(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 790 875**

(51) Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2015** **PCT/GB2015/053731**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016** **WO16087878**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2015** **E 15808770 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020** **EP 3227277**

(54) Título: **Compuesto antimicótico**

(30) Prioridad:

05.12.2014 EP 14196662

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

(73) Titular/es:

PULMOCIDE LIMITED (100.0%)
c/o Covington & Burling LLP, 265 Strand
London WC2R 1BH, GB

(72) Inventor/es:

SUNOSE, MIHIRO;
COLLEY, THOMAS CHRISTOPHER;
ITO, KAZUHIRO;
RAPEPORT, GARTH y
STRONG, PETER

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 790 875 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

Compuesto antimicótico

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un compuesto útil en el tratamiento de la micosis, composiciones que lo contienen y su uso en la terapia.

Antecedentes de la invención

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado sustancialmente a lo largo de las dos últimas décadas y las formas invasivas son las principales causas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos. La candidiasis diseminada, la aspergilosis pulmonar y los hongos oportunistas emergentes son los agentes más comunes que producen estas micosis graves. Una característica particular de los hongos es que son capaces de generar una matriz extracelular (MEC) que los une y les permite adherirse a sus sustratos *in vitro* o *in vivo*. Estas biopelículas sirven para protegerlos contra los entornos hostiles del sistema inmunitario del huésped y para resistir la muerte antimicrobiana **(Kaur** y **Singh,** 2013).

La aspergilosis pulmonar se puede segmentar en aquellos pacientes que padecen una enfermedad no invasiva *frente a* aquellos con una afección invasiva. Se usa una subdivisión adicional para caracterizar a los pacientes que exhiben un componente alérgico a la aspergilosis (conocido como ABPA; aspergilosis broncopulmonar alérgica) en comparación con aquellos que no lo hacen. Los factores que precipitan la aspergilosis pulmonar pueden ser agudos, tales como la exposición a altas dosis de medicamentos inmunosupresores o a la intubación en una unidad de cuidados intensivos. Alternativamente, pueden ser crónicos, tales como una infección anterior por TB (**Denning** *y col.,* 2011a). Las infecciones pulmonares crónicas con Aspergillus pueden dejar a los pacientes con daño pulmonar amplio y permanente, lo que requiere tratamiento de por vida con fármacos azólicos orales (**Limper** *y col.,* 2011).

Un grupo de investigaciones creciente sugiere que la infección por Aspergillus puede desempeñar un papel importante en el asma clínico (**Chishimba** *y col.,* 2012; **Pasqualotto** *y col.,* 2009). Además, el trabajo publicado recientemente ha correlacionado la infección por Aspergillus con peores resultados clínicos en pacientes con EPOC (**Bafadhel** *y col.,* 2013). Estudios transversales similares han demostrado asociaciones entre la presencia de *Aspergillus spp.* y *Candida spp.* en el esputo y la función pulmonar empeorada (**Chotirmall** *y col*., 2010; **Agbetile** *y col*., 2012).

La aspergilosis invasiva (AI) presenta tasas altas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, aquellos sometidos a trasplante alogénico de células madre o trasplantes de órganos sólidos (tales como trasplantes de pulmón). El primer caso de AI descrito en un paciente inmunocomprometido se produjo en 1953. Este evento fue concurrente con la introducción de los corticosteroides y la quimioterapia citotóxica en los regímenes de tratamiento **(Rankin**, 1953). La aspergilosis invasiva es una preocupación importante en el tratamiento de la leucemia y otras malignidades hematológicas dada su alta incidencia y la mortalidad asociada. Las tasas de mortalidad por lo general superan el 50 % (**Lin** *y col.,* 2001) y las tasas a largo plazo pueden alcanzar el 90 % en receptores de trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas, a pesar de la disponibilidad de medicamentos triazólicos orales (**Salmeron** *y col.,* 2012). En pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos (particularmente del pulmón), el uso de dosis altas de esteroides deja a los pacientes vulnerables a la infección **(Thompson** y **Patterson**, 2008), lo que es un problema grave. La enfermedad también se ha presentado en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos menos gravemente. Estas incluyen aquellos que padecen EPOC o cirrosis subyacente, pacientes que reciben dosis altas de esteroides e individuos provistos de catéteres venosos centrales o asistidos por ventilación mecánica (**Dimopoulos** *y col*., 2012).

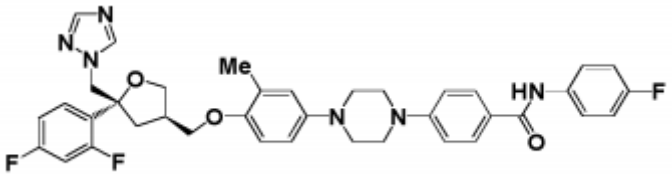
Los medicamentos antifúngicos existentes se administran predominantemente oral o sistémicamente. Estas vías de administración utilizadas habitualmente son deficientes para tratar infecciones de las vías respiratorias pulmonares, ya que las concentraciones de fármaco alcanzadas en el punto de infección tienden a ser inferiores a aquellas en los órganos. Esto es así especialmente para el hígado, que es un punto de toxicidad: hasta 15 % de los pacientes tratados con voriconazol padecen niveles elevados de transaminasas (**Levin** *y col.,* 2007; **Lat** y **Thompson,** 2011). La exposición del hígado también da como resultado interacciones farmacológicas significativas que surgen de la inhibición de las enzimas hepáticas P450 (**Jeong**, *y col.,* 2009; **Wexler** *y col.,* 2004).

Además, el uso generalizado de triazoles, tanto en la clínica como en la agricultura, ha conducido a una emergencia creciente y problemática de micosis resistentes en algunas ubicaciones (**Denning** *y col*., 2011b; **Bowyer** y **Denning,** 2014).

Resulta claramente evidente que existe una necesidad médica urgente de medicamentos antifúngicos novedosos que aporten una eficacia mejorada y mejores perfiles de tolerabilidad sistémica.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona el Compuesto (**I**),



Compuesto (I)

que es: 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidro furan-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-*N*-(4-fluorofenil)benzamida,
y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas (a las cuales, en lo sucesivo, a veces se hará referencia como el "compuesto de la invención").

Los datos biológicos descritos en esta invención revelan que el compuesto de la invención, el Compuesto (**I**), es un potente inhibidor del crecimiento de *Aspergillus fumigatus* en ensayos *in vitro*. En ratones inmunodeprimidos, el Compuesto (**I**) demostró una inhibición potente de las infecciones por *Aspergillus fumigatus*. En esta invención, se describen otras propiedades deseables del Compuesto (**I**).

Breve descripción de las figuras

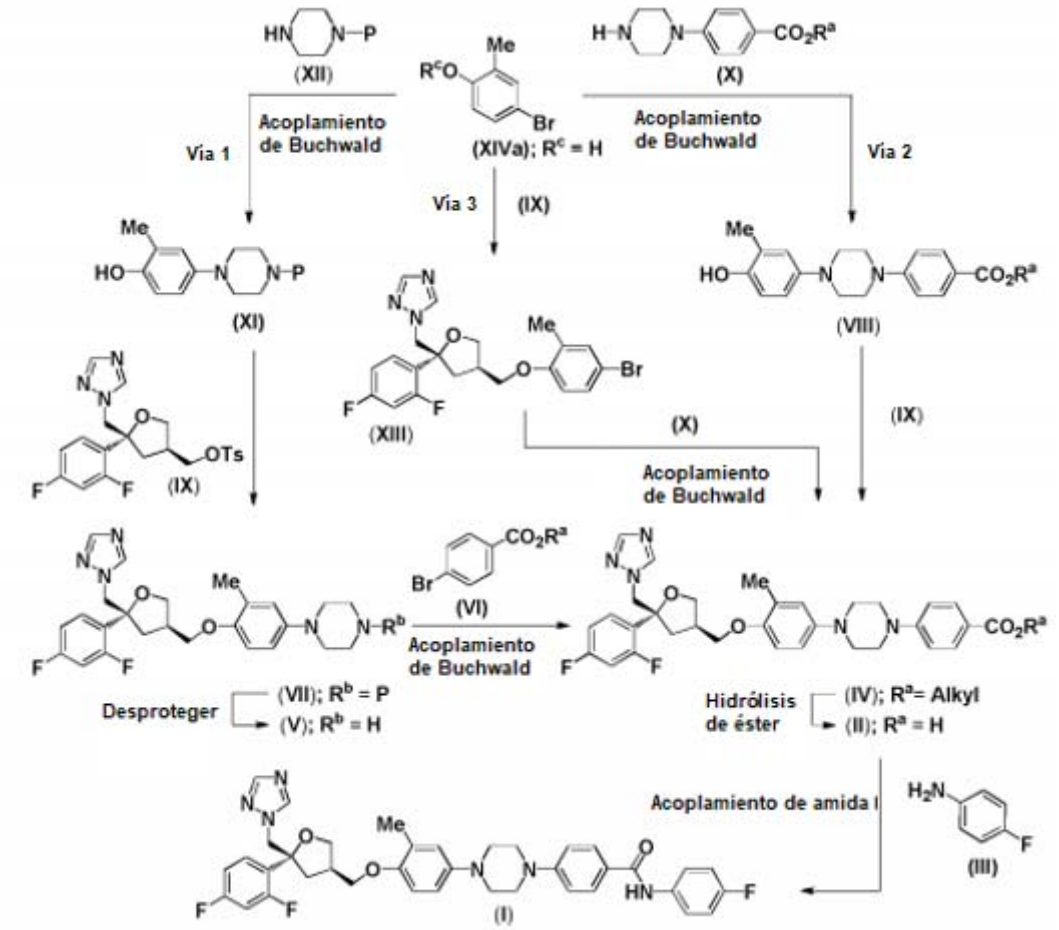
La **figura 1** muestra los efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre las UFC en los pulmones de ratones neutropénicos inmunocomprometidos e infectados con *Aspergillus fumigatus*.

La **figura 2** y la **figura 3** muestran los efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre las concentraciones de galactomanano en FLBA y suero, respectivamente, en ratones neutropénicos inmunocomprometidos e infectados con *Aspergillus fumigatus*.

En las figuras 1 a 3, el símbolo *** indica la importancia con $P < 0,001$.

Descripción detallada de la invención

Esquema 1: Preparación del Compuesto (I) por tres vías



Anteriormente, se representaron tres vías convergentes y alternativas, las cuales han sido desarrolladas para la generación del Compuesto (I) a partir de materiales de partida comercialmente disponibles (Esquema 1). Estas metodologías sintéticas difieren en la manera en la que se preparan los productos intermedios de ésteres de benzoato avanzados de la fórmula (**IV**).

Vía 1

El acoplamiento de Buchwald de un derivado de piperazina adecuadamente protegido (**XII**) con 4-bromo-2-metilfenol (**XIVa**) en condiciones típicamente empleadas para tales reacciones proporciona la piperazina mono*N*-arilada (**XI**). Un grupo protector de nitrógeno adecuado para tales transformaciones es como un uretano, usando un grupo Boc (P = $CO_2{}^tBu$). Los expertos en la materia entenderán que se puede usar una amplia variedad de condiciones para influir en las transformaciones de este tipo. En particular, los catalizadores de paladio y los ligandos de fosfina tales como RuPhosG3 y RuPhos se emplean rutinariamente en presencia de una base, por ejemplo, carbonato de cesio o hexametildisilazida de litio. La alquilación del fenol resultante (**XI**), en condiciones básicas, con el tosilato (**IX**) genera el éter (**VII**). El tosilato (**IX**) es un reactivo estable en términos de configuración, no volátil (sólido) que se encuentra ampliamente disponible, con una alta pureza enantiomérica, de fuentes comerciales; aunque otros derivados electrofílicos, como el mesilato correspondiente, así como también el derivado de halometilo (por ejemplo, de clorometilo y bromometilo) se anticiparían como alternativas adecuadas para esta transformación. La eliminación del grupo protector de nitrógeno revela la piperazina monosustituida (**V**). En el caso de un derivado de Boc (R^b = $CO_2{}^tBu$), la etapa de desprotección de amina se efectúa típicamente mediante la exposición del carbamato al ácido mineral fuerte o a un ácido orgánico fuerte, tal como TFA, ya sea puro o en presencia de un solvente, como DCM. Un segundo acoplamiento de Buchwald de la amina (**V**) con un 4-bromobenzoato de alquilo (**VI**), en condiciones básicas y con la actuación de un catalizador, da orgen al producto *N*,*N*'-bisarilado (**IV**) en el que R^a representa un alquilo enor, como el alquilo C_{1-5}, por ejemplo, metilo o etilo, o incluso *terc*-butilo.

Vía 2

Los productos intermedios de éster de benzoato (**IV**) pueden obtenerse en un procedimiento alternativo en el que solo se requiere un único acoplamiento mediado por paladio. La reacción del bromofenol (**XIVa**) con un derivado de piperazina mono*N*-arilada [(**X**), R^a = alquilo menor, tal como un alquilo C_{1-5}, por ejemplo, metil o etil, o incluso *terc*-butil], en condiciones de acoplamiento de Buchwald estándares, da origen a una 1,4-bisarilpiperazina (**VIII**). La *O*-alquilación de este producto fenólico, con el tosilato (**IX**), como se describió anteriormente, proporciona los productos de éteres (**IV**) directamente, en dos etapas, a partir de materiales de partida comercialmente disponibles.

Vía 3

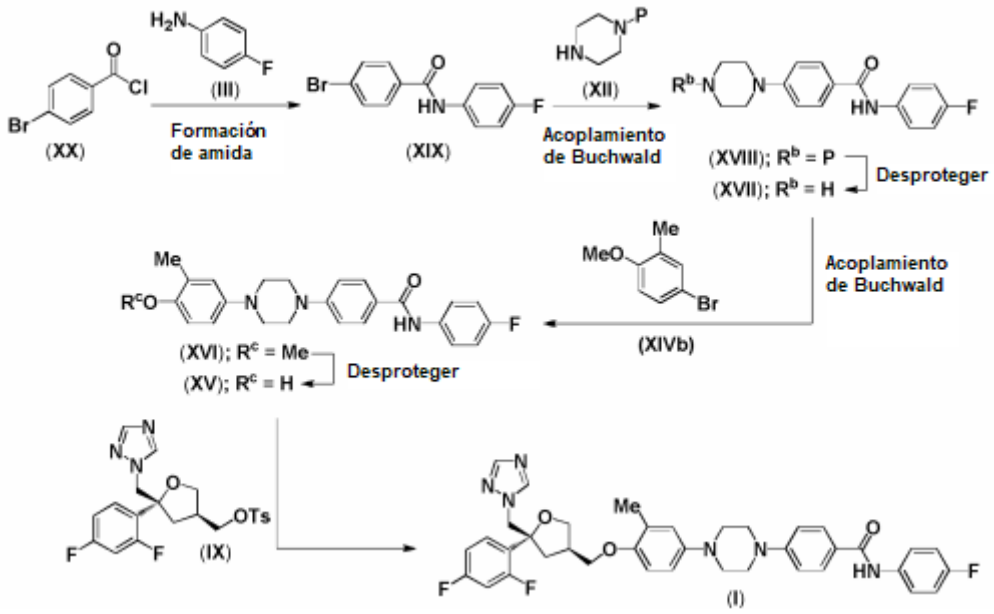
Se entenderá a partir de las rutas preparativas descritas anteriormente (**Esquema 1**) que, en algunos casos, es ventajoso realizar las mismas transformaciones sintéticas o similares en un orden diferente para mejorar la eficiencia general de los procedimientos y/o la calidad de los materiales obtenidos a partir de los mismos. Por ejemplo, el bromofenol (**XIVa**) puede transformarse en los compuestos de la fórmula (**IV**) llevando a cabo dos etapas, descritas anteriormente, en el orden inverso. De esta manera, el tratamiento de dicho fenol con el tosilato (**IX**) proporciona los derivados de éter de la fórmula (**XIII**). Este sustrato de bromuro de arilo puede hacerse reaccionar con una piperazina *N*-arilo de la fórmula (**X**), en condiciones de acoplamiento de Buchwald como se describió anteriormente, para proporcionar los productos intermedios de la fórmula (**IV**).

Preparación del Compuesto (I) desde el producto intermedio (IV)

En algunos casos, por ejemplo, aquellos en los que R^a es metilo o etilo, la generación del ácido benzoico libre (**II**) se efectúa convenientemente mediante el tratamiento del éster (**IV**) con una base en presencia de agua. Las condiciones típicas incluyen el tratamiento con un hidróxido de metal alcali, como hidróxido de litio, en una mezcla de agua y un solvente miscible ac. adecuado. En otros casos, como en el caso de un *terc*-butil éster, puede ser ventajoso efectuar la etapa de la hidrólisis en condiciones acídicas. Los reactivos comunes para tales interconversiones incluyen fuertes ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido hidroclórico, en presencia de un solvente orgánico y miscible en agua, tal como IPA.

El tratamiento del producto de ácido benzoico (**II**), con 4-fluoroanilina en condiciones de acoplamiento de amina estándares, ampliamente disponibles en la técnica, proporciona el compuesto de la invención, el Compuesto (**I**). Por ejemplo, la reacción puede efectuarse mediante la mezcla del ácido (**II**) y 4-fluoroanilina con los agentes de acoplamiento HOBt y EDCI en un solvente polar no prótico, tal como DMF, en presencia de una base orgánica no nucleofílica, típicamente DIPEA y similares.

Esquema 2: Preparación del Compuesto (I) por la vía 4

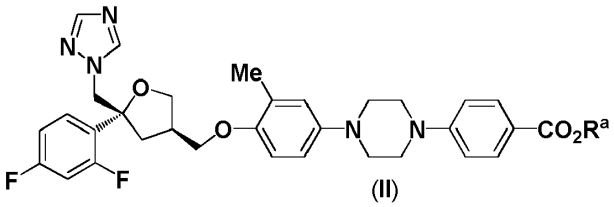


Vía 4

El compuesto de la presente invención también puede ensamblarse usando incluso otra variación de las tecnologías preparativas descritas en esta invención (**Esquema 2**). En este procedimiento alternativo (**Vía 4**), la formación de la unión de amida se efectúa como la primera etapa y la generación del enlace del éter constituye la última transformación sintética. La acilación de 4-fluoroanilina (**III**) con cloruro de 4-bromobenzoilo (**XX**) proporciona el fragmento de anilida (**XIX**). Como ya se observó, dichos productos amídicos pueden prepararse a partir de la amina y el ácido benzoico correspondientes directamente usando una variedad de agentes de activación, incluyendo reactivos de acoplamiento peptídico, de los cuales hay una amplia gama disponible en la técnica. Al someter el producto de bromuro de arilo a las condiciones de acoplamiento de Buchwald, con una piperazina monoprotegida adecuada (**XII**), bajo la actuación de un catalizador, en la manera antes registrada, se da origen a los productos intermedios de la fórmula (**XVIII**). En el caso de un grupo protector Boc [P = $CO_2{}^tBu$] la piperazina *N*-arilo deseada (**XVII**) se obtiene de inmediato mediante una breve exposición a un fuerte ácido, por ejemplo, mediante un tratamiento con TFA, el cual, a continuación, se elimina convenientemente del medio de reacción mediante la evaporación bajo presión reducida. El precursor fenólico para el compuesto (**I**), [(**XV**); R^c = H], a continuación, se derivó en dos etapas desde un acoplamiento de Buchwald con el bromo-anisol (**XIVb**), para dar el producto intermedio de metiléter [(**XVI**) R^c = Me], seguido de una O-desalquilación con tribromuro de boro. El fenol (**XV**), a continuación, se convirtió en el Compuesto (**I**), mediante la realquilación con el reactivo de tosilato (**IX**) en la manera antes descrita.

