

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 991 873**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61K 31/501 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014 E 19191562 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3626242**

(54) Título: **Análogos del itraconazol como inhibidores de fibrosis**

(30) Prioridad:

07.06.2013 US 201361832768 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2024

(73) Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

(72) Inventor/es:

**LAIRSON, LUKE;
BOLLONG, MICHAEL;
SCHULTZ, PETER, G.;
CHATTERJEE, ARNAB, K.;
YANG, BAIYUAN;
KUMAR, PUNEET y
URKALAN, KAVERI**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 991 873 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos del itraconazol como inhibidores de fibrosis

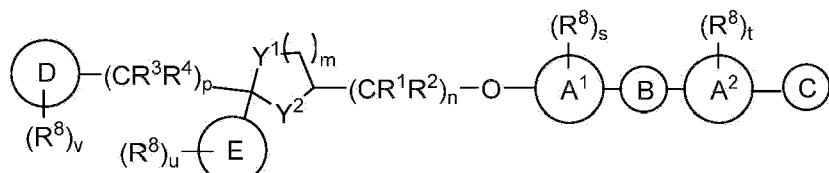
5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La fibrosis, generalmente se define como la producción de cantidades excesivas de tejido conectivo, se desarrolla como consecuencia de diversas enfermedades subyacentes. La inflamación crónica o el daño/remodelación de los tejidos son eventos inductores de fibrosis típicos. Los ejemplos de enfermedades específicas incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), fibrosis hepática asociada con las etapas posteriores de cirrosis hepática alcohólica y no alcohólica, fibrosis renal, fibrosis cardíaca y formación de queloides como resultado de curación anormal de heridas [Wynn, TA (2004) *Nature Reviews Immunology.* 4: 583-594; Friedman, SL (2013) *Science Translation Medicine.* 5 (167): 1 - 17]. Además, la fibrosis es una característica patológica clave asociada con enfermedades autoinmunes crónicas, incluida la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, el lupus eritematoso sistémico y la esclerodermia. Las enfermedades que representan una necesidad médica insatisfactoria grave incluyen la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la esclerodermia y la fibrosis hepática relacionada con la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Se espera que el aumento de la incidencia de fibrosis hepática relacionada con NASH sea paralela directamente a la de la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Pulm. Pharmacol Ther.* 2011, 24, 81-91 propone la pentoxifilina como tratamiento complementario en paracoccidioidomicosis pulmonar debido a sus propiedades inmunomoduladoras y antifibróticas demostradas *in vitro* e *in vivo* en hígado, piel y pulmón.

La esclerodermia es una rara enfermedad autoinmune crónica caracterizada por el reemplazo de tejido normal con tejido fibroso denso y grueso. Si bien se desconoce la causa subyacente exacta de la esclerodermia, la enfermedad generalmente implica la activación mediada por células inmunes de miofibroblastos dérmicos que conducen al depósito de cantidades excesivas de proteínas de la matriz extracelular (p. ej., colágeno tipo I) que causa un engrosamiento de la piel y en algunos casos el endurecimiento y eventual falla de múltiples órganos. En la actualidad, no hay cura para la esclerodermia. El tratamiento se limita a los intentos de controlar los síntomas y generalmente requiere una combinación de enfoques. Si bien la esclerodermia localizada en la piel generalmente no es mortal, la esclerodermia sistémica que afecta a múltiples órganos internos puede ser una enfermedad potencialmente mortal.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

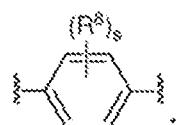
Las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo:



45 Formula (I)

para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, en donde:

50 A¹ es



55 A² es



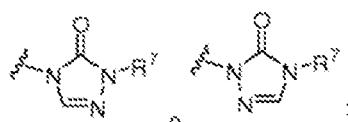
o piridina;
B es

5



C es

10



15

D es arilo o heteroarilo;
E es arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico o alquilo;
cada R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, haloalquilo o alcoxi;
R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno (NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquileno(cicloalquilo), o -alquileno(heterociclico);
cada R⁸ se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, heterociclico, halo, hidroxi, nitrilo, azido, nitro, alcoxi, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno (NR¹³R¹⁴), -alquileno(cicloalquilo), -alquileno(heterociclico), arilo, heteroarilo, -SR¹³, -SOR¹³, -SO₂R¹³, -SO₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³SO₂R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹³R¹⁴; o dos R⁸ adyacentes forman un anillo heterociclico; cada R¹³ y R¹⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, heterociclicolalquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo y heteroarilo; o R¹³ y R¹⁴ tomados juntos forman un heterociclo con los átomos a los que están unidos;
Y¹ e Y² son O;
n es 1 o 2;
m es 1 o 2;
p es 1, 2, 3 o 4;
s es 0 o 1;
t es 0 o 1;
u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y
v es 0, 1, 2, 3 o 4;
y en donde
"alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo;
"alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada, como se describe para alquilo;
"alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical alquilo como se define anteriormente;
"arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático;
"cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico que tiene de tres a quince átomos de carbono, que pueden incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que están saturados o insaturados;
"halo" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo;
"haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se definió anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se definió anteriormente;
"haloalcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical haloalquilo como se definió anteriormente;
"heterocicloalquilo" o "heterociclico" o "heterociclo" se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre
"heterocicloalquilo" también incluye todas las formas de anillo de los carbohidratos, incluidos, entre otros, los monosacáridos, los disacáridos y los oligosacáridos, y tiene de 2 a 10 carbonos en el anillo;
"heteroarilo" se refiere a un monoradical aromático que contiene de cinco a veinte átomos del anillo esquelético, donde uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, selenio y estaño, pero no limitado a estos átomos y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos O o S adyacentes.

60

En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), A¹ es

65



5 En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de fórmula (I), A² es

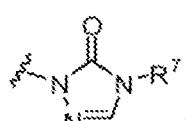


10 10 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), C es



20 y R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno (NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquileno(cicloalquilo), o -alquileno(heterociclico).

25 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), C es



30 y R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno (NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquileno(cicloalquilo) o -alquileno(heterociclico).

35 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es alquilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es cicloalquilo.

40 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es heterociclico.

45 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es arilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), E es



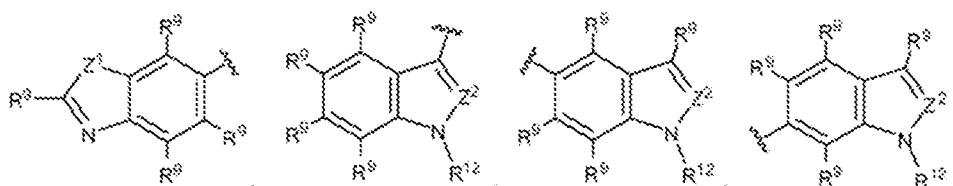
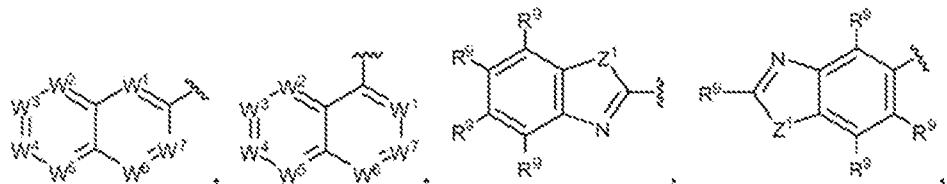
50 y u es 0, 1, 2, 3, 4, o 5.

55 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), E es heteroarilo.

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), E se selecciona entre:

60

65



W¹, W², W³, W⁴, W⁵, W⁶, y W⁷ se seleccionan independientemente de N y CR⁹;

Z¹ es NR¹², S, u O;

Z² es N o CR⁹;

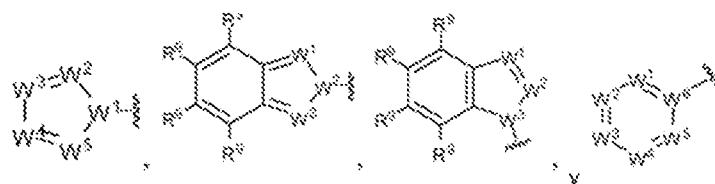
30 cada R⁹ se selecciona independientemente de H, halógeno, CN, NO₂, alquilo, -SR¹⁰, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, NR¹⁰C(O)(alquilo), -NR¹⁰C(O)cicloalquilo, -NR¹⁰C(O) (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O) (arilo), -NR¹⁰C(O) (heteroarilo), -C(O)NR¹⁰R¹¹, -C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (arilo), -C(O)NR¹⁰ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (arilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)O(alquilo), -NR¹⁰C(O)O(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(arilo), -NR¹⁰C(O)O(heteroarilo), -NR¹⁰SO₂(alquilo), -NR¹⁰SO₂(cicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(heterocicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(arilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), -SO₂NR¹⁰R¹¹, -SO₂NR¹⁰(cicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(heterocicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(arilo), -SO₂NR¹⁰(heteroarilo), haloalquilo, arilo y heteroarilo;

35 cada R¹⁰ y R¹¹ se selecciona independientemente de H y alquilo; o R¹⁰ y R¹¹ tomados juntos forman un heterociclo con el nitrógeno al que están unidos; y R¹² es H, alquilo o haloalquilo.

40 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), D es arilo.

45 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), E es heteroarilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), D se selecciona de:



W¹, W², W³, W⁴ y W⁵ se seleccionan independientemente de N y CR⁹;

60 W⁶ es N o C; y cada R⁹ se selecciona independientemente de H, halógeno, CN, NO₂, alquilo, -SR¹⁰, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, NR¹⁰C(O)(alquilo), -NR¹⁰C(O)cicloalquilo, -NR¹⁰C(O) (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O) (arilo), -NR¹⁰C(O) (heteroarilo), -C(O)NR¹⁰R¹¹, -C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (arilo), -C(O)NR¹⁰ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (arilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)O(alquilo), -NR¹⁰C(O)O(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(arilo), -NR¹⁰C(O)O(heteroarilo), -NR¹⁰SO₂(alquilo), -NR¹⁰SO₂(cicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(heterocicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(arilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), -SO₂NR¹⁰R¹¹, -SO₂NR¹⁰(cicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(heterocicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(arilo), -SO₂NR¹⁰(heteroarilo),

$\text{SO}_2\text{NR}^{10}$ (heteroarilo), haloalquilo, arilo y heteroarilo.

En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (I), D es

5



10 En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (I), D es

15



En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (I), D es

20



25 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), Y¹ e Y² son O.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (I), m es 1.

30 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (I), p es 1, 2 o 3.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), p es 1.

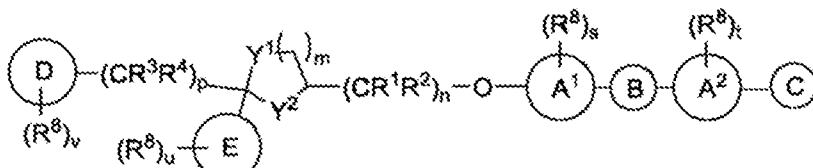
35 En algunas realizaciones descritas arriba o abajo de un compuesto de Fórmula (I), R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno.

40 Además, se proporciona en la presente un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática usando un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones en donde la fibrosis hepática se asocia con las últimas etapas de la cirrosis hepática alcohólica o no alcohólica.

45 También se proporciona en la presente un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática, el método comprendiendo administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones en combinación con uno o más agentes farmacéuticos. En ciertas realizaciones descritas anteriormente, el uno o más agentes farmacéuticos son agentes antifibróticos. En ciertas realizaciones descritas anteriormente, el uno o más agentes farmacéuticos son agentes antifúngicos.

50 En un aspecto, la presente se proporcionan compuestos de Fórmula (II), una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, profármaco, metabolito, N-óxido, estereoisómero, o isómero del mismo:

55



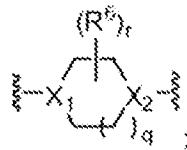
60

Formula (II)

en donde:

65 A¹ y A² se seleccionan independientemente de arilo o heteroarilo;

B es

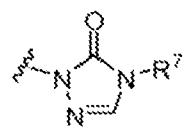


- 10 C es heterociclico de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido o heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido, en el que el heterociclico o el heteroarilo contiene de 1 a 4 átomos de nitrógeno;
D es arilo o heteroarilo;
E es arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico o alquilo;
15 cada R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, haloalquilo o alcoxi;
X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de N y CR⁵;
R⁵ es H, OH, alquilo, o alcoxi; cada R⁶ es independientemente alquilo, haloalquilo, halo, alcoxi, -alquieno (NR¹³R¹⁴) o arilo;
20 R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquieno (NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquieno(cicloalquilo), o -alquieno(heterociclico); cada R⁸ se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, heterociclico, halo, hidroxi, nitrilo, azido, nitro, alcoxi, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquieno (NR¹³R¹⁴), -alquieno(cicloalquilo), -alquieno(heterociclico), arilo, heteroarilo, -SR¹³, -SOR¹³, -SO₂R¹³, -SO₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³SO₂R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹³R¹⁴; o dos R⁸ adyacentes forman un anillo heterociclico;
25 cada R¹³ y R¹⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, heterociclicalquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo y heteroarilo; o R¹³ y R¹⁴ tomados juntos forman un heterociclo con los átomos a los que están unidos;
Y¹ e Y² se seleccionan independientemente entre O, CH₂, NH, y NR¹³;
n es 1, 2 o 3;
m es 1 o 2;
30 p es 1, 2, 3 o 4;
q es 1, 2 o 3;
r es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;
s es 0, 1, 2, 3 o 4;
t es 0, 1, 2, 3 o 4;
35 u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
v es 0, 1, 2, 3 o 4;

siempre que:

si X₁ y X₂ son N, r es 0, q es 1, A¹ y A² son fenilo, Y¹ e Y² son O, m y n son 1, R¹ R², R³, y R⁴ son hidrógeno, y C es

40



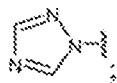
45

entonces D no es

50



55



y el compuesto no es 4-(4-(4-((2-((1H-pirazol-1-il)metil)-2-(2,4-difluorofenil)-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)fenil)piperazin-1-il)fenil)-1-isopropil-1H-1,2,4-triazol-5(4H)-ona.

60

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), X₁ y X₂ son N.

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), X₁ es CR⁵ y X₂ es N.

65

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), X₁ es N y X₂ es CR⁵.

5 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de fórmula (II), q es 1 y r es 0.

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), A¹ es arilo.

10 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), A¹ es



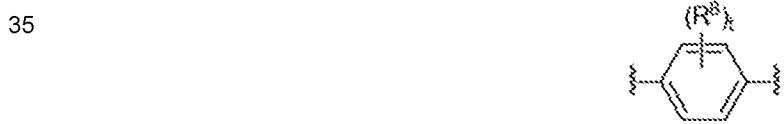
20 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), A¹ es



En algunas realizaciones se ha descrito anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), A¹ es heteroarilo.

30 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de fórmula (II), A² es arilo.

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), A² es



40 En algunas formas de realización descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), A² es



50 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), A² es heteroarilo.

55 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), A² es piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo o triazinilo.

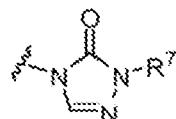
En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), C es heteroarilo opcionalmente sustituido de 5 a 6 miembros. En otras realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (I), C es heterociclico de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), C es

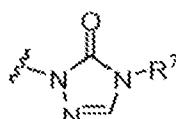


65

5 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II),
 C es



10 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II),
 C es



15 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), E es alquilo.
 20

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), E es
 cicloalquilo.

25 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), E es
 ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), E es
 heterociclico.

30 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), E es arilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), E es



40 y u es 0, 1, 2, 3, 4, o 5.

45 En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II),
 E es heteroarilo.

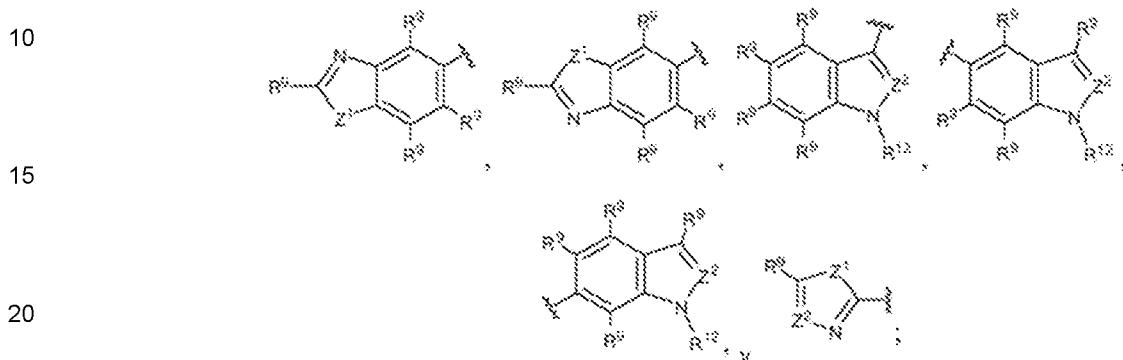
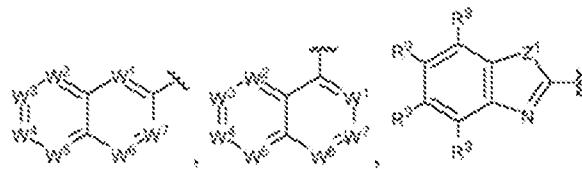
En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II),
 E se selecciona de:

50

55

60

65



W¹, W², W³, W⁴, W⁵, W⁶ y W⁷ se seleccionan independientemente de N y CR⁹,

Z¹ es NR¹², S, o O;

Z² es N o CR⁹;

cada R⁹ se selecciona independientemente de H, halógeno, CN, NO₂,

alquilo, -SR¹⁰, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, NR¹⁰C(O)(alquilo), -NR¹⁰C(O)cicloalquilo, -NR¹⁰C(O) (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O) (arilo), -NR¹⁰C(O)heteroarilo, -C(O)NR¹⁰R¹¹, -C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (arilo), -C(O)NR¹⁰ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (arilo), -NR¹⁰C(O)O(alquilo), -NR¹⁰C(O)O(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(arilo), -NR¹⁰C(O)O(heteroarilo), -NR¹⁰SO₂(alquilo), -NR¹⁰SO₂(cicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(heterocicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(arilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), -SO₂NR¹⁰R¹¹, -SO₂NR¹⁰(cicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(heterocicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(arilo), -SO₂NR¹⁰(heteroarilo), haloalquilo, arilo y heteroarilo;

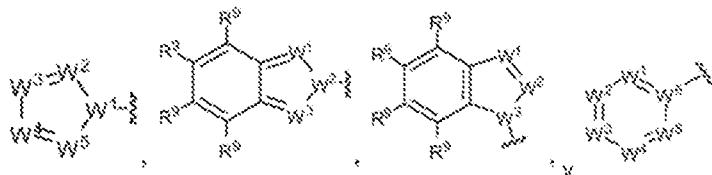
cada R¹⁰ y R¹¹ se selecciona independientemente de H y alquilo; o R¹⁰ y R¹¹ tomados juntos forman un heterociclo con el nitrógeno al que están unidos; y

R¹² es H, alquilo o haloalquilo.

40 En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), D es arilo.

En algunas realizaciones descritas anteriormente o más abajo de un compuesto de Fórmula (II), D es heteroarilo.

45 En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), D se selecciona de



55 ; W¹, W², W³,

W⁴ y W⁵ se

seleccionan independientemente de N y CR⁹;

W⁶ es N o C; y cada R⁹ se selecciona independientemente de H, halógeno, CN, NO₂, alquilo, -SR¹⁰, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, NR¹⁰C(O)(alquilo), -NR¹⁰C(O)cicloalquilo, -NR¹⁰C(O) (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O) (arilo), -NR¹⁰C(O) (heteroarilo), -C(O)NR¹⁰R¹¹, -C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -C(O)NR¹⁰ (arilo), -C(O)NR¹⁰ (heteroarilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹⁰ (arilo), -NR¹⁰C(O)O(alquilo), -NR¹⁰C(O)O(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(arilo), -NR¹⁰C(O)O(heteroarilo), -NR¹⁰SO₂(alquilo), -NR¹⁰SO₂(cicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(heterocicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(arilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), -SO₂NR¹⁰R¹¹, -SO₂NR¹⁰(cicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(heterocicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(arilo), -SO₂NR¹⁰(heteroarilo), haloalquilo, arilo y heteroarilo.

En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), D es

5



En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), D es

10



En ciertas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), D es

15



20

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), Y¹ e Y² son O.

25

En algunas realizaciones descritas anteriormente o por debajo de un compuesto de Fórmula (II), m es 1.

25

En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula (II), p es 1, 2 o 3.

30

En algunas realizaciones descritas arriba o abajo de un compuesto de Fórmula (II), p es 1.

30

En algunas realizaciones descritas arriba o abajo de un compuesto de Fórmula (II), R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno.

35

También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (II) o como se describe anteriormente y a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, profármaco, metabolito, N-óxido, estereoisómero o isómero del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40

Además, se divulgan en la presente, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, sistemas basados en imágenes para identificar inhibidores de fibrosis. El sistema puede comprender (a) uno o más fibroblastos; y (b) un dispositivo de obtención de imágenes celulares para producir una o más imágenes del uno o más fibroblastos. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender un microscopio fluorescente. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender tecnología de cámara CCD. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede estar automatizado. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede manejarse manualmente. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede enfriarse termoeléctricamente.

45

El sistema puede comprender además una fuente de luz. La fuente de luz puede ser un LED.

50

El sistema puede comprender además un escáner.

50

El sistema puede comprender además una computadora.

55

El sistema puede comprender además una o más ubicaciones de memoria para almacenar y/o recibir una o más imágenes. El sistema puede comprender además una o más ubicaciones de memoria para almacenar y/o recibir una o más instrucciones para producir una o más imágenes.

60

El sistema puede comprender además uno o más procesadores para analizar uno o más imágenes del uno o más fibroblastos. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para procesar la una o más imágenes de uno o más fibroblastos. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para transmitir la una o más imágenes de uno o más fibroblastos.

El sistema puede comprender además uno o más programas de software para capturar, producir, analizar, escanear, almacenar y/o transmitir una o más imágenes.

El sistema puede comprender además uno o más lectores de códigos de barras para leer uno o más códigos de barras en una o más muestras que comprenden una o más celdas.

5 El sistema puede comprender además uno o más robots para manejar una o más muestras que comprende una o más células. El sistema puede comprender además uno o más robots para tratar una o más muestras que comprenden una o más células con uno o más agentes.

10 Los uno o más agentes pueden comprender TGF-beta. Los uno o más agentes pueden comprender uno o más agentes de prueba.

15 El sistema puede comprender además uno o más procesadores para identificar el uno o más agentes de ensayo como inhibidores de la fibrosis. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para clasificar los inhibidores de la fibrosis.

20 15 El sistema puede comprender además uno o más algoritmos. En algunas realizaciones, el uno o más algoritmos analizan una morfología del uno o más fibroblastos. Los uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos contactados con el uno o más agentes. En algunas realizaciones, el uno o más algoritmos analizan una intensidad del uno o más fibroblastos. Los uno o más algoritmos pueden analizar una intensidad de fluorescencia del uno o más fibroblastos.

25 20 El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender una plataforma de CellInsight NXT High Content Screening (HCS).

25 25 Los uno o más fibroblastos son células estrelladas hepáticas (HSC).

30 30 En la presente se divultan además, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, métodos para identificar inhibidores de fibrosis. El método puede comprender (a) poner en contacto una primera muestra que comprende uno o más fibroblastos con un agente de crecimiento celular; (b) poner en contacto una segunda muestra que comprende uno o más fibroblastos con el agente de crecimiento celular y un primer agente de prueba; (c) producir una o más imágenes del uno o más fibroblastos de la primera muestra y una o más imágenes del uno o más fibroblastos de la segunda muestra; y (d) determinar si el primer agente de prueba es un inhibidor de la fibrosis basado en un análisis de una o más imágenes de la primera muestra y una o más imágenes de la segunda muestra.

35 35 El agente de crecimiento celular puede ser un factor de crecimiento. El agente de crecimiento celular puede ser el factor de crecimiento transformante beta (TGF-b).

40 40 El primer agente de prueba puede ser una molécula pequeña. El primer agente de prueba puede ser una molécula pequeña bioactiva.

45 45 La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular y el primer agente de prueba simultáneamente. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular y el primer agente de prueba secuencialmente. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular antes del contacto con el primer agente de prueba. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el primer agente de prueba antes del contacto con el agente de crecimiento celular.

50 50 El método puede comprender además una o más muestras adicionales que comprenden uno o más fibroblastos. La primera muestra, la segunda muestra y/o una o más muestras adicionales pueden ser de la misma fuente. La primera muestra, la segunda muestra y/o una o más muestras adicionales pueden ser de dos o más fuentes diferentes.

55 55 El método puede comprender además poner en contacto las una o más muestras adicionales con el agente de crecimiento celular y uno o más agentes de prueba adicionales.

60 55 La una o más imágenes de la primera muestra y la una o más imágenes de la segunda muestra pueden capturarse simultáneamente. La una o más imágenes de la primera muestra y la una o más imágenes de la segunda muestra pueden capturarse secuencialmente.

65 60 El uno o más fibroblastos de la primera muestra pueden cultivarse en uno o más pocillos en una primera placa de cultivo. El uno o más fibroblastos de la segunda muestra pueden cultivarse en uno o más pocillos en una segunda placa de cultivo. El uno o más fibroblastos de la una o más muestras adicionales pueden cultivarse en uno o más pocillos en una o más placas de cultivo adicionales.

65 65 La primera placa de cultivo y la segunda placa de cultivo pueden ser diferentes. La primera placa de cultivo, la segunda placa de cultivo y/o la una o más placas de cultivo adicionales pueden ser diferentes.

La primera placa de cultivo y la segunda placa de cultivo pueden ser iguales. La primera placa de cultivo, la segunda placa de cultivo y/o la una o más placas de cultivo adicionales pueden ser iguales.

5 El método puede comprender además poner en contacto el uno o más fibroblastos de la primera muestra y/o el uno o más fibroblastos de la segunda muestra con un tercer agente. El método puede comprender además poner en contacto el uno o más fibroblastos de una o más muestras adicionales con un tercer agente.

