volumen total). Después de la incubación durante la noche, se transfirieron 10 µl de sobrenadante a placas de 384 pocillos que contenían 2,2 x 103 células con replicón/pocillo en 30 µl (sembradas el día antes). Después de 24 horas de incubación, la replicación se midió al ensayar la actividad de luciferasa usando 40 µl/pocillo de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) y se midió con un aparato de obtención de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). La actividad inhibidora de cada compuesto sobre las células Huh7-luc/neo se presentó como valores de EC50, definida como la concentración de compuesto aplicado a las PBMCs que da como resultado una reducción de 50% de actividad de luciferasa que a su vez indica el grado de replicación de ARN de replicón al transferir una cantidad definida de medio de cultivo de PBMC. Se usó interferón α-2a recombinante (Roferon-A) como un compuesto de control estándar. Todos los compuestos mostraban una CC50 de >24 µM en el ensayo HEK 293 TOX descrito anteriormente.

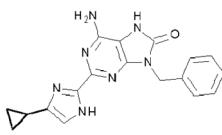
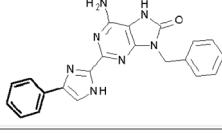
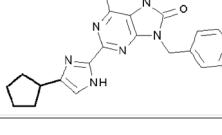
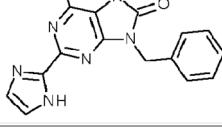
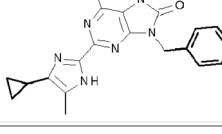
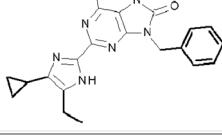
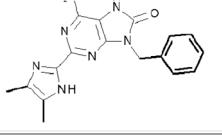
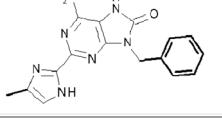
Medida de la producción de interferón en PBMC humana (PBMC HEK-ISRE-luc LEC)

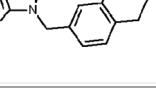
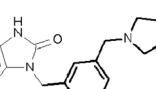
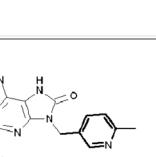
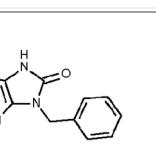
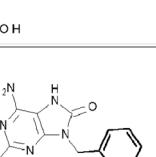
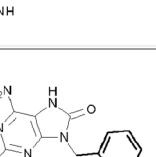
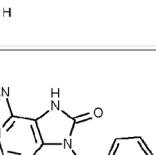
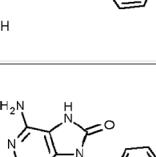
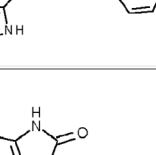
La activación de TLR7 humano da como resultado la producción robusta de interferón por células dendríticas plasmacitoides presentes en sangre humana. El potencial de los compuestos para inducir interferón se evaluó mediante la determinación de interferón en el medio acondicionado procedente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La presencia de interferón en las muestras se determinó, usando una línea celular indicadora de interferón que expresa establemente una construcción indicadora de elementos sensibles estimulados por interferón (ISRE)-luc. El elemento ISRE con una secuencia GAAACTGAAACT es altamente sensible al factor de transcripción STAT1-STAT2-IRF9, que se activa con la unión de IFN- β al receptor de IFN. Brevemente, las PBMCs se prepararon a partir de capas leucocíticas de al menos dos donantes usando un protocolo de centrifugación de Ficoll estándar. Las PBMCs aisladas se resuspendieron en medio RPMI complementado con suero AB humano al 10% y 2 x 105 células/pocillo se distribuyeron en placas de 384 pocillos que contenían compuestos (70 µl de volumen total). Después de la incubación durante la noche de las PBMCs con los compuestos, se transfirieron 10 µl de sobrenadante a placas de 384 pocillos que contenían 5 x 103 células HEK-ISRE-luc/pocillo en 30 µl (sembradas el día antes). Después de 24 horas de incubación, la activación de los elementos ISRE se midió al ensayar la actividad de luciferasa usando 40 µl/pocillo de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) y se midió con un aparato de obtención de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). La actividad estimulante de cada compuesto sobre las células HEK-ISRE-luc se presentó LEC. La LEC indica el grado de activación de ISRE al transferir una cantidad

definida de medio de cultivo de PBMC. Se usó interferón α -2a recombinante (Roferon-A) como un compuesto de control estándar.