Los grupos protectores y los medios para su retirada se describen en "Protective Groups in Organic Synthesis", de Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc; 4ta Edición Rev., 2006, ISBN-10: 0471697540. Un análisis de las metodologías para la preparación de amidas se describe en: "Amide bond formation and peptide coupling", Montalbetti, C.A.G.N. y Falque, V. Tetrahedron, 2005, 61, 10827-10852.

Por consiguiente, la invención también proporciona un procedimiento para preparar el Compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (**II**):

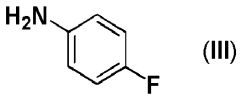


en la que:

R^a representa el hidrógeno;

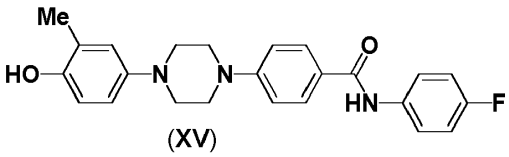
o un derivado activado del mismo (como un haluro de ácido, por ejemplo, un cloruro de ácido o un anhídrido de ácido); o una sal del mismo;

con un compuesto de la fórmula (**III**):



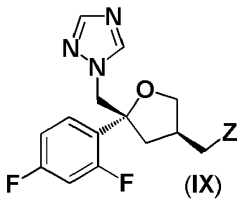
o una sal del mismo.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar el Compuesto (**I**) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (**XV**);



o una sal del mismo;

con un compuesto de la fórmula (**IX**);



(**IX**)

donde

Z representa un grupo de escisión, tal como *p*-TolylSO_2O;

o una sal del mismo.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (**I**) incluyen en particular sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. Con sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (**I**) se pretende comprender las sales de adición de ácido no tóxicas terapéuticamente activas que son capaces de formar los compuestos de fórmula (**I**). Estas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener convenientemente tratando la forma de base libre con tales ácidos apropiados en un solvente o una mezcla de solventes adecuados. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares.

Por otro lado, dichas formas salinas se pueden convertir mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

La definición del compuesto de la fórmula (**I**) está destinada a incluir todos los tautómeros de dicho compuesto.

La definición del compuesto de la fórmula (**I**) está destinada a incluir todos los solvatos de dicho compuesto (lo que incluye solvatos de sales de dicho compuesto) a menos que el contexto lo indique específicamente de otro modo. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

El compuesto de la descripción incluye realizaciones donde uno o más átomos especificados son isótopos de origen natural o no natural. En una realización, el isótopo es un isótopo estable. Por tanto, los compuestos de la descripción incluyen, por ejemplo, compuestos que contienen deuterio y similares.

La descripción también abarca todas las formas polimórficas del compuesto definido en esta invención.

Los productos intermedios innovadores, como se describen en esta invención, de las fórmulas (**II**), (**IV**), (**V**), (**VII**), (**VIII**), (**XIII**) y (**XV**) y sus sales, forman un aspecto adicional de la invención. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables (tales como las mencionadas anteriormente) y sales no farmacéuticamente aceptables. Las sales de ácidos (por ejemplo, ácidos carboxílicos) incluyen sales de metales del primer y segundo grupo que incluyen sales de sodio, potasio, magnesio y calcio.

En una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra tópicamente al pulmón o la nariz, particularmente, tópicamente al pulmón. Por tanto, en una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables.

Las composiciones adecuadas para administración pulmonar o intranasal incluyen polvos, soluciones líquidas, suspensiones líquidas, gotas nasales, que comprenden soluciones o suspensiones, o aerosoles presurizados o no presurizados.

Las composiciones se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a edición, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las composiciones también se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria múltiple.

La administración tópica a la nariz o el pulmón se puede conseguir mediante el uso de una formulación no presurizada tal como una solución o suspensión acuosa. Tales formulaciones se pueden administrar por medio de un nebulizador, por ejemplo, uno que puede ser manual y portátil o para uso doméstico u hospitalario (es decir, no portátil). Un dispositivo de ejemplo es un inhalador RESPIMAT. La formulación puede comprender excipientes tales como agua, tampones, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes ajustadores del pH, modificadores de la viscosidad, tensioactivos y cosolventes (tales como etanol). Las formulaciones de líquido de suspensión y aerosol (ya sea presurizado o no presurizado) contendrán típicamente el compuesto de la invención en forma finamente dividida, por ejemplo, con un D_{50} de 0,5 a 10 µm, por ejemplo, alrededor de 1 a 5 µm. Las distribuciones del tamaño de partícula se pueden representar usando los valores D_{10}, D_{50} y D_{90}. El valor de mediana D_{50} de las distribuciones del tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micras que divide la distribución por la mitad. La medición obtenida a partir de difracción láser se describe con mayor exactitud como una distribución de volumen y, por consiguiente, el valor D_{50} obtenido usando este procedimiento se denomina más convenientemente valor Dv_{50} (mediana para una distribución de volumen). Como se emplea en esta invención, los valores Dv se refieren a distribuciones del tamaño de partícula medidas usando difracción láser. De manera similar, los valores D_{10} y D_{90}, usados en el contexto de la difracción láser, se toman para indicar los valores Dv_{10} y Dv_{90} y se refieren al tamaño de partícula mediante el cual el 10 % de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{10} y el 90 % de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{90}, respectivamente.

Según un aspecto específico de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención en forma de partículas suspendidas en un medio acuoso. El medio acuoso comprende típicamente agua y uno o más excipientes seleccionados entre tampones, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes ajustadores del pH, modificadores de la viscosidad y tensioactivos.

La administración tópica a la nariz o el pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de aerosol. Las formulaciones de aerosol comprenden típicamente el principio activo suspendido o disuelto en un propelente de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propelentes de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propelente 11), diclorotetrafluorometano (propelente 114) y diclorodifluorometano (propelente 12). Los propelentes de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propelente comprende típicamente 40 %-99,5 %, por ejemplo, 40 %-90 % en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen cosolventes (por ejemplo, etanol) y tensioactivos (por ejemplo, lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Otros excipientes posibles incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y similares. Las formulaciones de aerosol se envasan en recipientes metálicos herméticos y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula dosificadora (por ejemplo, como las suministradas por Bespak, Valois o 3M o alternativamente por Aptar, Coster o Vari).

La administración tópica al pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el compuesto de la descripción en forma finamente dividida, típicamente con un MMD de 1 a 10 µm o un D_{50} de 0,5 a 10 µm, por ejemplo, alrededor de 1 a 5 µm. Los polvos del compuesto de la invención en forma finamente dividida se pueden preparar mediante un procedimiento de micronización o un procedimiento de reducción de tamaño similar. La micronización se puede realizar usando un molino de chorro tal como los fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución del tamaño de partícula resultante se puede medir usando difracción láser (por ejemplo, con un instrumento Mastersizer 2000S de Malvern). La formulación contendrá típicamente un diluyente tópicamente aceptable tal como lactosa, glucosa o manitol (preferiblemente lactosa), por lo general de tamaño de partícula comparativamente grande, por ejemplo, un MMD de 50 µm o más, por ejemplo, 100 µm o más o un D_{50} de 40 a 150 µm. Como se emplea en esta invención, el término "lactosa" se refiere a un componente que contiene lactosa, lo que incluye α-lactosa monohidratada, β-lactosa monohidratada, α-lactosa anhidra, β-lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de lactosa se pueden procesar mediante micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por pulverización. También están abarcadas formas de lactosa comercializadas en diversas formas, por ejemplo, Lactohale® (lactosa de grado inhalatorio; DFE Pharma), InhaLac®70 (lactosa tamizada para inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) y Respitose® (lactosa de grado inhalatorio tamizada; DFE Pharma). En una realización, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en α-lactosa monohidratada, α-lactosa anhidra y lactosa amorfa. Preferiblemente, la lactosa es α-lactosa monohidratada.

Las formulaciones de polvo seco también pueden contener otros excipientes tales como estearato de sodio, estearato de calcio o estearato de magnesio.

Una formulación de polvo seco se administra típicamente usando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI). Los ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYEHALER, ACCUHALER y CLICKHALER. Otros ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen

ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X- CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, inhalador de polvo seco ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

El compuesto de la invención también se podría administrar tópicamente a otra superficie interna o externa (por ejemplo, una superficie mucosa o piel) u oralmente. El compuesto de la invención se puede formular convencionalmente para tales vías de administración.

El compuesto de la invención es útil en el tratamiento de micosis y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis.

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso del compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de micosis y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un sujeto con una micosis que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva del compuesto de la invención.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a una micosis en un sujeto, el cual comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva del compuesto de la invención.

La micosis puede ser causada, en particular por un *Aspergillus spp.*, tal como *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus pullulans*, especialmente *Aspergillus fumigatus*. Las micosis también pueden ser causadas por *Candida spp.*, por ejemplo, *Candida albicans o Candida glabrata, Rhizopus spp.*, por ejemplo, *Rhizopus oryzae, Cryptococcus spp.*, por ejemplo, *Cryptococcus neoformans, Chaetomium spp.*, por ejemplo, *Chaetomium globosum, Penicillium spp.*, por ejemplo, *Penicillium chrysogenum y Trichophyton spp.*, por ejemplo, *Trichophyton rubrum.*

Una enfermedad asociada a una micosis es, por ejemplo, la aspergilosis pulmonar.

El compuesto de la invención se puede usar en un contexto profiláctico administrando dicho compuesto antes del comienzo de la micosis.

Los sujetos incluyen sujetos humanos y animales, especialmente sujetos humanos.

El compuesto de la invención es especialmente útil para el tratamiento de micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* en sujetos de riesgo. Los sujetos de riesgo incluyen lactantes prematuros, niños con defectos congénitos del pulmón o el corazón, sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, los que padecen infección por VIH), asmáticos, sujetos con fibrosis quística, sujetos ancianos y sujetos que padecen una afección médica crónica que afecta al corazón o al pulmón (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

El compuesto de la invención también es útil para el tratamiento de micosis resistentes a azoles tales como infección por *Aspergillus fumigatus* resistente a azoles, particularmente en combinación con posaconazol.

El compuesto de la invención se puede administrar en combinación con un segundo principio activo o más. El segundo o más principios activos se pueden seleccionar, por ejemplo, entre otros agentes antifúngicos (tales como voriconazol o posaconazol), anfotericina B, una equinocandina (tal como caspofungina) y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina).

El segundo o más principios activos incluyen principios activos adecuados para el tratamiento o la prevención de una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o una enfermedad asociada a una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o afecciones comórbidas con una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

El compuesto de la invención se puede coformular con un segundo principio activo o más, o el segundo o más principios activos se pueden formular para ser administrados independientemente por la misma vía o una diferente.

Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar a pacientes que ya están siendo tratados sistémicamente con un antifúngico, tal como voriconazol o posaconazol.

Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede coadministrar, por ejemplo, coformular, con uno o más agentes seleccionados entre anfotericina B, una equinocandina, tal como caspofungina, y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina.

El compuesto de la invención se puede coadministrar, por ejemplo, coformular, alternativamente (o además), con uno o más agentes seleccionados entre candicidina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina, rimocidina, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, ketoconazol, luliconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, albaconazol, efinaconazol, epoxiconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, propiconazol, ravuconazol, terconazol, abafungina, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, anidulafungina, micafungina, ácido benzoico, ciclopirox, flucitosina (5-fluorocitosina), griseofulvina, tolnaftato y ácido undecilénico.

Los compañeros de combinación preferidos incluyen intraconazol, voriconazol, caspofungina y posaconazol.

Según un aspecto de la invención se proporciona un kit de partes que comprende (a) una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (b) una composición farmacéutica que comprende un segundo principio activo opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (c) opcionalmente una o más composiciones farmacéuticas adicionales que comprenden cada una un tercer principio activo o más opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; y (d) instrucciones para la administración de las composiciones farmacéuticas a un sujeto con necesidad de las mismas. El sujeto con necesidad de las mismas puede padecer, o ser susceptible de, una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

El compuesto de la invención se puede administrar en un intervalo adecuado, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

Una cantidad de dosis adecuada para un humano de peso promedio (50-70 kg) se espera que sea de alrededor de 50 µg a 10 mg/día, por ejemplo, 500 µg a 5 mg/día, aunque la dosis exacta que se va a administrar puede ser determinada por un experto en la técnica.

Se espera que el compuesto de la invención tenga uno o más de los siguientes atributos favorables:

- actividad antifúngica potente, particularmente actividad contra *Aspergillus spp.* tales como *Aspergillus fumigatus,* o actividad contra *Candida spp.,* por ejemplo, *Candida albicans o Candida glabrata, Rhizopus spp.,* por ejemplo, *Rhizopus oryzae, Cryptococcus spp.,* por ejemplo, *Cryptococcus neoformans, Chaetomium spp.,* por ejemplo, *Chaetomium globosum, Penicillium spp.*, por ejemplo, *Penicillium chrysogenum o Trichophyton spp.*, por ejemplo, *Trichophyton rubrum,* especialmente después de la administración tópica al pulmón o la nariz;
- duración larga de la acción en los pulmones, preferentemente consistente con la administración una vez al día;
- exposición sistémica baja después de la administración tópica al pulmón o la nariz; y
- un perfil de seguridad aceptable, especialmente después de la administración tópica al pulmón o la nariz.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Las abreviaturas usadas en esta invención se definen a continuación (**Tabla 1**). Cualquier abreviatura no definida está destinada a expresar su significado generalmente aceptado.

Tabla 1: Abreviaturas

ABPA	aspergilosis broncopulmonar alérgica
ac.	acuosa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BALF	fluido de lavado broncoalveolar
BEAS2B	línea celular epitelial bronquial humana inmortalizada con SV40
Boc	*terc*-butiloxicarbonilo
br	amplia
BSA	albúmina sérica bovina
CC_{50}	concentración de citotoxicidad celular de 50 %
UFC	unidad(es) formadora(s) de colonias

CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
COI	índice de corte
conc.	concentración/concentrada
d	doblete
DCM	diclorometano
DFB_{50}	días necesarios para alcanzar una carga fúngica de 50 % del control
DIPEA	*N,N*-diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DSS	sulfato sódico de dextrano
EBM	medio basal endotelial
MEC	matriz extracelular
EDCI.HCl	*clorhidrato de N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida
EGM2	medio de crecimiento celular endotelial 2
EUCAST	Comité Europeo de Antibiogramas
(ES^+)	ionización por electroespray, modo positivo
Et	etilo
Et_3N	trietilamina
EtOAc	acetato de etilo
FBS	suero fetal bovino
GM	galactomanano
HPAEC	célula endotelial de arteria pulmonar humana
$HOBt.H_2O$	1-hidroxibenzotriazol monohidratado
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
h	hora(s)
AI	aspergilosis invasiva
i.n.	intranasal
IPA	2-propanol
i.t.	intratraqueal
LC-MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
Li Hep	heparina de litio
LiHMDS	bis(trimetilsilil)amida de litio
m	multiplete
$(M+H)^+$	ion molecular protonado
MDA	malondialdehído
Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MHz	megahercio
CMI_{50}	50 % de concentración mínima inhibitoria
CMI_{75}	75 % de concentración mínima inhibitoria

CMI_{90}	90 % de concentración mínima inhibitoria
min	minuto(s)
MMD	diámetro medio másico
MOI	multiplicidad de infección
MOPS	ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico
m/z:	relación masa/carga
NCPF	Colección Nacional de Hongos Patógenos
RMN	(espectroscopía de) resonancia magnética nuclear
NE	no ensayado
DO	densidad óptica
PBS	solución salina tamponada con fosfato
P	grupo protector
q	cuarteto
TA	temperatura ambiente
RP HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
RuPhos	2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenilo
RuPhosG3	metanosulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio (II)
s	singlete
sat.	saturado(a)
sc.	subcutáneo(a)
SDS	dodecilsulfato sódico
t	triplete
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TR34/L98H	*Una cepa de Aspergillus fumigatus* que contiene una sustitución de leucina a histidina en el codón 98 y una repetición en tándem de 34 pb

Procedimientos generales

Todos los materiales de partida y solventes se obtuvieron indistintamente de fuentes comerciales o se prepararon según la cita bibliográfica. A menos que se indique de otro modo, se agitaron todas las reacciones. Las soluciones orgánicas se secaron rutinariamente sobre sulfato de magnesio anhidro.

Procedimientos analíticos

Procedimientos de HPLC de fase inversa:

Columna Waters Xselect CSH C18 XP, 2,5 µm (4,6 x 30 mm) a 40 °C ; velocidad de flujo 2,5-4,5 ml min^{-1} eluida con un gradiente de H_2O-MeCN que contenía ya sea 0,1 % v/v de ácido fórmico (**Procedimiento a**) o 10 mM NH_4HCO_3 en agua (**Procedimiento b**) a lo largo de 4 min que emplea una detección de UV a 254 nm. Información de gradiente: 0-3,00 min, incrementado desde 95 % de H_2O-5 % MeCN al 5 % de H_2O-95 % de MeCN; 3,00-3,01 min, mantenido al 5 % de H_2O-95 % de MeCN, velocidad de flujo incrementada a 4,5 ml min^{-1}; 3,01 3,50 min, mantenido al 5 % de H_2O-95 % de MeCN; 3,50-3,60 min, regresado al 95 % de H_2O-5 % de MeCN, velocidad de flujo reducida a 3,50 ml min^{-1}; 3,60-3,90 min, mantenida al 95 % de H_2O-5 % de MeCN; 3,90-4,00 min, mantenido al 95 % de H_2O-5 % de MeCN, velocidad de flujo reducida a 2,5 ml min^{-1}.

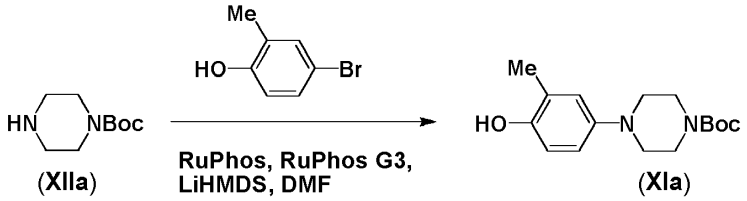
^{1} Espectroscopía por H RMN:

Los espectros de ^{1}H RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker Advance III a 400 MHz usando un solvente sin

deuterar residual como referencia y, a menos que se indicase lo contrario, se ejecutaron en DMSO-d_6.