10 El tercer agente puede ser un anticuerpo. El tercer agente puede ser un anticuerpo de actina de músculo liso (SMA).

15 La una o más imágenes de la primera muestra y/o la una o más imágenes de la segunda muestra pueden basarse en las imágenes de uno o más fibroblastos contactados con el tercer agente. La una o más imágenes de las una o más muestras adicionales pueden basarse en las imágenes de uno o más fibroblastos contactados con el tercer agente.

20 La producción de las una o más imágenes puede comprender el uso de uno o más dispositivos de obtención de imágenes celulares. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender una plataforma CellInsight NXT High Content Screening (HCS).

25 El método puede comprender además uno o más algoritmos. El uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos. El uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos contactados con el uno o más agentes. Los uno o más algoritmos pueden analizar la intensidad de uno o más fibroblastos. El uno o más algoritmos puede analizar una intensidad de fluorescencia del uno o más fibroblastos.

30 El método puede comprender además detectar la transdiferenciación de uno o más fibroblastos. La transdiferenciación del uno o más fibroblastos puede comprender la transdiferenciación en uno o más miofibroblastos.

35 Determinar si el primer agente de prueba se identifica como un inhibidor de la fibrosis puede basarse en una comparación de la composición de miofibroblastos en la primera muestra con la composición de miofibroblastos en la segunda muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es menor que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 veces menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra.

40 El método puede comprender además determinar si el uno o más agentes de prueba adicionales son inhibidores de la fibrosis. Determinar si el uno o más agentes de prueba adicionales se identifica como un inhibidor de la fibrosis puede basarse en una comparación de la composición de miofibroblastos en la primera muestra con la composición de miofibroblastos en la una o más muestras adicionales. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es menor que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es al menos aproximadamente 1,5, 2-, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 veces menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 **Figura 1** describe un ensayo de formación de imágenes de alto contenido, basado en la tinción de α -SMA y los cambios morfológicos celulares asociados con la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos que se ha establecido usando fibroblastos de pulmón humanos primarios y HSC de roedores primarios. Se han identificado afecciones, que implican la inanición sérica y el posterior tratamiento con TGF- β , que facilitan la transdiferenciación *in vitro* robusta en un formato miniaturizado (placa de 384 pocillos) que es susceptible de detección de moléculas pequeñas de alto rendimiento. Se utiliza un inhibidor selectivo del receptor ALK-5 TGF-B1(SB-431542) como control positivo.

60 **Figura 2** describe el itraconazol que inhibe la diferenciación de miofibroblastos en múltiples tipos de células *in vitro*. Las preparaciones de fibroblastos primarios cardíacos, pulmonares o dérmicos y HSC se probaron para la capacidad de respuesta a TCF β . Las células se analizaron para la morfología de miofibroblastos mediante tinción de actina de músculo liso. Inhibidor de ALK5 (SB-431542) utilizado como control positivo. El itraconazol (Itra, 2,5 μ m) inhibe la diferenciación de miofibroblastos en fibroblastos derivados de pulmón, corazón, piel o hígado (HSC).

Figura 3 describe el itraconazol que inhibe la diferenciación de miofibroblastos en múltiples tipos de células in vitro. Las preparaciones de fibroblastos primarios cardíacos, pulmonares o dérmicos y HSC se probaron para la capacidad de respuesta a TCFB. Análisis de qRT-PCR y análisis de transferencia Western de múltiples genes relacionados con la fibrosis utilizados para confirmar la actividad in vitro. Los estudios farmacológicos apoyan la doble inhibición de MOA (VEGF, señalización Hh).

Figura 4 muestra la eficacia de Itraconazol en estudios de PoC de roedores en modelos de hígado (CC14) y pulmón (bleomicina). Utilizando pirfenidona y AM-152 como puntos de referencia, se demostró que itraconazol tiene una eficacia igual o superior en la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono y en los modelos de ratón de fibrosis cutánea y pulmonar inducida por bleomicina.

Figura 5 muestra los datos obtenidos de un ensayo basado en imágenes de activación de miofibroblastos: (a) análisis de células para el área celular media de tinción de SMA; (b) análisis de células para la intensidad de fluorescencia media de la tinción de SMA.

Figura 6 muestra análisis de transferencia Western de proteínas relacionadas con fibrosis en células expuestas a TGF β e itraconazol.

Figura 7 muestra el análisis de expresión génica de fibroblastos de pulmón humano tratados con itraconazol: (a) análisis de datos expresados como regulación de pliegue en relación con una muestra no tratada con TGF-B1; (b) datos brutos de la matriz de PCR RT2 Profiler centrada en fibrosis.

Figura 8 muestra el análisis qPCR de genes relacionados con Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata tratadas con itraconazol: (a) niveles relativos de ARNm de PTCH1; (b) niveles relativos de ARNm de GLI1; (c) datos en bruto para ambos experimentos qPCR.

Figura 9 muestra análisis de transferencia Western de HSC COL1-GFP después de la eliminación de Smoothened.

Figura 10 muestra el análisis de transferencia Western del patrón de migración de VEGFR2 después del tratamiento con itraconazol.

Figura 11 muestra el análisis de transferencia Western de células estrelladas hepáticas de rata tratadas con combinaciones de compuestos inhibidores de VEGFR y Hedgehog.

Figura 12 muestra la actividad de itraconazol y el compuesto 42 en un ensayo indicador de hedgehog: (a) actividad relativa de GLI-LUC de células TM3-GLI-LUC expuestas a SAG 10 nM y dosis indicadas de inhibidor; (b) actividad relativa de GLI-LUC de células TM3-GLI-LUC expuestas a SAG 400 nM y dosis indicadas de inhibidor.

Figura 13 muestra análisis de transferencia Western de células estrelladas hepáticas humanas LX2 después de la eliminación de VEGFR1, VEGFR2 o SMO.

Figura 14 muestra el diseño del estudio modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina para la evaluación del compuesto 42 e itraconazol.

Figura 15 muestra la evaluación del compuesto 42 e itraconazol en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina: (a) puntuaciones medias de Ashcroft de ratones expuestos a bleomicina y las dosis indicadas de fármaco; (b) representación gráfica del modelo utilizado para evaluar fármacos antifibróticos; (c) imágenes representativas del pulmón teñido con tricromo de Masson de los grupos de tratamiento indicados.

Figura 16 muestra la caracterización del sistema de puntuación Ashcroft modificado.

Figura 17 muestra la cuantificación de los datos histológicos de la evaluación del compuesto 42 e itraconazol en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina: (a) puntajes medios de Ashcroft; (b) valores medios de área manchada porcentual.

Figura 18 muestra el diseño del estudio modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono para la evaluación del compuesto 42 e itraconazol.

Figura 19 muestra la evaluación del compuesto 42 y el itraconazol en el modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono: (a) porcentaje total de área positiva para tinción con rojo Sirius; (b) datos numéricos del análisis de imagen del modelo de fibrosis hepática inducida por CCl4; (c) imágenes representativas de secciones de hígado teñidas con rojo Sirius del modelo de fibrosis hepática inducida por CCl4; (d) análisis de transferencia western.

Figura 20 muestra el diseño del estudio del modelo de curación de heridas de roedores para la evaluación del compuesto 42 e itraconazol.

Figura 21 muestra los resultados del estudio de la evaluación del compuesto 42 e itraconazol en el modelo de curación de heridas de roedores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La fibrosis representa un problema de salud críticamente importante pero sorprendentemente descuidado. Casi el 45% de todas las muertes naturales en el mundo occidental se atribuyen a enfermedades fibroproliferativas crónicas. Sin embargo, actualmente solo hay un fármaco clínicamente aprobado (pirfenidona) que se dirige específicamente a la patogénesis de la fibrosis y está directamente indicado para el tratamiento de una enfermedad fibrótica. La fibrosis afecta a casi todos los tejidos del cuerpo y, cuando es muy progresiva, puede provocar un mal funcionamiento de los órganos y la muerte. Claramente, la identificación de nuevos fármacos antifibróticos representa una necesidad médica insatisfecha que tendría un impacto beneficioso significativo en pacientes de múltiples poblaciones de enfermedades. Además, en la actualidad no existe cura para la esclerodermia y el tratamiento se limita al manejo de los síntomas.

La fibrosis, generalmente definida como la producción de cantidades excesivas de tejido conectivo, se

desarrolla como consecuencia de diversas enfermedades subyacentes. La inflamación crónica o el daño/remodelación de los tejidos son eventos inductores de fibrosis típicos. La fibrosis afecta a casi todos los tejidos del cuerpo y, cuando es muy progresiva, puede provocar un mal funcionamiento de los órganos y la muerte. Ejemplos específicos de enfermedades incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI); fibrosis hepática asociada con las últimas etapas de la cirrosis hepática alcohólica y no alcohólica; fibrosis renal; fibrosis cardiaca; y formación de queloídes como resultado de la curación anormal de la herida. Además, la fibrosis es una característica patológica clave asociada con enfermedades autoinmunes crónicas, que incluyen artritis reumatoide, esclerodermia, enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico. Como tal, la fibrosis representa un problema de salud críticamente importante pero sorprendentemente descuidado. De hecho, casi el 45% de todas las muertes naturales en el mundo occidental se atribuyen a enfermedades fibroproliferativas crónicas. Sin embargo, en la actualidad, solo hay un fármaco clínicamente aprobado (Pirfenidona, aprobado para el tratamiento de la FPI solo en Europa) que se dirige específicamente a la patogénesis de la fibrosis y está directamente indicado para el tratamiento de una enfermedad fibrótica. Desafortunadamente, la pirfenidona tiene efectos secundarios hepáticos y gastrointestinales significativos, y se recomienda a los pacientes tratados con pirfenidona que eviten la exposición directa a la luz solar, ya que se sabe que causa reacciones de fotosensibilidad que provocan erupción cutánea, piel seca o prurito. Recientemente, se ha demostrado que los antagonistas del ácido lisofosfatídico 1 (LPA1) (p. ej., AM-152) son eficaces en modelos preclínicos de IPF. Sin embargo, la eficacia clínica queda por demostrar para AM-152. Claramente, la identificación de nuevos fármacos antifibróticos representa una importante necesidad médica no satisfecha que tendría un impacto beneficioso significativo en pacientes de múltiples poblaciones de enfermedades.

A pesar de la diversidad de enfermedades y desencadenantes que pueden iniciar un proceso fibrótico en un tejido u órgano dado, se producen mecanismos bioquímicos y celulares comunes en todos los casos estudiados hasta la fecha. Después de una lesión o insulto inflamatorio, fibroblastos residentes (en algunos casos, fibroцитos de circulación derivados de la médula ósea reclutados o células epiteliales que han sido sometidos a una transición epitelio-mesenquimal) son activados y "transdiferenciados" en una actina de músculo α -liso (α -SMA) que expresan miofibroblastos que secretan los componentes de la matriz extracelular (ECM) necesarios para la reparación de heridas. En el caso de la fibrosis hepática, una población de pericitos residente denomina un quiescente de células estrelladas hepáticas (HSC) "transdiferencia" en un colágeno de tipo I la producción de HSC "activados" fibrogénicos expresados por α -SMA. La señalización Smad 3/4 mediada por factor de crecimiento β 1 transformante (TGF-B1) comúnmente impulsa la transdiferenciación de fibroblastos o HSC residentes a miofibroblastos o HSC activados y estimula la producción de componentes de ECM en las últimas poblaciones. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también sirve como una citocina pro-fibrótica común que impulsa la activación y proliferación celular.

Un enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades de fibrosis progresiva es apuntar a una de las multitudes de procesos inmunológicos causales complejos. Este enfoque está limitado por la falta de claridad mecanicista y la posible exacerbación de la enfermedad subyacente. Un enfoque alternativo atractivo para el tratamiento de diversas enfermedades fibróticas es apuntar directamente a la vía de transdiferenciación responsable de la interconversión de fibroblastos quiescentes y miofibroblastos pro-fibróticos activados. Los fármacos capaces de bloquear la conversión de fibroblastos en miofibroblastos activados podrían administrarse profilácticamente después de una lesión o insulto (por ejemplo, infarto de miocardio) o terapéuticamente en las primeras etapas de la enfermedad en órganos capaces de reparación (por ejemplo, fibrosis hepática, FPI o esclerodermia). Los supresores directos de la producción de TGF- β 1 (p. ej., pirfenidona) no son candidatos ideales para la dosificación crónica y son especialmente indeseables para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, ya que tienen el potencial de exacerbar las respuestas autoinmunes. Alternativamente, los medicamentos capaces de inducir la reversión de los miofibroblastos existentes a un destino celular inactivo tendrían una amplia aplicabilidad para el tratamiento de la fibrosis en múltiples tipos de tejidos y podrían ser potencialmente eficaces en las etapas posteriores de la enfermedad.

Se han establecido ensayos de formación de imágenes de alta contenido, utilizando fibroblastos primarios humanos de pulmón y HSCs de roedor primarios, que permiten la identificación de pequeñas moléculas que o bien inhiben la formación de miofibroblastos/activación o inducen la reversión de miofibroblastos activados a un estado de fibroblastos quiescentes. Se han identificado afecciones, que implican la inanición sérica y el posterior tratamiento con TGF- β , que facilitan la transdiferenciación *in vitro* robusta en un formato miniaturizado (placa de 384 pocillos) que es susceptible de detección de moléculas pequeñas de alto rendimiento. El ensayo de inhibición se basa en la tinción inmunofluorescente α -SMA y los cambios en la morfología celular asociados con la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, utilizando el inhibidor selectivo del receptor ALK-5 TGF-B1 (SB-43154) como control positivo, el ensayo de inhibición se ha utilizado para iniciar una pantalla de una colección de ~100,000 moléculas pequeñas que consiste en moléculas pequeñas bioactivas y un conjunto de diversidad que se ha ensamblado en base a la diversidad estructural 2D y 3D y las propiedades inherentes de "similitud de drogas". El cribado preliminar condujo a la identificación de múltiples moléculas antifibróticas previamente identificadas. La mayoría de estos tienen una utilidad clínica limitada, como resultado de problemas conocidos de toxicidad fuera del objetivo o falta demostrada de eficacia *in vivo*. Sin embargo, además de estos, el agente antifúngico triazol Itraconazol se identificó como un inhibidor altamente eficaz de la formación de miofibroblastos (a dosis muy inferiores a las asociadas con toxicidad en fibroblastos u otros tipos de células de control).

La actividad de itraconazol se confirmó *in vitro* mediante el análisis de los cambios de expresión en múltiples

genes asociados con fibroblastos a miofibroblastos transdiferenciación usando métodos bioquímicos (es decir, transferencia Western y RT-PCR). Utilizando métodos farmacológicos, la base mechanista de la actividad antifibrótica de esta molécula se ha establecido como la doble inhibición de la señalización de hedgehog y la glicosilación/tráfico del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) (ninguna actividad por sí sola es suficiente). De manera alentadora, se estableció que la actividad de Itraconazol se traduce tanto en tipos de células humanas como de roedores, así como en células derivadas de múltiples tipos de tejidos (p. ej., pulmón, hígado, piel, corazón). Utilizando pirenidona y AM-152 como compuestos de control de referencia, se demostró que el itraconazol tiene eficacia en modelos de ratón de fibrosis hepática inducida por bleomicina y pulmón inducido por tetracloruro de carbono. Como tal, el fármaco aprobado por la FDA Itraconazol se ha identificado como un novedoso avance para el desarrollo de una nueva clase de medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la fibrosis múltiple.

Una posible limitación al uso de este fármaco como antifibrótico, especialmente para el tratamiento de la fibrosis hepática, es un perfil de toxicidad hepática conocido que está asociado con la coordinación de hierro hemo por N4 del resto 1,2,4 triazol, que conduce a la inhibición de las enzimas P450 (más notablemente Cyp3A4), una actividad distinta de la actividad VEGF y Hgh del itraconazol. Como tal, se han iniciado esfuerzos de química medicinal para identificar análogos de itraconazol optimizados con perfiles de toxicidad hepática favorables y mejoras adicionales en la eficacia antifibrótica. Desde un panel inicial de <30 análogos de itraconazol, en el que el *pKa* de N4 se reduce o el nitrógeno N4 se sustituye con carbono, se han identificado varios cables candidatos en los que se elimina la actividad de inhibición de Cyp y se retiene la actividad antifibrótica *in vitro*. En particular, las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos son comparables a las del compuesto original. Con base en la actividad *in vitro* observada, la eficacia *in vivo*, la exposición al suero de roedores y los datos de exposición humana, se anticipa que es deseable una mejora de 5 veces en la eficacia y/o exposición para el candidato clínico final. Un estudio preliminar de la relación de la actividad de la estructura ha revelado que se puede lograr una mejora de la potencia haciendo modificaciones en los sitios distales al sustituyente de triazol. Los esfuerzos de la química están en curso y se utilizarán para optimizar la eficacia, la exposición ($C_{max} > 5$ veces CE_{50} *in vitro*) y los perfiles de toxicidad (basados en perfiles de panel humano fuera del objetivo, ensayos de toxicidad *in vitro* hERG y AMES e inducción de Cyp/ensayos de inhibición). Se demostrará una actividad de modificación de la enfermedad reproducible, es decir, una eficacia igual o mayor que la de los estándares de atención existentes (pirfenidona) o potenciales futuros (AM-152), para un análogo optimizado de Itraconazol, utilizando modelos de fibrosis de roedores pulmonares y hepáticos.

Definiciones

En la siguiente descripción, se exponen ciertos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión exhaustiva de diversas realizaciones. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que la invención se puede practicar sin estos detalles. En otros casos, no se han mostrado ni descrito en detalle estructuras bien conocidas para evitar oscurecer innecesariamente las descripciones de las realizaciones. A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la especificación y las reivindicaciones que siguen, la palabra "comprende" y sus variaciones, como "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "incluyendo, pero no limitado a". Además, los títulos proporcionados aquí son solo para conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de la invención reivindicada.

La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "realización" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización. Por lo tanto, las apariencias de las frases "en una realización" o "en realizaciones" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. Además, como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También debe tenerse en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido, incluyendo "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Los términos de abajo, como se usa en este documento, tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

- 55 "Amino" se refiere al radical -NH₂.
- "Ciano" o "nitrilo" se refiere al radical -CN.
- "Hidroxilo" o "hidroxilo" se refiere al radical -OH.
- "Nitro" se refiere a la -NO₂ radical.
- 60 "Oxo" se refiere al sustituyente = O.
- "Oxima" se refiere al sustituyente = N-OH.
- "Tioxo" se refiere al sustituyente = S.

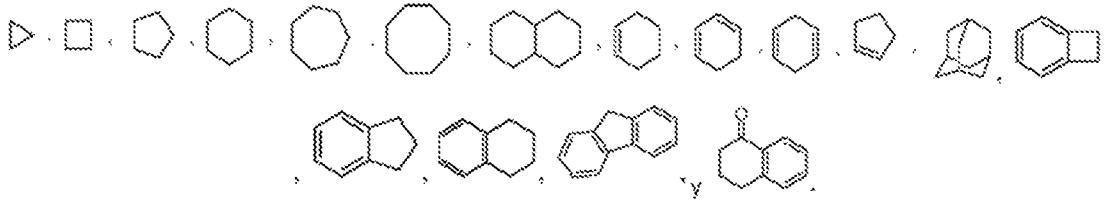
"Alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, tiene de uno a treinta átomos de carbono y está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Se incluyen alquilos que comprenden cualquier

número de átomos de carbono de 1 a 30. Un alquilo que comprende hasta 30 átomos de carbono se refiere como un C₁-C₃₀ alquilo, del mismo modo, por ejemplo, un alquilo que comprende hasta 12 átomos de carbono es un C₁-C₁₂ alquilo. Los alquilos (y otros restos definidos aquí) que comprenden otros números de átomos de carbono se representan de manera similar. Los grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, C₁-C₃₀ alquilo, C₁-C₂₀ alquilo, C₁-C₁₅ alquilo, C₁-C₁₀ alquilo, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₄ alquilo, C₁-C₃ alquilo, C₁-C₂ alquilo, C₂-C₈ alquilo, C₃-C₈ alquilo y C₄-C₈ alquilo. Los grupos alquilo representativos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (iso-propilo), n-butilo, i-butilo, s-butilo, n-pentil, 1,1-dimetiletilo (t-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, vinilo, alilo y propinilo. Las insaturaciones que comprenden alquilo incluyen grupos alquenilo y alquinilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación. "Alquieno" o "cadena de alquieno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada, como se describió anteriormente para alquilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquieno puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR_a donde R_a es un radical alquilo como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático. El radical arilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo condensados o puenteados. Los radicales arilo incluyen, pero no se limitan a, radicales arilo derivados de los sistemas de anillo de hidrocarburo de aceantríleno, acenaftíleno, acentaantíleno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, fenileno, fenantreno, pleiadeno, pireno y trifenileno. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (como en "aralquilo") incluye radicales arilo que están opcionalmente sustituidos.

"Cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados o puenteados, que están saturados o insaturados. Los cicloalquilos o carbociclos representativos incluyen, pero no se limitan a, cicloalquilos que tienen de tres a quince átomos de carbono, de tres a diez átomos de carbono, de tres a ocho átomos de carbono, de tres a seis átomos de carbono, de tres a cinco átomos de carbono, o tres a cuatro átomos de carbono. Los cicloalquilos o carbociclos monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los cicloalquilos o carbociclos policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantilo, norbornilo, decalinilo, biciclo[3,3,0]octano, biciclo[4,3,0]nonano, cis-decalina, trans-decalina, biciclo[2,1,1]hexano, biciclo[2,2,1]heptano, biciclo[2,2,2]octano, biciclo[3,2,2]nonano y biciclo[3,3,2]decano, y 7,7-dimetil-biciclo[2,2,1]heptanilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo cicloalquilo o carbociclo puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes restos:



"Fusionado" se refiere a cualquier estructura de anillo descrita en el presente documento que se fusiona a una existente estructura de anillo. Cuando el anillo fusionado es un anillo heterocíclico o un anillo heteroarilo, cualquier átomo de carbono en la estructura de anillo existente que se convierte en parte del anillo heterocíclico fusionado o el anillo heteroarilo fusionado puede reemplazarse con un átomo de nitrógeno.

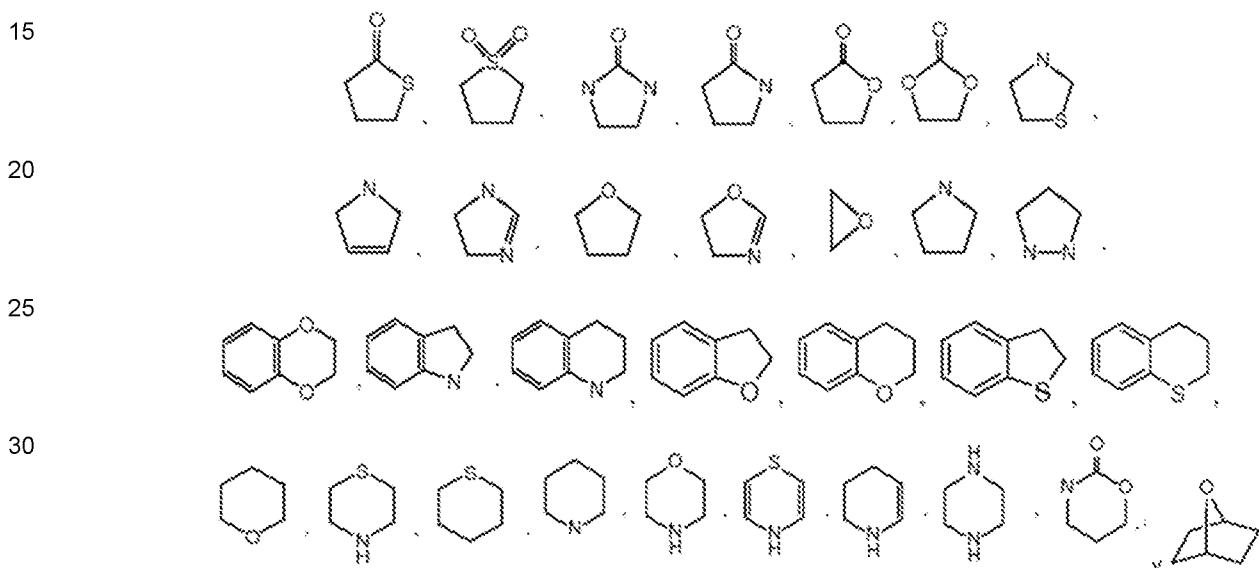
"Halo" o "halógeno" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo.

"Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se definió anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se definió anteriormente, e. g., trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 3 -bromo-2-fluoropropilo y 1,2-dibromoetilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo haloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

"Haloalcoxi" se refiere de manera similar a un radical de la fórmula -OR_a donde R_a es un radical haloalquilo como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo haloalcoxi puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Heterocicloalquilo" o "heterociclico" o "anillo heterocíclico" o "heterociclo" se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A menos que se especifique lo contrario

específicamente en la especificación, el radical heterocíclico puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo condensados o puenteados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterocíclico pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterocíclico puede estar parcial o totalmente saturado. Ejemplos de tales radicales heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, azetidinilo, dioxolanilo, tienilo[1,3]ditianilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, quinuclidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofurilo, tritianilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiamorfolinilo, 1-oxotiomorfolinilo, 1,1-dioxo-tiomorfolinilo, 12-corona-4,15-corona-5,18-corona-6,21-corona-7, aza-18-corona-6, diaza-18-corona-6, aza-21-corona-7 y diaza-21-corona-7. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos ilustrativos de grupos heterocicloalquilo, también conocidos como heterociclos no aromáticos, incluyen:

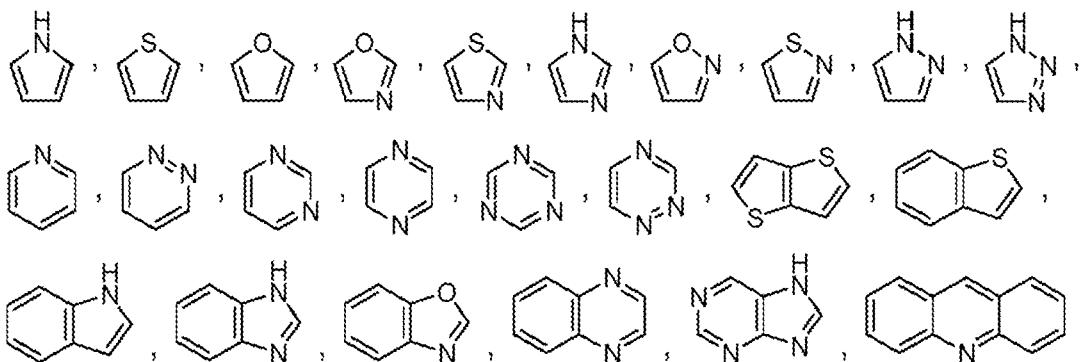


El término heterocicloalquilo también incluye todas las formas de anillo de los carbohidratos, incluidos, entre otros, osacáridos, los disacáridos y los oligosacáridos. A menos que se indique lo contrario, los heterocicloalquilos tienen de 2 a 10 carbonos en el anillo. Se entiende que cuando se refiere al número de átomos de carbono en un heterocicloalquilo, el número de átomos de carbono en el heterocicloalquilo no es el mismo que el número total de átomos (incluidos los heteroátomos) que forman el heterocicloalquilo (es decir, los átomos esqueléticos del anillo heterocicloalquilo). A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo heterocicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

El término "heteroarilo" como se usa en el presente documento, solo o en combinación, se refiere a opcionalmente sustituido monorradicales aromáticos que contienen de aproximadamente cinco a aproximadamente veinte átomos en el anillo del esqueleto, donde uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, selenio y estaño, pero no se limitan a estos átomos y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos de O o S adyacentes. En realizaciones en las que dos o más heteroátomos están presentes en el anillo, los dos o más heteroátomos pueden ser iguales entre sí, o algunos o todos los dos o más heteroátomos pueden ser diferentes de los demás. El término heteroarilo incluye radicales heteroarilo condensados y no condensados opcionalmente sustituidos que tienen al menos un heteroátomo. El término heteroarilo también incluye heteroarilos condensados y no condensados que tienen de cinco a aproximadamente doce átomos de anillo esquelético, así como aquellos que tienen de cinco a aproximadamente diez átomos de anillo esquelético. La unión a un grupo heteroarilo puede ser a través de un átomo de carbono o un heteroátomo. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, un grupo imidazol puede unirse a una molécula original a través de cualquiera de sus átomos de carbono (imidazol-2-ilo, imidazol-4-ilo o imidazol-5-ilo), o sus átomos de nitrógeno (imidazol-1-ilo o imidazol-3-ilo). Del mismo modo, un grupo heteroarilo puede estar adicionalmente sustituido mediante cualquiera o todos sus átomos de carbono, y/o cualquiera o todos sus heteroátomos. Un radical heteroarilo fusionado puede contener de dos a cuatro anillos fusionados donde el anillo de unión es un anillo heteroaromático y los otros anillos individuales pueden ser alicíclicos, heterocíclicos, aromáticos, heteroaromáticos o cualquier combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un grupo heteroarilo de anillo único incluye piridilo; los grupos heteroarilo de anillo condensado incluyen bencimidazolilo, quinolinilo, acridinilo; y un grupo bi-heteroarilo no fusionado incluye bipiridinilo. Otros ejemplos de heteroarilos incluyen, sin limitación, furanilo, tienilo, oxazolilo, acridinilo, fenazinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazol, benzotiofenilo, benzoxadiazolilo, benzotriazolilo, imidazolilo, indolilo, isoxazolilo, isoquinolinilo, indolizinilo, isotiazolilo,

isoindoliloxadiazolilo, indazolilo, piridilo, piridazilo, pirimidilo, pirazinilo, pirrolilo, pirazinilo, pirazolilo, purinilo, ftalazinilo, pteridinilo, quinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, triazinilo, y tiadiazolilo, y sus óxidos, tales como, por ejemplo, piridilo-N-óxido. Los ejemplos ilustrativos de grupos heteroarilo incluyen los siguientes restos:

5



El radical heteroarilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo condensados o puenteados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heteroarilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzindolilo, benzodioxolilo, benzofuranilo, benzooxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonaftofuranilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinolinilo, dibenzofuranilo, dibenzotienilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizinilo, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxiranilo, 1-oxidopiridinilo, 1-oxidopirimidinilo, 1-oxidopirazinilo, 1-oxidopiridazinilo, 1-fenilo-1H-pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinuclidinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo y tienilo (*i. e.*, tienilo).

Todos los grupos anteriores pueden estar sustituidos o no sustituidos. El término "sustituido" como se usa en el presente documento significa que cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo, alquilo, alquileno, alcoxi, arilo, cicloalquilo, haloalquilo, heterociclico y/o heteroarilo) puede funcionalizarse adicionalmente en donde al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado por un enlace a un sustituyente de átomo no de hidrógeno. A menos que se indique específicamente en la especificación, un grupo sustituido puede incluir uno o más sustituyentes seleccionados entre: oxo, amino, $-CO_2H$, nitrilo, nitro, hidroxilo, tioxi, alquilo, alquileno, alcoxi, arilo, cicloalquilo, heterociclico, heteroarilo, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, trialquilamonio ($-N^+R^3$), N-óxidos, imidas y enaminas; un átomo de silicio en grupos tales como grupos trialquilsililo, grupos dialquilalarilsililo, grupos alquildiarilsililo, grupos triarilsililo, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi, por ejemplo, trifluorometilo o trifluorometoxi. "Sustituido" también significa cualquiera de los anteriores grupos en los que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por un enlace de orden superior (*p. ej.*, un doble o triple enlace) a un heteroátomo tal como oxígeno en oxo, carbonilo, grupos carboxilo y éster; y nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Por ejemplo, "sustituido" incluye cualquiera de los grupos anteriores en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan con $-NH_2$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NrgSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $=NSO_2R_g$, y $-SO_2NR_gR_h$. En lo anterior, R_g y R_h son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, tioalquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, haloalquilo, heterociclico, *N*-heterociclico, heterocicliclalquilo, heteroarilo, *N*-heteroarilo y *N*-heteroarilo/o heteroarilalquilo. Además, cada uno de los sustituyentes anteriores también puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los sustituyentes anteriores. Además, cualquiera de los grupos anteriores puede sustituirse para incluir uno o más átomos internos de oxígeno, azufre o nitrógeno. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de oxígeno internos para formar un grupo éter o poliéter. De manera similar, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de azufre internos para formar un tioéter, disulfuro, etc.

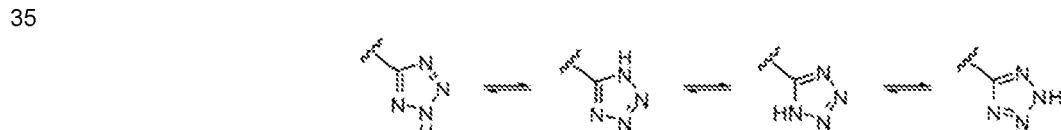
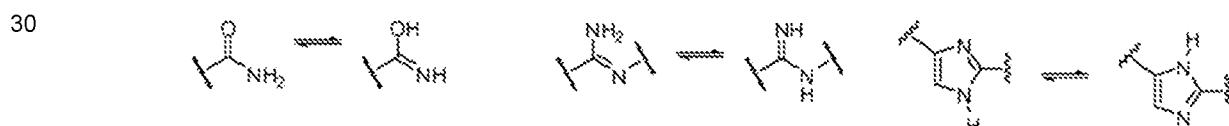
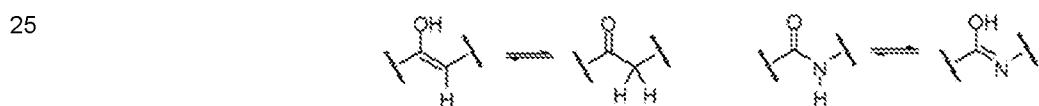
El término "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia posteriormente descrita puede o no ocurrir, y que la descripción incluye instancias donde dicho evento o circunstancia ocurre e instancias en las que no ocurre. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" significa "alquilo" o "alquilo sustituido" como se definió anteriormente. Además, un grupo opcionalmente sustituido puede estar sin sustituir (por ejemplo, -CH₂CH₃), completamente sustituido (por ejemplo, -CF₂CF₃), monosustituido (por ejemplo, -CH₂CH₂F) o sustituido en un nivel en cualquier lugar entre completamente sustituido y monosustituido (por ejemplo, -CH₂CHF₂, -CH₂CF₃, -CF₂CH₃, -CFHCHF₂, etc.). Los expertos en la materia entenderán con respecto a cualquier grupo que contenga uno o más sustituyentes que dichos grupos no pretenden introducir ningún patrón de sustitución o sustitución (por ejemplo, alquilo sustituido incluye grupos cicloalquilo opcionalmente sustituidos, que a su vez se definen como incluyendo grupos

alquilo opcionalmente sustituidos, potencialmente ad infinitum) que son estéricamente poco prácticos y/o sintéticamente no viables. Por lo tanto, cualquier sustituyente descrito debe entenderse generalmente que tiene un peso molecular máximo de aproximadamente 1.000 daltons, y más típicamente, hasta aproximadamente 500 daltons.

5 Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto administrado a un sujeto mamífero, ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado.

10 El "tratamiento" de un individuo (por ejemplo, un mamífero, como un humano) o una célula es cualquier tipo de intervención utilizada en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye la administración de una composición farmacéutica, posterior al inicio de un evento patológico o contacto con un agente etiológico e incluye la estabilización de la afección (por ejemplo, la afección no empeora) o el alivio de la afección. En otras realizaciones, el tratamiento también incluye tratamiento profiláctico (por ejemplo, la administración de una composición descrita aquí cuando se sospecha que un individuo padece una infección bacteriana).

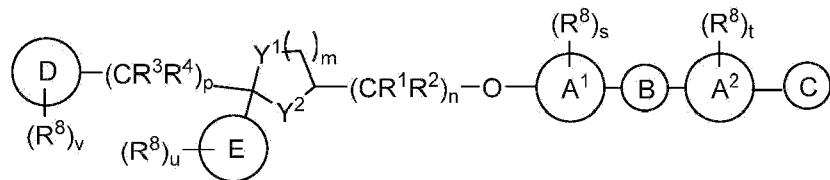
15 Un "tautómero" se refiere a un cambio de protones de un átomo de una molécula a otro átomo de la misma molécula. Los compuestos presentados aquí pueden existir como tautómeros. Los tautómeros son compuestos que son interconvertibles por la migración de un átomo de hidrógeno, acompañados por un interruptor de un enlace simple y un enlace doble adyacente. En los arreglos de unión donde es posible la tautomerización, existirá un equilibrio químico de los tautómeros. Se contemplan todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos aquí. La proporción exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluidos la temperatura, el disolvente y el pH. Algunos ejemplos de interconversiones tautoméricas incluyen:



40 Un "metabolito" de un compuesto descrito en este documento es un derivado de ese compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolizado", como se usa en el presente documento, se refiere a la suma de los procesos (que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas, tales como reacciones de oxidación) por las cuales un organismo cambia una sustancia particular. Por lo tanto, las enzimas pueden producir alteraciones estructurales específicas en un compuesto. Por ejemplo, el citocromo P450 cataliza una variedad de reacciones oxidativas y reductoras, mientras que las transferasas de uridina difosfato glucurónil catalizan la transferencia de una molécula de ácido glucurónico activada a alcoholes aromáticos, alcoholes alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas y grupos sulfhidrilo libres. Se puede obtener más información sobre el metabolismo en The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición, McGraw-Hill (1996). Los metabolitos de los compuestos descritos en este documento pueden identificarse mediante la administración de compuestos a un huésped y el análisis de muestras de tejido del huésped, o mediante la incubación de compuestos con células hepáticas *in vitro* y el análisis de los compuestos resultantes. Ambos métodos son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los metabolitos de un compuesto se forman mediante procesos oxidativos y corresponden al correspondiente compuesto que contiene hidroxi. En algunas realizaciones, un compuesto se metaboliza a metabolitos farmacológicamente activos.

Compuestos

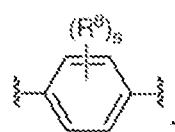
60 La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo:



10 Formula (I)

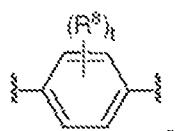
para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, en donde:

15 A¹ es



20

A² es



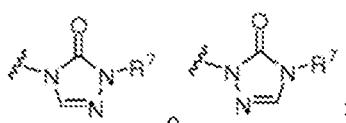
30

o piridina;
B es



35

C es



40

D es arilo o heteroarilo;
E es arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico o alquilo;
cada R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, haloalquilo o alcoxi;
R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno(NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquileno(cicloalquilo), o -alquileno(heterociclico);
cada R⁸ se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, heterociclico, halo, hidroxi, nitrilo, azido, nitro, alcoxi, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno(NR¹³R¹⁴), -alquileno(cicloalquilo), -alquileno(heterociclico), arilo, heteroarilo, -SR¹³, -SOR¹³, -SO₂R¹³, -SO₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³SO₂R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹³R¹⁴; o dos R⁸ adyacentes forman un anillo heterociclico;
cada R¹³ y R¹⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, heterociclico, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo y heteroarilo; o R¹³ y R¹⁴ tomados juntos forman un heterociclo con los átomos a los que están unidos;
Y¹ e Y² son O;
n es 1 o 2;
m es 1 o 2;
p es 1, 2, 3 o 4;
s es 0 o 1;
t es 0 o 1;
u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y
v es 0, 1, 2, 3 o 4;
y en donde

"alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo;
 5 "alquieno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada, como se describe para alquilo;
 "alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical alquilo como se define anteriormente;
 "arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a
 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático;
 "cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico que tiene de tres a quince átomos de carbono, que pueden incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que están saturados o insaturados;
 10 "halo" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo;
 "haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se definió anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se definió anteriormente;
 "haloalcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical haloalquilo como se definió anteriormente;
 15 "heterocicloalquilo" o "heterociclico" o "heterociclo" se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre
 "heterocicloalquilo" también incluye todas las formas de anillo de los carbohidratos, incluidos, entre otros, los monosacáridos, los disacáridos y los oligosacáridos, y tiene de 2 a 10 carbonos en el anillo;
 20 "heteroarilo" se refiere a un monorradical aromático que contiene de cinco a veinte átomos del anillo esquelético, donde uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, selenio y estaño, pero no limitado a estos átomos y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos O o S adyacentes.

25 Además, se proporciona en la presente un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática que lo necesita, el método comprendiendo administrar al sujeto un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones. La fibrosis hepática puede ser fibrosis pulmonar idiopática.

30 Preparación de compuestos

En este documento se describen compuestos que tratan fibrosis, un trastorno caracterizado por fibrosis o una enfermedad caracterizada por fibrosis, y procesos para su preparación. También se describen en el presente documento sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente activos y profármacos farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de tales compuestos o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo o profármaco farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Los compuestos de la Fórmula (I) o la Fórmula (II) se pueden sintetizar usando reacciones de síntesis estándar conocidos por los expertos en la técnica o utilizando métodos conocidos en la técnica. Las reacciones pueden emplearse en una secuencia lineal para proporcionar los compuestos o pueden usarse para sintetizar fragmentos que posteriormente se unen mediante los métodos conocidos en la técnica.

45 El material de partida utilizado para la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento puede sintetizarse o puede obtenerse de fuentes comerciales, tales como, pero sin limitación, Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin), Bachem (Torrance, California) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri). Los compuestos descritos en el presente documento y otros compuestos relacionados que tienen diferentes sustituyentes pueden sintetizarse usando técnicas y materiales conocidos por los expertos en la técnica, como los descritos, por ejemplo, en marzo, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 4^a edición (Wiley 1992); Carey y Sundberg, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY 4^a Ed., Vols. A y B (Plenum 2000, 2001); Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS 3^a Ed., (Wiley 1999); Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5 and Supplements (Elsevier Science Publishers, 1989); Organic Reactions, Volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991); y Larock's Comprehensive 50 Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989). Otros métodos para la síntesis de compuestos descritos en este documento se pueden encontrar en la publicación de patente internacional número WO 01/01982901, Arnold et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10 (2000) 2167-2170; Burchat y col. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1687-1690. Los métodos generales para la preparación del compuesto como se describe en el presente documento pueden derivarse de reacciones conocidas en el campo, y las reacciones pueden modificarse mediante el uso de reactivos y condiciones apropiadas, como reconocería el experto, para la introducción de los diversos restos encontrados en las fórmulas como se proporcionan en este documento.

60 Los productos de las reacciones pueden aislarse y purificarse, si se desea, usando técnicas convencionales, que incluyen, pero no se limitan a, filtración, destilación, cristalización y cromatografía. Dichos materiales pueden caracterizarse usando medios convencionales, que incluyen constantes físicas y datos espectrales.

Los compuestos descritos en este documento se pueden preparar como un solo isómero o una mezcla de isómeros.

Formas adicionales de compuestos descritos en este documento

5

Isómeros

Además, en algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento existen como isómeros geométricos. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en este documento poseen uno o más dobles enlaces. Los compuestos presentados en el presente documento incluyen todos los isómeros cis, trans, syn, anti, entgegen (E) y zusammen (Z), así como las mezclas correspondientes de los mismos. En algunas situaciones, los compuestos existen como tautómeros. Los compuestos descritos aquí incluyen todos los tautómeros posibles dentro de las fórmulas descritas aquí. En algunas situaciones, los compuestos descritos en este documento poseen uno o más centros quirales y cada centro existe en la configuración R o confirmación S. Los compuestos descritos en el presente documento incluyen todas las formas diastereoméricas, enantioméricas y epiméricas, así como las mezclas correspondientes de los mismos. En realizaciones adicionales de los compuestos y métodos proporcionados aquí, las mezclas de enantiómeros y/o diastereoisómeros, que resultan de una sola etapa preparativa, combinación o interconversión son útiles para las aplicaciones descritas aquí. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se preparan como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereómeros y recuperando los enantiómeros ópticamente puros. En algunas realizaciones, se prefieren los complejos disociables (por ejemplo, sales diastereoméricas cristalinas). En algunas realizaciones, los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y se separan aprovechando estas diferencias. En algunas realizaciones, los diastereómeros se separan por cromatografía quiral, o preferiblemente, por técnicas de separación/resolución basadas en diferencias en la solubilidad. En algunas realizaciones, el enantiómero ópticamente puro se recupera, junto con el agente de resolución, por cualquier medio práctico que no resulte en racemización.

30

Compuestos marcados

30

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento existen en sus formas marcadas isotópicamente. Los métodos divulgados en el presente documento, pero no reivindicados en las reivindicaciones adjuntas, incluyen métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales compuestos marcados isotópicamente. Los métodos divulgados en el presente documento, pero no reivindicados en las reivindicaciones adjuntas, incluyen métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales compuestos marcados isotópicamente como composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los mencionados aquí, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que generalmente se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloruro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Los compuestos descritos en el presente documento, y los metabolitos, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, profármacos, solvatos, hidratos o derivados de los mismos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de esta invención. Ciertos compuestos marcados isotópicamente, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Los isótopos tritiatos, es decir, ^3H y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos pesados como el deuterio, es decir, ^2H , produce ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos. En algunas realizaciones, los compuestos marcados isotópicamente, sales, ésteres, profármacos, solvatos, hidratos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se preparan por cualquier método adecuado.

55

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en este documento están marcados por otros medios, que incluyen, pero no se limitan a, el uso de cromóforos o restos fluorescentes, marcadores bioluminiscentes o marcadores quimioluminiscentes.

Sales farmacéuticamente aceptables

60

En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí existen como sus sales farmacéuticamente aceptables. Los métodos divulgados en el presente documento, pero no reivindicados en las reivindicaciones adjuntas, incluyen métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales sales farmacéuticamente aceptables. Los métodos divulgados en este documento, pero no reivindicados en las reivindicaciones adjuntas, incluyen métodos para tratar enfermedades mediante la administración de sales farmacéuticamente aceptables como composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en este documento poseen grupos ácidos o básicos y, por lo tanto, reaccionan con cualquiera de una serie de bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, estas sales se preparan *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos de la invención, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado en su forma libre con un ácido o base adecuado, y aislando la sal así formada.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas sales preparadas por reacción de los compuestos descritos en la presente memoria con un mineral, ácido orgánico o base inorgánica, tales sales que incluyen, acetato, acrilato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, bisulfito., bromuro, butirato, butin-1,4-dioato, alcanforato, alcancorsulfonato, caproato, caprilato, clorobenzoato, cloruro, citrato, ciclopentanopropionato, decanoato, digluconato, dihidrogenofosfato, dinitrobenzoato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glutefosfato, gluteroato de fumarato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hexeno-1,6-dioato, hidroxibenzoato, γ -hidroxibutirato, hidrocloruro, bromhidrato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, yoduro, isobutirato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, metadefosfato de mandelato, metanosulfato de metano, metano sulfonato metilbenzoato, monohidrogenofosfato, 1-naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoate, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, pirosulfato, pirofosfato, propiolato, ftalato, fenilacetato, fenilbutirato, propanosulfonato, salicilato, succinato, sulfato, sulfito, succinato, suberato, sebacato, sulfonato, tartrato, tiocianato, undecilato de tosilato y xilenosulfonato.

Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse como sales farmacéuticamente aceptables formadas haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable, que incluye, pero no se limita a, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido metafosfórico; y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido tartárico, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido arilsulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, 4-metilbicielo-[2,2,2]oct-2-eno-1-ácido carboxílico, ácido glucoheptónico, 4,4'-metilenbis-(3-hidroxi-2-eno-1-ácido carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico y ácido mucónico. En algunas realizaciones, otros ácidos, tales como oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables en sí mismos, se emplean en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento que comprenden un grupo ácido libre reaccionan con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato, bicarbonato, sulfato, de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco o con un compuesto orgánico farmacéuticamente aceptable. amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Las sales representativas incluyen las sales alcalinas o alcalinotérreas, como las sales de litio, sodio, potasio, calcio y magnesio y aluminio. Ejemplos ilustrativos de bases incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de colina, carbonato de sodio y N-(C1-4 alquilo)4.

Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina y piperazina. Debe entenderse que los compuestos descritos en el presente documento también incluyen la cuaternización de cualquier grupo básico que contenga nitrógeno que contengan. En algunas realizaciones, se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite por dicha cuaternización.

Solvatos

En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí existen como solvatos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales solvatos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades administrando tales solvatos como composiciones farmacéuticas.

Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente y, en algunas realizaciones, se forman durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua y etanol. Los hidratos se forman cuando el solvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el solvente es alcohol. Los solvatos de los compuestos descritos aquí pueden prepararse o formarse convenientemente durante los procesos descritos aquí. Solo a modo de ejemplo, los hidratos de los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse convenientemente por recristalización a partir de una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos, usando disolventes orgánicos que incluyen, pero no se limitan a, dioxano, tetrahidrofurano o metanol. Además, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas a los efectos de los compuestos y métodos proporcionados en este documento.

Polimorfos

En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí existen como polimorfos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales polimorfos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades administrando tales polimorfos como composiciones farmacéuticas.

Por lo tanto, los compuestos descritos en el presente documento incluyen todas sus formas cristalinas, conocidas como polimorfos. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaque de cristal de la misma composición elemental de un compuesto. En ciertos casos, los polimorfos tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma de cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. En ciertos casos, varios factores, como el disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento, hacen que domine una sola forma de cristal.

15 Profármacos

En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí existen en forma de profármacos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades mediante la administración de tales profármacos. Se divultan pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas métodos para tratar enfermedades administrando tales profármacos como composiciones farmacéuticas.

Los profármacos son generalmente precursores de fármacos que, después de la administración a una absorción individual y posterior, se convierten en una especie activa o más activa a través de algún proceso, tal como la conversión por una vía metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad o alguna otra propiedad al medicamento. Una vez que el grupo químico se ha escindido y/o modificado del profármaco, se genera el fármaco activo. Los profármacos a menudo son útiles porque, en algunas situaciones, son más fáciles de administrar que el fármaco original. Por ejemplo, están biodisponibles por administración oral, mientras que los padres no lo están. En ciertos seguros, el profármaco también tiene una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas sobre el fármaco original. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto como se describe en el presente documento que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que luego se hidroliza metabólicamente al ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Otro ejemplo de un profármaco podría ser un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido donde el péptido se metaboliza para revelar el resto activo. (Véase, por ejemplo, Bundgaard, "Design and Application of Prodrugs" en A Textbook of Drug Design and Development, Krosgaard-Larsen y Bundgaard, Ed., 1991, Capítulo 5, 113-191).

En algunas realizaciones, los profármacos están diseñados como derivados de fármacos reversibles, para uso como modificadores para mejorar el transporte de fármacos a tejidos específicos del sitio. El diseño de profármacos hasta la fecha ha sido aumentar la solubilidad efectiva en agua del compuesto terapéutico para apuntar a regiones donde el agua es el disolvente principal.

Además, los derivados de profármacos de los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse mediante métodos descritos en el presente documento, que de otro modo se conocen en la técnica (para más detalles, véase Saulnier et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1994, 4, 1985). Solo a modo de ejemplo, se pueden preparar profármacos apropiados haciendo reaccionar un compuesto no derivado con un agente de carbamilación adecuado, tal como, pero sin limitación, 1,1-aciloxialquilcarbanocloridato, carbonato de *para*-nitrofenilo, o similares. Las formas de profármaco de los compuestos descritos en el presente documento, en donde el profármaco se metaboliza *in vivo* para producir un derivado como se establece en el presente documento, se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones. De hecho, algunos de los compuestos descritos aquí son profármacos para otro derivado o compuesto activo.