5 Los valores de LEC para los compuestos de la tabla 2 sobre HEK293 TLR8-NF κ B-luc y HEK293 NF κ B-luc cuando eran mayores que la concentración probada más alta (> 10 μ M para el compuesto 6 y > 25 μ M para todos los otros compuestos).

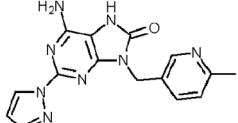
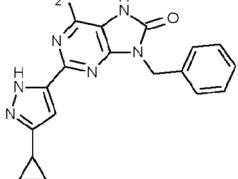
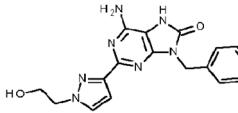
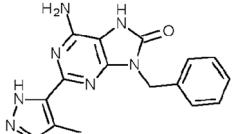
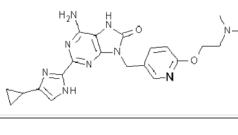
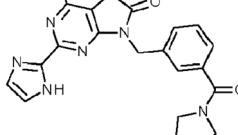
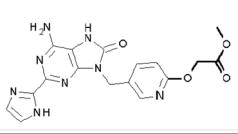
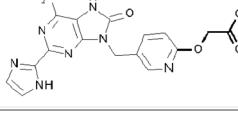
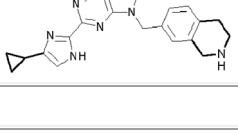
Tabla 2. Actividad biológica de los compuestos de fórmula (I)

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (μ M)	TLR7-dlRR2_LEC 24 h (μ M)	TLR7-wt_LEC 48 h (μ M)	TLR7-dlRR2_LEC 48 h (μ M)	PBMC-HUH7_EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; μ M)
1			0.33	8.25	0.18	0.081	0.064
2		4.72	1.2			0.531	
3		>24.59	7.67			13.97	
4			0.077	1.23	0.04	0.16	0.12
5			2.2	21.47	1.13	0.2	0.13
6			0.66	6.32	0.34	0.053	0.04
7				>25	1.46	0.64	0.88
8				5.91	0.17	0.17	0.25

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (µM)	TLR7-dIRR2_LEC 24 h (µM)	TLR7-wt_LEC 48 h (µM)	TLR7-dIRR2_LEC 48 h (µM)	PBMC-HUH7_EC50 (µM)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; µM)
							
25				2.46	0.39	0.006	0.007
26				2.42	0.21	0.005	0.006
27				6.03	0.63	0.8	0.43
28				>25	8.77	>23.81	>23.81
29					1.58	1.66	0.82
30				12.71	0.14	0.17	0.12
31				23.23	0.51	1.3	2.2
32				6.5	0.97	1.51	0.97
33				21.66	0.98	0.81	0.52

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 24 h (µM)	TLR7-wt_LEC 48 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 48 h (µM)	PBMC-HUH7_EC50 (µM)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; µM)
34				>25	1.21	0.69	0.49
35				0.36	0.033	0.17	0.10
36				0.22	0.017	0.047	0.033
37				0.05			0.01
38				0.38			>25
39				0.05			0.01
40				0.03			0.01
41				0.03			0.40