Procedimientos sintéticos para la preparación del Compuesto (I)

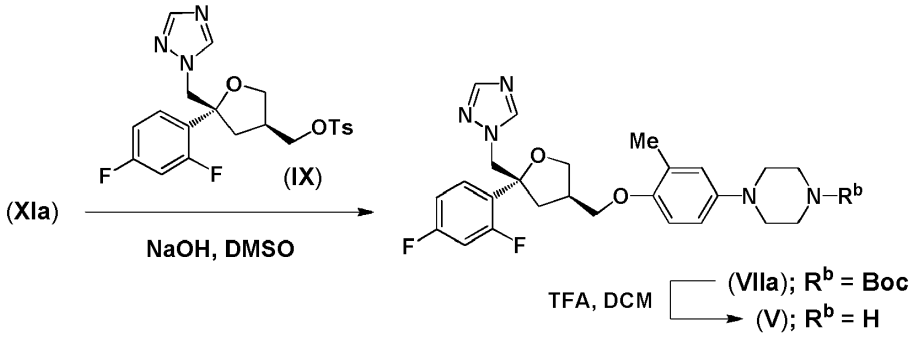
***terc*-butil 4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazina-1-carboxilato.**



Un matraz cargado con piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (**XIIa**) (7,44 g, 40,0 mmol), 4-bromo-2-metilfenol (6,23 g, 33,3 mmol), RuPhos (311 mg, 0,67 mmol) y RuPhos G3 (557 mg, 0,67 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces. Se adicionó una solución de LiHMDS (1 M en THF, 100 ml, 100 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 3 h.

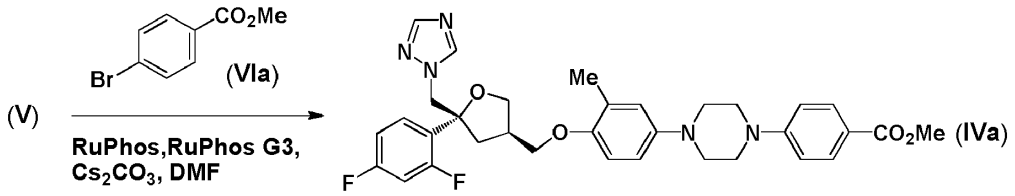
Después de enfriar a TA, la mezcla se enfrió rápidamente mediante la adición de ácido clorhídrico 1 M (100 ml) y a continuación se neutralizó con $NaHCO_3$ ac. 1 M (100 ml). La capa ac. se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados. Los volátiles se eliminaron *in vacuo* para proporcionar un producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 120 g, 0-100 % de EtOAc en isohexanos, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**XIa**) como un sólido marrón claro (7,80 g, 78 %); T^r 2,07 min (Procedimiento b); m/z 293 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 1,41 (9H, s), 2,07 (3H, s), 2,86-2,88 (4H, m), 3,41-3,43 (4H, m), 6,58-6,65 (2H, m), 6,71 (1H, d) y 8,72 (1H, s).

1-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina.



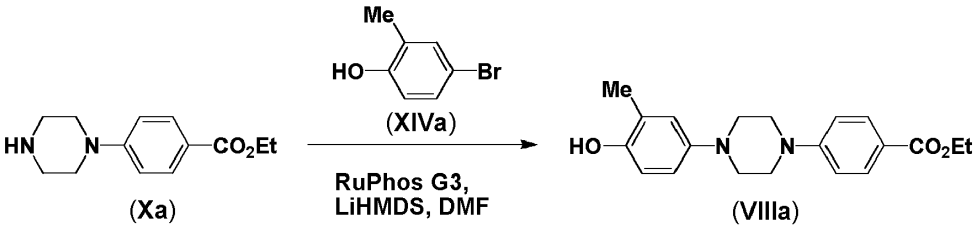
A una solución de producto intermedio (Xla) (7,80 g, 25,1 mmol) en DMSO (60 ml) se adicionó hidróxido de sodio ac. (3,0 ml, 12,5 M, 37,6 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 10 min y, a continuación, se trató porción a porción con ((3*S*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluoro fenil)tetrahidrofuran-3-il)metil4-metilbencenosulfonato (**IX**) (ex APIChem, Número de catálogo: AC-8330, 12,4 g, 27,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante 18 h, se enfrió a TA y se adicionó agua (200 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2 x 200 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón. El análisis del producto bruto protegido con Boc (**VIIa**) mediante RMN ^1H indicó que contenía ~10 % del alqueno: (*R*)-1-((2-(2,4-difluorofenil)-4-metilentetrahidrofuran-2-il)metil)-1*H*-1,2,4-triazol, formado como subproducto de la eliminación. El uretano bruto (**VIIa**) se recolectó en DCM (150 ml) y se trató con TFA (39,0 ml, 502 mmol). Después de 2 h a TA, la mezcla de reacción se concentró *in vacuo* para eliminar la mayoría de los volátiles y a continuación se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con NaOH (2 M, 200 ml). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2 x 200 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón claro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 80 g, 0-10 % de NH_3//MeOH 0,7 M en DCM, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**V**), como un aceite viscoso marrón claro (9,46 g, 80 %); T^r 1,91 min (Procedimiento b); m/z 470 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,07 (3H, s), 2,15 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,52-2,56 (1H, m), 2,79-2,81 (4H, m), 2,87-2,90 (4H, m), 3,66 (1H, dd), 3,73-3,77 (2H, m), 4,04 (1H, t), 4,57 (2H, dd), 6,64 (1H, dd), 6,70-6,75 (2H, m), 6,99 (1H, td), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76 (1H, s) y 8,34 (1H, s).

Metil 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetra hidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



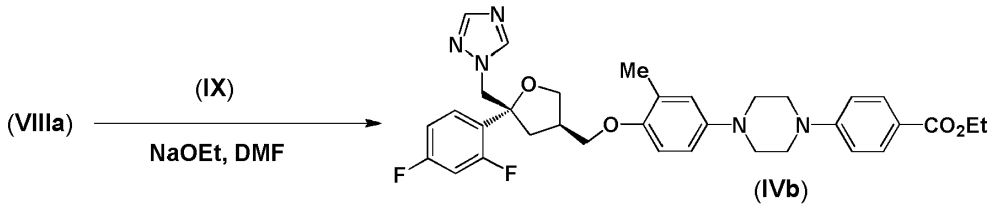
Un matraz cargado con producto intermedio (**V**) (9,00 g, 19,2 mmol), metil-4-bromobenzoato (**VIa**) (4,95 g, 23,0 mmol), RuPhos (0,18 g, 0,38 mmol, 2 % molar), RuPhosG3 (0,32 g, 0,38 mmol, 2 % molar) y carbonato de cesio (9,99 g, 30,7 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces antes de adicionar DMF (150 ml). La mezcla se calentó a 80 °C durante 22 h y a continuación, mientras aún estaba caliente, se vertió en agua (150 ml) para formar una goma marrón. Se adicionó más agua (300 ml) y se extrajo la fase ac. con DCM (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y concentraron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón que se vertió en agua (100 ml). El precipitado resultante se recolectó mediante filtración y a continuación se resuspendió en THF (100 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, durante la cual se formó una suspensión crema. La mezcla se enfrió hasta alcanzar la TA y el precipitado resultante se recolectó mediante filtración, se lavó con THF (2 x 50 ml) y se secó *in vacuo* para obtener el compuesto del título, el producto intermedio (**IVa**), como un sólido amarillo claro (9,48 g, 79 %); T^r 2,79 min (Procedimiento b); m/z 604 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,11-3,14 (4H, m), 3,43-3,46 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (5H, s superponiéndose sobre m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br d), 7,00 (1H, td), 7,04 (2H, d), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76 (1H, s), 7,81 (2H, d) y 8,34 (1H, s).

Etil 4-(4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



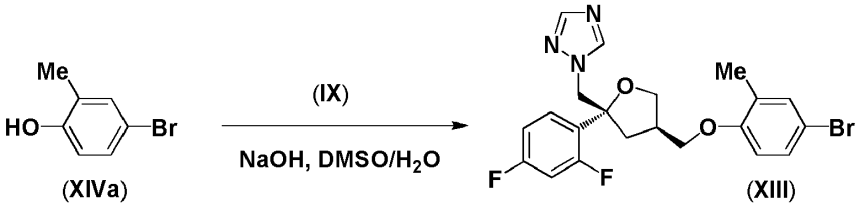
Un matraz cargado con una solución de 4-(piperazin-1-il)benzoato de etilo (**Xa**) (20,0 g, 85,0 mmol) y 4-bromo-2-metilfenol (19,2 g, 102 mmol) en DMF (213 ml) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces. Se adicionó RuPhos G3 (1,43 g, 1,71 mmol) y el matraz se evacuó y rellenó con nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se adicionó LiHMDS (17,1 g, 102 mmol). La reacción se agitó a TA durante 10 min, a continuación, se enfrió en un baño de agua y se adicionó LiHMDS (20,0 g, 120 mmol) en partes iguales (7 x 2,85 g) a intervalos de 5 min. La solución resultante se agitó a TA durante 30 min y a continuación se enfrió a 0 °C y trató con ácido clorhídrico 2 M (200 ml), lo que dio como resultado un pH de 6-7. La mezcla se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se extrajo con EtOAc (220 ml). La capa ac. se separó y extrajo con EtOAc (4 x 50 ml) y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (6 x 50 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un sólido crema. Se adicionó una mezcla de isohexanos e IPA (1:1, 150 ml) y la suspensión se agitó a TA durante 30 min. El sólido se recolectó mediante filtración y la torta del filtro se lavó con una mezcla de isohexanos e IPA (1:1, 2 x 10 ml) seguida de isohexanos (4 x 10 ml) y se secó *in vacuo* a 40 °C durante 18 h para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**VIIIa**), como un sólido crema (15,3 g, 50 %); T^r 2,29 min (Procedimiento b); m/z 341 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ:1,29 (3H, t), 2,09 (3H, s), 3,06-3,09 (4H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 4,24 (2H, dd), 6,66 (2H, brs), 6,76 (1H, brs), 7,03 (2H, d), 7,80 (2H, d), 8,72 (1H, s).

Etil 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidro furan-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



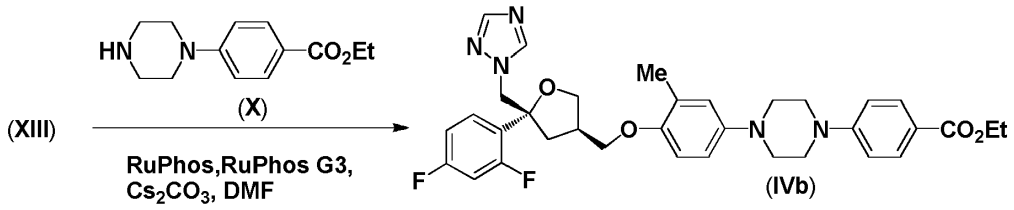
A una solución de producto intermedio (**VIIIa**) (15,3 g, 44,9 mmol) en DMF (110 ml) enfriada a 0 °C se adicionó etóxido de sodio (3,13 g, 46,1 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 10 min y a continuación se trató con el tosilato (**IX**) (20,2 g, 44,9 mmol). Se permitió que la mezcla de reacción se calentara a TA, se calentó a 50 °C durante 1 h y a continuación se enfrió a TA. Se adicionaron ácido clorhídrico (1 M, 60 ml) y agua (200 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min a TA y a continuación se extrajo con DCM (150 ml). La capa ac. se separó y extrajo con DCM (2 x 50 ml) y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (4 x 30 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un sólido crema. El sólido se suspendió en una mezcla equitativa de isohexanos e IPA (80 ml) y se agitó a TA durante 1 h. El sólido se recolectó mediante filtración, se lavó con una mezcla de isohexanos e IPA 1:1 (3 x 20 ml) y a continuación se secó *in vacuo* a 40 °C durante 18 h para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**IVb**), como un sólido blanco (16,4 g, 56 %); T^r 2,92 min (Procedimiento b); m/z 618 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 1,29 (3H, t), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,14 (4H, m), 3,43-3,46(4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,24 (2H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,76 (2H, br s), 6,86 (1 H, br s), 6,98-7,05 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,81 (2H, d), 8,34 (1H, s).

1-(((2*R*,4*R*)-4-((4-bromo-2-metilfenoxi)metil)-2-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-2-il)metil)-1*H*-1,2,4-triazol.



A una solución de 4-bromo-2-metilfenol (920 mg, 4,89 mmol) en DMSO (10 ml) se adicionó hidróxido de sodio ac. (0,39 ml, 12,5 M, 4,89 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 10 min y a continuación se trató con el tosilato (**IX**) (2,00 g, 4,45 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 72 h y a continuación se enfrió a TA y se repartió entre agua (25 ml) y EtOAc (20 ml). Se separó y retuvo la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (3 x 15 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo.* El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 12 g, 0-30 % de EtOAc en DCM, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**XIII**), como un aceite incoloro (1,84 g, 86 %); T^r 2,78 min (Procedimiento a); m/z 464 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,09 (3H, s), 2,17 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,60 (1H, m), 3,72-3,78 (2H, m), 3,82 (1H, dd), 4,00-4,06 (1H, m), 4,57 (2H, dd), 6,82 (1H, d), 7,00 (1H, td), 7,25-7,34 (4H, m), 7,76 (1H, s), 8,34 (1H, s).

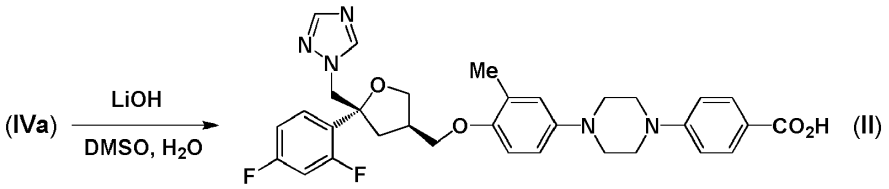
Etil 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidro furan-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



Un vial cargado con 4-(piperazin-1-il)benzoato de etilo (X) (103 mg, 0,44 mmol), producto intermedio (**XIII**) (170 mg, 0,37 mmol), RuPhos (8,5 mg, 18 µmol), RuPhos G3 (14,2 mg, 18 µmol) y carbonato de cesio (191 mg, 0,59 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces antes de adicionar DMF (3,0 ml). La mezcla se calentó a 80 °C durante 18 h y a continuación a 100 °C durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se repartió entre agua (10 ml) y EtOAc (10 ml). Se separó y retuvo la fase orgánica y la capa ac. se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (3 x 10 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo.* El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 12 g, 0 a 100 % de EtOAc en isohexano, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**IVb**), como un sólido blanco (100 mg, 43 %).

Ácido 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoico.

***Hidrólisis del éster metílico* (IVa)**

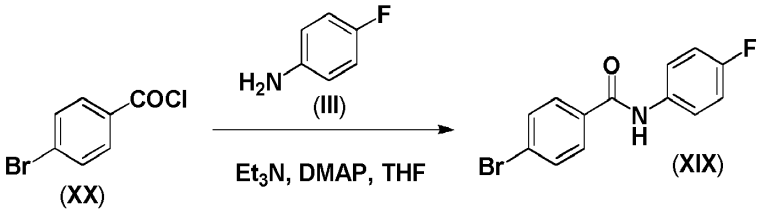


A una suspensión de producto intermedio (**IVa**) (9,00 g, 14,9 mmol) en DMSO (370 ml) se adicionó una solución de hidróxido de litio (1,79 g, 74,5 mmol) en agua (37,0 ml). La mezcla se calentó a 70 °C durante 22 h y a continuación se enfrió a TA, se diluyó con agua (1000 ml) y se acidificó (a - pH 2) mediante la adición de ácido clorhídrico ac. 1 M (80 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo durante 2 h y el precipitado resultante se recolectó mediante filtración. La torta del filtro se lavó con agua (3 x 80 ml) y se secó *in vacuo* a 50 °C para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**II**), como un sólido blanco (4,66 g, 54 %); T^r 2,21 min (Procedimiento 1a); m/z 590 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,14 (4H, m), 3,42-3,45 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,76 (2H, br s), 6,86 (1H, br d), 6,97-7,03 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,77-7,80 (3H, m), 8,34 (1H, s) y 12,31 (1H, s).

Hidrólisis del éster etílico (IVb)

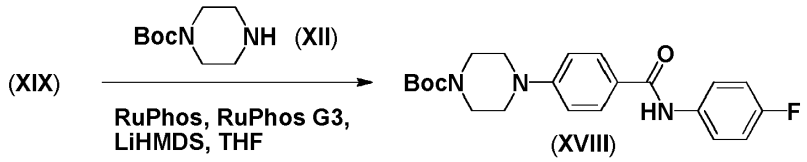
A una suspensión de producto intermedio (**IVb**) (16,4 g, 26,6 mmol) en DMSO (375 ml) se adicionó una solución de hidróxido de litio (3,18 g, 74,5 mmol) en agua (50 ml). La mezcla se calentó a 70 °C durante 22 h y a continuación se enfrió a TA, se vertió en agua (500 ml) y se acidificó (a ~ pH 5-6) mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M (70 ml). La mezcla se agitó a TA durante 30 min y el sólido resultante se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (2 x 20 ml) y con dietil éter (3 x 30 ml) y a continuación se secó *in vacuo* a 40 °C durante 18 h para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**II**), como un sólido tostado (14,2 g, 84 %); T^r 2,26 min (Procedimiento 1a); m/z 590 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,14 (4H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,86 (1H, br s), 6,97-7,03 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,77-7,80 (3H, m), 8,34 (1H, s), 12,31 (1H, brs).

4-bromo-*N*-(4-fluorofenil)benzamida.



A una solución de 4-fluoroanilina (**III**) (0,85 ml, 9,00 mmol), trietilamina (1,88 ml, 13,5 mmol) y DMAP (0,11 g, 0,90 mmol) en THF (15 ml) se adicionó cloruro de 4-bromobenzoilo (**XX**) (2,37 g, 10,8 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h y a continuación se repartió entre EtOAc (100 ml) y ácido clorhídrico 1 M (100 ml). La fase orgánica se separó y lavó secuencialmente con ácido clorhídrico 1 M (100 ml), $NaHCO_3$ ac. sat. (100 ml) y salmuera (100 ml) y a continuación se secó y evaporó *in vacuo.* El residuo bruto se trituró de DCM caliente (100 ml) y la mezcla se calentó a reflujo para proporcionar una suspensión blanca que se permitió que enfriara a TA. El precipitado resultante se recolectó mediante filtración para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**XIX**), como un sólido blanco (1,81 g, 65 %); T^r 2,23 min; m/z 294/296 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 7,20 (2H, t), 7,74-7,79 (4H, m), 7,90 (2H, d) y 10,36 (1H, s).