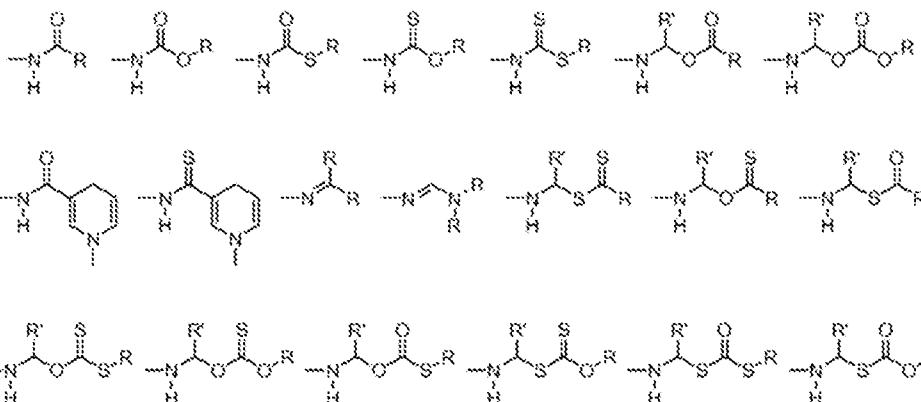
En algunas realizaciones, los profármacos incluyen compuestos en los que un residuo de aminoácido, o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se une covalentemente a través de un enlace amida o éster a un amino libre, grupo hidroxilo o ácido carboxílico. Los residuos de aminoácidos incluyen, entre otros, los 20 aminoácidos naturales y también incluyen 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, cirtulina, homocisteína, homoserina, ornitina y metionina sulfona. En otras realizaciones, los profármacos incluyen compuestos en los que un residuo de ácido nucleico, o un oligonucleótido de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) residuos de ácido nucleico se une covalentemente a un compuesto.

Los profármacos farmacéuticamente aceptables también incluyen, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, tiocarbonatos, derivados de N-acilo, derivados de N-aciloxialquilo, derivados cuaternarios de aminas terciarias, bases de N-Mannich, bases de Schiff, conjugados de aminoácidos, ésteres de fosfato, sales metálicas y ésteres de sulfonato. Los compuestos que tienen grupos amino, amido, hidroxi o carboxílicos libres se pueden convertir en profármacos.

Por ejemplo, los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse como amidas o ésteres de alquilo. En ciertos casos, todos estos restos de profármacos incorporan grupos que incluyen, pero no se limitan a, funcionalidades de éter, amina y ácido carboxílico.

Los profármacos hidroxilados incluyen ésteres, tales como, aunque sin limitación, ésteres de aciloxialquilo (por ejemplo, aciloximetilo, aciloxietilo), ésteres de alcoxcarboniloxialquilo, ésteres de alquilo, ésteres de arilo, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato, ésteres de sulfato y ésteres que contienen disulfuro; éteres, amidas, carbamatos, hemisuccinatos, dimetilaminoacetatos y fosforiloximetiloxicarbonilos, como se esboza en Advanced Drug Delivery Reviews 1996, 19, 115.

amina derivan profármacos incluyen, pero no se limitan a los siguientes grupos y combinaciones de grupos:



así como sulfonamidas y fosfonamidas.

En ciertos casos, los sitios en cualquier porción de anillo aromático son susceptibles a diversas reacciones metabólicas, por lo tanto, la incorporación de sustituyentes apropiados en las estructuras de anillo aromático puede reducir, minimizar o eliminar esta ruta metabólica.

35 Metabolitos

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) o Fórmula (II) son susceptibles a diversas reacciones metabólicas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la incorporación de sustituyentes apropiados en la estructura reducirá, minimizará o eliminará una ruta metabólica. En realizaciones específicas, el sustituyente apropiado para disminuir o eliminar la susceptibilidad de un anillo aromático a reacciones metabólicas es, a modo de ejemplo solamente, un halógeno o un grupo alquilo.

En realizaciones adicionales o adicionales, los compuestos de Fórmula (I) o Fórmula (II) descritos en este documento se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se usa para producir un efecto deseado, que incluye un efecto terapéutico deseado.

Composiciones/formulaciones farmacéuticas

En este documento se proporcionan, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) como se describe aquí, o una sal farmacéuticamente aceptable, polimorfo, solvato, profármaco, N-óxido, estereoisómero, o isómero del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas se formulan de manera convencional usando uno o más ingredientes inactivos farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida. Se puede encontrar un resumen de las composiciones farmacéuticas aquí descritas, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania 1975; Liberman, HA y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Séptima Ed. (Lippincott Williams y Wilkins 1999).

En el presente documento se proporcionan, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) y al menos un ingrediente

inactivo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse como composiciones farmacéuticas en las que un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) se mezcla con otros ingredientes activos, como en la terapia de combinación. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir otros agentes medicinales o farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Una composición farmacéutica, como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla de un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) con otros componentes químicos (es decir, ingredientes inactivos farmacéuticamente aceptables), tales como portadores, excipientes, aglutinantes, agentes de relleno, agentes de suspensión, agentes saborizantes, agentes edulcorantes, agentes desintegrantes, agentes dispersantes, tensioactivos, lubricantes, colorantes, diluyentes, solubilizantes, agentes humectantes, plastificantes, estabilizadores, potenciadores de la penetración, agentes humectantes, agentes antiespumantes, antioxidantes, conservantes, o una o más combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. En la puesta en práctica de los métodos de tratamiento, pero no reivindicados en las reivindicaciones adjuntas, o uso proporcionados en el presente documento, se administran cantidades terapéuticamente efectivas de compuestos descritos en el presente documento en una composición farmacéutica a un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección a tratar. El mamífero puede ser un humano. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado y otros factores. Los compuestos se pueden usar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos como componentes de mezclas.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un sujeto por rutas de administración apropiadas, que incluyen, pero no se limitan a, rutas de administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), intranasal, bucal, tópica, rectal o transdérmica. Las formulaciones farmacéuticas aquí descritas incluyen, entre otras, dispersiones líquidas acuosas, líquidos, geles, jarabes, elixires, lodos, suspensiones, dispersiones autoemulsionantes, soluciones sólidas, dispersiones liposomales, aerosoles, formas farmacéuticas orales sólidas, polvos, inmediato, formulaciones de liberación, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de fusión rápida, tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, grageas, formulaciones efervescentes, formulaciones liofilizadas, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones multiparticuladas y formulaciones mixtas de liberación inmediata y controlada.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) se fabrican de manera convencional, tal como, a modo de ejemplo solamente, mediante mezcla, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsión, procesos de encapsulación, atrapamiento o compresión.

Las composiciones farmacéuticas incluirán al menos un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) como ingrediente activo en forma de ácido libre o base libre, o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable. Además, los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen el uso de *N*-óxidos (si corresponde), formas cristalinas, fases amorfas, así como metabolitos activos de estos compuestos que tienen el mismo tipo de actividad. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento existen en forma no solvatada o en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua y etanol. Las formas solvatadas de los compuestos presentados aquí también se consideran descritas aquí.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se obtienen mezclando uno o más excipientes sólidos con uno o más de los compuestos descritos aquí, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmecelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; u otros tales como: polivinilpirrolidona (PVP o povidona) o fosfato de calcio. Si se desea, se agregan agentes desintegrantes, como la croscarmelosa sódica reticulada, la polivinilpirrolidona, el agar o el ácido algínico o una sal de los mismos, como el alginato de sodio. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se administran por vía oral incluyen cápsulas de gelatina de ajuste a presión, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión contienen los ingredientes activos mezclados con relleno como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. En algunas realizaciones, se añaden estabilizadores.

Pueden emplearse sistemas de suministro para compuestos farmacéuticos, tales como, por ejemplo,

liposomas y emulsiones. Las composiciones proporcionadas en el presente documento, pero no reivindicadas en las reivindicaciones adjuntas, también pueden incluir un polímero mucoadhesivo, seleccionado entre, por ejemplo, carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poliacrilamida, policarbofilo, copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato de sodio y dextrano.

5

Tratamiento combinado

Los compuestos de acuerdo con la Fórmula (I) o la Fórmula (II) pueden usarse en combinación con uno o más agentes antifibróticos adicionales. El agente antifibrótico puede ser un antagonista del ácido lisofatídico 1 (LPA1). El agente antifibrótico puede ser seleccionado de pirfenidona, nintedanib, talidomida, carlumab, FG-3019, fresolimumab, alfa interferón, lecitinizada superóxido dismutasa, simtuzumab, tanzisertib, tralokinumab, hu3G9, huTBT13_2_1, 2,126,458, AM-152, IFN-gamma- 1b, IW-001, PRM-151, PXS-25, pentoxyfilina/N-acetilcisteína, pentoxyfilina/vitamina E, sulfato de salbutamol, [SaR9, Met (O2) 11] -Sustancia P, pentoxyfilina, bitartrato de mercaptamina, ácido obeticólico, aramcol, GFT-505, éster etílico de icosapent, clorhidrato de metformina, metreleptina, muromonab-CD3, oltipraz, IMM-124-E, MK-4074, PX-102 y RO-5093151.

Los compuestos según la fórmula (I) o la Fórmula (II) puede usarse en combinación con uno o más agentes antifúngicos azólicos. El agente antifúngico azole puede seleccionarse de un antifúngico imidazol, un antifúngico triazol o un antifúngico tiazol. Los ejemplos de tales agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, derivados de imidazol como miconazol, ketoconazol, clotrimazol, clomidazol, croconazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, miconazol, neticonazol, sulfato, toconazol, sulfato, toconazol, sulfato, oxígeno, derivados de triazol como fluconazol, fosfluconazol, hexaconazol, itraconazol, isavuconazol, posaconazol, voriconzol, terconazol, albaconazol; y derivados de tiazol como la abafungina.

25

Administración de composición farmacéutica

Las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, administración oral, intravenosa, rectal, aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar, transmucosa, transdérmica, vaginal, ótica, nasal y tópica. Además, solo a modo de ejemplo, el suministro parenteral incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intralifáticas e intranasales.

Los compuestos de Fórmula (I) o Fórmula (II) y sus composiciones pueden administrarse de cualquier manera adecuada. La forma de administración se puede elegir basándose, por ejemplo, en si se desea un tratamiento local o sistémico, y en el área a tratar. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular), por inhalación, extracorpórea, tópica (incluyendo transdérmica, oftálmica, vaginal, rectal, intranasal) o similares.

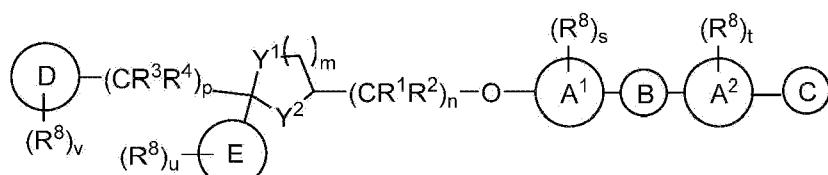
La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución de suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque revisado más recientemente para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida de modo que se mantenga una dosis constante.

45

Métodos

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo:

50



55

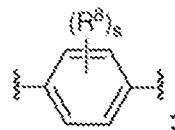
Formula (I)

60

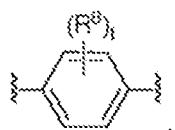
para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, en donde:

A¹ es

5

A² es

10



15

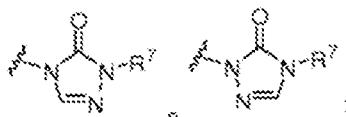
o piridina;
B es

20



C es

25



30

D es arilo o heteroarilo;
 E es arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico o alquilo;
 cada R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, haloalquilo o alcoxi;
 R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno(NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquileno(cicloalquilo), o -alquileno(heterociclico);
 cada R⁸ se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, heterociclico, halo, hidroxi, nitrilo, azido, nitro, alcoxi, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquileno(NR¹³R¹⁴), -alquileno(cicloalquilo), -alquileno(heterociclico), arilo, heteroarilo, -SR¹³, -SOR¹³, -SO₂R¹³, -SO₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³SO₂R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹³R¹⁴; o dos R⁸ adyacentes forman un anillo heterociclico;
 cada R¹³ y R¹⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, heterociclicalalquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo y heteroarilo; o R¹³ y R¹⁴ tomados juntos forman un heterociclo con los átomos a los que están unidos;
 Y¹ e Y² son O;
 n es 1 o 2;
 m es 1 o 2;
 p es 1, 2, 3 o 4;
 s es 0 o 1;
 t es 0 o 1;
 u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y
 v es 0, 1, 2, 3 o 4;
 y en donde
 "alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo;
 "alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada, como se describe para alquilo;
 "alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical alquilo como se define anteriormente;
 "arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático;
 "cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico que tiene de tres a quince átomos de carbono, que pueden incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que están saturados o insaturados;
 "halo" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo;
 "haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se definió anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se definió anteriormente;
 "haloalcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical haloalquilo como se definió anteriormente;

60

65

"heterocicloalquilo" o "heterociclilo" o "heterociclo" se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre

5 "heterocicloalquilo" también incluye todas las formas de anillo de los carbohidratos, incluidos, entre otros, los monosacáridos, los disacáridos y los oligosacáridos, y tiene de 2 a 10 carbonos en el anillo;

10 "heteroarilo" se refiere a un monorradical aromático que contiene de cinco a veinte átomos del anillo esquelético, donde uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, selenio y estaño, pero no limitado a estos átomos y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos O o S adyacentes.

10 También se proporciona en el presente documento, pero no se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (II) o como se describe anteriormente y a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, profármaco, metabolito, N-óxido, estereoisómero o isómero del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Además, se proporciona en el presente documento un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática usando un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones, en donde la fibrosis hepática se asocia con las últimas etapas de la cirrosis hepática alcohólica o no alcohólica.

20 También se proporciona en el presente documento un compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática, el método comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) como se define en las reivindicaciones en combinación con uno o más agentes farmacéuticos. En ciertas realizaciones descritas anteriormente, el uno o más agentes farmacéuticos son agentes antifibróticos. En ciertas realizaciones descritas anteriormente, el uno o más agentes farmacéuticos son agentes antifúngicos.

25 Ademá se divulgan en el presente documento, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, sistemas basados en imágenes para identificar inhibidores de fibrosis. El sistema puede comprender (a) uno o más fibroblastos; y (b) un dispositivo de obtención de imágenes celulares para producir una o más imágenes del uno o más fibroblastos. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender un microscopio fluorescente. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender tecnología de cámara CCD. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede estar automatizado. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede manejarse manualmente. El dispositivo de obtención de imágenes celulares se enfriá termoeléctricamente.

30 35 El sistema puede comprender además una fuente de luz. La fuente de luz puede ser LED.

El sistema puede comprender además un escáner

40 El sistema puede comprender además una computadora.

45 El sistema puede comprender además una o más ubicaciones de memoria para almacenar y/o recibir las una o más imágenes. El sistema puede comprender además una o más ubicaciones de memoria para almacenar y/o recibir una o más instrucciones para producir la una o más imágenes.

50 55 El sistema puede comprender además uno o más procesadores para analizar la una o más imágenes de uno o más fibroblastos. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para procesar la una o más imágenes de uno o más fibroblastos. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para transmitir la una o más imágenes de uno o más fibroblastos.

60 65 El sistema puede comprender además uno o más programas de software para capturar, producir, analizar, escanear, almacenar y/o transmitir la una o más imágenes.

El sistema puede comprender además uno o más lectores de códigos de barras para leer uno o más códigos de barras en una o más muestras que comprenden la una o más células.

70 El sistema puede comprender además uno o más robots para manejar una o más muestras que comprenden la una o más células. El sistema puede comprender además uno o más robots para tratar una o más muestras que comprenden la una o más células con uno o más agentes.

75 Los uno o más agentes pueden comprender TGF-beta. Los uno o más agentes pueden comprender uno o más agentes de prueba.

80 El sistema puede comprender además uno o más procesadores para identificar los uno o más agentes de prueba como inhibidores de la fibrosis. El sistema puede comprender además uno o más procesadores para clasificar

los inhibidores de la fibrosis.

El sistema puede comprender además uno o más algoritmos. El uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos. Los uno o más algoritmos pueden analizar una morfología de los uno o más fibroblastos contactados con el uno o más agentes. Los uno o más algoritmos pueden analizar una intensidad de los uno o más fibroblastos. Los uno o más algoritmos pueden analizar una intensidad de fluorescencia del uno o más fibroblastos.

El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender una plataforma CellInsight NXT High Content Screening (HCS).

Los uno o más fibroblastos pueden ser células estrelladas hepáticas (HSC).

En la presente se divulan, pero no se reivindican en las reivindicaciones adjuntas, métodos para identificar inhibidores de fibrosis. El método puede comprender (a) poner en contacto una primera muestra que comprende uno o más fibroblastos con un agente de crecimiento celular; (b) poner en contacto una segunda muestra que comprende uno o más fibroblastos con el agente de crecimiento celular y un primer agente de prueba; (c) producir una o más imágenes del uno o más fibroblastos de la primera muestra y una o más imágenes del uno o más fibroblastos de la segunda muestra; y (d) determinar si el primer agente de prueba es un inhibidor de la fibrosis basado en un análisis de la una o más imágenes de la primera muestra y la una o más imágenes de la segunda muestra.

El agente de crecimiento celular puede ser un factor de crecimiento. El agente de crecimiento celular está transformando el factor de crecimiento beta (TGF- β).

El primer agente de prueba puede ser una molécula pequeña. El primer agente de prueba puede ser una molécula pequeña bioactiva.

La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular y el primer agente de prueba simultáneamente. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular y el primer agente de prueba secuencialmente. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el agente de crecimiento celular antes del contacto con el primer agente de prueba. La segunda muestra puede ponerse en contacto con el primer agente de prueba antes del contacto con el agente de crecimiento celular.

El método puede comprender además una o más muestras adicionales que comprenden uno o más fibroblastos. La primera muestra, la segunda muestra y/o una o más muestras adicionales pueden provenir de la misma fuente. La primera muestra, la segunda muestra y/o una o más muestras adicionales pueden provenir de dos o más fuentes diferentes.

El método puede comprender además poner en contacto la una o más muestras adicionales con el agente de crecimiento celular y uno o más agentes de prueba adicionales.

Las una o más imágenes de la primera muestra y la una o más imágenes de la segunda muestra pueden capturarse simultáneamente. Las una o más imágenes de la primera muestra y la una o más imágenes de la segunda muestra pueden capturarse secuencialmente.

El uno o más fibroblastos de la primera muestra pueden cultivarse en uno o más pocillos en una primera placa de cultivo. El uno o más fibroblastos de la segunda muestra pueden cultivarse en uno o más pocillos en una segunda placa de cultivo. El uno o más fibroblastos de la una o más muestras adicionales pueden cultivarse en uno o más pocillos en una o más placas de cultivo adicionales.

La primera placa de cultivo y la segunda placa de cultivo pueden ser diferentes. La primera placa de cultivo, la segunda placa de cultivo y/o la una o más placas de cultivo adicionales pueden ser diferentes.

La primera placa de cultivo y la segunda placa de cultivo pueden ser iguales. La primera placa de cultivo, la segunda placa de cultivo y/o la una o más placas de cultivo adicionales pueden ser iguales.

El método puede comprender además poner en contacto el uno o más fibroblastos de la primera muestra y/o el uno o más fibroblastos de la segunda muestra con un tercer agente. El método puede comprender además poner en contacto el uno o más fibroblastos de la una o más muestras adicionales con un tercer agente.

El tercer agente puede ser un anticuerpo. El tercer agente puede ser un anticuerpo anti- actina de músculo liso (SMA).

Las una o más imágenes de la primera muestra y/o la una o más imágenes de la segunda muestra pueden basarse en las imágenes de los uno o más fibroblastos contactados con el tercer agente. Las una o más imágenes de

una o más muestras adicionales pueden basarse en las imágenes de los uno o más fibroblastos contactados con el tercer agente.

5 La producción de una o más imágenes puede comprender el uso de uno o más dispositivos de obtención de imágenes celulares. El dispositivo de obtención de imágenes celulares puede comprender una plataforma CellInsight NXT High Content Screening (HCS).

10 El método puede comprender además uno o más algoritmos. El uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos. El uno o más algoritmos pueden analizar una morfología del uno o más fibroblastos contactados con el uno o más agentes. El uno o más algoritmos puede analizar una intensidad del uno o más fibroblastos. El uno o más algoritmos puede analizar una intensidad de fluorescencia del uno o más fibroblastos.

15 El método puede comprender además detectar la transdiferenciación de uno o más fibroblastos. La transdiferenciación del uno o más fibroblastos puede comprender la transdiferenciación en uno o más miofibroblastos.

20 Determinar si el primer agente de prueba se identifica como un inhibidor de la fibrosis puede basarse en una comparación de la composición de miofibroblastos en la primera muestra con la composición de miofibroblastos en la segunda muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es menor que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en la segunda muestra es al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 veces menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra.

25 El método puede comprender además determinar si el uno o más agentes de prueba adicionales son inhibidores de la fibrosis. Determinar si el uno o más agentes de prueba adicionales se identifica como un inhibidor de la fibrosis puede basarse en una comparación de la composición de miofibroblastos en la primera muestra con la composición de miofibroblastos en la una o más muestras adicionales. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es menor que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra. El primer agente de prueba puede identificarse como un inhibidor de la fibrosis si la composición de miofibroblastos en una o más muestras adicionales es al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 veces menos que la composición de miofibroblastos en la primera muestra.

40 EJEMPLOS

Lista de abreviaturas

45 Como se usó anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que las siguientes abreviaturas, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

50

55

60

| | | |
|----|-----------------------|--|
| | ACN | |
| 5 | Bn | bencilo |
| | BOC o Boc | terc-butil carbamato |
| | BOP | benzotriazol-1-il-oxitris (dimetilamino) fosfonio |
| | t-Bu | terc-butilo |
| | Cbz | carbamato de bencilo |
| 10 | Cy | Ciclohexilo |
| | DBU | 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno |
| | DCC | diciclohexilcarbodiimida |
| | DCM | diclorometano (CH_2Cl_2) |
| | DIC | 1,3-diisopropilcarbodiimida |
| 15 | DEAD | azodicarboxilato de dietilo |
| | DIAD | azodicarboxilato de diisopropilo |
| | DIEA | Diisopropiletilamina |
| | reactivo DMAP | 4-(N, N-dimetilamino)piridina |
| | DMP | Reactivos de Periodinano Dess-Martin |
| 20 | DMF | dimetilformamida |
| | DMA | N,N-dimetilacetamida |
| | DME | 1,2-dimetoxietano |
| | DMSO | dimetilsulfóxido |
| | Dppf | 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno |
| 25 | EDCI | 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl |
| | eq | equivalente(s) |
| | Et | etilo |
| | Et_2O | dietilo éter |
| | EtOH | etanol |
| 30 | EtOAc | acetato de etilo |
| | HOAt | 1-hidroxi-7-azabenzotriazol |
| | HOBT | 1-hidroxibenzotriazol |
| | HOSu | N-hidroxisuccinamida |
| | HPLC | cromatografía líquida de alto rendimiento |
| 35 | LAH | anhídrido de aluminio y litio |
| | Me | metilo |
| | Mel | yoduro de metilo |
| | MeOH | metanol |
| | MOMCl | cloruro de metoximetilo |
| 40 | MOM | metoximetilo |
| | MS | espectroscopía de masas |
| | NMP | N-metil-pirrolidin-2-ona |
| | RMN | resonancia magnética nuclear |
| | PyROP | benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio Hexafluorofosfato |
| 45 | SPHOS | 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibenilo |
| | TBD | 1,5,7-triazabiciclo[4.4.0]-dec-5-eno |
| | RP-HPLC | fase inversa-cromatografía líquida de alta presión |
| | TBS | terc-butildimetilsililo |
| 50 | TBSCl | cloruro de terc-butildimetilsililo |
| | TBTU | O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio |
| | TEOC | carbamato de 2-trimetilsililetílico |
| | TFA | ácido trifluoroacético |
| | Tf ₂ O | anhídrido de triflato |
| 55 | TMG | 1,1,3,3-tetrametilguanidina |
| | THF | tetrahidrofurano |
| | THP | tetrahidropirano |
| | TLC | cromatografía de capa fina |
| | XPHOS | 2-diciclofenoxifosfato-2',4',6'-triisopropilbifenilo |

60

Ejemplos generales para la preparación de compuestos de la invención

Los materiales de partida y productos intermedios para los compuestos de esta invención se pueden preparar por la aplicación o adaptación de los métodos descritos a continuación, sus equivalentes químicos obvios, o, por ejemplo, como se describe en literatura como *The Science of Synthesis*, Volúmenes 1-8. Editores EM Carreira et al.

editores Thieme (2001-2008). Los detalles de las opciones de reactivos y reacciones también están disponibles mediante búsquedas de estructura y reacción utilizando motores de búsqueda de computadoras comerciales como Scifinder (www.cas.org) o Reaxys (www.reaxys.com).

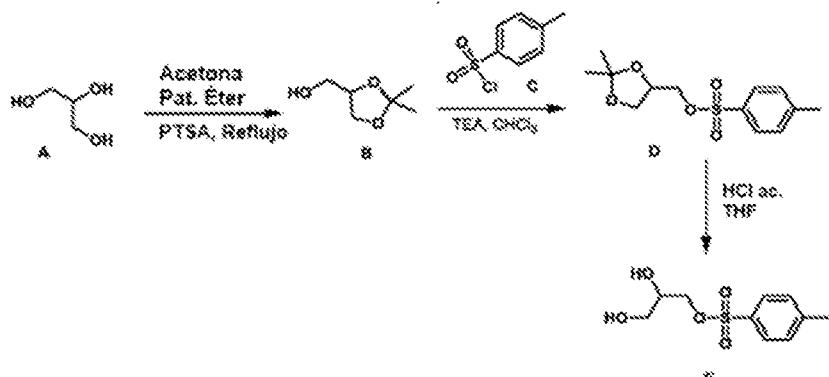
5 **Parte A:**

Los siguientes esquemas de reacción A, B y C detallan la síntesis de los materiales de partida implicados en la formación final del compuesto 46 (esquema D)

10

Esquema A: Síntesis de diol racémico (E)

15



20

25

A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml equipado con condensador y un Dean-stark se le añadió Intermedio A (25,0 g), acetona (75,0 ml), PTSA.H₂O (0,75 g) y éter de petróleo (75,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura de refluxo durante 12 h y se controló por TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 0,75 g de acetato de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa orgánica se decantó y se concentró a presión reducida para dar líquido crudo, Intermedio-B (27,0 g, 75,2%).

35

A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml equipado con tubo de protección de cloruro de calcio se añadió Intermedio B (25,0 g) en cloroformo (185 ml). Se añadió TEA (79,0 ml) y la reacción se enfrió a 0°C. El intermedio C (47,0 g) se cargó por lotes a la mezcla y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 5 h. Reacción controlada por TLC (Hexano: acetato de etilo (5: 5)). La mezcla de reacción se lavó con agua (200 ml) y la capa acuosa se extrajo con CHCl₃ (50 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar un aceite crudo. El aceite se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo al 6% en hexanos). Producto final Intermedio D (21,0 g, 38,6%).