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 24 h (µM)	TLR7-wt_LEC 48 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 48 h (µM)	PBMC-HUH7_EC50 (µM)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; µM)
42				1.73			0.45
43				0.50			0.15
44				0.10			0.04
45				0.58			1.37
46				0.21			0.03
47				14.12			1.64
48				0.01			0.01
49				0.31			0.06
50				0.03			0.01

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 24 h (µM)	TLR7-wt_LEC 48 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 48 h (µM)	PBMC-HUH7_EC50 (µM)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; µM)
							
51				0.16			0.17
52				4.42	0.41		0.42
53				3.17	0.36	0.76	
54				16.1	5.65	0.05	0.07
55				4.11	0.06	1.27	1.16
57				0.44	0.06	1.21	1.38
58				0.99	0.06	2.75	2.69
60				>25	1.25	0.034	0.019
61				>25	9.73	1.34	0.95

Nº	ESTRUCTURA	TLR7-wt_LEC 24 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 24 h (µM)	TLR7-wt_LEC 48 h (µM)	TLR7-dlRR2_LEC 48 h (µM)	PBMC-HUH7_EC50 (µM)	PBMC HEK-ISRE-luc (LEC; µM)
62				21.2	>25	0.70	0.72
63				>25	2.58	6.72	4.39

Todos los compuestos se probaron en los ensayos indicadores para la determinación de la actividad de TLR8 y mostraban LEC > 17 µM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen R&D Ireland

<120> DERIVADOS DE PURINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES

<140> EP12784574.1

5 < 141> 2013-05-16

<150> EP11188511.7

< 151> 2011-11-09

<160> 1

<170> BiSSAP 1.2

10 <210> 1

< 211> 12

< 212> DNA

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 221> fuente

< 222> 1..12

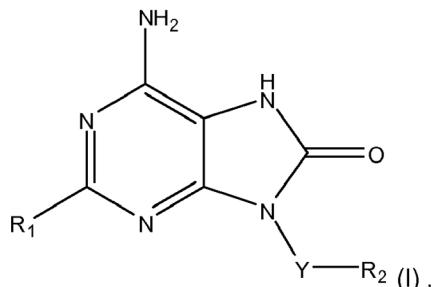
< 223> /organismo="Secuencia Artificial" /nota="Elemento sensible estimulado por interferón" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 1

20 gaaactgaaa ct 12

REIVINDICACIONES

- ### 1. Un compuesto de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo, en donde Y es alquíleno (C_{1-4}), R_1 se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, pirrolilo, furilo, oxadiazolilo, oxazolilo y pirimidilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-4} o cicloalquilo C_{3-6} y R_2 es un arilo² o un heterociclico; en donde el término arilo² incluye fenilo, naftilo, antracenilo y fenantrenilo, y está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-4} , trifluorometilo, CO_2R_3 , halógeno, hidroxil-alquilo(C_{1-4}), NR_6R_7 , $C(O)R_6$, $C(O)NR_6R_7$, alquil(C_{1-4})-dietetoxifosforilo o ácido alquil(C_{1-4})-fosfónico, en donde R_3 se selecciona de H y alquilo C_{1-6} , y R_6 y R_7 se selecciona cada uno independientemente de H, alquilo C_{1-6} y alcoxi C_{1-4} ; y en donde el término heterociclico se refiere a un tetrahidropirano y heteroarilo²; el término heteroarilo² incluye piridilo, tetrahidroisoquinolinilo, imidazopiridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, piracínilo, pirimidilo, naftiridinilo, piridacínilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, pirazolilo, tiazolilo, imidazolilo, indazolilo; el heteroarilo² está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-4} , oxi-alquil(C_{1-4})-amina o pirrolidinilmetanona.

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo según la reivindicación 1, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 3. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo según la reivindicación 1, o una composición farmacéutica según la reivindicación 2, para el uso como un medicamento.

4. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un polimorfo del mismo según la reivindicación 1, o una composición farmacéutica según la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento de un trastorno en el que está implicada la modulación de TLR7.

30