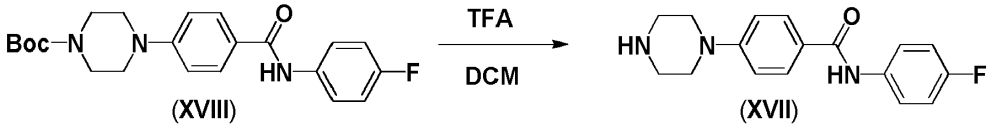
***terc*-Butil 4-(4-((4-fluorofenil)carbamoil)fenil)piperazina-1-carboxilato.**



Un matraz cargado con piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo (**XII**) (4,00 g, 215 mmol), producto intermedio (**XIX**) (6,63 g, 22,6 mmol), RuPhos (100 mg, 0,215 mmol) y RuPhos G3 (180 mg, 0,215 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno

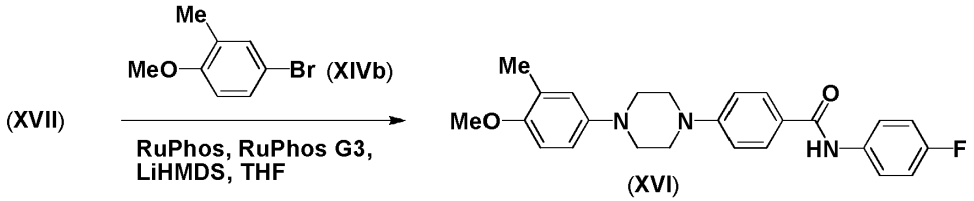
tres veces. Se adicionó una solución de LiHMDS (1 M en THF, 75,0 ml, 75,0 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 5 h. Después de enfriar a TA, la mezcla se repartió entre EtOAc (150 ml) y ácido clorhídrico 1 M (150 ml). Se separó y retuvo la fase orgánica y la fase ac. se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). Los orgánicos combinados se secaron y concentraron *in vacuo* para proporcionar un sólido marrón que se trituró en una mezcla de isohexanos y dietil éter (1:1, 100 ml). El producto así obtenido se recolectó mediante filtración, se lavó con una mezcla de isohexanos y dietil éter (1:1, 25 ml) y a continuación se secó *in vacuo* a 40 °C para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**XVIII**), como un sólido tostado (6,44 g, 85 %); T^r 2,40 min (Procedimiento a); m/z 400 $(M+H)^+$; ^1H RMN δ: 1,43 (9H, s), 3,27-3,30 (4H, m), 3,45-3,48 (4H, m), 7,03 (2H, d), 7,14-7,18 (2H, m), 7,74-7,79 (2H, m), 7,88 (2H, d), 9,99 (1H, s).

***N*-(4-fluorofenil)-4-(piperazin-1-il)benzamida.**



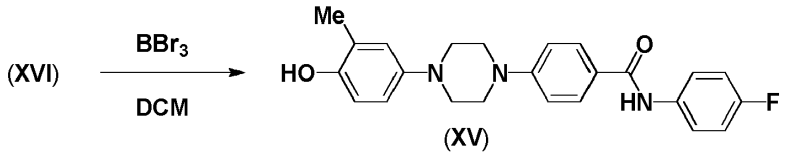
A una solución de producto intermedio (**XVIII**) (6,44 g, 16,1 mmol) en DCM (200 ml), se adicionó TFA (24,7 ml, 322 mmol). La reacción se agitó a TA durante 2 h y a continuación se evaporó *in vacuo.* Se adicionó tolueno (5,0 ml) y la mezcla se evaporó de nuevo *in vacuo.* El aceite resultante se recolectó en una mezcla de DCM (90 ml) y metanol (10 ml) y a continuación se extrajo con una mezcla de agua (50 ml) y $NaHCO_3$ ac. sat. (50 ml). Se separó y retuvo la fase orgánica y la capa ac. se extrajo con una mezcla de DCM y metanol (9:1, 3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron y concentraron *in vacuo* para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (XVII), como un sólido marrón (3,74 g, 70 %); T^r 1,02 min (Procedimiento a); m/z 300 $(M+H)^+$; ^1H RMN δ: 2,81-2,83 (4H, m), 3,18-3,20 (4H, m), 6,99 (2H, d), 7,14-7,18 (2H, m), 7,74-7,80 (2H, m), 7,85 (2H, d), 9,99 (1H, s).

***N*-(4-fluorofenil)-4-(4-(4-metoxi-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzamida.**



Un matraz cargado con 4-bromo-1-metoxi-2-metilbenceno (**XIVb**) (406 mg, 2,02 mmol), producto intermedio (XVII) (550 mg, 1,84 mmol), RuPhos (43 mg, 0,092 mmol) y RuPhos G3 (77 mg, 0,092 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces. Se adicionó una solución de LiHMDS (9,2 ml, 1 M en THF, 9,2 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 8 h. Después de enfriar a TA, la mezcla se enfrió rápidamente mediante la adición de ácido clorhídrico ac. 1 M (9,0 ml) y a continuación se repartió entre agua (15 ml) y EtOAc (15 ml). Se separó y retuvo la capa orgánica y la capa ac. se extrajo con EtOAc (2 x 15 ml). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (20 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo.* El producto bruto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 12 g, 0-100 % de EtOAc en isohexano, elución por gradiente) para proporcionar un sólido amarillo. Este material se repurificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 4 g, 0-10 % de EtOAc en DCM, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (XVI), como un sólido blanquecino (83 mg, 11 %); T^r 2,27 min (Procedimiento a); m/z 420 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,13 (3H, s), 3,13-3,16 (4H, m), 3,42-3,45 (4H, m), 3,72 (3H, s), 6,77-6,88 (3H, m), 7,08 (2H, d), 7,17 (2H, t), 7,75-7,80 (2H, m), 7,89 (2H, d), 10,02 (1H, s).

***N*-(4-fluorofenil)-4-(4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzamida.**

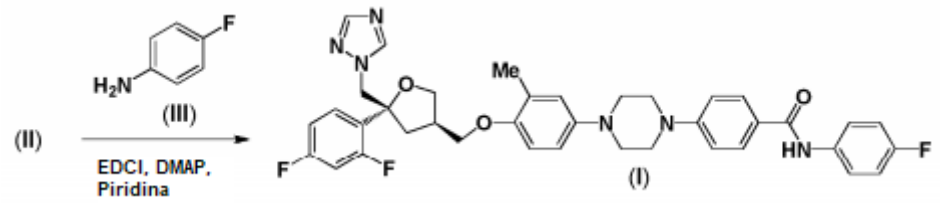


A una suspensión de producto intermedio (XVI) (83 mg, 0,20 mmol) en DCM (5,0 ml) a 0 °C se adicionó una solución de tribromuro de boro (0,59 ml, 1 M en DCM, 0,59 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min, se permitió que se calentara a TA durante 8 h y a continuación se repartió entre agua (15 ml) y DCM (10 ml). Se separó

y retuvo la capa orgánica y la capa ac. se extrajo con una mezcla de DCM y MeOH (90:10, 5 x 15 ml). Los orgánicos combinados se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 4,0 g, 0-3 % de MeOH en DCM, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, producto intermedio (**XV**), como un sólido beige (61 mg, 72 %); T^r 1,73 min (Procedimiento a); m/z 406 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,10 (3H, s), 3,08-3,11 (4H, m), 3,41-3,43 (4H, m), 6,67 (2H, br s), 6,77 (1H, br s), 7,07 (2H, d), 7,17 (2H, t), 7,76-7,80 (2H, m), 7,89 (2H, d), 8,73 (1H, s), 10,01 (1H, s).

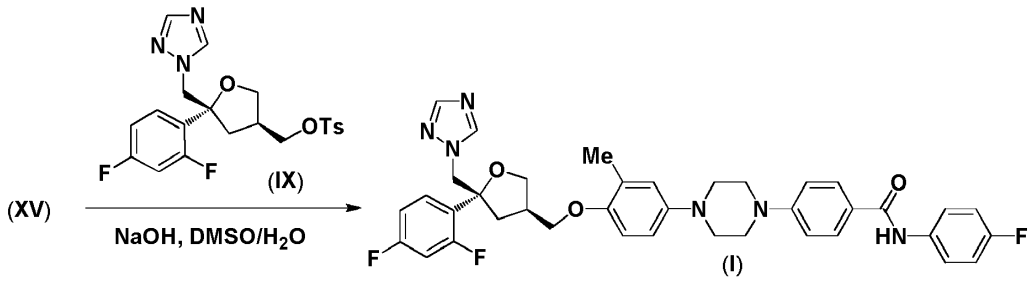
4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-*N*-(4-fluorofenil)benzamida.

1. Preparación del Compuesto (I) desde el producto intermedio de ácido benzoico (II).



A una suspensión de producto intermedio (**II**) (2,50 g, 4,24 mmol), EDCI (1,63 g, 8,48 mmol) y DMAP (30 mg, 0,21 mmol) en piridina (30 ml) se adicionó 4-fluoroanilina (0,41 ml, 4,3 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 2 h y a continuación se enfrió a TA. La dilución de la mezcla con agua (60 ml) y agitación durante 5 min produjo un sólido, que se recolectó mediante filtración y a continuación se lavó con agua (3 x 10 ml) y con dietil éter (2 x 15 ml) para proporcionar un polvo de color tostado. El producto bruto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 40 g, 0-3 % de MeOH en DCM, elución por gradiente) para proporcionar el Compuesto (**I**), como un sólido amarillo (2,47 g, 85 %); T^r 2,60 min (Procedimiento a); m/z 683 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,10 (3H, s), 2,15 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,53-2,58 (1H, m), 3,13-3,16 (4H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,76 (2H, br s), 6,86 (1H, br s), 6,99 (1H, td), 7,08 (2H, d), 7,16 (2H, t), 7,25-7,35 (2H, m), 7,76-7,80 (3H, m), 7,89 (2H, d), 8,34 (1H, s) y 10,00 (1H, s).

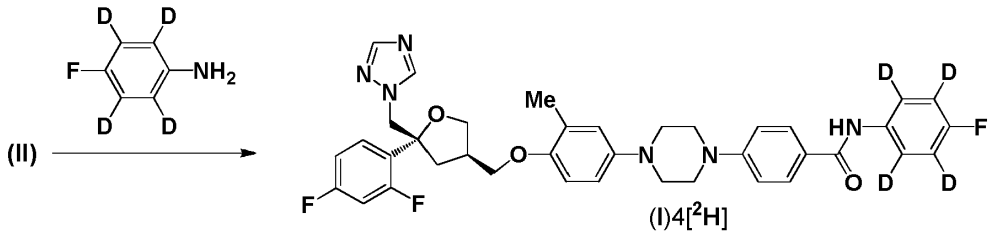
2. Preparación del Compuesto (I) desde el producto intermedio de fenol (XV).



A una solución de producto intermedio (**XV**) (19 mg, 0,047 mmol) en DMSO (1,5 ml) se adicionó hidróxido de sodio ac. (1 M, 98 µl, 0,098 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 10 min y a continuación se trató con una solución de tosilato (**IX**) (ex APIChem, número de catálogo: AC-8330, 23,2 mg, 0,052 mmol) en DMSO (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h, se enfrió a TA y se adicionó agua (10 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón. El producto bruto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 4 g, 0-2 % de MeOH en DCM, elución por gradiente) para proporcionar un sólido beis (23 mg). El producto se repurificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO_2, 4,0 g, 0-50 % de EtOAc en DCM, elución por gradiente) para dar el Compuesto (**I**), como un sólido blanquecino (14 mg, 42 %); T^r 2,60 min (Procedimiento a); m/z 683 $(M+H)^+$ (ES^+).

4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-*N*-(4-fluorofenil-2,3,5,6-d_4)benzamida.

Preparación de un derivado tetra-deuterio del Compuesto (I)



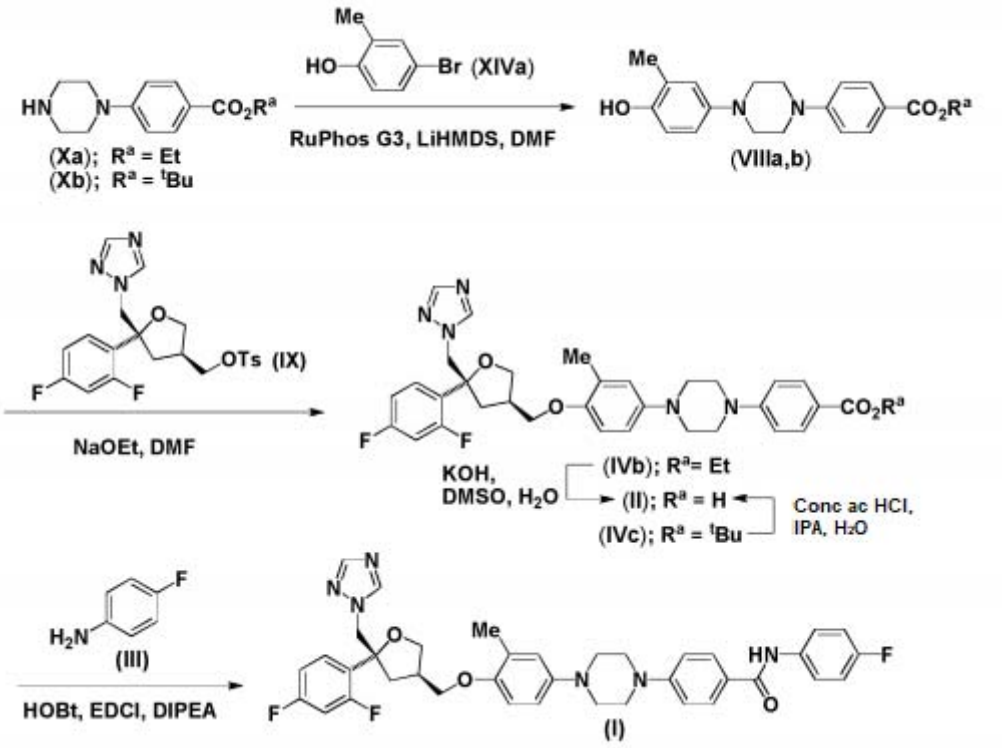
A una suspensión de producto intermedio (**II**) (200 mg, 0,34 mmol), EDCI (130 mg, 0,68 mmol) and DMAP (2,1 mg, 0,02 mmol) en piridina (1,5 ml) se adicionó una solución de 4-fluoroanilina-2,3,5,6-d_4 (43 mg, 0,37 mmol) en piridina (0,5 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta alcanzar la TA, se diluyó con agua (10 ml) y se agitó durante 5 min, lo que produjo un precipitado. El sólido se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (3 x 2,0 ml) y se tomó en una mezcla de DCM y MeOH (9:1, 5,0 ml). La mezcla se pasó a través de un separador de fases y la solución orgánica se evaporó *in vacuo* para dar un sólido de color (200 mg). El producto bruto así obtenido se purificó dos veces mediante una cromatografía en columna flash (SiO_2, 12 g, 0-2 % MeOH en DCM, elución de gradiente; SiO_2, 40 g, 0-2,5 % MeOH en DCM, elución de gradiente) para dar un polvo de color blanquecino.

El sólido se suspendió en DMSO (0,75 ml) y se calentó a 60 °C durante 5 min hasta completar la disolución. La solución resultante se enfrió hasta alcanzar la TA y se trató con agua (1,0 ml), lo que dio un precipitado. La suspensión se agitó a TA durante 20 min y el sólido se recolectó mediante filtración, se enjuagó con agua (3 x 0,5 ml) y se secó *in vacuo* a 50 °C o tres días) para dar el compuesto del título, (I) 4[^{2}**H**] como un sólido blanco (147 mg, 62 %); T^r 2.59 min (Procedimiento 1a); m/z 687 $(M+H)^+$ (ES^+); ^{1}H RMN δ: 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,60 (1H, m), 3,13-3,16 (4H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,76 (2H, br s), 6,86 (1H, br s), 7,00 (1H, td), 7,08 (2H, d), 7,25-7,35 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,89 (2H, d), 8,34 (1H, s) y 10,01 (1H, s).

Aumento progresivo de la preparación del Compuesto (I) a través de la vía 2

La metodología sintética antes descrita para la Vía 2, (**Esquema 1**), ha sido explotada exitosamente para preparar el compuesto de la presente invención en una escala de más de 1,0 kg de API (**Esquema 3**). Se han desarrollado dos variantes de la metodología en las que el benzoato de 4-piperazinilo [Producto intermedio (**VIII**)] comprende ya sea el éster de etilo (**VIIIa**) o el éster de *terc*-butilo (**VIIIb**) correspondiente. Estos dos compuestos pueden acoplarse con el tosilato (**IX**) para dar los precursores de éster correspondientes para el ácido benzoico (**II**). En el caso del éster de etilo, el ácido libre se obtiene mediante saponificación, mientras que el derivado de *terc*-butilo se desesterifica mediante acidólisis. Los procedimientos adoptados para esta campaña sintética se representan a continuación y se describen en esta invención.

Esquema 3: Aumento progresivo de la síntesis del Compuesto (I):



Procedimientos analíticos y espectroscópicos

Los procedimientos analíticos y espectroscópicos pertenecientes a esta sección experimental se establecen a continuación.

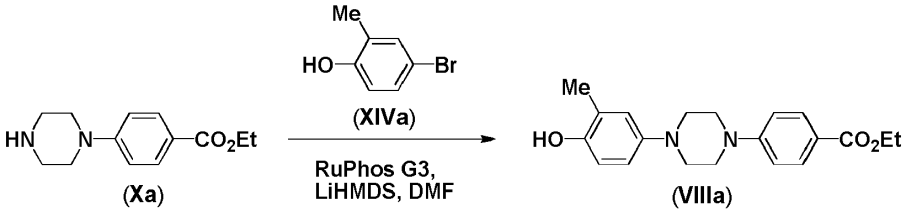
Condiciones de HPLC de fase inversa para el análisis LCMS:

Columna XBridge BEH Phenyl 4,6 x 150 mm; 2,5 µm (Ex. Waters #186006720) a 40 °C ; velocidad de flujo 1,0 ml.min^{-1} eluida con un gradiente de H_2O-MeCN purificado que contenía 0,1 % de ácido fórmico a lo largo de 25 min empleando detección UV a 300 nm. Volumen de inyección 5 µL. Información de gradiente: 0-2 min, mantenido al 95 % de H_2O-5 % de MeCN; 2-15 min, incrementado desde el 95 % de H_2O-5 % de MeCN al 10 % de H_2O-90 % de MeCN; 15-25 min, mantenido al 10 % de H_2O-90 % de MeCN.

Espectroscopía *^{1}H RMN:*

Los espectros de ^{1}H RMN se recolectaron usando un espectrómetro JOEL ECX 400 MHz. Se usó un solvente sin deuterar residual como referencia y, a menos que se especificase lo contrario, las muestras se ejecutaron en DMSO-d_6.