40

A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml equipado con agitador magnético se añadió Intermedio D (21,0 g) en THF (100 ml). La solución se enfrió a 0°C, se mezcló con 6N HCl (25,0 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Reacción controlada por TLC (Hexano: acetato de etilo (5: 5)). La mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. El producto se extrajo con CHCl₃ (50 ml *2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar un aceite espeso, intermedio E (16,0 g, 88,8%). El intermedio E se usó en la siguiente etapa de síntesis sin purificación adicional.

50

Datos espectrales intermedios:

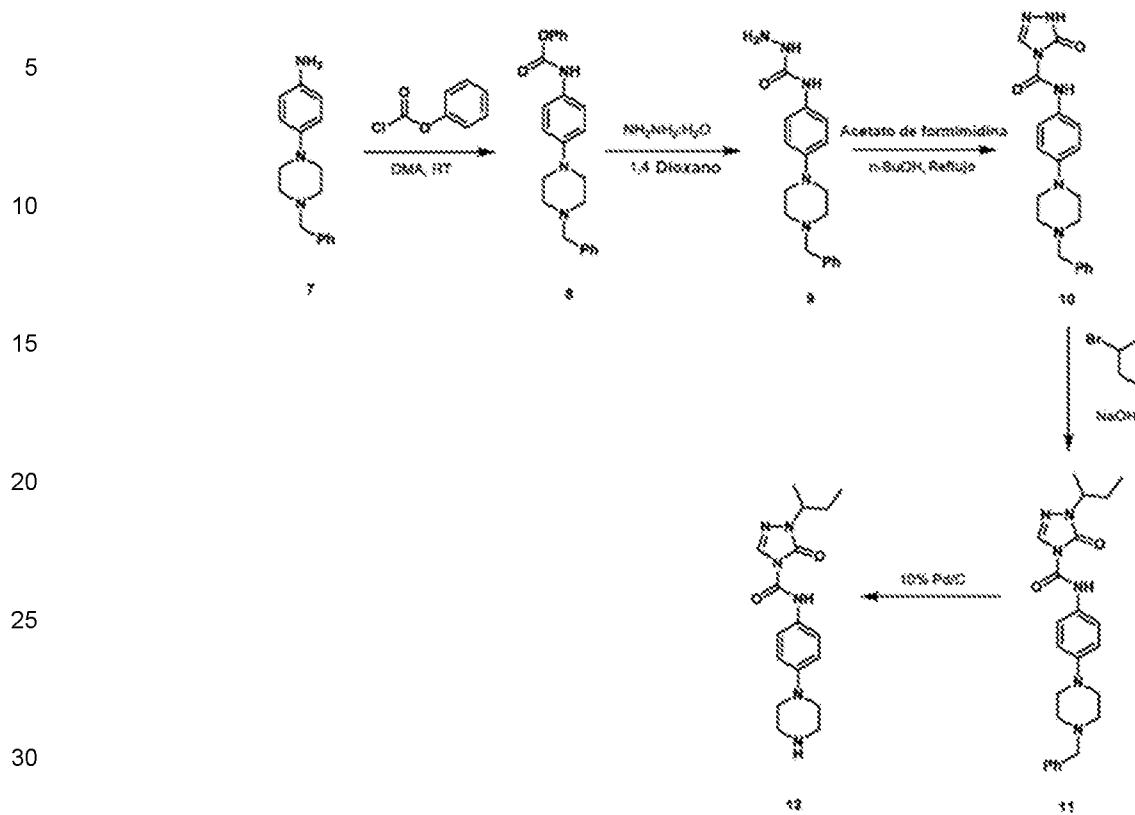
55

| Intermedio | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|------------|--|
| B | ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 1,23 (s, 3H), 1,3 (s, 3H), 3,44-3,55 (m, 3H), 3,61-3,64 (m, 1H), 3,89-3,92 (m, 1H), 4,05-4,10 (m, 1H). |
| D | LCMS: 98,1%; m/z: 304 (M+H ⁺ 20). |
| E | ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 2,46 (s, 3H), 2,85 (s, 1H), 3,4 (s, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,66-3,70 (m, 1H), 3,93-3,96 (m, 1H), 4,04-4,10 (m, 2H), 7,36-7,38 (dd, J = 8,0 Hz, 2H), 7,79-7,81 (dd, J = 8,0 Hz, 2H). |

60

65

Esquema B: Síntesis de Intermedio 12:



A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml equipado con tubo de cloruro de calcio se le añadió Intermedio 7 (5,0 g) en DMA (25,0 ml). Se le añadió gota a gota cloroformiato de fenilo (2,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante media hora. Reacción controlada por TLC (Hexano: acetato de etilo (5: 5)). La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para obtener el producto puro, Intermedio 8 (4,4 g, 61,1%).

40 A un matraz de tres bocas de fondo redondo de 100 ml equipado con un tubo de cloruro de calcio se añadió cargada intermedio 8 (4,4 g) en 1,4 dioxano (20,0 ml). Se añadió hidrato de hidrazina (1,37 ml) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 24 h. Reacción controlada por TLC (Hexano: acetato de etilo (5: 5)). La mezcla se vertió en agua con hielo. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para obtener el producto puro, Intermedio 9 (2,80 g, 53,8%).

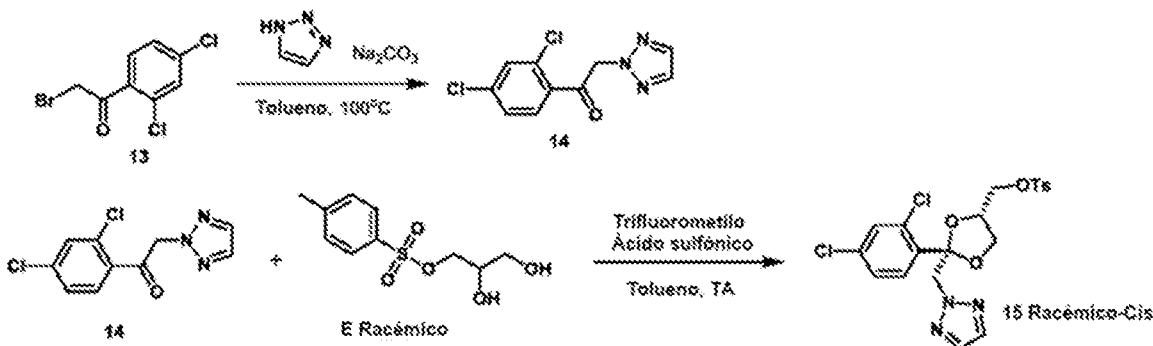
43 A un matraz de fondo redondo equipado con un condensador se añadió intermedio 9 (2,80 g) en nBuOH (25,0 ml) 100 ml de tres bocas. Se añadió acetato de formimidina (4,47 g) y la mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 4 h. Reacción controlada por TLC (EtOAc). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetato de etilo y se secó para obtener el producto puro, intermedio **10** (2,5 g, 86.8%).

50 A una 100 ml redondo de tres bocas se añadió matraz de fondo, equipado con condensador intermedio 10
 (2,50 g) en DMF (30,0 ml). Se añadieron NaOH (1,50 g) y secbromo butano (5,11 g) y la mezcla de reacción se agitó
 a 90°C durante 8 h. Reacción controlada por TLC (EtOAc). La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo. Los
 precipitados se recogieron por filtración, se lavaron con agua y se secaron al vacío para obtener el producto puro,
 55 Intermedio 11 (1,45 g, 49.8%).

A un recipiente de 100 ml hidrogenador Se añadió el intermedio 11 (1,45 g) en MeOH (25,0 ml). 10% Pd/C (0,15 g) se añadió y la mezcla de reacción se hidrogenó a TA en 10 kg de H₂ de presión durante la noche. Reacción controlada por TLC (EtOAc). Una vez completada la reacción, el catalizador se eliminó por filtración y el disolvente se evaporó para dar un aceite espeso. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (5% de MeOH en MDC). Producto final Intermedio 12 (0,75 g, 67,5%).

Datos espectrales intermedios:

| Intermedio Nº | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|----------------------|---|
| 8 | LCMS: 99,16% a 256 nm; m/z: 388 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 2,94-3,05 (m, 2H), 3,13 a 3,20 (m, 2H), 3,72-3,75 (d, 2H), 4,39-4,40 (d, 2H), 6,95-6,97 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,19-7,27 (m, 3H), 7,38-7,44 (m, 4H), 7,49-7,50 (m, 3H), 7,59-7,60 (d, J = 4,0 Hz, 2H). |
| 9 | LCMS: 97,61% a 254 nm; m/z: 326 (M+H). |
| 10 | LCMS: 98,34% a 256 nm; m/z: 336 (M+H). |
| 11 | LCMS: 96,95% a 258 nm; m/z: 392 (M+H). |
| 12 | LCMS: 95,78% a 257 nm; m/z: 302 (M+H). |

15 *Esquema C: Síntesis de Intermedio 15*

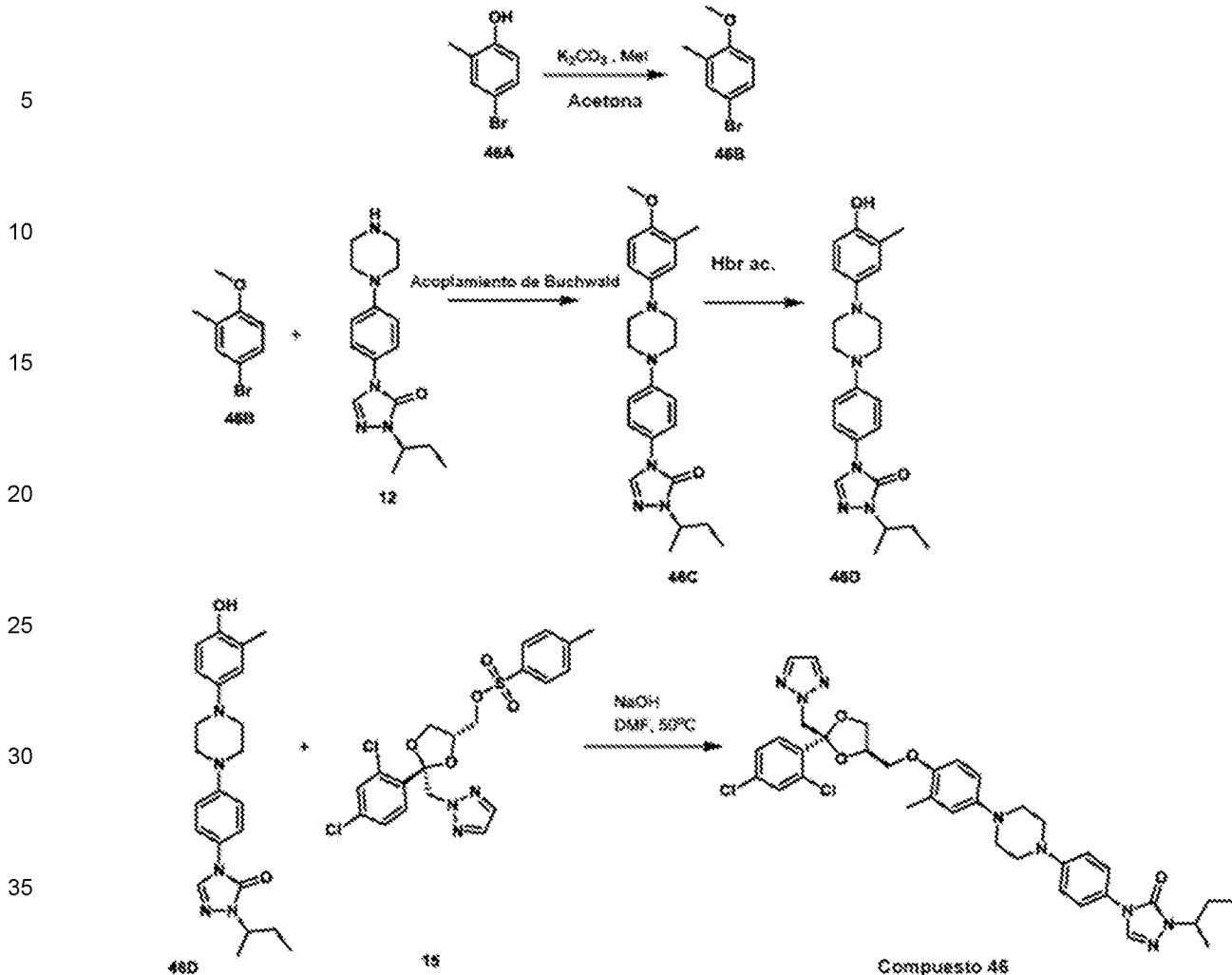
30 A una solución agitada de Intermedio 13 (2,0 g) en tolueno (30,0 ml) se cargaron 1H-1,2,3 triazol (1,96 g) y Na₂CO₃ (3,01 g) a TA. La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 3 h. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (hexano: acetato de etilo (5: 5)). Una vez completada la reacción, la mezcla se enfrió a TA y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica obtenida se lavó con agua (50 ml X₂). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna. (Acetato de etilo al 20% en hexanos). Intermedio **14** (0,70 g, 19,2%).

40 A una solución agitada de Intermedio 14 (1,30 g) en tolueno (15,0 ml) se le cargó el Intermedio E (1,50 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se le añadió ácido tríflico gota a gota (1,80 ml). La mezcla se calentó a TA y se agitó durante 60 h. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se vertió en agua (25 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml x 2). La capa orgánica se combinó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar un aceite espeso. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo al 10% en hexanos). Intermedio **15** (0,32 g, 24,6%).

45 *Datos espectrales intermedios:*

| Intermedio Nº | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|----------------------|---|
| 14 | LCMS: 96,62% a 252 nm; m/z 258 (M+H). ^1H RMN (400MHz, CDCl ₃): 5,91 (s, 2H), 7,36-7,39 (dd, J ₁ = 12,0 Hz y J ₂ = 4,0 Hz, 1H), 7,51-7,52 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 7,64-7,66 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,73 (s, 2H). |
| 15 | LCMS: 100% a 225 nm; m/z 486 (M + 2). ^1H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 2,49 (s, 3H), 3,41-3,45 (m, 1H), 3,75-3,82 (m, 1H), 3,84-3,89 (m, 2H), 4,23-4,26 (m, 1H), 4,94-4,98 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,06-5,09 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 7,18-7,21 (dd, J ₁ = 10,4 Hz y J ₂ = 2,0 Hz, 1H), 7,38-7,40 (d, J ₁ = 12,0 Hz y J ₂ = 8,0 Hz, 2H), 7,44-7,46 (m, 2H), 7,55 (s, 2H), 7,77-7,79 (d, J ₁ = 12,0 Hz y J ₂ = 8,4 Hz, 2H). |

60 *Esquema D: Síntesis de Compuesto 46:*



40 A una solución agitada de Intermedio 46A (0,50 g) en acetona (7,0 ml) se le cargó K₂CO₃ (0,44 g) a temperatura ambiente. Bajo atmósfera de argón. Se añadió yoduro de metilo (0,20 ml) gota a gota y la mezcla se calentó a TA y se agitó durante 24 h. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada la reacción, la mezcla se vertió en agua (25 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar masa bruta, intermedio **46-B** (0,53 g, 100%).

Se cargó a una solución agitada de Intermedio 46B (0,125 g) en tolueno (3,0 ml) Intermedio 12 (0,188 g), terc-butóxido de sodio (0,089 g), Ru (Phos) (0,028 g) y Pd 2 (dba) 3 (0,055 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se purgó con globo de argón durante 10 minutos y se agitó a 120°C durante 15 h. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Después de completar la reacción, la mezcla se vertió en agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo al 25% en hexanos). Intermedio **46-C** (0,08g, 30,7%).

55 Se cargó en un tubo de 5 ml Intermedio 46C (0,080 g) en 48% ac. HBr (0,80 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura de reflujo durante la noche. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (acetato de etilo). La mezcla de reacción se diluyó con agua (5,0 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para obtener Intermedio **46-D** puro (0,050 g, 64,90%).

En una solución agitada de Intermedio 46-D (0,050 g) en DMF (1,0 ml) se cargó Intermedio 15 (0,050 g) y NaOH (0,020 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se agitó a 50°C durante la noche. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se vertió en agua (10 ml) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentró bajo presión reducida. El producto en

bruto se purificó por HPLC preparativa (eluyendo en ACN: agua que contiene 0,1% de NH₃ por purificación preparativa de fase inversa). Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener un producto puro, (0,012 g, 11,32%).

Datos espectrales de compuestos intermedios y finales:

| Compuesto intermedio/final # | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|------------------------------|---|
| 46B | ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 2,19 a 2,20 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 3H), 3,82 (s, 3H), 6,69-6,70 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1H), 7,26 a 7,28 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H). |
| 46C | LCMS: 98,3% a 261 nm; m/z 422 (M + 1). |
| 46D | LCMS: 81,9% a 258 nm; m/z 408 (M + 1). |
| 46 | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 719,51 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,91 a 0,94 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,16-2,19 (s, 3H), 3,25 (s, 4H), 3,38 (s, 4H), 3,48-3,52 (q, 1H), 3,91-4,00 (m, 3H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,39-4,41 (m, 1H), 5,06-5,09 (d, <i>J</i> = 14,0 Hz, 1H), 5,17-5,20 (d, <i>J</i> = 14,0 Hz, 1H), 6,69-6,71 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 6,78-6,84 (m, 2H), 7,04-7,06 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H), 7,20-7,23 (dd, <i>J</i> 1 = 10,4 Hz y <i>J</i> 2 = 2,0 Hz, 1H), 7,44-7,48 (m, 3H), 7,52-7,54 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz ¹ H), 7,60-7,64 (m, 3H). |

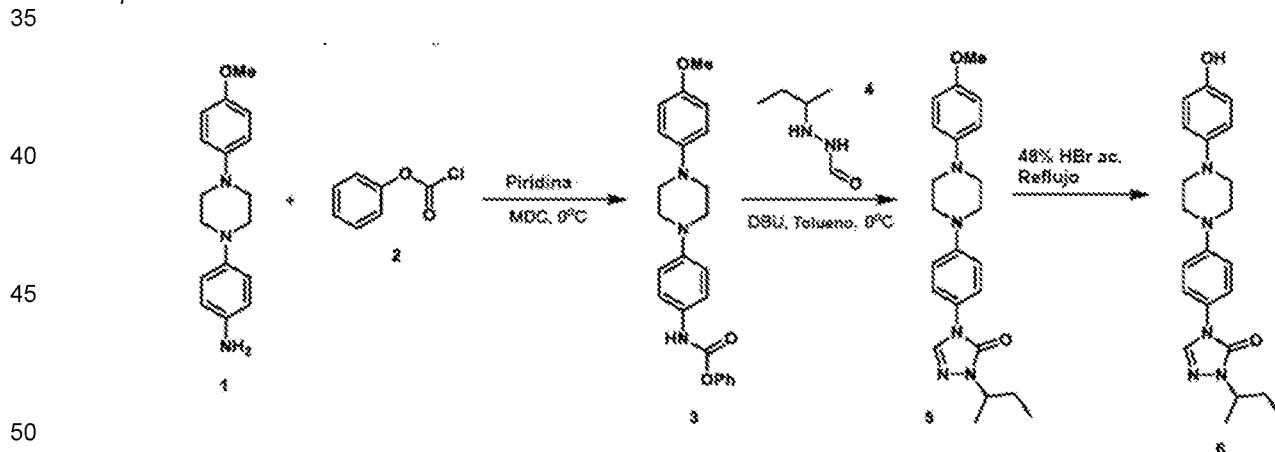
Información sintética adicional:

Los compuestos 47-54 se prepararon usando el esquema de reacción idéntico con sus correspondientes bromofenoles (Intermedio 46A).

Parte B:

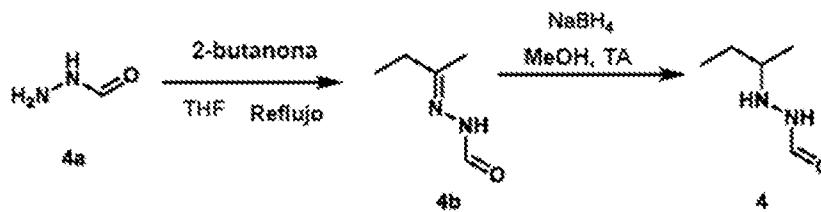
Los siguientes esquemas de reacción E y F detallan la síntesis de los materiales de partida implicados en la formación final del compuesto 42 (esquema G). El mismo diol racémico producido en el Esquema A (Parte A) también se usó en la síntesis que sigue.

Esquema E: Síntesis de Intermedio 6:



Se cargaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml equipado con tubo de cloruro de calcio (5,13 g), piridina (12,0 ml) y MDC (50,0 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se le añadió cloroformato de fenilo (5,0 ml). La reacción se agitó a 4°C durante la noche. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). A la mezcla se le añadió agua (100 ml) y la solución se agitó a TA durante 30 minutos. El precipitado se filtró, se lavó con diclorometano (10 ml x 2) y se secó al vacío para obtener el producto puro, Intermedio 3 (5,5 g, 75,1%).

Síntesis de Intermedio 4:



10 Se cargaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml equipado con condensador y una trampa Dean-Stark Intermedio 4a (20,0 g), 2-butanona (29,8 ml) y sulfato de sodio anhidro en THF (150 mg). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 2 h. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (acetato de etilo). La reacción se enfrió a TA y el disolvente se evaporó a presión reducida para dar un sólido blanco, Intermedio 4b (32,0 g, 84,2%).

15 Se cargaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml equipado con agitador magnético Intermedio 4b (32,0 g) en MeOH (350 ml). La mezcla resultante se enfrió a 0°C seguido de la adición de NaBH4 (9,01 g). La reacción se agitó a TA durante 5 h. La finalización de la reacción se confirmó por TLC usando (hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completado, el disolvente se eliminó por destilación y el residuo se disolvió en agua (100 ml). El producto se extrajo con CHCl3c (100ml x 3). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na2SO4 y se concentró bajo presión reducida para dar un aceite espeso. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo al 10% en hexanos). Intermedio 4 (22,0 g, 67,6%).

25 Se cargaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml equipado con un condensador y un tubo de cloruro de calcio Intermedio 3 (5,0 g), Intermedio 4 (1,51 g) y DBU (0,022 g) en tolueno (50,0 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a 100°C durante 15 h. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (acetato de etilo). La mezcla se concentró a presión reducida y se añadió metanol. La solución se agitó a 4°C durante 2 h. El precipitado resultante se recogió por filtración y se secó para obtener Intermedio 5 puro (4,35 g, 85,9%).

30 Se cargaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml equipado con condensador Intermedio 5 (4,35 g) en tolueno (43,5 ml). La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante la noche. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (acetato de etilo). La mezcla de reacción se enfrió a TA y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó para obtener el Intermedio 6 puro (3,30 g, 78,3%).

35 *Datos espectrales intermedios:*

| Nº | Intermedio | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|----|------------|---|
| 40 | 3 | LCMS: 57,55% a 202 nm y 100% a 259 nm; m/z: 404,95 (M+H). |
| | 4 | ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,81-0,86 (m, 6H), 0,89-0,93 (m, 6H), 1,12-1,22 (m, 2H), 1,37-1,46 (m, 2H), 2,61-2,66 (m, 1H), 2,73-2,74 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 4,79-4,86 (d, J = 28,0 Hz, 2H), 7,92-8,01 (m, 2H), 8,73-8,76 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 9,31-9,32 (d, J = 4,0 Hz, 1H). |
| 45 | 5 | LCMS: 77,46% a 260 nm; m/z: 409,2 (M+H). |
| | 6 | LCMS: 72,11% a 202 nm y 99,12 a 250 nm; m/z: 394,6 (M+H). |

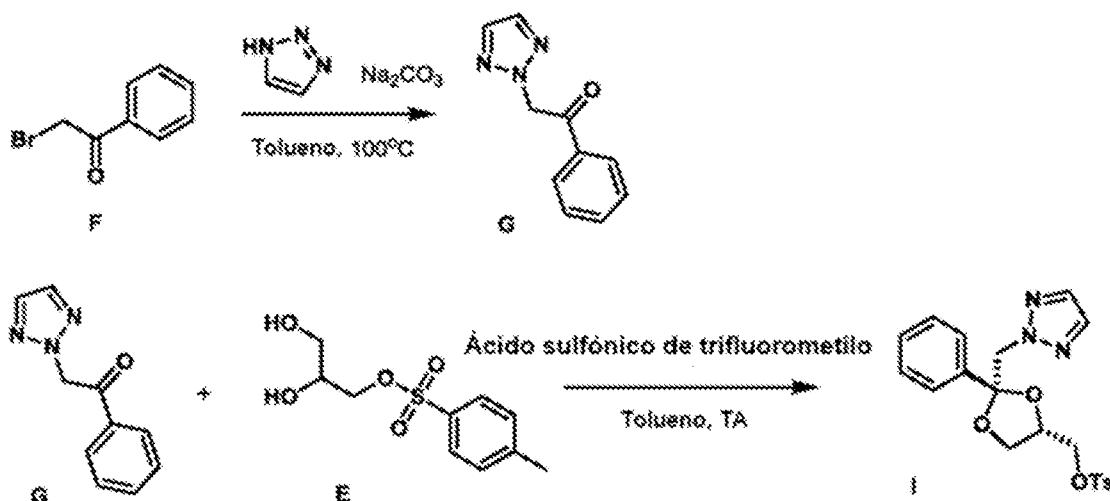
55 *Esquema F: Síntesis de Intermedio I:*

50

55

60

65



A una solución agitada de Intermedio F (2,0 g) en tolueno (15,0 ml) se le cargó 1H-1,2,3 Triazol (1,78 g) y Na₂CO₃ (2,74 g) a TA. La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 3 h. La finalización de la reacción se controló en TLC (Hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada, la mezcla se enfrió a TA y se diluyó con acetato de etilo (25 ml). La solución se lavó con agua (25 ml *2). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar masa bruta. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (15% de acetato de etilo en hexanos). Intermedio G (0,65 g, 26,7%).