Etil 4-(4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



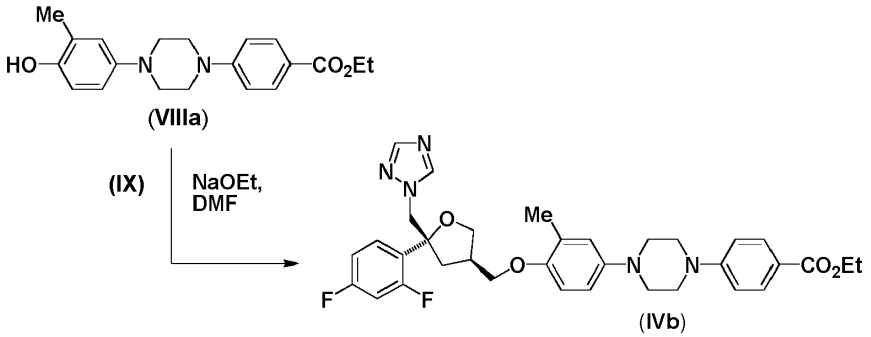
Una solución de etil 4-(1-piperazinil)benzoato (**Xa**) (500 g, 2,13 mol) y 4-bromo-2-metil fenol (479 g, 2,56 mol) en DMF anhídrido (5,0 L) se desgasificó mediante la colocación de la mezcla alternativamente al vacío y, a continuación, en una atmósfera de nitrógeno tres veces. La mezcla, a continuación, se trató con RuPhos G3 (35,7 g, 0,043 mol) y una solución de LiHMDS (1,0M en THF, 2560 ml, 2,56 mol), mientras que se mantuvo la temperatura interna por debajo

de 35 °C (enfriamiento de baño de agua). A continuación, se adicionó una solución de LiHMDS (1,0 M en THF) en catorce porciones iguales, en intervalos de dos minutos (14 x 213 ml, total 2,98 L, 2,98 mol) a 20-35 °C . La solución resultante se agitó a 18-25 °C durante 30 min, después de lo cual, el análisis por HPLC indicó que el 0,6 % del benzoato 4-(1-piperazinil) etílico permaneció, y la reacción se consideró como completa.

La mezcla de reacción se ajustó a un pH 7,6 mediante la adición de ácido hidroclórico 2M (5,50 L), mientras que se mantuvo la temperatura por debajo de 40 °C , después de lo cual, se adicionó EtOAc (3,00 l) y las fases resultantes se separaron. La fase ac. se extrajo con EtOAc (2 x 3,00 l y, a continuación, 2 x 2,00 l) y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera sat. (8 x 1,00 l), se secaron en $MgSO_4$ y, a continuación, se evaporaron *in vacuo* para dar un sólido oleoso marrón claro. El producto bruto se empastó en IPA (2,50 l) a 20-25 °C durante 30 min y el sólido resultante se recolectó mediante filtración. La torta de filtración se lavó con IPA (2 x 500 ml) y se tiró hasta secar, y los sólidos, a continuación, se secaron al vacío a 50 °C para proporcionar el compuesto del título, el producto intermedio (**VIIIa**), como un sólido tostado claro (380,0 g, 52 %, pureza de HPLC del 97,2 %); T^r 11,01 min; m/z 341,3 $(M+H)^+$ (ES^+).

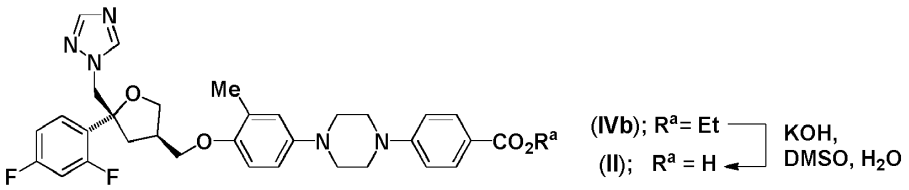
A fin de controlar el nivel de residuos de paladio, los productos de varios lotes se combinaron (1900 g, Pd residual 108 ppm), y se tomaron en THF (19,0 l) y se trataron con resina MP-TMT (250 g) a 18-25 °C . La mezcla se agitó a esta temperatura durante 24 h y la resina, a continuación, se eliminó mediante filtración y se lavó con THF (3,49 l). El filtrado se evaporó a sequedad *in vacuo* y el sólido resultante se empastó en IPA (4,75 l) a 18-25 °C durante 1 h y se recolectó mediante filtración. La torta de filtración se lavó con IPA (500 ml), se secó hasta secar y, a continuación, se secó *in vacuo* a 50 °C para dar el compuesto de título, el producto intermedio (**VIIIa**), como un sólido blanquecino (1789 g, 94 %, Pd residual de 17 ppm).

Etil 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)-tetrahidro furan-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.



A una solución de producto intermedio (**VIIIa**) (1780 g, 5,23 mol) en DMF anhídrido (17,8 L) a 15-25 °C se adicionó etóxido de sodio (391 g, 5,75 mol). Después de 45 min, el tosilato (**IX**) (2586 g, 5,75 mol) se adicionó en una porción y la agitación se continuó a 60-65 °C durante 5 h. El análisis mediante HPLC indicó que la reacción esencialmente se completó (1,67 % de material de partida restante). La mezcla se enfrió hasta 18-25 °C y la suspensión resultante se trató con agua (18,0 l), mientras se mantuvo la temperatura por debajo de 30 °C . Después del enfriamiento hasta 15 a 25 °C durante 45 min, el sólido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (2 x 7,14 l). La torta de filtración húmeda se empastó en etanol (8,92 l) a un reflujo durante 2 h y la mezcla, a continuación, se enfrió hasta 15-25 °C y se agitó durante 18 h. Los sólidos así obtenidos se recolectaron mediante filtración, se lavaron con etanol (2 x 1,78 l) y, a continuación, se secaron *in vacuo* a 50 °C para proporcionar el compuesto del título, el producto intermedio (**IVb**), como un sólido blanquecino (2855 g, 88 %, pureza de HPLC del 95,97 %); T^r 14,99 min; m/z 618,5 $(M+H)^+$ (ES^+).

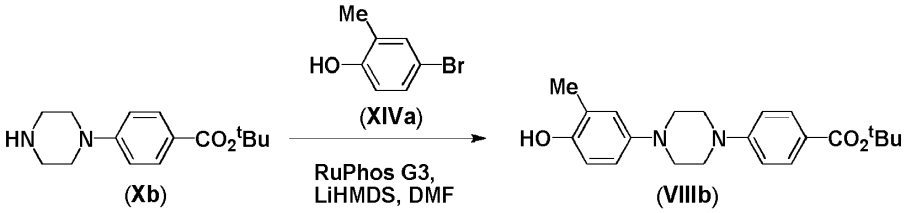
Monohidrocloruro de 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)-tetraidrofuran -3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)ácido benzoico.



A una suspensión de producto intermedio (**IVb**) (1467 g, 2,38 mol) en la mezcla de DMSO (1,45 l) y agua (5,90 l) a 18-

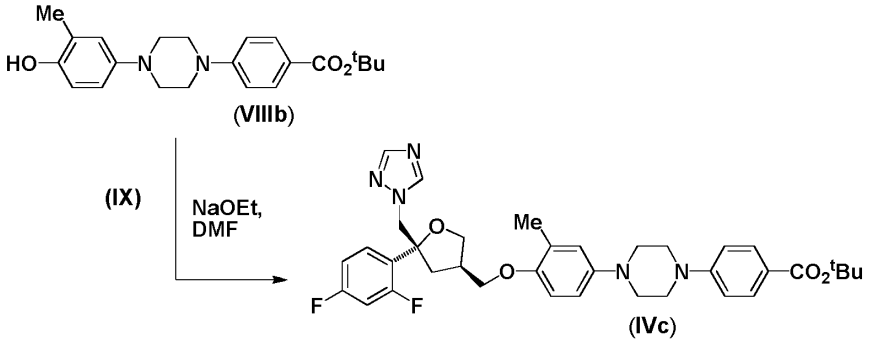
25 °C se adicionó un 50 % p/p de solución de KOH en agua (2,93 l). La suspensión se calentó a 90-95 °C durante 18 h, después de lo cual, el análisis HPLC indicó que la reacción había sido completada (0,16 % de remanente del material de partida, 97,9 % de producto). La mezcla de reacción se enfrió hasta 40-50 °C y se adicionó una mezcla de IPA (14,9 l) y agua (4,42 l). Después del enfriamiento hasta 15-25 °C , el pH se ajustó a 1-2 mediante la adición de ácido hidroclórico concentrado (3,12 L), mientras se mantuvo la temperatura interna debajo de 40 °C . La suspensión resultante se enfrió hasta 15-25 °C y los sólidos se recolectaron mediante filtración, se tiraron hasta secarlos y, a continuación, se empastaron en agua (7,40 l) a 90-95 °C durante 30 min. Después del enfriamiento hasta 15-25 °C , los sólidos se recolectaron mediante filtración, se lavaron con agua (2 x 1,48 L) y se tiraron hasta secarlos. Con el secado adicional *in vacuo* a 50 °C se obtuvo el compuesto del título, el producto intermedio (**II**), como un sólido blanco (1329 g, 89 %, pureza de HPLC del 99,0 %; contenido de cloro: 6,61 p/p % [teoría 5,66 p/p %]; T^r 12,92 min; m/z 590,4 $(M+H)^+$ (ES^+).

***terc*-butil 4-(4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.**



Una solución de *terc-butil* 4-(piperazin-1-il)benzoato (**Xb**) (100 g, 381 mmol) y 4-bromo-2-metilfenol (85,5 g, 457 mmol) en DMF anhídrido (1,00 l) se desgasificó colocando la mezcla de manera alterna al vacío y, a continuación, en una atmósfera de nitrógeno tres veces. Después de este procedimiento, se adicionó RuPhos G3 (6,38 g, 7,62 mmol) a 15-25 °C seguido de una solución de LiHMDS en THF (1,06 M, 432, ml, 457 mmol) durante 5 min, mientras que se mantuvo la temperatura dentro de 15-30 °C , (enfriamiento de baño de agua). Después de agitar durante 5 min, alícuotas adicionales de la solución de LiHMDS (1,06 M en THF) se adicionaron a la mezcla de reacción en catorce porciones iguales (14 x 36 ml, total 504 ml, 533 mmol) en intervalos de 2 min, lo que resultó en una emisión de calor de 16 a 21 °C . La reacción se agitó a 15-25 °C durante la noche (en cuyo punto la HPLC mostró la formación del 72, % del producto deseado) y el pH de la mezcla se ajustó a 7,3 mediante la adición de ácido hidroclórico 2M (~900 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo de manera repetida con EtOAc (1,0 l, 500 ml y 2 x 250 ml). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (6 x 400 ml), se secaron en $MgSO_4$ y se concentraron *in vacuo* para dar un sólido amarillo pegajoso. El sólido así obtenido se suspendió en IPA (500 ml) y se agitó a 15-25 °C durante 1 h. La suspensión se filtró y la torta de filtración se lavó con IPA (250 ml, 200 ml) y se tiró hasta secar. El secado adicional del producto *in vacuo* a 50 °C proporcionó el compuesto del título, el producto intermedio (**VIIIb**) como un sólido blanquecino (105,6 g, 75 %, pureza de HPLC del 97,1 %); T^r 12,23 min; m/z 369.3 $(M+H)^+$ (ES^+)

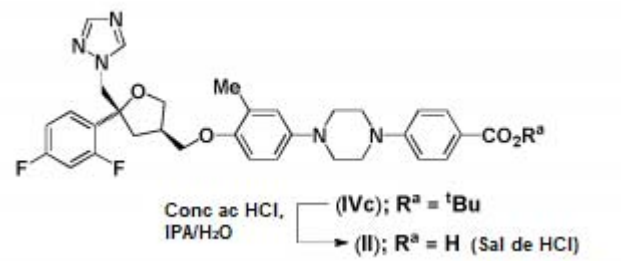
***terc*-butil 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)-tetra hidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoato.**



A una solución de producto intermedio (**VIIIb**) (100 g, 271 mmol) en DMF (500 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno, se adicionó etóxido de sodio (22,2 g, 325 mmol), lo que resultó en una leve emisión de calor (de 20 a 22,0 °C). Después de agitar a 15-25 °C durante 45 min, la mezcla de reacción se trató con el tosilato (IX) (146,4 g, 325 mmol) y, a continuación, se calentó a 60-65 °C durante 2 h. El análisis de la mezcla resultante mediante HPLC indicó que la reacción había sido esencialmente completada (remanente de 4,4 % de fenol, 14,6 % de tosilato, 77,6 % de producto) y la mezcla se enfrió hasta 40-45 °C y se adicionó IPA (800 ml). A continuación, se adicionó agua gota a gota a 40-45 °C hasta que una ligera turbidez persistió (se requirieron 500 ml), punto en el cual una pequeña muestra del

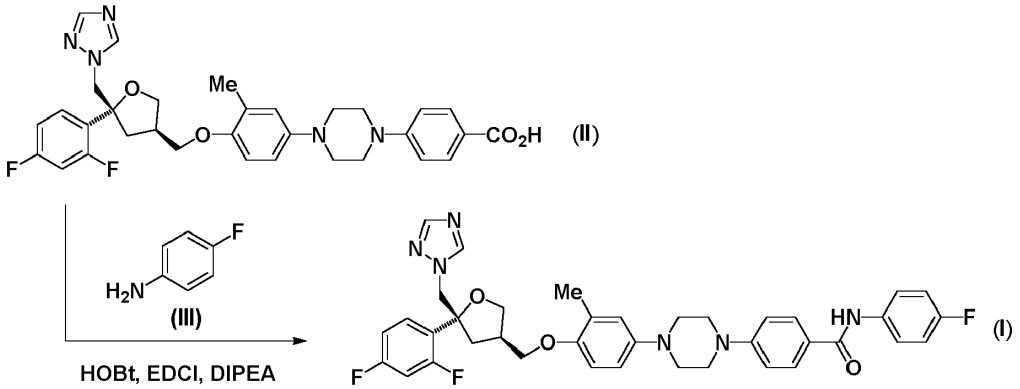
producto (100 mg, 0,15 mmol) se adicionó como una semilla y la mezcla se agitó durante 10 min a 40-45 °C para asegurar el inicio de la precipitación. Se adicionó agua (500 ml) gota a gota a 40-45 °C y la suspensión, a continuación, se enfrió hasta 15 a 25 °C . El sólido resultante se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (3 x 200 ml) y, a continuación, se secó *in vacuo* a 50 °C para dar el producto bruto como un sólido blanquecino (155,9 g, 89 %, pureza de HPLC del 94,8 %). Una porción de este material (85,0 g) se tomó en IPA (510 ml) mediante un calentamiento a 65-75 °C hasta completar la disolución. A continuación, la solución se enfrió a 15-25 °C y se agitó durante 30 min. El sólido resultante se recolectó mediante filtración, se lavó con IPA (2 x 85 ml) y se secó *in vacuo* a 50 °C para dar el compuesto del título, el producto intermedio (**IVc**) como un sólido blanco (83,4 g, 87 % de rendimiento general, pureza de HPLC del 98,2 %); T^r 15,74 min; m/z 646,6 $(M+H)^+$ (ES^+)

Monohidrocloruro de 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)-tetraidrofuran -3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)ácido benzoico.



A una suspensión del *terc*-butil benzoato (**IVc**) (83,4 g, 129 mmol) en una mezcla de agua (250 ml) e IPA (417 ml) se adicionó una solución de ácido hidroclórico conc. (167 ml) en agua (167 ml), mientras que se mantuvo la temperatura interna por debajo de 35 °C . A continuación, la solución resultante se mantuvo a 35 °C durante 24 h (al cabo de 2-3 h se observó la formación de sólidos), punto en el que el análisis de HPLC indicó que la reacción había sido esencialmente completada (con un remanente del 0,6 % de éster, 98,1 % de producto). La mezcla se enfrió hasta 15-25 °C , se adicionó IPA (417 ml) y el pH se ajustó -10 mediante la adición de NaOH ac (10 M, 200 ml) a < 40 °C para dar una solución. A continuación, se reajustó el pH a 1-2 mediante la adición de ácido hidroclórico conc. (25 ml) a < 40 °C . La suspensión resultante se enfrió hasta 15 a 25 °C y los sólidos se recolectaron mediante filtración. La torta de filtración se resuspendió en agua (834 ml), se calentó a 80-85 °C y, a continuación, se agitó durante 30 min. A continuación, la suspensión se enfrió hasta 15-25 °C y los sólidos se recolectaron mediante filtración, se lavaron con agua (2 x 83 ml) y se secaron *in vacuo* a 50 °C para proporcionar el compuesto del título, el producto intermedio (**II**), (como la sal de monohidrocloruro) como un sólido blanco (64,6 g, 80 %, pureza de HPLC del 97,6 %); T^r 12,92 min; m/z 590,4 $(M+H)^+$ (ES^+).

4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)-tetrahidrofuran -3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida.



A una suspensión agitada de ácido benzoico (**II**) como su sal de monohidrocloruro (1001 g, 1,60 mol) y HOBt.H_2O (216, g, 1,41 mol) en DMF (5020 ml) a < 40 °C se adicionó DIPEA (840 ml, 4,823 mol), seguido de 4-fluoroanilina (181 ml, 1,91 mol) y, a continuación, EDCI.HCl (368 g, 1,92 mol). La mezcla se calentó a 60-65 °C durante 17 h, después de lo cual, el análisis HPLC indicó que la reacción había sido completada (no se detectó ningún material de partida ni producto intermedio de reacción, 82,63 % del producto). La solución resultante se enfrió a 15-25 °C y se templó con agua (15,2 l) a < 35 °C , a continuación, se enfrió nuevamente hasta 15-25 °C y se agitó durante 1 h. El sólido resultante

se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (2 x 2,00 l) y se lo tiró hasta secarlo. La torta de filtración se volvió a empastar en agua (5,00 l) a 15-25 °C durante 45 min y los sólidos se recolectaron mediante filtración, se lavaron con agua (2 x 2,00 l) y se secaron in vacuo para dar el compuesto del título, el Compuesto (**I**), como un sólido blanquecino (1101 g, -100 %, pureza de HPLC 95,8 %); T^r 14,46 min; m/z 683.5 $(M+H)^+$ (ES^+); ^1H RMN δ: 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,50-2,58 (1H, m), 3,13-3,15 (4H, m), 3,41-3,44 (4H, m), 3,67 (1H, dd), 3,74-3,78 (2H, m), 4,05 (1H, t), 4,55 (1H, d), 4,61 (1H, d), 6,76 (2H, s), 6,86 (1H, s), 7,00 (1H, d,t), 7,08 (2H, d), 7,17 (2H, t), 7,26-7,35 (2H, m), 7,76-7,80 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,89 (2H, d), 8,35 (1H, s) y 10,02 (1H. S).