A una solución agitada de Intermedio G (0,25 g) en Tolueno (3,5 ml) se le cargó el Intermedio E (0,39 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a 0°C y se le añadió ácido trifluíco (0,48 ml) gota a gota. La solución se calentó luego a TA y se agitó durante 60 h. La finalización de la reacción se controló en TLC (Hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada, la mezcla resultante se vertió en agua (10 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml *2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida para dar un aceite espeso. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo al 6% en hexanos). Intermedio I (0,12 g, 21,8%).

Datos espectrales intermedios:

| Intermedio | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|------------|---|
| G | LCMS: 100% a 245 nm; m/z 182,82 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 5,95 (s, 2H), 7,52-7,56 (m, 2H), 7,65-7,69 (m, 2H), 7,76 (s, 2H), 7,98-8,00 (m, 2H) |
| I | LCMS: 100% a 223 nm; m/z 416,2 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 2,19 (s, 2H), 2,47 (s, 2H), 3,58-3,61 (m, 1H), 2,72-2,76 (m, 1H), 3,83-3,87 (m, 1H), 3,93-3,97 (m, 1H), 4,09-4,12 (m, 1H), 4,74 (s, 2H), 7,28-7,35 (m, 5H), 7,39-7,41 (m, 2H), 7,62 (s, 2H), 7,66-7,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H). |

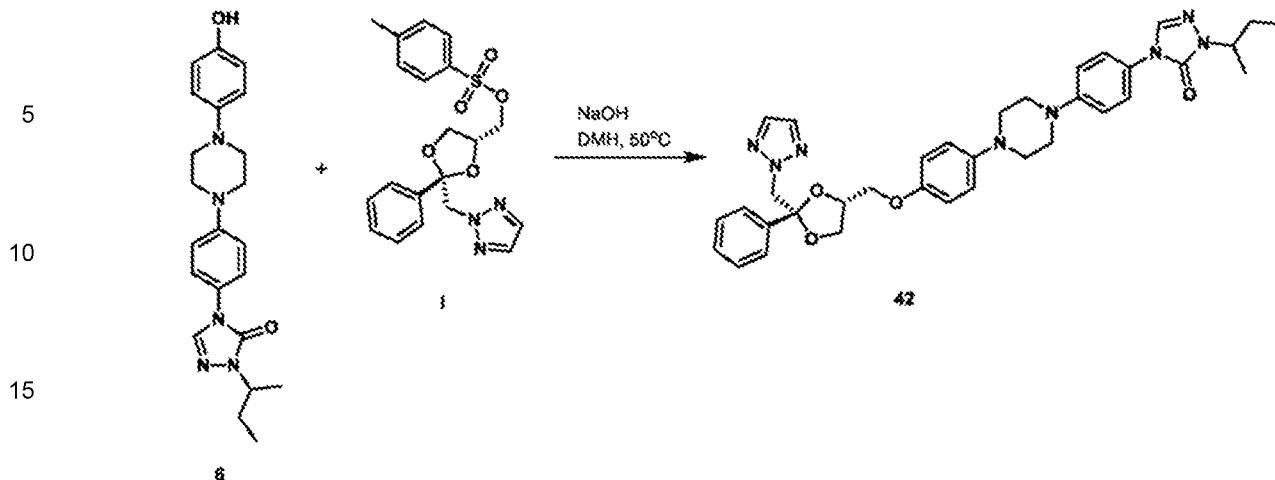
Esquema G: Síntesis de Compuesto 42:

50

55

60

65



20 Se cargó en una solución agitada de Intermedio 6 (0,060 g) en DMF (1,0 ml) Intermedio I (0,070 g) y NaOH (0,024 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se agitó a 50°C durante la noche. La finalización de la reacción se controló en TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Después de completarse, la reacción se vertió en agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml*2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar masa bruta. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa (ACN: agua que contiene 0,1% de NH₃ por purificación preparativa de fase inversa). Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener un producto puro, **42** (0,016 g, 16%).

25

Datos espectrales intermedios:

| 30 | Compuesto final Nº | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|----|---------------------------|---|
| 35 | 42 | LCMS: 100% a 261 nm; m/z 637,45 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,86-1,89 (m, 1H), 3,30-3,43 (m, 9H), 3,73-3,78 (m, 1H), 3,83-3,86 (m, 1H), 3,89-3,93 (m, 1H), 4,30-4,33 (m, 1H), 4,37-4,40 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 6,79-6,81 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,02-7,07 (m, 4H), 7,38-7,42 (m, 3H), 7,44- 7,47 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,56-7,59 (m, 2H), 7,64 (d, J = 2,8 Hz, 3H) |

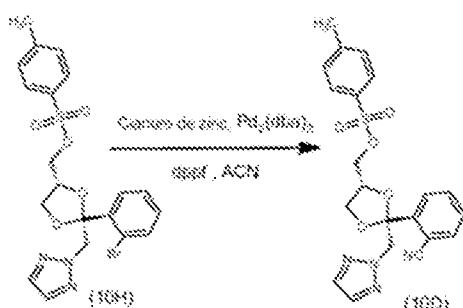
40 *Información sintética adicional:*

Los compuestos 30-45 se prepararon usando el esquema de reacción idéntico con sus correspondientes bromuros/cloruros de fenacilo (Intermedio F).

45 Parte C: Síntesis del Compuesto 74

El Compuesto 74 se preparó usando procedimientos análogos a los utilizados para preparar el Compuesto 46, sustituyendo el Intermedio 10D por el Intermedio 15 (Esquema D). Intermedio 10H, el precursor del Intermedio 10D, se preparó utilizando procedimientos análogos a los utilizados para preparar el Intermedio 15.

Esquema H: Síntesis de Intermedio 10D:



65 A una solución agitada de Intermedio 10H (0,1 g) en ACN (7,0 ml) se le cargó Zn(CN)₂ (0,47 g), dppf (0,017

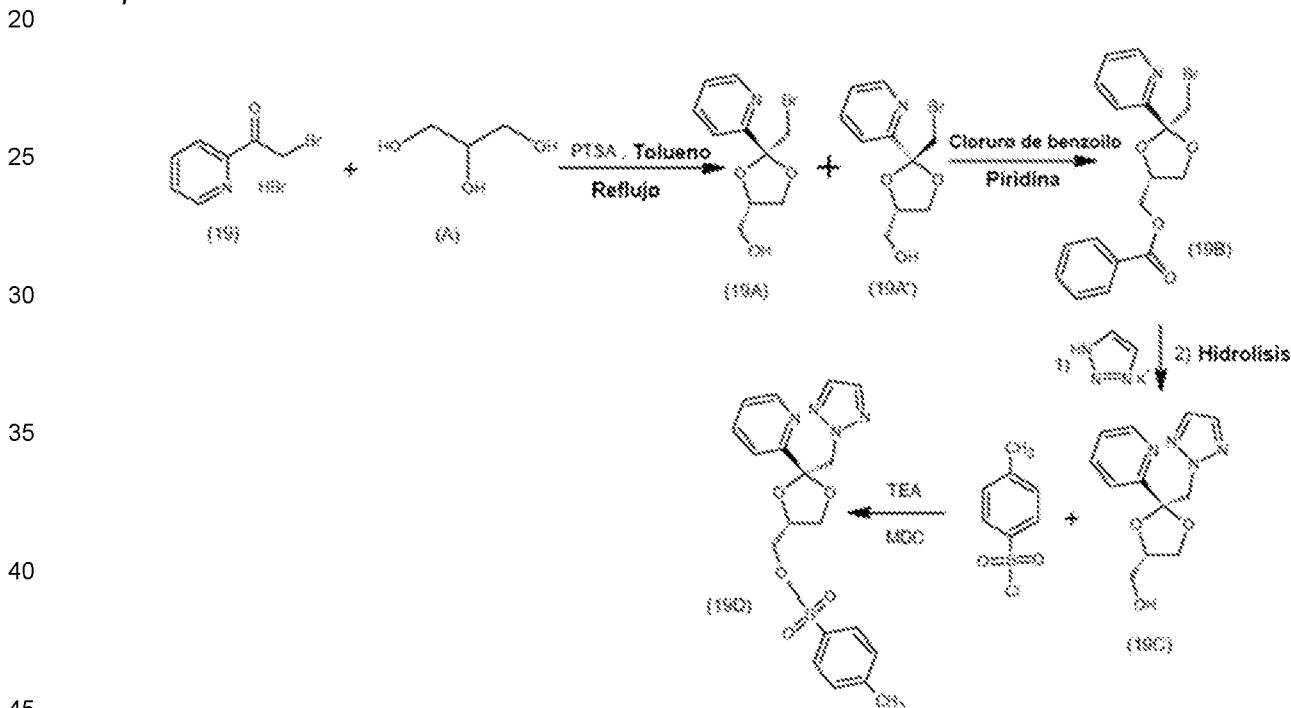
g) y Pd₂(dba)₃ (0,027 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se purgó con argón durante 10 min y se agitó a 120°C durante 15 h. La finalización de la reacción se controló por TLC (hexano: acetato de etilo (5:5)). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se vertió en agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). La capa orgánica se combinó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar masa bruta que se purificó por cromatografía en columna (25% acetato de etilo en hexanos). Intermedio: **10D** (0,013g, 13,4%).

| | Compuesto intermedio Nº | Datos de caracterización (RMN/LCMS) |
|----|-------------------------|---|
| 10 | 10D | LCMS: 95,23% a 225 nm; m/z 440,9 (M+H). |

Parte D: Síntesis del Compuesto 75

El Compuesto 75 se preparó usando procedimientos análogos a los utilizados para preparar el Compuesto 42, sustituyendo el Intermedio 19D por el Intermedio I (Esquema G). El intermedio 19D se preparó como se muestra en el Esquema I (a continuación), invirtiendo los pasos en los esquemas A y C de modo que la bromometil cetona 19 reaccionó con el intermedio A antes de la reacción con 1H-1,2,3-triazol.

Esquema I: Síntesis de Intermedio 19D



A una solución agitada de Intermedio 19 (0,75 g - preparada por analogía al precursor de bromocetona para el compuesto 88) en tolueno (6,0 ml) Intermedio A agregado (1,53 g), PTSA (0,076 g) y tamices moleculares (0,5 g) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura de reflujo durante 24 h. La finalización de la reacción se controló por TLC usando hexano: acetato de etilo (5:5) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se enfrió a TA y se vertió en agua (10 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron al vacío para dar una mezcla cruda de Intermedios **19A** y **19A'** que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Peso de la mezcla de Intermedio **19A** e Intermedio **19A'**: 1,0 g (crudo). LCMS: 33,84%; m/z: 276 (M + 2).

A una solución agitada de Intermedio 19A y 19A' (1,0 g) en MDC (10,0 ml) se añadió piridina (0,58 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. En la mezcla resultante, se añadió cloruro de benzoilo (0,43 ml) gota a gota antes de que la mezcla se dejara agitar a TA durante la noche. La finalización de la reacción se controló por TLC usando hexano: acetato de etilo (5:5) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se vertió en agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo con MDC (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron al vacío para dar un aceite espeso que se purificó adicionalmente por HPLC preparativa (ACN: agua que contiene ácido fórmico al 0,1%). Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener Intermedio **19B**. Peso del Intermedio 19B: 0,20 g (rendimiento: 14,5%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃ δ ppm): 3,89-3,97 (m, 2H), 4,15-4,22 (m, 2H), 4,54-4,61 (m, 3H), 7,29-7,33 (m, 1H), 7,46 -7,50 (m, 2H), 7,58-7,62 (m, 1H), 7,65-7,67 (m,

1H), 7,75-7,79 (m, 1H), 8,09-8,11 (m, 2H), 8,69-8,70 (d, 1H). LCMS: 100% de pureza; m/z: 380 (M + 2).

A una solución agitada de Intermedio 19B (0,20 g) en DMF (3,0 ml) se le añadió sal de triazol de potasio (0,14 g) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se calentó con agitación a 130°C durante 24 h. La finalización de la reacción se controló por TLC usando hexano: acetato de etilo (5:5) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se enfrió a TA y se eliminó la DMF al vacío. El residuo se disolvió en THF (4,0 ml) antes de la adición de solución acuosa de NaOH al 32% (4,0 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura de refugio durante 3 h. La finalización de la hidrólisis se controló por TLC usando MDC: MeOH (9: 1) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se enfrió a TA y se vertió en agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a vacío para dar un aceite espeso que se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (60% acetato de etilo en hexanos) para proporcionar intermedio 19C. Peso del intermedio 19C: 0,045 g (Rendimiento: 32,6%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃ δ ppm): 2,19 (s, 1H), 3,33-3,37 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 3,84-3,94 (m, 2H), 4,05-4,08 (m, 1H), 4,32 (s, 1H), 4,99-5,03 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 5,25-5,29 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 7,35-7,36 (m, 1H), 7,57-7,59 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,66 (s, 2H), 7,75-7,78 (m, 1H), 8,76 (s, 1H). LCMS: 99,27% de pureza por UV; m/z: 263 (M + 1).

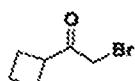
A una solución agitada de Intermedio 19C (0,045 g) en diclorometano (1,5 ml) se le cargó trietilamina (0,04 ml) a temperatura ambiente bajo argón atmósfera. La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se le añadió p-TSCI (0,04 g) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se controló en TLC usando hexano: acetato de etilo (5:5) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla resultante se vertió en agua (10 ml) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a vacío para dar intermedio 19D como un aceite espeso. Peso del intermedio 19D: 0,075 g (crudo). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃ δ ppm) 2,49 (s, 3H), 3,22-3,28 (m, 1H), 3,69-3,73 (m, 1H), 3,85-3,89 (m, 1H), 3,98-4,01 (m, 1H), 4,42-4,43 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 5,01-5,12 (m, 2H), 7,19-7,21 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,39-7,44 (m, 2H), 7,44-7,48 (m, 3H), 7,78-7,83 (m, 3H), 7,94-7,96 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,84-8,85 (d, J = 4,0 Hz, 1H). LCMS: 88,74% de pureza por UV; m/z: 417 (M + 1).

El Compuesto 78 se preparó por analogía con el Compuesto 75, excepto que se usó 2-acetiltiazol en lugar de 2-acetilpiridina como material de partida inicial. La bromación se puede llevar a cabo por analogía con la síntesis del precursor de bromocetona del compuesto 88.

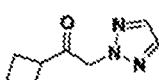
Parte E: Síntesis del Compuesto 88

El Compuesto 88 se prepara usando procedimientos análogos a los utilizados para preparar el Compuesto 42, sustituyendo el ciclobutil-(N₂) triazolilo. cetona para Intermedio 14 (esquema C).

Síntesis de ciclobutil-(N₂)triazolilcetona



A una solución enfriada de ciclobutilmetilcetona (1 equiv) en MeOH se le añadió bromo (1 equiv) gota a gota a 0°C durante 30 min. La mezcla de reacción resultante se agitó a la misma temperatura durante aproximadamente 2 h, y luego a TA durante otros 30 min. A continuación, el bromo sin reaccionar se inactivó cuidadosamente con la solución acuosa al 10% de Na₂S₂O₃. La entonces la mezcla se extrajo con éter, y se lavó con NaHCO₃ y salmuera. El extracto orgánico combinado se secó sobre anhidro MgSO₄, se filtró y se concentró para proporcionar la bromocetona deseada.



A la solución de bromocetona (1,0 equiv) y triazol (1,2 equiv) en ACN se le añadió DIPEA (1,2 equiv). La mezcla de reacción resultante se calentó luego a reflugio durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía instantánea en columna para proporcionar la ciclobutil-triazolil cetona deseada como un aceite amarillo pálido que solidificó lentamente con el tiempo.

Se prepararon compuestos adicionales que aparecen en la Tabla 1 usando procedimientos análogos a los procedimientos anteriores.

Ejemplos biológicos

EJEMPLO I: Ensayos biológicos

Se estableció un ensayo de formación de imágenes de alto contenido, basado en la tinción de α -SMA y los cambios morfológicos celulares asociados con la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, usando fibroblastos de pulmón humanos primarios y HSC de roedores primarios. Condicionales, que implican la privación de suero y posterior tratamiento de TGF- β , se identificaron que facilitan transdiferenciación robusta *in vitro* en un formato miniaturizado (placa de 384 pocillos) que es susceptible de molécula pequeña de alto rendimiento de cribado. Se usó un inhibidor selectivo del receptor ALK-5 TGF- β 1 (SB-431542) como control positivo. El ensayo de 4 días de duración fue susceptible de exámenes del orden de 100,000 pozos y facilitó la identificación de compuestos que inhiben selectivamente la transdiferenciación de miofibroblastos a fibroblastos. Este ensayo se usó para identificar un compuesto de éxito (itraconazol) y se usó para evaluar paneles enfocados de análogos de itraconazol generados a partir de esfuerzos de química médica.

La actividad de itraconazol y sus análogos se confirmó mediante el análisis de cambios en la expresión génica de múltiples genes asociados con fibroblastos a miofibroblastos transdiferenciación usando métodos bioquímicos (es decir, transferencia Western y RT-PCR). Estos ensayos de 4 días se usaron para evaluar conjuntos de 6 compuestos a la vez en un modo de respuesta a la dosis de 4 puntos.

Ensayos de α -SMA

Se sembraron células estrelladas hepáticas de rata inactivas en placas de 384 pocillos (350 células por pocillo) recubiertas con poli-D-lisina en medio de células estrelladas (ScienCell). Después de 24 horas de incubación, las células se trataron con las dosis indicadas de itraconazol durante 48 horas en presencia de 10 ng/ml de TGF- β 1 en medio estrellado hepático. Después de la fijación y la tinción con un anticuerpo anti-actina del músculo liso, la morfología celular se analizó con un lector de imágenes de Cellomics (Figura 1 para imágenes representativas). Las células se analizaron para determinar el área celular media de la tinción de α -SMA (Figura 5a) o la intensidad de fluorescencia media de la tinción de SMA (Figura 5b). En este ensayo, el itraconazol indujo de manera reproducible disminuciones dependientes de la dosis tanto en el área celular media como en la tinción de actina del músculo liso alfa, lo que indica la inhibición de la transdiferenciación y activación de miofibroblastos.

Análisis de transferencia Western de proteínas relacionadas con fibrosis en células expuestas a TGF β e itraconazol (Itra)

Se sembraron fibroblastos de pulmón humano a 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio de ensayo (suero bovino fetal al 2%, DMEM). Después de 24 incubaciones, el medio se cambió a medio de ensayo que contenía TGF- β 1 (10 ng/ml) y se trató simultáneamente con itraconazol (10 μ M), SB431542 (10 μ M) o control del vehículo (Figura 6). Después de la incubación durante 48 horas, las células fueron cosechadas por breve tripsinización y centrifugación. Las células se lisaron en Cell Lytic M (Sigma) y las concentraciones de lisado se normalizaron mediante lecturas de absorción a 260 nm. Las muestras se hirvieron en tampón de muestra 2X y 10% de betamercaptoetanol. Se cargaron tres microgramos de lisado en cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron mediante transferencia semiseca a membranas de PVDF. Despues de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce). En este ensayo, el itraconazol indujo de manera reproducible una disminución dependiente de la dosis en los niveles de los niveles inducidos de proteína de actina del músculo liso alfa, lo que indica la inhibición de la transdiferenciación y activación de miofibroblastos.

Análisis de expresión génica de fibroblastos de pulmón humano tratados con itraconazol

Se sembraron fibroblastos de pulmón humano a 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio de ensayo (suero bovino fetal al 2% en DMEM). Después de 24 horas, el medio se cambió a medio de ensayo que contenía TGF- β 1(10 ng/ml) e itraconazol (500 nM). Después de 48 horas de incubación a 37°C, las células fueron cosechadas por breve tripsinización y centrifugación. El ARN se extrajo con el kit RNeasy (Qiagen) y el ADN se amplificó con el kit de síntesis de primer filamento SuperScript III (Life Technologies). Las reacciones de qPCRs se llevaron a cabo utilizando un kit de matriz de PCR RT2 Profiler centrado en fibrosis con placa suministrada y reactivos. Los datos se analizaron usando N = 1 por reacción por condición de tratamiento. Los datos se expresaron como regulación de pliegue en relación con una muestra no tratada con TGF- β 1 (Figura 7a). Los datos sin procesar de la matriz de PCR RT2 Profiler centrada en fibrosis se muestran en la Figura 7b. En este ensayo, el itraconazol indujo de forma reproducible cambios dependientes de la dosis en múltiples genes relacionados con la fibrosis, lo que indica la inhibición de la transdiferenciación y activación de miofibroblastos.

La actividad anti-fibrótica de itraconazol y análogos de la misma no fue resultado de la inhibición de P450 asociada con la actividad antifúngica. El itraconazol inhibió las vías de señalización pro-fibrótica de VEGF y Hedgehog.

Análisis qPCR de genes relacionados Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata tratados con itraconazol

Las células hepáticas de rata estrelladas se sembraron a 10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina en medio celular estrellado (ScienCell) y se dejaron proliferar hasta la confluencia completa (~2 semanas). El medio se cambió luego a DMEM y suero bovino fetal al 0,5% con 1 ug/ml de SHH-N (sistemas de I + D). Las células fueron tratadas con SHH-N y compuestos (ciclopamina 5 μ m (control positivo), itraconazol 1 μ m) durante 24 horas. Las células fueron cosechadas por breve trypsinización y centrifugación. El ARN se extrajo con el kit RNeasy (Qiagen) y el ADN se amplificó con el kit de síntesis de primer filamento SuperScript III (Life Technologies). qPCR se realizó utilizando una mezcla maestra verde SYBR (Takara). Los niveles relativos de PTCH1 (homólogo parcheado de proteína 1) y mRNA GLI1 (dedo de zinc de la familia GLI 1) (ver Figuras 8a y 8b; los datos brutos para ambos experimentos qPCR se muestran en la Figura 8c) indicaron que el itraconazol inhibe la señalización de Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata.

Análisis de transferencia Western de COL1-GFP HSCs después de knockdown de Smoothened

HSC de COL1-GFP (una línea de células estrelladas hepáticas de ratón inmortalizada con GFP en el locus de colágeno) se sembraron a $7,5^5$ células por pocillo en medio de ensayo (suero bovino fetal al 10%, DMEM). Después de 24 horas, las células se transdijeron con partículas lentivirales. Después de 24 horas de incubación con partículas virales, las células se cambiaron a medio de ensayo nuevo y se incubaron durante 48 horas. Las células se lisaron en Cell Lytic M (Sigma) y las concentraciones de lisado se normalizaron mediante lecturas de absorción a 260 nm. Las muestras se hirvieron en tampón de muestra 2X y 10% de beta-mercaptoetanol. Se cargaron cantidades iguales de lisado en cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron por transferencia semiseca a membranas de PVDF. Después de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce); ver Figura 9. Las construcciones para los shARN entregados lentiviramente se obtuvieron de Sigma como reservas de glicerol de MISSION. Los lentivirus se empaquetaron usando células 293T y vectores de empaquetamiento pMD2.G y pSPAX2. Los clones 71, 12 y 95 corresponden a shARN a SMO y pLKO es el plásmido SCH002 que codifica un shARN no dirigido. La eliminación de SMO mediada por shARN y la inhibición resultante de la señalización de Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata recapitularon parcialmente la actividad antifibrótica de itraconazol.

Análisis de transferencia Western de patrón de migración VEGFR2 después del tratamiento con itraconazol

Las células hepáticas de rata quiescentes estrelladas se sembraron a 10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertos con poli-D-lisina en medio de células estrelladas (ScienCell). Después de 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con varias dosis de itraconazol durante 24 horas. Las células fueron cosechadas por breve trypsinización y centrifugación. Las células se lisaron en Cell Lytic M (Sigma) y las concentraciones de lisado se normalizaron mediante lecturas de absorción a 260 nm. Las muestras se hirvieron en tampón de muestra 2X y 10% de beta-mercaptoetanol. Se cargaron cantidades iguales de lisado en cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron por transferencia semiseca a membranas de PVDF. Después de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce); ver Figura 10. El itraconazol inhibió la glicosilación y el tráfico de VEGFR2, causando así una inhibición de la señalización de VEGF pro-fibrótica en células estrelladas hepáticas de rata.

Análisis de transferencia Western de células estrelladas hepáticas de rata tratadas con combinaciones de compuestos inhibidores de VEGFR y Hedgehog

Se sembraron células estrelladas hepáticas de rata inactivas en 10^5 células por pocillo en platos de 6 pocillos recubiertos con Poli-D-Lisina en medio de células estrelladas (ScienCell). Después de 24 horas de incubación, las células se cambiaron a medio celular estrellado que contiene 10 ng/ml de TGF- β 1 y las combinaciones de compuestos indicadas. Después de 48 horas de tratamiento, las células se cosecharon por breve trypsinización y centrifugación. Las células se lisaron en Cell Lytic M (Sigma) y las concentraciones de lisado se normalizaron mediante lecturas de absorción a 260 nm. Las muestras se hirvieron en tampón de muestra 2X y 10% de beta-mercaptoetanol. Se cargaron tres microgramos de lisado en cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron mediante transferencia semiseca a membranas de PVDF. Después de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce); ver Figura 11. La inhibición farmacológica de la señalización de VEGF o Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata recapituló parcialmente la actividad antifibrótica de itraconazol o análogos de los mismos. La inhibición farmacológica dual de la señalización de VEGF y Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata recapituló la actividad antifibrótica de itraconazol.

Actividad de itraconazol y compuesto 42 en un ensayo de indicador hedgehog

Se cosecharon células TM3-GLI-LUC (clón estable de células TM3 de ratón que expresan el indicador GLI-Luc) y luego se sembraron a 5.000 células por pocillo en placas de 384 pocillos en 40 μ l de medio de ensayo (DMEM: F12 y suero bovino fetal al 2%). Los compuestos se disolvieron en DMSO en diluciones en serie y se transfirieron a las placas de ensayo usando una cabeza de pintoool de 100 nL en una estación de trabajo automatizada Biomek.

5 Despues de la transferencia de compuestos, se añadieron 10 μ l de medio de ensayo que contenía el agonista de hedgehog de molécula pequeña SAG de tal manera que la concentración final de ensayo de SAG era 10 nM o 400 nM. Las placas de ensayo se incubaron durante 48 horas antes de usar reactivos Bright-Glo para determinar las señales de luminancia en un lector de placas Envision. La actividad relativa de GLI-LUC de las células TM3-GLI-LUC expuestas a SAG 10 nM y las dosis indicadas de inhibidor se muestran en la Figura 12a. La actividad relativa de GLI-LUC de las células TM3-GLI-LUC expuestas a SAG 400 nM y las dosis indicadas de inhibidor se muestran en la Figura 12b. N = 3 por dosis. El itraconazol y sus análogos inhibieron la señalización pro-fibrótica de Hedgehog en células estrelladas hepáticas de rata.

10

15

Análisis de transferencia Western de células estrelladas hepáticas humanas LX2 después de la eliminación de VEGFR1, VEGFR2 o SMO.

Las células LX2 (una línea de células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas, laboratorio de Scot Friedman) se colocaron en placas a 10^5 células por pocillo en medio de ensayo (suero bovino fetal al 10%, DMEM). Despues de 24 horas, las células se transdujeron con partículas lentivirales. Despues de 24 horas de incubación con partículas virales, las células se cambiaron a medio de ensayo nuevo y se incubaron durante 48 horas. Las células se lisaron en Cell Lytic M (Sigma) y las concentraciones de lisado se normalizaron mediante lecturas de absorción a 260 nm. Las muestras se hirvieron en tampón de muestra 2X y 10% de beta-mercaptoetanol. Se cargaron cantidades iguales de lisado en cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron por transferencia semiseca a membranas de PVDF. Despues de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce); ver Figura 13. Las construcciones para los shARN entregados lentiviramente se obtuvieron de Sigma como reservas de glicerol de MISSION. Los lentivirus se empaquetaron usando células 293T y vectores de empaquetamiento pMD2.G y pSPAX2. El clón 65 corresponde a un shARN dirigido a SMO, 31 y 32 corresponden a un shARN dirigido a VEGFR1, los clones 86 y 87 corresponden a un shARN dirigido a VEGFR2, y pLKO es el plásmido SCH002 que codifica un shARN no dirigido. La eliminación genética de la señalización de VEGF y Hedgehog en células estelares humanas inhibió la activación de miofibroblastos pro-fibróticos y recapituló parcialmente la actividad anti-fibrótica de itraconazol y sus análogos.

20

25

30

35 La Tabla 1 siguiente muestra datos analíticos compuestos (RMN y EM) así como su actividad biológica. La CE50 para la actividad (imagen y occidental) se clasifica como: +++ = <500 nM; ++ = 500 nM a 5 μ M; + = 5 a 30 μ M. Los compuestos 1, 2, 4 - 14, 16, 17, 19 - 23, 26, 27, 29, 84, 100 y 101 son compuestos de referencia.

Tabla 1

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|---------|------------|---------------------------------------|-----------|
| ITZ | | Cis racemato | +++ |
| POS | | Cis racemato | + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|---------|------------|--|-----------|
| 1 | | Cis racemato LC-MS: m/z 673,0 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 8,21 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,49 (m, 1H), 7,42 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 6,88 (m, 2H), 6,79 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,70 (dd, J = 16,4 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,98 (dd, J = 6,8 Hz, 5,2 Hz, 1H), 3,83-3,77 (m, 2H), 3,49 (dd, J = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 1H), 3,37-3,35 (m, 4H), 3,24-3,22 (m, 4H), 1,86 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,38 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 6,0 Hz, 3H). | ++ |
| 2 | | LC-MS: m/z 673,0 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 7,73 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 7,65 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,49 (m, 1H), 7,43 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,87 (m, 2H), 6,77 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,90 (s, 2H), 4,41 (m, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 3,96 (dd, J = 6,8 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,81 (dd, J = 9,6 Hz, 4 Hz, 1H), 3,75 (dd, J = 7,6 Hz, 3,6 Hz, 1H), 3,38-3,35 (m, 5H), 3,24-3,22 (m, 4H), 1,85 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,39 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 6,0 Hz, 3H). | ++ |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 3 | | LC-MS: m/z 673,0 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl_3): 7,62 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,46-7,42 (m, 3H), 7,03 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 6,87 (m, 2H), 6,81 (m, 2H), 5,00 (dd, $J = 24,4$ Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,97-3,81 (m, 2H), 3,50 (dd, J = 7,6 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,37 (m, 4H), 3,25 (m, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,38 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, $J = 6,0$ Hz, 3H). | + |
| 4 | | LC-MS: m/z 686,1 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl_3): 7,62 (s, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,44-7,30 (m, 3H), 7,03 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 6,87 (m, 2H), 6,76 (m, 2H), 6,01 (m, 1H), 4,55 (dd, $J = 28,8$ Hz, 12,0 Hz, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,82-3,71 (m, 3H), 3,37 (br s, 4H), 3,25 (m, 4H), 2,25 (s, 3H), 1,86 (m, 1H), 1,73 (m, 1H), 1,39 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,90 (t, $J = 6,0$ Hz, 3H). | + |

(Continuación)

| 5 | Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|----|------------|------------|--|-----------|
| 10 | 5 | | CL-EM: m/z 687,0 (M+H) | + |
| 15 | 20 | | Cis quiral LC-MS: m/z 673,0 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 8,21 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,49 (m, 1H), 7,42 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 6,88 (m, 2H), 6,79 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,70 (dd, J = 16,4 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,98 (dd, J = 6,8 Hz, 5,2 Hz, 1H), 3,83-3,77 (m, 2H), 3,49 (dd, J = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 1H), 3,40 (br s, 4H), 3,28 (br s, 4H), 1,86 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,38 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 6,0 Hz, 3H)."/> | ++ |

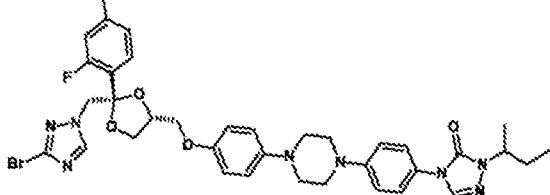
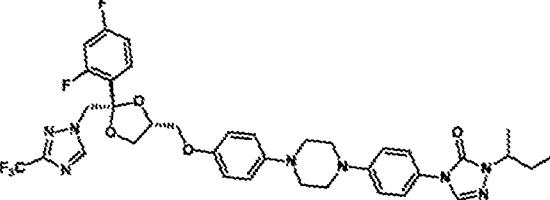
55

60

65

(Continuación)

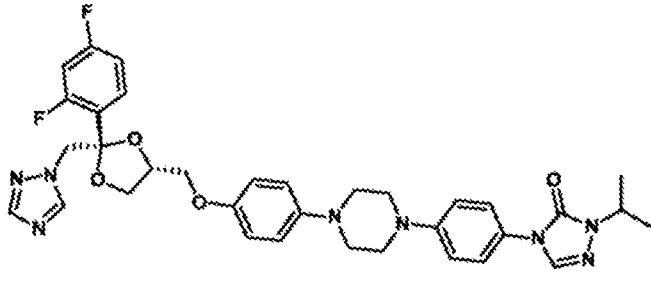
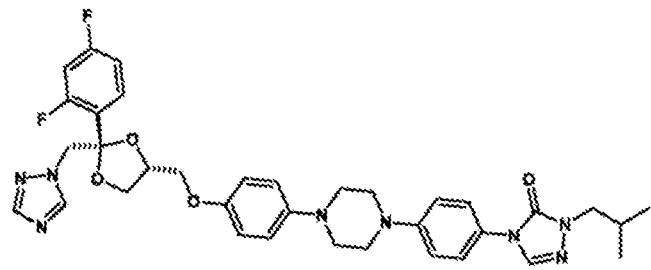
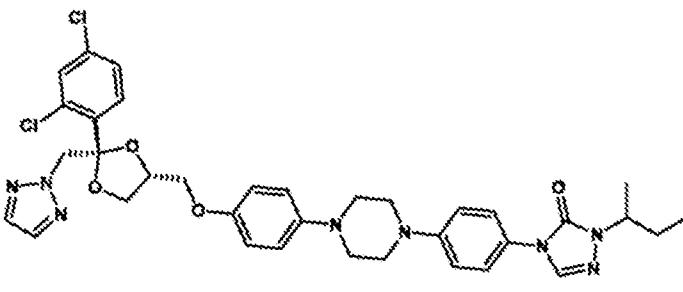
(Continuación)

| Compº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | de Actividad |
|-------|---|---|--------------|
| 9 |  | LC-MS: m/z 750,9 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 8,12 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,44 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 6,95-6,88 (m, 4H), 6,84 (m, 2H), 4,65 (dd, J = 15,6 Hz, 12,0 Hz, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,98 (dd, J = 6,8 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,86 (dd, J = 6,8 Hz, 4,0 Hz, 1H), 3,82 (dd, J = 7,6 Hz, 3,6 Hz, 1H), 3,52 (dd, J = 7,6 Hz, 4,8 Hz, 1H), 3,37 (br s, 4H), 3,25 (br s, 4H), 1,86 (m, 1 H), 1,72 (m, 1 H), 1,39 (d, J = 5,6 Hz, 3H), 0,91 (t, J = 5,6 Hz, 3H). | + + |
| 10 |  | LC-MS: m/z 741,0 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 8,33 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,44 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 7,04 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 6,93-6,89 (m, 4H), 6,82 (br s, 2H), 4,74 (dd, J = 14,0 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,43 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,99 (dd, J = 6,8 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,83 (dd, J = 6,8 Hz, 4,4Hz, 1H), 3,79 (m, 1 H), 3,51 (m, 1 H), 3,38 (br s, 4H), 3,25 (br s, 4H), 1,85 (m, 1 H), 1,73 (m, 1H), 1,39 (d, J = 5,6 Hz, 3H), 0,91 (t, J = 5,6 Hz, 3H). | + + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | 11 | <p>LC-MS: m/z 829,3 (M+H) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7,62 (s, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,42 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 6,96-6,88 (m, 4H), 6,83 (m, 2H), 4,67 (dd, J = 24,0 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,43 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,90 (dd, J = 7,2 Hz, 4,0Hz, 1H), 3,85 (dd, J = 7,6 Hz, 4,0 Hz, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,37 (br s, 4H), 3,26 (br s, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,39 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,91 (t, J = 6,0 Hz, 3H).</p> | + |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | | | |
| 45 | | | |
| 50 | 12 | <p>LC-MS: m/z 723,0 (M+H) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7,88-7,87 (m, 2H), 7,62 (s, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,43 (m, 4H), 7,04 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 6,94-6,83 (m, 4H), 6,41 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 5,30 (dd, J = 37,6 Hz, 9,6 Hz, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,94 (dd, J = 7,2 Hz, 4,8 Hz, 1H), 3,89 (dd, J = 6,8 Hz, 3,2 Hz, 1H), 3,53 (br s, 1H), 3,36 (br s, 4H), 3,22 (br s, 4H), 2,99 (m, 1H), 1,85 (m, 1 H), 1,72 (m, 1 H), 1,39 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,91 (t, J = 6,0 Hz, 3H).</p> | + |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

(Continuación)

| 5 | Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|----|------------|--|--|-----------|
| 10 | 13 |  | LC-MS: m/z 659,0 (M+H) | + |
| 15 | 14 |  | LC-MS: m/z 673,0 (M+H) | + |
| 20 | 30 |  | LC-MS: m/z 705,2 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl3) δ 7,64 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,61 (s, 2H), 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,51 - 7,40 (m, 3H), 7,23 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,09 - 7,03 (m, 2H), 6,98 - 6,91 (m, 2H), 6,84 - 6,77 (m, 2H), 5,25 - 5,03 (m, 3H), 4,46 - 4,36 (m, 1H), 4,36 - 4,27 (m, 1H), 3,98 - 3,84 (m, 3H), 3,48 (dd, J = 9,5, 7,1 Hz, 1H), 3,39 (m, 4H), 3,26 (m, 4H), 1,89 (m, 2H), 1,74 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3 H)."/> | ++ |

(Continuación)

| 5 | Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|----|------------|------------|--|-----------|
| 10 | 16 | | LC-MS: m/z 755,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,12 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,86 - 7,77 (m, 2H), 7,65 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,58 - 7,53 (m, 2H), 7,48 - 7,36 (m, 4H), 7,33 (dd, J = 8,5, 2,1 Hz, 1H), 7,27 - 7,20 (m, 2H), 6,72 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,54 - 5,29 (m, 2H), 4,56 - 4,37 (m, 1H), 4,34 - 4,18 (m, 1H), 4,04 - 3,84 (m, 2H), 3,68 (m, 8H), 3,61 - 3,44 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + + |
| 20 | 45 | | Trans-racémica LC-MS: m/z 755,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,95 - 7,86 (m, 2H), 7,63 (dd, J = 4,6, 3,9 Hz, 2H), 7,49 - 7,37 (m, 5H), 7,18 (m, 1H), 7,08 - 7,01 (m, 2H), 6,92 6,84 (m, 2H), 6,72 - 6,61 (m, 2H), 5,42 - 5,27 (m, 3H), 4,38 - 4,22 (m, 2H), 4,01 - 3,90 (m, 2H), 3,89 - 3,76 (m, 2H), 3,36 (m, 4H), 3,22 (m, 4H), 1,90 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,87 (t, J = 7,2 Hz, 3H). | + + |

(Continuación)

| 5 | Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|----|------------|------------|--|-----------|
| 10 | 18 | | LC-MS trans-racémica: m/z 705,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,63 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 7,55 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,49 - 7,39 (m, 3H), 7,17 (dd, J = 8,5, 2,1 Hz, 1H), 7,08 - 6,99 (m, 2H), 6,96 - 6,84 (m, 2H), 6,77 - 6,63 (m, 2H), 5,19 - 4,96 (m, 2H), 4,32 (m, 2H), 4,03 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,30 - 3,15 (m, 4H), 1,88 (m, 1H), 1,81 - 1,64 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 15 | 19 | | LC-MS: m/z 704,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,49 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,47 - 7,41 (m, 2H), 7,31 - 7,25 (m, 1H), 7,09 - 7,01 (m, 3H), 6,99 - 6,91 (m, 3H), 6,87 - 6,77 (m, 2H), 4,62 - 4,40 (m, 2H), 4,39 - 4,26 (m, 2H), 3,89 (dd, J = 8,4, 6,5 Hz, 1H), 3,82 - 3,71 (m, 2H), 3,41 - 3,34 (m, 4H), 3,31 (dd, J = 9,6, 6,8 Hz, 1H), 3,29 - 3,18 (m, 4H), 1,95 - 1,81 (m, 1H), 1,79 - 1,66 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | LC-MS: m/z 754,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 9,43 (s, 1H), 8,11 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 8,08 - 7,99 (m, 1H), 7,86 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,73 - 7,67 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 7,58 - 7,46 (m, 4H), 7,21 (m, 3H), 6,57 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 5,33 - 5,05 (m, 3H), 4,51 - 4,36 (m, 2H), 4,33 - 4,17 (m, 1H), 3,89 (dd, J = 8,5, 7,4 Hz, 1H), 3,79 (dd, J = 8,5, 4,9 Hz, 1H), 3,71 (dd, J = 10,6, 3,1 Hz, 1H), 3,60 - 3,46 (m, 9H), 1,89 (m, 1H), 1,82 - 1,72 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |
| 40 | | LC-MS: m/z 716,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,98 (s, 1H), 8,65 (s, 2H), 8,10 (s, 1H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,54 - 7,46 (m, 2H), 7,36 (dd, J = 8,5, 2,1 Hz, 1H), 7,20 (m, 4H), 6,87 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,96 - 3,66 (m, 4H), 3,57 - 3,38 (m, 8H), 1,89 (m, 1H), 1,75 (m, 1H), 1,40 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |

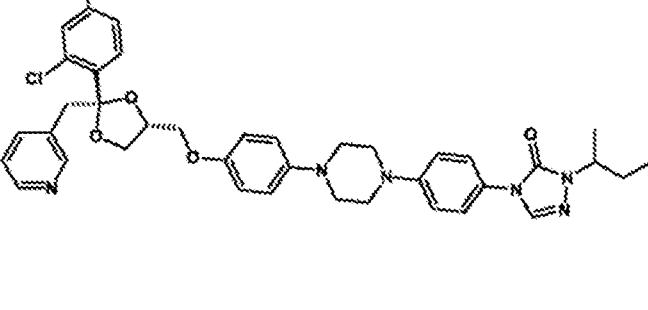
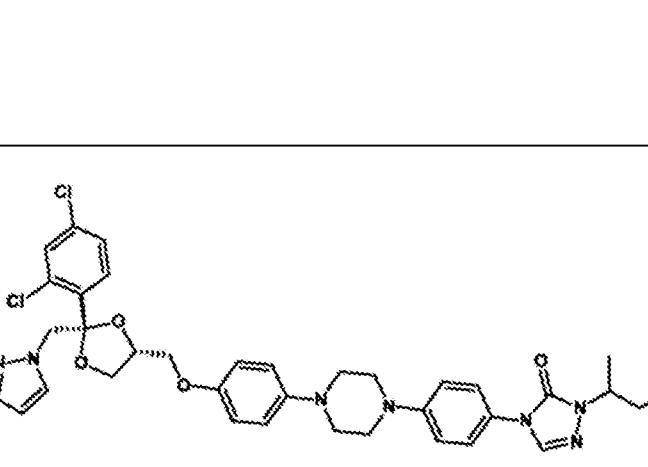
(Continuación)

| Compº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|-------|------------|--|-----------|
| 22 | | LC-MS: m/z 716,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 9,13 (dd, J = 2,2, 1,2 Hz, 1H), 9,03 (dd, J = 5,2, 1,2 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,53 - 7,48 (m, 2H), 7,48 - 7,42 (m, 2H), 7,36 (dd, J = 5,2, 2,3 Hz, 1H), 7,24 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,08 - 7,04 (m, 2H), 6,99 - 6,93 (m, 2H), 6,79 - 6,73 (m, 2H), 4,36 - 4,28 (m, 2H), 3,85 (dd, J = 8,4, 6,8 Hz, 1H), 3,79 (dd, J = 8,5, 5,0 Hz, 1H), 3,74 (dd, J = 9,7, 5,0 Hz, 1H), 3,56 - 3,51 (m, 1H), 3,48 (d, J = 13,8 Hz, 1H), 3,44 - 3,35 (m, 5H), 3,26 (dd, J = 6,5, 3,6 Hz, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,80 - 1,71 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | +++ |
| 23 | | LC-MS: m/z 715,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,51 - 8,44 (m, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,51 - 7,42 (m, 4H), 7,24 - 7,15 (m, 3H), 7,10 - 7,03 (m, 2H), 7,00 - 6,91 (m, 2H), 6,80 - 6,71 (m, 2H), 4,39 - 4,27 (m, 2H), 3,90 - 3,79 (m, 2H), 3,59 - 3,45 (m, 3H), 3,45 - 3,33 (m, 5H), 3,32 - 3,19 (m, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | +++ |

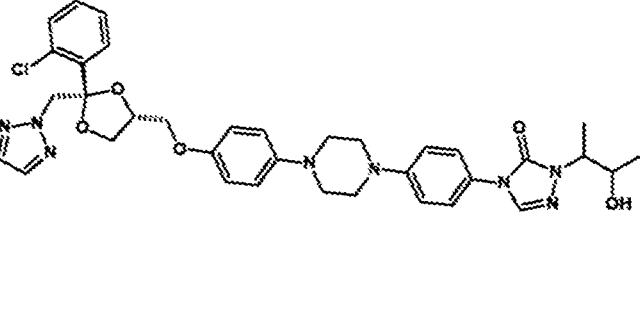
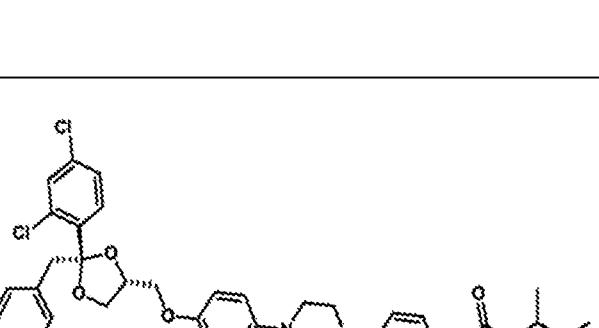
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | | | |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |
| | | LC-MS: m/z 706,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,28 (dd, J = 2,8, 0,7 Hz, 1H), 7,75 (dd, J = 9,1, 2,8 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 2,2 Hz, 3H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,23 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 6,99 - 6,91 (m, 2H), 6,84 - 6,76 (m, 3H), 5,26 - 4,97 (m, 2H), 4,46 - 4,36 (m, 1H), 4,34 - 4,24 (m, 1H), 4,01 - 3,83 (m, 3H), 3,83 - 3,73 (m, 4H), 3,46 (dd, J = 9,5, 7,1Hz, 1H), 3,27 - 3,14 (m, 4H), 1,89 (m, 1H), 1,80 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (s, 2H), 0,94 (d, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |
| | | LC-MS: m/z 706,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,28 (dd, J = 2,8, 0,7 Hz, 1H), 7,75 (dd, J = 9,1, 2,8 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 2,2 Hz, 3H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,23 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 6,99 - 6,91 (m, 2H), 6,84 - 6,76 (m, 3H), 5,26 - 4,97 (m, 2H), 4,46 - 4,36 (m, 1H), 4,34 - 4,24 (m, 1H), 4,01 - 3,83 (m, 3H), 3,83 - 3,73 (m, 4H), 3,46 (dd, J = 9,5, 7,1Hz, 1H), 3,27 - 3,14 (m, 4H), 1,89 (m, 1H), 1,80 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,94 (d, J = 7,4 Hz, 3H). | + |

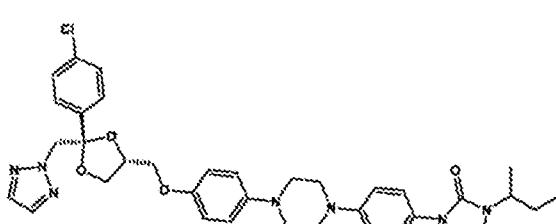
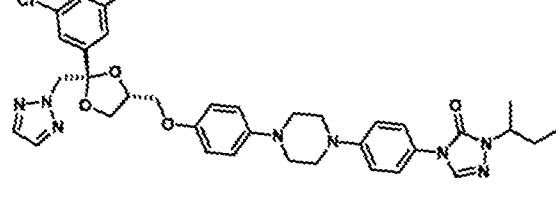
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|---|---|-----------|
| 26 |  | LC-MS: m/z 715,3 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,48 (m, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,46 (m, 4H), 7,23 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,16 (m, 1H), 7,05 (m, 2H), 6,94 (m, 2H), 6,75 (m, 2H), 4,31 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 3,72 (m, 1H), 3,49- 3,34 (m, 7H), 3,27 - 3,14 (m, 4H), 1,89 (m, 1H), 1,80 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,94 (d, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |
| 27 |  | LC-MS: m/z 704,2 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,51 (td, J = 2,3, 0,7 Hz, 2H), 7,49 - 7,41 (m, 3H), 7,25 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,08 - 7,02 (m, 2H), 6,99 - 6,90 -(m, 2H), 6,83 6,74 (m, 2H), 6,24 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 4,91 - 4,63 (m, 2H), 4,45 - 4,24 (m, 2H), 3,94 - 3,74 (m, 3H), 3,43 - 3,30 (m, 5H), 3,29 - 3,15 (m, 4H), 1,94 - 1,85 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,94 (d, J = 7,4 Hz, 3H)."/> | + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|---------|---|---|-----------|
| 28 |  | LC-MS: m/z 721,3 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,09 (s, 1H), 7,57 - 7,50 (m, 5H), 7,43 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,30 (dd, J = 8,6, 2,1 Hz, 2H), 7,24 - 7,17 (m, 2H), 7,12 - 7,02 (m, 2H), 5,11 (m, 2H), 4,49 - 4,38 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,99 (m, 3H), 3,93 - 3,76 (m, 2H), 3,70 - 3,50 (m, 8H), 1,40 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 1,28 (d, J = 6,4 Hz, 3H). | ++ |
| 29 |  | LC-MS: m/z 732,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 9,16 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 8,10 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,72 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 7,67 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 9,1, 2,7 Hz, 2H), 7,49 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,39 (dd, J = 8,5, 2,1 Hz, 1H), 7,29 - 7,17 (m, 2H), 6,95 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,42 - 4,33 (m, 1H), 4,16 (h, J = 7,1 Hz, 1H), 4,04 - 3,95 (m, 1H), 3,92 - 3,79 (m, 3H), 3,72 (s, 4H), 3,64 (q, J = 6,8, 5,1 Hz, 4H), 3,61 - 3,50 (m, 2H), 1,48 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,15 (d, J = 6,3 Hz, 3H). | +++ |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|---|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 |  | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 671,41 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40 - 1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 3,17 - 3,36 (m, 4H), 3,41-3,43 (m, 5H), 3,77-3,80 (m, 1H), 3,86-3,90 (m, 2H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,37-4,38 (m, 1H), 4,84 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 6,90-6,91 (m, 2H), 7,05-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,35-7,37 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,46-7,54 (d, J = 8,4 Hz, 4H), 7,63-7,65 (m, 3H). | ++ |
| 35 |  | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 705,46 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,27-3,39 (s, 4H), 3,39-3,47 (s, 4H), 3,48-3,51 (m, 1H), 3,80-3,84 (m, 1H), 3,89-3,95 (m, 2H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,38-4,42 (m, 1H), 4,83 (s, 2H), 6,80-6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,961 (s, 2H), 7,04-7,07 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,36-7,40 (m, 3H), 7,44-7,46 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 2,8 Hz, 3H). | ++ |

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 32 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 671,41 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,43 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 1,69-1,79 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,26-3,51 (m, 9H), 3,82-3,88 (m, 2H), 3,93-3,96 (m, 1H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,37-4,43 (m, 1H), 5,08-5,11 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,22-5,25 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,79-6,81 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,91-6,95 (m, 2H), 7,02-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,24-7,28 (m, 1H), 7,31-7,35 (m, 1H), 7,44-7,48 (m, 3H), 7,63-7,68 (m, 4H) | + |
| 33 | | LCMS: 99,39% a 262 nm; m/z 671,41 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,43 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,69-1,79 (m, 1H), 1,83-1,92 (m, 1H), 3,27-3,44 (m, 9H), 3,77-3,81 (m, 1H), 3,86-3,94 (m, 2H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,36-4,42 (m, 1H), 4,84 (s, 2H), 6,79-6,81 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (s, 2H), 7,02-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,30-7,37 (m, 2H), 7,41-7,46 (m, 3H), 7,53-7,54 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,63-7,65 (m, 3H). | ++ |