Ensayos biológicos: procedimientos experimentales

Evaluación del crecimiento de hongos planctónicos

a. Ensayo *de microtitulación de resazurina*

Este ensayo se efectuó usando un procedimiento modificado y publicado **(Monteiro** *y col.*, 2012). Se cultivaron esporas de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010, Public Health England, Wiltshire) en agar dextrosa Sabouraud durante 3 días. Se preparó una suspensión madre de esporas a partir de un cultivo de agar dextrosa Sabouraud lavando con PBS-tween (10 ml; PBS que contiene 0,05 % de Tween-20, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina). El recuento de esporas se evaluó usando un hemocitómetro Neubauer y usando PBS ajustado a 10^6 esporas/ml. Se preparó una suspensión de trabajo de esporas (10^4 esporas/ml) en MOPS RPMI-1640 esterilizado con filtro (50 ml; RPMI-1640 que contiene L-glutamina 2 mM, 2 % de glucosa y MOPS 0,165 M, tamponado a pH 7 con NaOH). Se adicionó sal sódica de resazurina (100 µl de solución a 1 %; Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) a la suspensión de esporas y se mezcló bien. Se adicionó la mezcla de suspensión de esporas-resazurina (100 µl/pocillo) a placas de 384 pocillos (No. de catálogo 353962, BD Falcon, Oxford, Reino Unido). Simultáneamente, se adicionaron los compuestos de ensayo (solución de DMSO de 0,5 µl) a 100 µl de la mezcla de esporas-resazurina por cuadruplicado para proporcionar una solución final de DMSO de 0,5 % usando un Integra VIAFLO 96 de Integra (Integra, Zizers, Suiza). Para los pocillos de control sin esporas, se adicionó solución de MOPS-RPMI-resazurina (100 µl) en lugar de la mezcla de esporas-resazurina. La placa se cubrió con una membrana Breathe Easier (No. de catálogo Z763624, Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) y se incubó (35 °C , 5 % de CO_2) hasta que la fluorescencia en los pocillos inoculados fue el doble de la de los pocillos de control (alrededor de 24 h). La fluorescencia de cada pocillo (545 nm (excitación)/590 nm (emisión), ganancia 800, altura focal 5,5 mm) se determinó usando un multiescáner (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, Reino Unido). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calcularon los valores CMI_{50}, CMI_{75} y CMI_{90} a partir de la curva de concentración-respuesta generada para cada compuesto de ensayo.

b. Ensayo *de microdilución en caldo*

Este ensayo se efectuó usando un procedimiento modificado publicado por EUCAST (**Rodriguez-Tudela** *y col.,* 2008). Se cultivaron esporas de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010, NCPF7010 (mutación 220 de metionina), NCPF7099 (mutación G54 de glicina) de Public Health England, Wiltshire; mutantes TR34/L98H del St Louis Hospital, París, Francia) en agar dextrosa Sabouraud durante 3 días. Se preparó una suspensión madre de esporas a partir de un cultivo de agar dextrosa Sabouraud lavando con PBS-tween (10 ml; PBS que contiene 0,05 % de Tween-20, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina). El recuento de esporas se evaluó usando un hemocitómetro Neubauer y a continuación se ajustó a 10^6 esporas/ml con PBS. Se preparó una suspensión de trabajo de esporas (2 x 10^5 esporas/ml) en BSA MOPS RPMI-1640 (50 ml; RPMI-1640 que contiene L-glutamina 2 mM, 0,5 % de BSA, 2 % de glucosa, MOPS 0,165 M, tamponado a pH 7 con NaOH) esterilizado con filtro. Para el ensayo, primero se adicionó BSA MOPS RPMI-1640 (50 µl/pocillo) en toda la placa de 384 pocillos (número de catálogo 353962, BD Falcon, Oxford, Reino Unido). Los compuestos de prueba (solución de DMSO de 0,5 µl) se adicionaron, a continuación, por cuadruplicado usando un VIAFLO 96 de Integra (Integra, Zizers, Suiza) y se mezclaron bien usando un mezclador de placas. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de la suspensión de trabajo de esporas preparada anteriormente a todos los pocillos excepto a los pocillos de control sin esporas. Para los pocillos de control sin esporas, se adicionó en su lugar solución de BSA MOPS-RPMI (50 µl/pocillo). La placa se cubrió con una tapa de plástico y se incubó (35 °C con aire ambiente) durante 48 h. La DO de cada pocillo a 530 nm se determinó usando un multiescáner (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, Reino Unido). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calcularon los valores CMI_{50}, CMI_{75} y CMI_{90} a partir de la curva de concentración-respuesta generada para cada compuesto de ensayo.

El cribado del panel de hongos fue realizado por Eurofins Panlabs Inc. Los valores CMI y CMI_{50} de los artículos de ensayo se determinaron siguiendo las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute, procedimientos de microdilución en caldo para levaduras (CLSI M27-A2), (**CLSI**, 2002) y para hongos filamentosos (CLSI M38-A), (**CLSI**, 2008).

Infección con Aspergillus fumigatus de células epiteliales bronquiales

Se sembraron células BEAS2B en placas de 96 pocillos (100 µl; 30 000 células/pocillo; No. de catálogo 3596, Sigma Aldrich, Dorset, Reino Unido) en 10 % de FBS RPMI-1640 y a continuación se incubaron (37 °C , 5 % de CO_2) durante un día antes de la experimentación. Se adicionaron los compuestos de ensayo (solución de DMSO de 0,5 µl) o vehículo (DMSO) a cada pocillo para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5 %. Las células BEAS2B se incubaron con los compuestos de ensayo durante 1 h (35 °C , 5 % de CO_2) antes de la infección con suspensión de conidios (0,5 x 10^5/ml en 10 % de FBS RPMI-1640) de *Aspergillus fumigatus* (20 µl; Public Health England). La placa se incubó durante 24 h (35 °C , 5 % de CO_2). El sobrenadante (50 µl) se recolectó y se transfirió a una placa de PCR (No. de catálogo L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, Reino Unido), que se congeló (-20 °C) hasta su uso. Después de descongelar, el sobrenadante (5 µl) se diluyó 1:20 adicionando solución de R7-PBS (95 µl; R7 a PBS 1:4; Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). Los niveles de GM en estas muestras (50 µl) se midieron usando kits de Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calculó el valor CI_{50} a partir de la curva de concentración-respuesta generada para cada compuesto de ensayo.

Infección con Aspergillus fumigatus de bicapas de alvéolos humanos

Los modelos *in vitro* de alvéolos humanos, que consisten en una bicapa de células epiteliales y células endoteliales alveolares humanas, como se describió anteriormente (**Hope** *y col.,* 2007). Este sistema permite la administración de un compuesto de ensayo a los compartimentos superior (espacio "aire") y/o inferior (espacio "sistémico"). Esta flexibilidad se ha aprovechado para explorar los efectos de los tratamientos combinados administrando el Compuesto (I) de compuesto a la cámara superior y posaconazol u otros agentes antifúngicos a la cámara inferior. Se cosecharon células endoteliales de arteria pulmonar humana primarias (HPAEC) y se diluyeron a 10^6 células/ml en medio EGM-2 (Lonza, Basilea, Suiza). Se invirtieron los transpocillos y se aplicó la suspensión de células (100 µl/pocillo) a la base de cada transpocillo. Los transpocillos invertidos se incubaron a TA dentro de una campana de flujo durante 2 h, después de lo cual se giraron a la posición vertical. Se adicionó medio EGM-2 a los compartimientos inferior (700 µl/pocillo) y superior (100 µl/pocillo) y se incubaron los transpocillos durante 48 h (37 °C , 5 % de CO_2). El medio EGM-2 del compartimiento inferior se sustituyó a continuación por medio EGM-2 fresco. Las células A549 se cosecharon y diluyeron a 5 x 10^5 células/ml en 10 % de EBM, a continuación, se adicionaron al compartimiento superior (100 µl/pocillo) de todos los transpocillos y se incubaron las placas durante 72 h (37 °C , 5 % de CO_2). Se cultivaron conidios de *Aspergillus fumigatus* (la cepa sensible a itraconazol NCPF2010 y la cepa resistente a itraconazol TR34-L98H) por separado en agar dextrosa Sabouraud durante 3 días. Se preparó una suspensión madre de conidios de cualquiera de las cepas a partir de un cultivo de agar dextrosa Sabouraud lavando con PBS-tween (10 ml; PBS que contiene 0,05 % de Tween-20, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina). El recuento de conidios se evaluó utilizando un hemocitómetro Neubauer y se ajustó a 10^6 conidios/ml con PBS. Se preparó una solución madre de trabajo de conidios en EBM (conc. de 10^5 conidios/ml) inmediatamente antes de su uso.

Se adicionaron los compuestos de ensayo y de referencia (o DMSO puro como vehículo) a los pocillos apropiados de placas de 24 pocillos (3 µl/pocillo que contenían 600 µl de FBS EBM a 2 %) para el tratamiento del compartimiento inferior y a placas de 96 pocillos (1 µl/pocillo que contenía 200 µl de FBS EMB a 2 %) para el tratamiento del compartimiento superior, para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5 %. Se aspiró el medio del compartimiento superior y se adicionaron los que contenían los compuestos de ensayo y de referencia apropiados, o vehículo, (100 µl/pocillo). Los transpocillos se transfirieron a continuación a la placa de 24 pocillos que contenía los compuestos de ensayo y de referencia o vehículo de DMSO. Después de la incubación durante 1 h (35 °C , 5 % de CO_2), se adicionó la suspensión de conidios (10 µl/pocillo) al compartimiento superior de cada transpocillo. Las placas se incubaron a continuación durante 24 h (35 °C , 5 % de CO_2). Los sobrenadantes de cada compartimiento (5 µl/compartimento) se recolectaron y almacenaron (-20 °C). El medio se sustituyó diariamente después de recolectar los sobrenadantes y se trataron todos los pocillos con los compuestos de ensayo y de referencia o con DMSO, como se describió anteriormente, durante 3 días. Se siguieron recolectando muestras hasta que el crecimiento fúngico fue visible a simple vista en todos los transpocillos. Los niveles de GM en el sobrenadante del compartimiento inferior se midieron a continuación mediante ELISA (BioRad, CA, EE.UU.) como un índice de la invasión de *Aspergillus fumigatus*.

Viabilidad celular: ensayo de resazurina

Las células BEAS2B se sembraron en placas de 384 pocillos (100 µl; 3000/pocillo; BD Falcon, No. de catálogo 353962) en RPMI-LHC8 (medio RPMI-1640 y LHC8 combinado en proporciones iguales) un día antes de la experimentación. Para los pocillos de control exentos de células, se adicionó RPMI-LHC8 (100 µl). Se adicionaron los compuestos de ensayo (0,5 µl de una solución de DMSO) para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5 % usando un VIAFLO 96 de Integra (Integra, Zizers, Suiza). Se incubaron células BEAS2B con cada compuesto de ensayo durante 1 día (37 °C /5 % de CO_2 en RPMI-LHC8). Después de la adición de solución madre de resazurina (5 µl, 0,04 %), las placas se incubaron durante 4 h adicionales ((37 °C /5 % de CO_2). La fluorescencia de cada pocillo a 545 nm (excitación) y 590 nm (emisión) se determinó usando un multiescáner (Clariostar: BMG Labtech). El porcentaje de pérdida de viabilidad celular se calculó para cada pocillo con respecto al tratamiento con vehículo (0,5 % de DMSO).

Cuando procedía, se calculó un valor CC_{50} a partir de la curva de concentración-respuesta generada a partir de la curva de concentración-respuesta para cada compuesto de ensayo.

Actividad antifúngica in vivo

Aspergillus fumigatus (ATCC 13073 [cepa: NIH 5233], American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) en placas de agar de Malta (Nissui Pharmaceutical, Tokio, Japón) durante 6-7 días a TA (24 ± 1 °C). Las esporas se desprendieron asépticamente de las placas de agar y se suspendieron en agua destilada estéril con 0,05 % de Tween 80 y 0,1 % de agar. El día de la infección, se evaluaron los recuentos de esporas mediante hemocitómetro y se ajustó el inóculo para obtener una concentración de $1,67 \times 10^8$ esporas ml^{-1} de solución salina fisiológica.

Para inducir la inmunosupresión y neutropenia, se administró a ratones A/J (machos, 5 semanas de edad) hidrocortisona (Sigma H4881; 125 mg/kg, sc,) en los días 3, 2 y 1 antes de la infección, y ciclofosfamida (Sigma C0768; 250 mg/kg, ip) 2 días antes de la infección. El día 0, los animales se infectaron con la suspensión de esporas (35 µl intranasalmente).

Los compuestos de ensayo se administraron intranasalmente (35 µl de una suspensión de 0,08-2,00 mg/ml en solución salina fisiológica) una vez al día, 30 minutos antes de la infección en el día 0 y a continuación en los días 1, 2 y 3 (lo que representa el tratamiento profiláctico) o solo en los días 1, 2 y 3 (lo que representa el tratamiento terapéutico). Para el tratamiento profiláctico prolongado, los compuestos de ensayo (35 µl de una suspensión de 0,0032 o 0,016 mg/ml en solución salina fisiológica) se administraron intranasalmente una vez al día durante siete días; a continuación 30 min antes de la infección en el día 0 y, posteriormente, indistintamente en los días 1, 2 y 3 después de la infección, o solo en el día 0. Los efectos de estos paradigmas de tratamiento se compararon con los obtenidos cuando el tratamiento se limitó a un día y 30 minutos antes de la inoculación y a continuación en los días 1, 2 y 3 posinfección; o se redujo aún más a solo un día y 30 minutos antes de la infección. Los pesos corporales de los animales se monitorizaron diariamente y los que presentaron una reducción ≥ 20 %, en comparación con su peso corporal en el día 0, se sacrificaron.

Seis horas después de la última dosis, los animales se anestesiaron, se canuló la tráquea y se recolectó el BALF. El número total de células alveolares se determinó utilizando un hemocitómetro, y los números de macrófagos y neutrófilos alveolares se determinaron mediante análisis por FACS (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) usando MOMA2-FITC antirratón (macrófago) o 7/4 antirratón (neutrófilo), respectivamente, como se describió anteriormente (**Kimura** *y col.,* 2013). Los niveles de IFN-γ e IL-17 en BALF, y de IL-6 y TNFα en suero se determinaron usando el kit de ELISA de IFN-γ, IL-17, IL-6 o TNF-α de ratón Quantikine® (R&D systems, Inc., Mineápolis, MN, EE.UU.), respectivamente. El MDA, un marcador del estrés oxidativo, se ensayó usando kits de ensayo OxiSelect® TBARS (cuantificación de MDA; Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, EE.UU.). El GM de Aspergillus en suero se determinó usando kits de Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). El índice de corte se calculó mediante la fórmula: Índice de corte = DO en la muestra /DO en el control de corte proporcionado en el kit. Para los ensayos de carga fúngica tisular, se eliminaron asépticamente 100 mg de tejido pulmonar y se homogeneizaron en 0,2 ml de agar a 0,1 % en agua destilada estéril. Los homogenatos pulmonares diluidos en serie se emplacaron en placas de agar de malta (50 µL/placa) y se incubaron a 24±1 °C durante 72 a 96 h. Se contaron las colonias de *A. fumigatus* en cada placa y la concentración fúngica se presentó como UFC por gramo de tejido pulmonar.

Se usaron ratones A/J neutropénicos gravemente inmunodeprimidos (machos, 5 semanas de edad) a los que se había administrado hidrocortisona (Sigma H4881; 125 mg/kg, sc,) diariamente durante tres días antes de la infección y ciclofosfamida (Sigma C0768; 250 mg/kg, ip) dos días antes de la infección para evaluar los efectos del tratamiento combinado del Compuesto (**I**) administrado intranasalmente y posaconazol administrado oralmente. El día 0, los animales se infectaron intranasalmente con 35 µl de la suspensión de esporas ($1,67 \times 10^8$ esporas/ml en solución salina fisiológica) de *Aspergillus fumigatus* (ATCC 13073 [cepa: NIH 5233]). El Compuesto (**I**), preparado como una suspensión en solución salina isotónica (0,4 mg/ml), se administró una vez al día mediante una inyección intranasal (35 µl/ratón) en los días 1-6 después de la infección. El posaconazol (1 mg/kg) se administró oralmente una vez al día en los días 1-6 después de la infección. El peso corporal y la supervivencia se monitorizaron diariamente hasta el día 7.

Resumen de los resultados del cribado

El Compuesto (**I**) demuestra una potente actividad inhibidora contra el crecimiento fúngico tanto del *Aspergillus fumigatus* sensible al azol, según lo evaluado por el ensayo de resazurina, como de la infección fúngica de las células epiteliales bronquiales (**Tabla 2**). En estos sistemas de ensayo, el Compuesto (**I**) mostró una potencia significativamente mayor que el voriconazol y la anfotericina B y una potencia similar al posaconazol. La incubación con el Compuesto (**I**) no tuvo, o tuvo poco, efecto sobre la viabilidad de las células epiteliales bronquiales BEAS2B en

concentraciones de hasta, al menos, 10 μM.

Tabla 2 Efectos del tratamiento con voriconazol, posaconazol, anfotericina B y el Compuesto (**I**) sobre el crecimiento fúngico planctónico de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010), sobre la infección fúngica de células epiteliales bronquiales BEAS2B y sobre la viabilidad de las células BEAS2B.

	Valores CMI_{50}/CMI_{75}/CC_{50} en el sistema de ensayo indicado (nM)			
Tratamiento (compuesto de prueba)	**Crecimiento fúngico planctónico[1]**		**Infección de células BEAS2B[2]**	**Viabilidad celular de BEAS2B[3]**
	CMI_{50}	**CMI_{75}**	**CMI_{50}**	**CC_{50}**
Voriconazol	90,8	168	154	> 28600
Posaconazol	3,64	6,94	4,48	> 14300
Anfotericina B	28,5	64,4	ne	977
Compuesto (I)	1,98	5,02	5,43	> 12200
Compuesto (I).4[^{2}H]	ne	ne	3,15	> 14600

Notas al pie de la tabla: 1. Ensayo de microtitulación de resazurina; **2.** Células epiteliales bronquiales; **3.** n = 1 a 5;

El Compuesto (**I**) además presenta una actividad inhibidora potente contra el crecimiento fúngico planctónico como se evalúa en un ensayo de microdilución en caldo (**Tabla 3**). En este ensayo, el Compuesto (**I**) mostró una potencia significativamente mayor *frente a* las cepas resistentes al posaconazol (NCPF7099, NCPF7100 y TR34/L98H) y a una cepa sensible al posaconazol (NCPF2010), que el posaconazol, el voriconazol y la anfotericina B.

Tabla 3 Efectos del tratamiento con voriconazol, posaconazol, anfotericina B y el Compuesto (I) sobre el crecimiento fúngico planctónico de aislados de *Aspergillus fumigatus.*

Tratamiento (compuesto de prueba)	**Valores CMI_{75} (nM) contra las cepas clínicas de *Aspergillus fumigatus* indicadas[1]**			
	NCPF2010	**NCPF7099**	**NCPF7100**	**L98H**
Voriconazol	496	96,7	596	> 2860
Posaconazol	15,3	112	71,5	150
Anfotericina B	382	365	> 1080	209
Compuesto (I)	13,6	16,5	19,7	56,7
Compuesto (I).4[^{2}H]	14,7	13,7	28,6	70,0

Notas al pie de la tabla: 1. Ensayo de microdilución en caldo, n = 1-3

Los efectos del Compuesto (**I**) sobre el crecimiento de un amplio abanico de patógenos fúngicos se evaluaron usando los procedimientos de microdilución en caldo del CLSI. Se halló que el Compuesto (**I**) es un potente inhibidor del crecimiento de *Rhizopus oryzae, Cryptococcus neoformans, Chaectomimum globosum, Penicillium chrysogenum* y *Trichophyton rubrum*, así como de algunas *Candida* spp. (**Tabla 4**).

Tabla 4 Efectos del Compuesto (**I**) sobre el crecimiento de un intervalo de especies fúngicas.

		Compuesto (I)		**Voriconazol**		**Posaconazol**	
Agente fúngico	**Cepa**	**CMI_{50}**	**CMI_{100}**	**CMI_{50}**	**CMI_{100}**	**CMI_{50}**	**CMI_{100}**
		(μg/ml)		(μg/ml)		(μg/ml)	
Aspergillus flavus	ATCC204304	1,0	> 8,0	1,0	2,0	0,063	0,13
Aspergillus pullulans	ATCC9348	> 8,0	> 8,0	> 8,0	> 8,0	0,25	1,0
Candida albicans	20240,047	0,031	> 8,0	0,031	> 8,0	0,031	> 8,0
	ATCC10231	0,13	> 8,0	0,25	> 8,0	0,13	> 8,0

	20183,073	0,5	> 8,0	4,0	> 8,0	0,25	> 8,0
	20186,025	> 8,0	> 8,0	> 8,0	> 8,0	> 8,0	> 8,0
Candida glabrata	ATCC36583	0,5	> 8,0	0,25	> 8,0	0,5	> 8,0
	R363	0,5	> 8,0	> 8,0	> 8,0	0,5	> 8,0
Rhizopus oryzae	ATCC11145	0,063	2,0	8,0	> 8,0	0,13	> 8,0
Cryptococcus neoformans	ATCC24067	0,008	1,0	0,016	1,0	0,016	0,25
Chaetomium globosum	ATCC44699	0,063	> 8,0	0,5	1,0	0,13	0,25
Penicillium chrysogenum	ATCC9480	0,031	> 8,0	1,0	2,0	0,063	0,13
Trichophyton rubrum	ATCC10218	< 0,008	0,031	< 0,008	0,063	< 0,008	0,031

Notas al pie de la tabla: CMI_{50}/CMI_{100}= concentración requerida para la inhibición de 50 % y 100 % del crecimiento fúngico mediante inspección visual (CLSI).

La monoterapia indistintamente con el Compuesto (**I**) (0,1 µg/ml en la cámara superior) o posaconazol (0,01 µg/ml en la cámara inferior) inhibió la producción de GM en el día 1 en bicapas de alvéolos humanos. Sin embargo, los efectos inhibidores de estos tratamientos se perdieron rápidamente después (**Tabla 5**). Por el contrario, el tratamiento combinado del Compuesto (**I**) con posaconazol presentó una inhibición sostenida de la invasión posinfección. Por consiguiente, DFB_{50} para el tratamiento combinado fue 5,48 días, mucho más largo que los valores para cualquiera de los compuestos solos. Este efecto sinérgico o aditivo de la terapia combinada también se confirmó cuando el tratamiento con el Compuesto (**I**) se combinó con el de intraconazol, voriconazol o caspofungina (resultados no presentados).

Tabla 5 Efectos del Compuesto (**I**), el posaconazol y el tratamiento combinado sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010) en la cámara inferior en bicapas de alvéolos humanos (transpocillos).

	Niveles de GM en la cámara inferior para los tratamientos indicados Valor de DO (% de inhibición frente al control) I			
Día de tratamiento	**Vehículo**	**Compuesto (I)[1] Cámara superior**	**Posaconazol[2] Cámara inferior**	**Tratamiento combinado**
0	0	0	0	0
1	0,68	0,091 (86)	0,064 (91)	0,007 (99)
2	1,19	1,15 (3,4)	1,01 (15)	0,011 (99)
3	1,19	1,14 (3,7)	1,14 (4,1)	0,025 (98)
4	1,18	1,13 (4,5)	1,17 (1,1)	0,11 (91)
5	1,18	1,18 (0,3)	1,18 (-0,6)	0,42 (64)
6	1,18	1,18 (-0,3)	1,19 (-1,1)	0,73 (38)
7	1,18	1,16 (0,9)	1,17 (0,3)	1,15 (2,0)
8	1,16	1,13 (2,8)	1,15 (0,8)	1,12 (3,7)
Valores DFB_{50} para los tratamientos indicados		**1,13**	**1,45**	**5,48**

Notas al pie de la tabla: 1. Administrado a 0,1 µg/ml; **2.** Administrado a 0,01 µg/ml; **DFB_{50}:** días necesarios para alcanzar una carga fúngica de 50 % del control

Además, este tratamiento combinado ha sido probado en bicapas infectadas con la cepa resistente al azol de *Aspergillus fumigatus*: TR34-L98H. (**Table 6**) La monoterapia con el Compuesto (I) (1 µg/ml) en la cámara superior o con posaconazol (0,1 µg/ml) en la cámara inferior mostró un beneficio limitado. Por el contrario, la combinación del Compuesto (**I**) y posaconazol presentó efectos inhibidores notables sobre la invasión fúngica en la cámara inferior. El efecto beneficioso del tratamiento combinado se observó en el día 1 posinfección, pero desapareció después del día 2.

Tabla 6 Efectos del Compuesto (**I**), el posaconazol y el tratamiento combinado sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (cepa TR34-L98H) en la cámara inferior en el sistema celular de bicapa alveolar (transpocillos)

	Niveles de GM en la cámara inferior para los tratamientos indicados Valor de DO (% de inhibición frente al control) I		
Día de tratamiento	**Compuesto (I)[1] Cámara superior**	**Posaconazol[2] Cámara inferior**	**Tratamiento combinado**
0	0	0	0
1	0,35	0,039 (88)	0,013 (96)
2	0,99	1,02 (-2,7)	0,082 (92)
3	0,99	0,97 (1,7)	0,54 (45)
4	1,01	1,02 (-1,4)	1,09 (-8,8)
Valores DFB_{50} para los tratamientos indicados	**1,10**	**1,64**	**2,93**

Notas al pie de la tabla: 1. Administrado a 1 µg/ml; **2**. Administrado a 0,1 µg/ml; **DFB_{50}:** días necesarios para alcanzar una carga fúngica de 50 % del control

Cuando se administró intranasalmente a ratones neutropénicos inmunocomprometidos, en el día 0 y los días 1-3 después de la inoculación (tratamiento profiláctico) en una comparación directa, el Compuesto (**I**) mostró efectos superiores al posaconazol en la reducción de la pérdida de peso corporal, medida a lo largo de 3 días, causada por la infección con *Aspergillus fumigatus.* **(Tabla 7**).

Tabla 7: *Comparación de los efectos del tratamiento con el Compuesto (***I**) y posaconazol sobre la pérdida de peso corporal de ratones neutropénicos inmunocomprometidos causada por infección con Aspergillus fumigatus.

Tratamiento con fármaco[1]	**Pérdida de peso corporal causada por la infección por A. fumigatus[2] (% de inhibición de la pérdida de peso)**		
	Día 1	**Día 2**	**Día 3**
Vehículo más esporas	9,2 ± 1,5	14,3 ± 1,9	19,3 ± 1,4
Posaconazol	7,3 ± 2,0 (**21**)	13,4 ± 1,9 (**6**)	18,1 ± 2,0 (**6**)
Compuesto (I)	6,1 ± 1,8 (**34**)	8,7 ± 2,5 (**39**)	11,1 ± 5,6 (**42**)

Notas al pie de la tabla: 1. Administrado a 0,4 mg/ml intranasalmente; **2** % de pérdida de peso en comparación con el peso animal al día 0.

Además, el tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) mostró efectos superiores al posaconazol sobre la carga fúngica en el pulmón, así como sobre las concentraciones de GM, tanto en BALF como en suero, posinfección. Los datos para el Compuesto (**I**), usado en regímenes de dosificación profilácticos y terapéuticos, se muestran en la **Tabla 8** y las **Fig. 1**, **2** and **3** (valores DI_{50} presentados en la **Tabla 9**).

Tabla 8: Efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre las UFC en el pulmón y las concentraciones de galactomanano en el BALF y el suero de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*

Régimen de tratamiento	**Conc. de fármaco (mg/ml)**	**% de inhibición de la respuesta**		
		UFC (/mg de pulmón)	**GM en BALF (COI)**	**GM en suero (COI)**
Vehículo + Esporas	**Ninguna**	28,4 ± 16,9	4,8 ± 0,40	5,3 ± 1,1
Compuesto (I): tratamiento profiláctico	**0,08**	15,2 ± 13,7 (**46**)	0,70 ± 0,39 (**85**)	0,81 ± 0,52 (**85**)
	0,4	2,1 ± 1,6 (**93**)	0,37 ± 0,46 (**92**)	0,24 ± 0,18 (**95**)
	2	0,8 ± 0,7 (**97**)	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,07

			(**97**)	(**97**)
Compuesto (I): tratamiento terapéutico	**0,4**	3,8 ± 1,0 (**87**)	0,24 ± 0,06 (**95**)	0,29 ± 0,11 (**95**)
	2	1,9 ± 1,7 (**93**)	0,22 ± 0,14 (**95**)	0,25 ± 0,19 (**95**)
	10	0,5 ± 0,3 (**98**)	0,11 ± 0,05 (**98**)	0,24 ± 0,11 (**95**)

Notas al pie de la tabla: los datos para la carga fúngica se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM; n = 5-6).

Tabla 9: Valores DI_{50} para el tratamiento profiláctico con posaconazol y el Compuesto (I) sobre la carga fúngica en el pulmón y sobre las concentraciones de galactomanano en el BALF y el suero de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Sustancia del fármaco (régimen profiláctico)	**Valores DI_{50} para la respuesta indicada (mg/ml)**		
	Carga fúngica en el pulmón	**GM en BALF**	**GM en suero**
Compuesto (I)	0,086	< 0,08	< 0,08
Posaconazol	0,24	1,3	0,47

El tratamiento profiláctico con el Compuesto (**I**) también inhibió la acumulación de células inflamatorias en el BALF (**Tabla 10**), de manera similar al posaconazol. Además, el tratamiento profiláctico con el Compuesto (**I**) mostró efectos inhibidores superiores al posaconazol frente a las concentraciones de IL-17, IFNγ y MDA en el BALF, y los valores de **DI_{50}** comparativos para el Compuesto (**I**) y para el posaconazol en experimentos independientes se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 10: Efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre la acumulación de macrófagos y neutrófilos en el BALF de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Tratamiento	**Conc. de fármaco (mg/ml)**	**Números de células en BAL x10^5/ml (% de inhibición)**	
		Macrófago	**Neutrófilo**
Vehículo + Esporas		0,65 ± 0,14	0,49 ± 0,09
Compuesto (I) tratamiento profiláctico	**0,08**	0,40 ± 0,15 (**38**)	0,37 ± 0,04 (**24**)
	0,4	0,32 ± 0,07 (**51**)	0,26 ± 0,12 (**47**)
	2	0,26 ± 0,05 (**60**)	0,22 ± 0,04 (**55**)
Compuesto (I) tratamiento terapéutico	**0,4**	0,43 ± 0,05 (**34**)	0,38 ± 0,04 (**22**)
	2	0,40 ± 0,11 (**38**)	0,34 ± 0,05 (**31**)
	10	0,32 ± 0,07 (**51**)	0,27 ± 0,08 (**45**)

Notas al pie de la tabla: los datos para el número de células se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM), N = 5-6.

Tabla 11: Valores de DI_{50} para el tratamiento profiláctico con posaconazol y el Compuesto (**I**) sobre los niveles de IL-17, IFNγ y MDA en el BALF de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Sustancia del fármaco (régimen profiláctico)	**Valores de DI_{50} para los biomarcadores indicados (mg/ml)**		
	IL-17	**IFNγ**	**MDA**
Compuesto (I)	0,074	< 0,08	0,11
Posaconazol	0,61	0,22	0,69

Además, los datos que muestran los efectos del Compuesto (I) sobre los niveles de IFNγ, IL-17 y MDA en el BALF, cuando se administra indistintamente profiláctica o terapéuticamente, se presentan en la **Table 12** y los efectos sobre el suero, IL-6 y TNFα se presentan en la **Table 13.**

Tabla 12: Efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre los niveles de IFNγ, IL-17 y MDA en el BALF de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Régimen de tratamiento	Conc. de fármaco (mg/ml)	Concentraciones de biomarcadores en BALF (% de inhibición)		
		IFNγ (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)	MDA (µg/ml)
Vehículo + Esporas		9,2 ± 1,0	19,8 ± 3,6	1,8 ± 0,2
Compuesto (I) profiláctico	**0,08**	3,7 ± 1,7 (**60**)	9,8 ± 5,3 (**51**)	0,96 ± 0,32 (**47**)
	0,4	3,0 ± 0,8 (**67**)	6,7 ± 4,9 (**66**)	0,57 ± 0,22 (**68**)
	2	2,5 ± 0,3 (**73**)	3,2 ± 0,8 (**84**)	0,34 ± 0,05 (**81**)
Compuesto (I) terapéutico	**0,4**	4,3 ± 2,2 (**53**)	8,5 ± 2,9 (**57**)	0,45 ± 0,10 (**75**)
	2	3,3 ± 0,8 (**64**)	4,0 ± 0,8 (**80**)	0,37 ± 0,10 (**79**)
	10	2,1 ± 0,3 (**77**)	2,9 ± 0,7 (**85**)	0,25 ± 0,05 (**86**)

Notas al pie de la tabla: los datos para las concentraciones de biomarcador se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM), N = 5-6.

Tabla 13: Efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (**I**) sobre los niveles de IL-6 y TNFα en el suero de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Régimen de tratamiento	Conc. de fármaco (mg/ml)	Conc. de los biomarcadores (pg/ml) (% de inhibición)	
		IL-6	TNFα
Vehículo + Esporas		284 ± 112	25,6 ± 8,0
Compuesto (I) tratamiento profiláctico	**0,08**	159 ± 73,3 (**44**)	11,8 ± 5,9 (**54**)
	0,4	86,3 ± 46,9 (**70**)	7,3 ± 3,5 (**71**)
	2	44,5 ± 12,2 (**84**)	4,7 ± 0,4 (**82**)
Compuesto (I) tratamiento terapéutico	**0,4**	51,7 ± 16,8 (**82**)	6,2 ± 0,5 (**76**)
	2	44,2 ± 11,4 (**84**)	5,5 ± 0,7 (**79**)
	10	35,9 ± 10,4 (**87**)	4,9 ± 0,6 (**81**)

Notas al pie de la tabla: los datos para las concentraciones de biomarcador se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM), N = 5-6.

También se halló que el tratamiento terapéutico con el Compuesto (I) mantiene una potente inhibición de la carga fúngica pulmonar, los niveles de galactomanano y en las concentraciones de citocinas de BALF en ratones neutropénicos e inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus* (**Tablas 7, 8, 9** y **10** y **Fig. 1, 2** y **3**).

También se evaluaron los efectos de la administración profiláctica prolongada del Compuesto (I) sobre los biomarcadores en ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*. Se halló que la profilaxis prolongada con el Compuesto (I) inhibía la carga fúngica en el pulmón, así como las concentraciones de GM, tanto en BALF como en suero, a dosis 25 veces inferiores que las usadas en un estudio de biomarcadores anterior (**Tabla 14**). Además, los datos sugieren una acumulación de efectos antifúngicos en el pulmón en la administración repetida, ya que siete días de profilaxis produjeron efectos antifúngicos mayores que el tratamiento profiláctico durante un solo día adicionado. La persistencia de acción del compuesto en el pulmón es sugerida por el hallazgo de que el tratamiento en los días -7 al día 0 generó efectos antifúngicos superiores en el día 3 que los resultantes del tratamiento solo en los días -1 y 0. Sin embargo, este protocolo de administración abreviado seguía siendo protector.

Tabla 14 Efectos de la administración profiláctica prolongada del Compuesto (I) sobre la carga fúngica (UFC) en el pulmón y las concentraciones de GM en el BALF y suero en ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Régimen de tratamiento[1] (días de administración)	**Dosis del compuesto (I) (µg/ml)**	**Valores y % de inhibición de la respuesta[3]**		
		UFC (/mg de pulmón)	**GM en BALF (COI)**	**GM en suero (COI)**
Vehículo más Esporas[2]	Ninguna	34,7 ± 10,7	5,1 ± 0,9	4,3 ± 1,0
-7 a +3	3,2	8,3 ± 2,0 (76)	2,6 ± 0,36 (49)	1,8 ± 0,43 (58)
-1 a +3	3,2	9,5 ± 3,3 (73)	2,8 ± 0,71 (45)	2,2 ± 0,69 (49)
-7 a +3	16	5,0 ± 2,3 (86)	1,7 ± 0,39 (67)	1,4 ± 0,20 (67)
-1 a +3	16	6,1 ± 2,8 (82)	2,2 ± 0,61 (57)	1,6 ± 0,41 (63)
-7 a 0	16	6,7 ± 1,7 (81)	2,3 ± 0,52 (55)	1,7 ± 0,59 (60)
-1, 0	16	13,1 ± 2,6 (62)	4,5 ± 0,50 (12)	4,0 ± 0,88 (7)

Notas al pie de la tabla: 1. El valor de N fue seis para todos los grupos tratados con el fármaco; **2.** El valor de N fue cinco para el grupo tratado con el vehículo; **3.** Los datos para la carga fúngica y los niveles de GM se presentan como la media ± error estándar de la media, y el porcentaje de inhibición, con respecto al vehículo.

Se evaluó la influencia sobre la supervivencia de la combinación de los tratamientos de Compuesto (**I**), administrado tópicamente, con posaconazol oral, en ratones neutropénicos gravemente inmunocomprometidos después de la inoculación con *Aspergillus fumigatus.* La monoterapia con el Compuesto (**I**) (0,4 mg/ml, administrado intranasalmente) o con Posaconazol (1,0 mg/kg, administrado oralmente) mostró solo un beneficio terapéutico muy limitado. Por el contrario, la combinación del Compuesto (**I**) y posaconazol demostró un aumento notable en el tiempo de supervivencia después de la infección (**Tabla 15**).

Tabla 15 Efectos del Compuesto (**I**) y Posaconazol como monoterapia o en combinación sobre la supervivencia de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus.*

Régimen de tratamiento	**Dosis (vía)**	**N.º de supervivientes en el día 7 (%)**	**Supervivencia media (días)**	**Ensayo de Mantel-Cox para la supervivencia (frente a la infección)**
Vehículo	ninguna	0/6 (0)	5	-
Compuesto (I)	0,4 mg/ml (in)	0/6 (0)	6	p < 0,05
Posaconazol	1 mg/kg (po)	0/6 (0)	6,5	No significativo
Compuesto (I) más Posaconazol	0,4 mg/ml (in)	5/6 (83)	No definida	p < 0,001
	1 mg/kg (po)			

Notas al pie de la tabla: N = 8 por grupo.

***Farmacocinética* in vivo**

Es un procedimiento usado habitualmente para agentes terapéuticos pulmonares que se van a administrar a los pulmones de animales, por ejemplo, ratones, y plasma recolectado en diversos momentos después de la administración con el fin de caracterizar la exposición sistémica resultante al compuesto administrado. El compuesto de la invención se puede ensayar en tales sistemas *in vivo*.

Resumen del perfil biológico del Compuesto (I)

Se halló que el Compuesto (**I**) es un potente inhibidor del crecimiento planctónico de *Aspergillus fumigatus* y de la infección celular epitelial bronquial. El Compuesto (**I**) también inhibió el crecimiento de los aislados de *Aspergillus fumigatus* resistentes al posaconazol y al voriconazol, demostrando una mayor potencia que el posaconazol, el voriconazol y el intraconazol contra estas cepas. También se halló que el Compuesto (**I**) es un potente inhibidor del crecimiento de *Rhizopus oryzae, Cryptococcus neoformans, Chaetomimum globosum, Penicillium chrysogenum* y *Trichophyton rubrum*, así como también algunas *Candida Spp.* En un modelo *in vitro* de alvéolos, el Compuesto (**I**) mostró una actividad impresionante contra la invasión de Apergillus, tanto como monoterapia como al ser administrado en combinación con posaconazol. *In vivo,* en ratones neutropénicos e inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*, el Compuesto (**I**), demostró una potente inhibición de la infección con *Aspergillus fumigatus*, así como también la respuesta inmune pulmonar asociada ya sea en la administración profiláctica o como un tratamiento. El Compuesto (**I**) también fue altamente eficaz para reducir la pérdida de peso corporal dependiente de la infección. Estos efectos inhibidores fueron superiores a los del posaconazol. Resulta significativo que los efectos antifúngicos beneficiosos del Compuesto (**I**) se observan tanto en el escenario profiláctico como en uno terapéutico.

Referencias

Agbetile, J., Fairs, A., Desai, D., Hargadon, B., Bourne, M., Mutalithas, K., Edwards, R., Morley, J.P., Monteiro, W.R., Kulkarni, N.S., Green, RH, Pavord, I.D., Bradding, P., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J. and Pashley, C.H. Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV1. Clin. Exp. Allergy, 2012, 42, 782-91.

Bafadhel M., McKenna S., Aqbetile J., Fairs A., Desai D., Mistry V., Morley J.P., Pancholi M., Pavord I.D., Wardlaw A.J., Pashley C.H. and Brightling C.E. Aspergillus fumigatus during stable state and exacerbations of COPD. Eur. Respir. J., 2014, 43, 64-71.

Bowyer P. and Denning D.W. Environmental fungicides and triazole resistance in Aspergillus. Pest Management Science, 2014, 70, 173-178.

Chishimba L., Niven R.M., Fom M., Cooley J. and Denning D.W. Voriconazole and Posaconazole Improve Asthma Severity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Severe Asthma with Fungal Sensitization. Pharmacotherapy, 2012, 49, 423-433.

Chotirmall S.H., O'Donoghue E., Bennett K., Gunaratnam C., O'Neill S.J. and McElvaney N.G. Sputum Candida albicans presages FEV1 decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. Chest, 2010, 138, 1186-95.

CLSI M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 2nd ed, NCCLS document M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2002.

CLSI M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed, CLSI document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

Denning D.W., Pleuvry A. and Cole D.C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. Bulletin of the World Health Organization, 2011a, 89, 864-872.

Denning D.W., Park S., Lass-Flori C., Fraczek M.G., Kirwan M., Gore R., Smith J., Bueid A., Moore C.B., Bowyer P. and Perlin D.S. High frequency triazole resistance found in nonculturable aspergillus fumigatus from lungs of patients with chronic fungal disease. Clin. Infect. Dis., 2011b, 52, 1123-1129.

Dimopoulos G., Frantzeskaki F., Poulakou G. and Armaganidis A. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. Ann. NY Acad. Sci., 2012, 1272, 31-39.

Geist M.J.P., Egerer G., Burhenne J., Riedel K-D. and Mikus G. Induction of voriconazole metabolism by rifampin in a patient with acute myeloid leukemia: importance of interdisciplinary communication to prevent treatment errors with complex medications. Antimicrob. Agents Chemother., 2007, 51, 3455-3456.

Hope W.W., Kruhlak M.J., Lyman C.A., Petraitiene R., Petraitis V., Francesconi A., Kasai M., Mickiene D., Sein T., Peter J., Kelaher A.M., Hughes J.E., Cotton M.P., Cotten C.J., Bacher J., Tripathi S., Bermudez L., Maugel T.K., Zerfas P.M., Wingard J.R., Drusano G.L. and Walsh T.J. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. J. Infect. Dis., 2007, 195(3), 455-466.

Jeong S., Nguyen P.D. and Desta Z. Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. Antimcrob. Agents Chemother., 2009, 53, 541-551.

Kaur S. and Singh S. Biofilm formation by Aspergillus fumigatus. Med. Mycol., 2014, 52, 2-9.

Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., Barnes P.J., Ito K. and Kizawa Y. Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyper-responsiveness in mice. Chest. 2013, 144, 99-105.

Lat A. and Thompson G.R. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. Infect. Drug Resist., 2011, 4, 43-53.

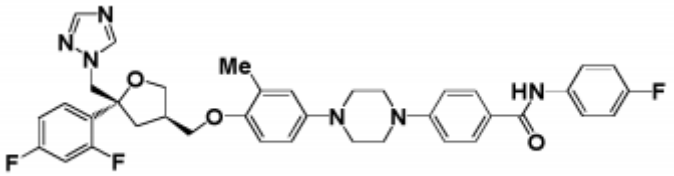
Limper A.H., Knox K.S., Sarosi G.A., Ampel N.M., Bennett J.E., Catanzaro A., Davies S.F., Dismukes W.E., Hage C.A.,

Marr K.A., Mody C.H., Perfect J.R. and Stevens D.A. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2011, 183, 96-128.
Levin M-D., den Hollander J.G., van der Holt B., Rijnders B.J., van Vliet M., Sonneveld P. and van Schaik R.H. Hepatotoxicity of oral and intravenous voriconazole in relation to cytochrome P450 polymorphisms. J. Antimicrob. Chemother., 2007, 60, 1104-1107.
Lin S-J, Scranz J and Teutsch S.M. Aspergillus case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin. Infect. Dis., 2001, 32, 358-366.
Monteiro M.C., de la Cruz M, Cantizani J., Moreno C., Tormo J.R., Mellado E, De Lucas J.R., Asensio F., Valiante V., Brakhage A.A., Latgé JP, Genilloud O., Vicente F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against Aspergillus fumigatus using resazurin. J. Biomol. Screen. 2012, 17, 542-549.
Pasqualotto A.C., Powell G., Niven R. and Denning D.W. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. Respirology, 2009, 14, 1121-127.
Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat. Protoc., 2008, 3, 1494-500.
Rankin, N. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with granulocytosis and antibiotic therapy. Br. Med. J., 1953, 183, 918-9.
Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Arikan S., Barchiesi F., Bille J., Chyssanthou E., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Denning D.W., Donnelly J.P., Fegeler W., Lass-Flörl C., Moore C., Richardson M., Gaustad P., Schmalreck A., Velegraki A. and Verweij P. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. E.DEF 9.1 2008, 1-13.
Salmeron G., Porcher R., Bergeron A., Robin M., Peffault de Latour R., Ferry C., Rocha V., Petropoulou A., Xhaard A., Lacroix C., Sulahian A., Socié G., and Ribaud P. Persistent poor long-term prognosis of alogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients surviving invasive aspergllosis. Haematolologica, 2012, 97, 1357-1363.
Thompson G.R. and Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 2008, 29, 103-110.
Wexler D., Courtney R., Richards W., Banfield C., Lim J. and Laughlin M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label two-way crossover study. Eur. J. Pharm. Sci., 2004, 21, 65-653.

En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones a continuación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un integrante, etapa, grupo de integrantes o grupo de etapas indicadas, pero no la exclusión ningún otro integrante, etapa, grupo de integrantes o grupo de etapas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, es decir, el Compuesto (**I**),



Compuesto (I)

que es:
4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-*N*-(4-fluorofenil)benzamida; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso como fármaco.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de micosis o para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis.

4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, donde la micosis es causada por *Aspergillus spp.*

5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 4, donde el *Aspergillus sp.* es *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus pullulans*, especialmente *Aspergillus fumigatus.*

6. Un compuesto para su uso según la reivindicación 4, donde el *Aspergillus sp.* es un *Aspergillus fumigatus* resistente al azol.

7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, donde la micosis es causada por *Candida spp.*, por ejemplo, *Candida albicans o Candida glabrata, Rhizopus spp.*, por ejemplo, *Rhizopus oryzae, Cryptococcus spp.*, por ejemplo, *Cryptococcus neoformans, Chaetomium spp.*, por ejemplo, *Chaetomium globosum, Penicillium spp.*, por ejemplo, *Penicillium chrysogenum o Trichophyton spp.*, por ejemplo, *Trichophyton rubrum.*

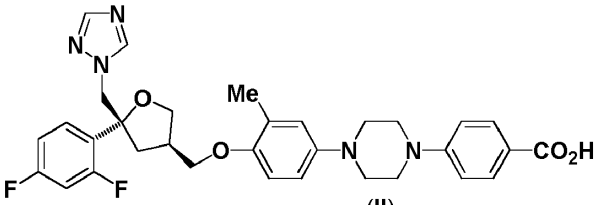
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

9. Un compuesto para uso según la reivindicación 2 en combinación con un segundo principio activo o más; o una composición farmacéutica según la reivindicación 8 que comprende un segundo o más principios activos.

10. Un compuesto para su uso o una composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde el segundo o más principios activos se seleccionan de entre agentes antifúngicos, anfotericina B, una equinocandina y un inhibidor de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.

11. Un compuesto para su uso o una composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde el segundo o más principios activos se seleccionan de entre candicidina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina, rimocidina, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, ketoconazol, luliconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, albaconazol, efinaconazol, epoxiconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, propiconazol, ravuconazol, terconazol, abafungina, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, anidulafungina, micafungina, ácido benzoico, ciclopirox, flucitosina (5-fluorocitosina), griseofulvina, tolnaftato y ácido undecilénico; o el segundo o más principios activos se seleccionan de entre voriconazol, posaconazol, caspofungina, lovastatina, pravastatina y fluvastatina.

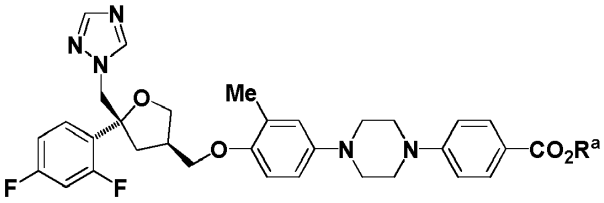
12. Un compuesto de la fórmula (**II**)



(II)

o una sal del mismo; o

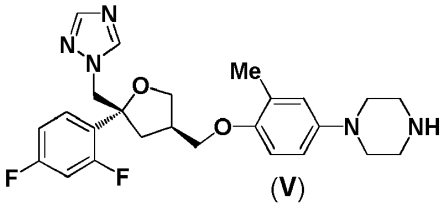
un compuesto de la fórmula (**IV**)



(IV)

donde R^a representa un alquilo C_{1-5};
o una sal del mismo; o

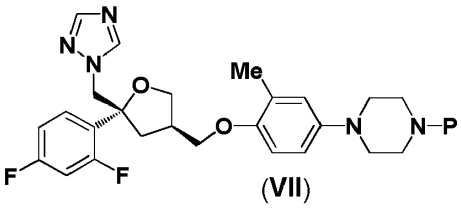
un compuesto de la fórmula (**V**)



(V)

o una sal del mismo; o

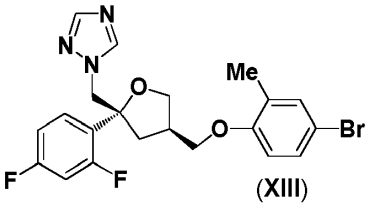
un compuesto de la fórmula (**VII**)



(VII)

donde P representa un grupo protector de nitrógeno;
o una sal del mismo; o

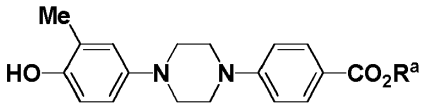
un compuesto de la fórmula (**XIII**);



(XIII)

o una sal del mismo.

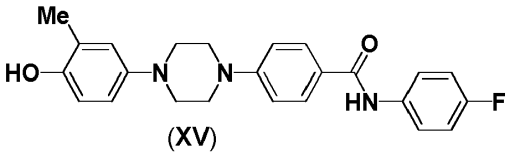
13. Un compuesto de la fórmula (VIII):



(**VIII**)

donde R^a representa un alquilo C_{1-5}; o una sal del mismo; o

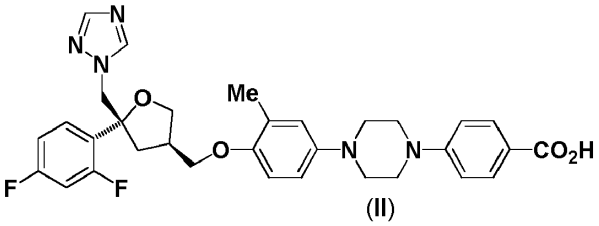
un compuesto de la fórmula (**XV**):



(**XV**)

o una sal del mismo.

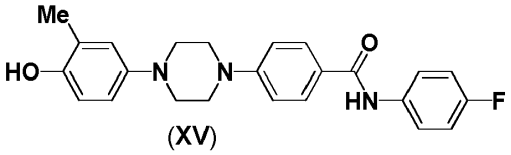
14. Un procedimiento para preparar el Compuesto (**I**) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (**II**):



(**II**)

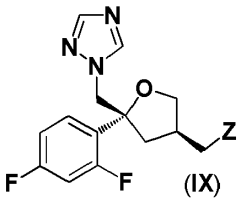
o un derivado activado del mismo; o una sal del mismo;
con 4-fluoroanilina o una sal del mismo; o

hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (**XV**):



(**XV**)

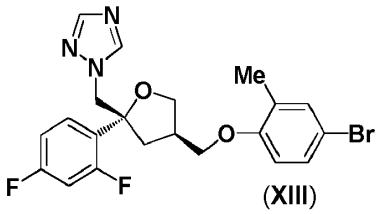
o una sal del mismo;
con un compuesto de la fórmula (**IX**);



(**IX**)

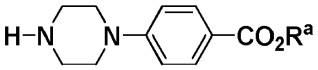
donde Z representa un grupo de escisión; o una sal del mismo.

15. Un procedimiento para preparar el Compuesto (**II**) o una sal del mismo que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (**XIII**):



(**XIII**)

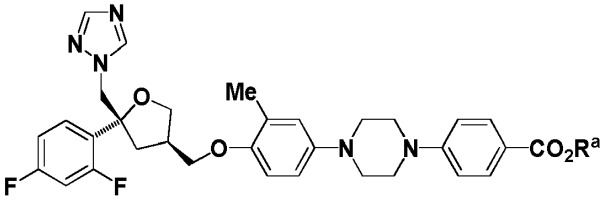
o una sal del mismo;
con el compuesto de la fórmula (**X**):



(**X**)

donde R^a representa un alquilo C_{1-5}; o una sal del mismo;

para dar un compuesto de la fórmula (**IV**):



(**IV**)

donde R^a representa un alquilo C_{1-5}; o una sal del mismo;

seguido de la hidrólisis del éster de alquilo para dar dicho compuesto de la fórmula (**II**).

Figura 1

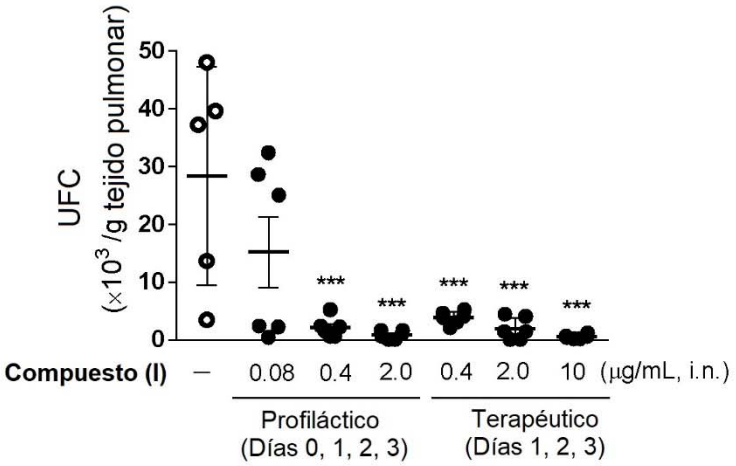


Figura 2

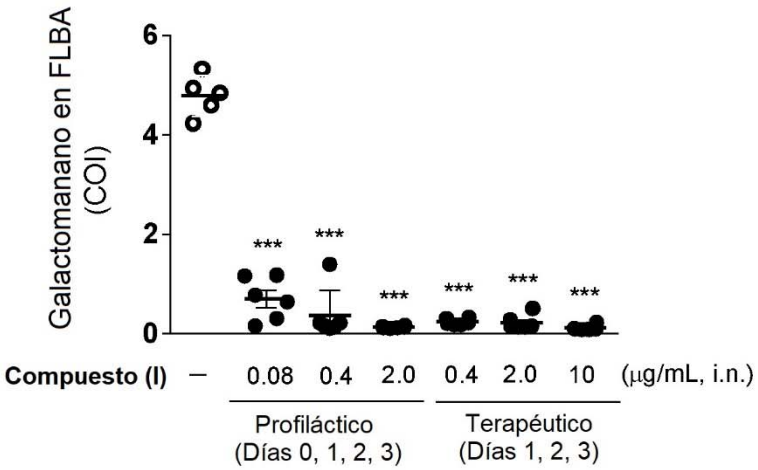
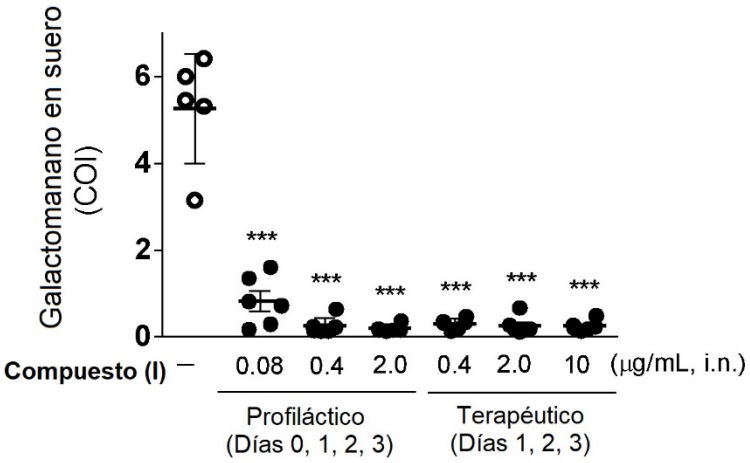



Figura 3