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 34 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 682,56 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,25-1,28 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,68-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,66-2,71 (q, 2H), 3,29-3,33 (m, 5H), 3,42 (s, 4H), 3,72-3,75 (m, 1H), 3,80-3,83 (m, 1H), 3,89-3,93 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 4,29-4,39 (m, 2H), 4,85 (s, 2H), 6,78-6,80 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,02-7,07 (m, 4H), 7,23-7,25 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,44-7,50 (q, 4H), 7,64 (s, 3H). | ++ |
| 35 | | LCMS: 99,39% a 262 nm; m/z 717,46 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,43 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,28 (s, 4H), 3,41-3,45 (m, 5H), 3,77-3,81 (m, 1H), 3,86-3,92 (m, 2H), 4,29-4,39 (m, 2H), 4,84 (s, 2H), 6,80-6,82 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 6,95-6,96 (s, 2H), 7,05-7,07 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,40-7,47 (m, 4H), 7,51-7,53 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,62-7,64 (d, J = 7,2 Hz, 3H). | ++ |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 36 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 705,36 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,75 (m, 1H), 1,84-1,88 (m, 1H), 3,26 (s, 4H), 3,39 (s, 4H), 3,46-3,50 (d, 1H), 3,79-3,83 (m, 1H), 3,91-3,92 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,30-4,41 (m, 2H), 4,84 (s, 2H), 6,80-6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,95 (s, 2H), 7,04-7,06 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,32-7,35 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz, 3H), 7,44-7,46 (m, 3H), 7,60-7,64 (m, 4H). | + |
| 37 | | LCMS: 99,81% a 262 nm; m/z 662,55 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,43 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,28 (s, 4H), 3,40 (s, 4H), 3,51-3,58 (d, 1H), 3,84-3,89 (m, 1H), 3,92-3,96 (m, 2H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,37-4,40 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 6,81-6,83 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,97 (s, 2H), 7,02-7,04 (d, 2H), 7,44-7,46 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,61-7,64 (m, 5H), 7,66-7,69 (m, 2H). | ++ |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

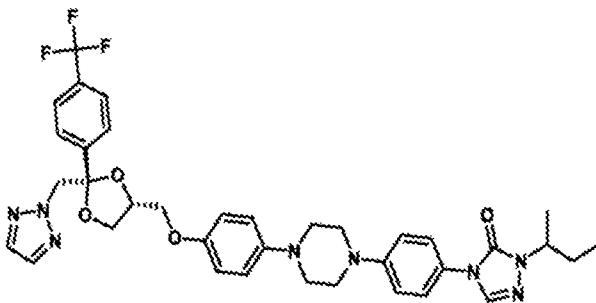
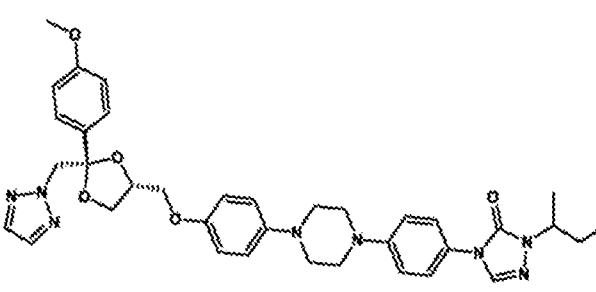
50

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|--|-----------|
| 38 |  | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 705,41 (M+H). 1H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 3,17 (s, 1 H), 3,27 (s, 2H), 3,41-3,48 (m, 6H), 3,78-3,82 (m, 1H), 3,89-3,92 (m, 2H), 4,29- 4,41 (m, 2H), 4,87 (s, 2H), 6,83-6,92 (m, 4H), 7,06-7,08 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,46-7,48 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 7,63-7,67 (m, 6H), 7,78-7,98 (m, 1H). | ++ |
| 39 |  | LCMS: 96,30% a 261 nm; m/z 667,46 (M+H). 1H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,26-3,39 (m, 9H), 3,73-3,76 (m, 1H), 3,82-3,92 (m, 5H), 4,29-4,39 (m, 2H), 4,84 (s, 2H), 6,80 (s, 2H), 6,90- 6,92 (m, 4H), 7,05-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,45-7,49 (m, 4H), 7,63-7,64 (d J = 4,8 Hz, 3H). | ++ |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | 41 | <p>LCMS: 100% a 262 nm; m/z 651,45 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDl₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 3,16-3,39 (m, 8H), 3,72-3,76 (m, 2H), 3,82-3,85 (m, 1H), 3,88-3,92 (m, 1H), 4,29 -4,38 (m, 2H), 4,85 (s, 2H), 6,80 (s, 2H), 6,89 - 6,94 (m, 2H), 7,02-7,07 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,20-7,22 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,44-7,46 (d, J = 8,0 Hz, 4H), 7,64-7,65 (m, 3H).</p> | ++ |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | 42 | <p>LCMS: 100% a 261 nm; m/z 637,45 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDI₃): 0,92 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,86-1,89 (m, 1H), 3,30-3,43 (m, 9H), 3,73-3,78 (m, 1H), 3,83-3,86 (m, 1H), 3,89-3,93 (m, 1H), 4,30-4,33 (m, 1H), 4,37-4,40 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 6,79-6,81 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,02-7,07 (m, 4H), 7,38-7,42 (m, 3H), 7,44-7,47 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,56-7,59 (m, 2H), 7,64 (m, 3H)</p> | +++ |
| 45 | | | |
| 50 | 43 | <p>LCMS: 100% a 262 nm; m/z 705,61 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDI₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d J = 6,4 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,26 (s, 4H), 3,37-3,41 (m, 4H), 3,82-3,87 (m, 2H), 3,90-3,94 (m, 1H), 4,29-4,34 (m, 3H), 4,94-5,04. (Q, 2H), 6,78-6,80 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,95 (s, 2H), 7,04-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,44-7,46 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,50-7,55 (m, 2H), 7,63-7,64 (m, 3H), 7,74-7,75 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,80-7,83 (m, 1H).</p> | + |

55

60

65

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | 44 | <p>LCMS: 99,84% a 261 nm; m/z 715,31 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDl₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,08-3,09 (s, 3H), 3,25-3,27 (m, 4H), 3,37-3,40 (m, 4H), 3,51-3,55 (m, 1H), 3,83-3,85 (m, 1H), 3,92-3,94 (m, 2H), 4,30-4,33 (m, 1H), 4,38-4,40 (m, 1H), 4,88 (s, 2H), 6,80-6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,95-6,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,04-7,06 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,44-7,46 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,62-7,64 (d, J = 8,0 Hz, 3H), 7,72-7,75 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,95-7,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H).</p> | + |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | | | |
| 45 | 45 | <p>LCMS: 100% a 262 nm; m/z 667,36 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDl₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 3,26 (s, 4H), 3,34-3,39 (m, 5H), 3,74-3,77 (m, 1H), 3,82-3,85 (m, 3H), 3,89-3,91 (m, 2H), 4,31 -4,38 (m, 2H), 4,84 (s, 2H), 6,77-6,81 (s, 2H), 6,90-6,93 (d, J = 8,8 Hz, 4H), 7,02-7,07 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,47-7,54 (m, 4H), 7,63-7,65 (m, 3H).</p> | + |
| 50 | | | |
| 55 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 46 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 719,51 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDI ₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,16-2,19 (s, 3H), 3,25 (s, 4H), 3,38 (s, 4H), 3,48-3,52 (q, 1H), 3,91-4,00 (m, 3H), 4,29-4,34 (m, 1H), 4,39-4,41 (m, 1H), 5,06-5,09 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 5,17-5,20 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 6,69-6,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,78-6,84 (m, 2H), 7,04-7,06 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,20-7,23 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz, 1H), 7,44-7,48 (m, 3H), 7,52-7,54 (d, J = 8,4 Hz 1H), 7,60-7,64 (m, 3H). | + |
| 47 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 752,51 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDI ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,69-1,77 (m, 1H), 1,83-1,92 (m, 1H), 3,34 (s, 4H), 3,45-3,52 (m, 5H), 3,85 (s, 3H), 3,94-3,98 (m, 3H), 4,29-4,34 (q, 1H), 4,41-4,44 (q, 1H), 5,06-5,10 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,14-5,21 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 6,82-6,84 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,05-7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,19-7,22 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,44-7,47 (m, 3H), 7,51-7,53 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,60-7,65 (m, 3H). | + |

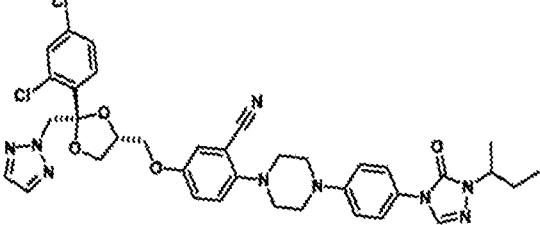
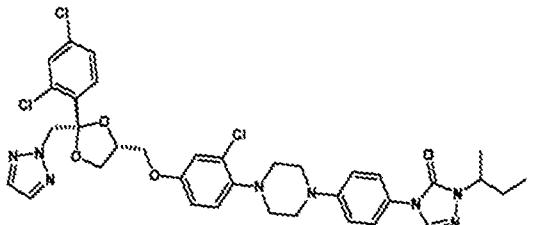
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | 48 | <p>LCMS: 100% a 262 nm; m/z 758,56 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDI₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,27-3,28 (s, 4H), 3,37-3,38 (s, 4H), 3,50-3,54 (q, 1H), 3,96-4,03 (m, 3H), 4,29-4,34 (q, 1H), 4,40-4,41 (q, 1H), 5,07-5,10 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,16-5,20 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,86 (s, 2H), 7,02-7,06 (m, 3H), 7,20-7,22 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,44 (s, 1H), 7,46-7,47 (m, 2H), 7,52-7,54 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,60 (s, 2H), 7,64 (s, 1H).</p> | ++ |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | 49 | <p>LCMS: 100% a 263 nm; m/z 723,81 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDI₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,84-1,92 (m, 1H), 3,25-3,28 (m, 4H), 3,36-3,38 (m, 4H), 3,50-3,55 (q, 1H), 3,92-3,95 (m, 3H), 4,29-4,34 (q, 1H), 4,37-4,42 (q, 1H), 5,04-5,08 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,16-5,20 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,65-6,66 (m, 1H), 6,67-6,76 (dd, J 1 = 16,8 Hz y J 2 = 3,2 Hz 1H), 6,86-6,90 (t, J = 9,2 Hz, 1H), 7,03-7,06 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,20-7,23 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,43-7,47 (m, 3H), 7,52-7,55 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,58-7,64 (m, 3H).</p> | ++ |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 50 | | LCMS: 100% a 265 nm; m/z 719,61 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 3,05 (s, 4H), 3,38-3,47 (m, 5H), 3,86-3,96 (m, 3H), 4,29-4,41 (m, 2H), 5,05-5,09 (d,, J = 14,4 Hz 1H), 5,17 hasta 5,21 (d,, J = 14,4 Hz 1H), 6,64-6,73 (m, 2H), 7,2 a 7,4 (m, 3H), 7,21 a 7,24 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,44-7,48 (m, 3H), 7,54-7,57 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,62-7,65 (m, 3H). | ++ |
| 51 | | LCMS: 100% a 262 nm; m/z 735,31 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 3,16-3,18 (s, 4H), 3,40-3,42 (m, 4H), 3,47-3,50 (m, 1H), 3,84-3,97 (m, 5H), 4,29-4,34 (q, 1H), 4,39-4,41 (q, 1H), 5,05-5,09 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,18-5,22 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,34-6,37 (dd, J 1 = 11,2 Hz y J 2 = 2,8 Hz 1H 1H), 6,47-6,48 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,89-6,91 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,04-7,06 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,22-7,24 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,42-7,48 (m, 3H), 7,55-7,64 (m, 4H). | ++ |

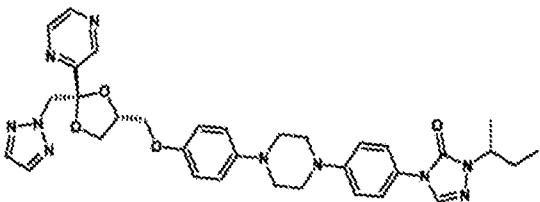
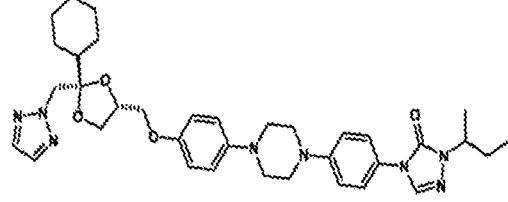
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|---|---|-----------|
| 52 |  | LCMS: 99,78% a 265 nm; m/z 730,51 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDI ₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,41-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,71-1,78 (m, 1H), 1,85-1,89 (m, 1H), 3,30-3,37 (m, 5H), 3,47-3,51 (m, 4H), 3,80-3,83 (m, 1H), 3,86-3,89 (m, 1H), 3,93-3,97 (m, 1H), 4,31-4,33 (q, 1H), 4,39-4,42 (q, 1H), 5,05-5,09 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,17-5,20 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 7,02-7,10 (m, 3H), 7,20-7,26 (m, 3H), 7,46-7,59 (m, 4H), 7,64-7,67 (m, 3H). | ++ |
| 53 |  | LCMS: 100% a 263 nm; m/z 741,56 (M+H). ¹ H RMN (400 MHz, CDI ₃): 0,91-0,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,71-1,77 (m, 1H), 1,85-1,90 (m, 1H), 3,17 (s, 4H), 3,41-3,46 (m, 4H), 3,51 (s, 1H), 3,81-3,84 (m, 1H), 3,87-3,96 (m, 2H), 4,29-4,36 (q, 1H), 4,37-4,41 (q, 1H), 5,05-5,08 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,17-5,20 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,73-6,76 (dd, J 1 = 11,6 Hz y J 2 = 2,8 Hz 1H), 6,92-6,93 (d, J = 302 Hz, 1H), 7,02-7,07 (m, 3H), 7,22-7,25 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,44-7,49 (m, 3H), 7,54-7,57 (m, 1H), 7,63-7,64 (m, 3H). | ++ |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | 54 | <p>LCMS: 100% a 263 nm; m/z 723,81 (M+H). ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃): 0,90-0,94 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,40-1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 3,17-3,20 (m, 4H), 3,38-3,46 (m, 5H), 3,80-3,83 (m, 1H), 3,86-3,96 (m, 2H), 4,29-4,36 (q, 1H), 4,37-4,40 (q, 1H), 5,04-5,08 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 5,17-5,21 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,56-6,64 (m, 2H), 6,92-6,97 (t, 1H), 7,04-7,06 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,22-7,25 (dd, J 1 = 10,4 Hz y J 2 = 2,0 Hz 1H), 7,43-7,48 (m, 3H), 7,55 -7,59 (m, 1H), 7,62-7,64 (m, 3H).</p> | +++ |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | 55 | | |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | 56 | <p>LC-MS: m/z 639,2 (M+H) ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃): 8,77 (d, J = 8,63 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,59 (s, 2H), 7,47 (m, 1H), 7,26 (m, 1H), 6,95 (m, 2H), 6,87 (m, 2H), 6,81 (m, 2H), 5,27 (dd, J = 24,4 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,97-3,81 (m, 2H), 3,50 (dd, J = 7,6 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,37 (m, 4H), 3,25 (m, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,38 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 6,0 Hz, 3H).</p> | + |
| 65 | | | |

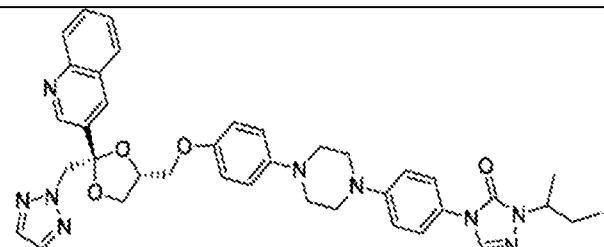
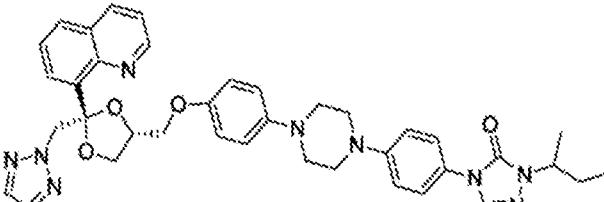
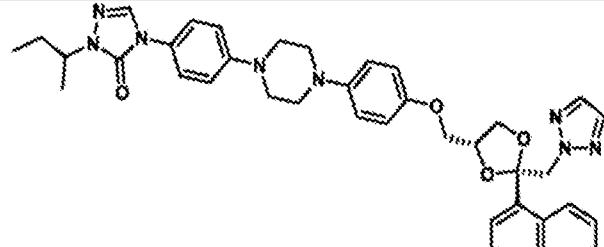
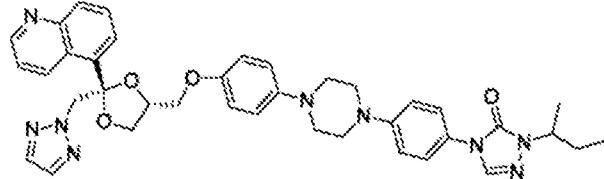
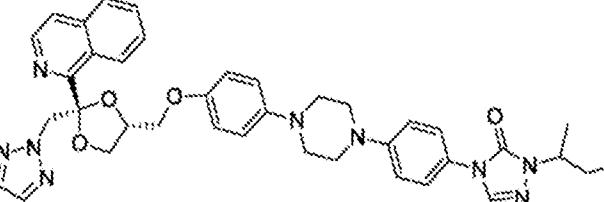
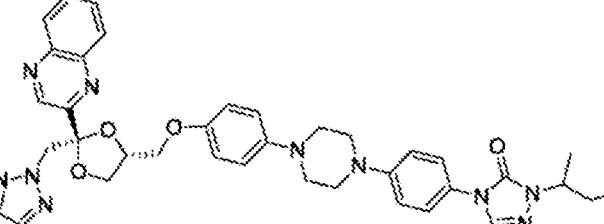
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | 57 |  LC-MS: m/z 639,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,85 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 8,66 (dd, J = 2,5, 1,5 Hz, 1H), 8,61 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,62 (s, 2H), 7,48 - 7,40 (m, 2H), 7,08 - 7,01 (m, 2H), 6,94 - 6,86 (m, 2H), 6,79 - 6,69 (m, 2H), 5,22 - 5,05 (m, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,37 - 4,22 (m, 1H), 4,15 (m, 3H), 4,09 - 3,93 (m, 4H), 3,37 (m, 4H), 3,23 (m, 4H), 1,98 - 1,83 (m, 1H), 1,82 - 1,72 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 45 | | | |
| 50 | 58 |  LC-MS: m/z 643,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,66 (d, J = 0,6 Hz, 2H), 7,64 (t, J = 0,7 Hz, 1H), 7,49 - 7,42 (m, 2H), 7,11 - 7,03 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 6,85 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,70 (s, 2H), 4,44 - 4,37 (m, 1H), 4,32 (dt, J = 8,6, 6,4 Hz, 1H), 4,18 (dd, J = 8,3, 6,3 Hz, 1H), 3,93 (dd, J = 9,7, 4,8 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 9,6, 6,0 Hz, 1H), 3,50 - 3,12 (m, 9H), 2,08 - 1,65 (m, 7H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 1,22 (m, 6H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | | | |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 63 | | LC-MS: m/z 687,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,81 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,92 (m, 3H), 7,71-7,63 (m, 4H), 7,58 - 7,48 (m, 4H), 7,09-6,71 (m, 6H), 5,24 - 5,05 (m, 2H), 4,44 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,40 - 4,27 (m, 1H), 3,99 (dd, J = 8,5, 6,3 Hz, 1H), 3,82 (td, J = 10,6, 9,8, 4,8 Hz, 2H), 3,73 - 3,04 (m, 9H), 1,89 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |

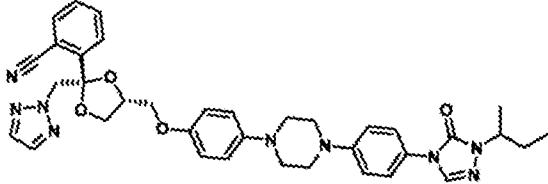
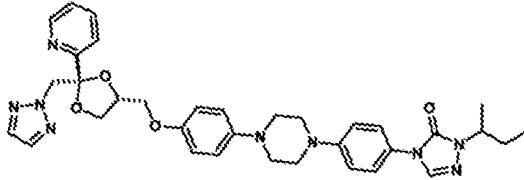
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|---|-----------|
| 64 |  | | |
| 65 |  | | |
| 66 |  | | |
| 67 |  | | |
| 68 |  | | |
| 69 |  | | |

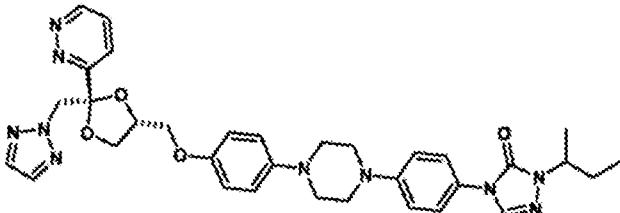
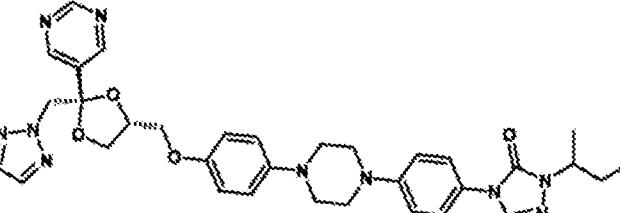
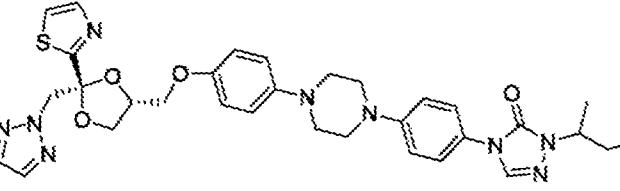
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 70 | | | |
| 71 | | | |
| 72 | | LC-MS: m/z 713,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,73-7,56 (m, 9H), 7,53 - 7,43 (m, 4H), 7,43-7,35 (m, 1H), 7,06 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,97 (m, 2H), 6,81 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,91 (s, 2H), 4,43 (ddd, J = 9,4, 6,8, 4,6 Hz, 1H), 4,37 - 4,26 (m, 1H), 3,97 (dd, J = 8,5, 6,5 Hz, 1H), 3,87 (dd, J = 8,5, 4,3 Hz, 1H), 3,79 (dd, J = 9,4, 5,1 Hz, 1H), 3,52 - 3,07 (m, 9H), 1,89 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,95 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 73 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|---|--|-----------|
| 74 |  | LC-MS: m/z 662,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,77 (dd, J = 7,5, 1,4 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,62 - 7,48 (m, 5H), 7,45 (dd, J = 9,1, 2,2 Hz, 2H), 7,10 - 7,03 (m, 2H), 7,01 - 6,93 (m, 2H), 6,89 - 6,81 (m, 2H), 5,17 - 5,01 (m, 2H), 4,46 (tt, J = 6,8, 4,6 Hz, 1H), 4,39 - 4,26 (m, 1H), 4,09 (dd, J = 8,6, 4,7 Hz, 1H), 4,07 - 3,95 (m, 2H), 3,70 (dd, J = 9,6, 7,0 Hz, 1H), 3,39 (m, 4H), 3,26 (m, 4H), 1,89 (m Hz, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |
| 75 |  | LC-MS: m/z 638,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,73 (ddt, J = 4,9, 1,7, 0,8 Hz, 1H), 7,76-7,68 (m, 1H), 7,64 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,54 (dd, J = 7,7, 1,2 Hz, 1H), 7,49 - 7,41 (m, 2H), 7,30 (m, 1H), 7,13 - 7,03 (m, 2H), 7,02 - 6,92 (m, 2H), 6,88 - 6,70 (m, 2H), 5,15 (m, 2H), 4,49 (ddd, J = 11,6, 6,7, 4,9 Hz, 1H), 4,42 - 4,26 (m, 1H), 4,07 (dd, J = 8,5, 6,4 Hz, 1H), 3,92 (td, J = 9,0, 8,4, 4,8 Hz, 2H), 3,56 (dd, J = 9,5, 7,2 Hz, 1H), 3,47-3,36 (m, 4H), 3,26 (m, 4H), 1,92 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7, 3H), 0,91 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |

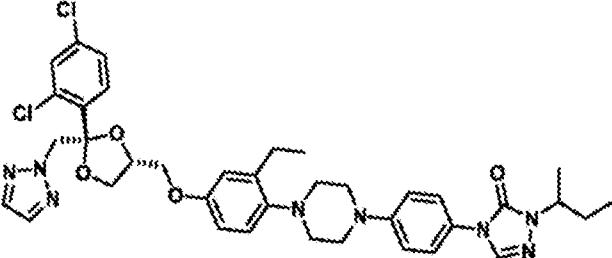
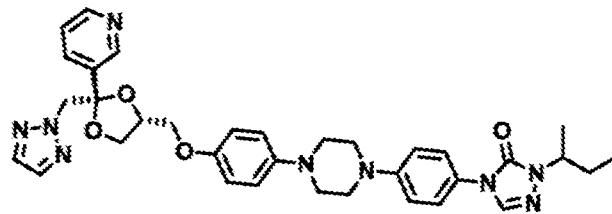
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|--|-----------|
| 76 |  | | |
| 77 |  | | |
| 78 |  | LC-MS: m/z 644,1 (M+H) ⁺ RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,91 (dd, J = 6,5, 3,2 Hz, 1H), 7,68- 7,64 (m, 3H), 7,47 - 7,41 (m, 2H), 7,39 (t, J = 3,3 Hz, 1H), 7,05 (dd, J = 9,0, 3,7 Hz, 2H), 7,00 - 6,93 (m, 2H), 6,85 - 6,76 (m, 2H), 5,31 - 5,12 (m, 2H), 4,62 (dq, J = 6,8, 5,4 Hz, 1H), 4,39 - 4,25 (m, 1H), 4,21 (dd, J = 8,6, 6,3 Hz, 1H), 3,88 (ddd, J = 10,5, 9,1, 5,1 Hz, 2H), 3,52 (dd, J = 9,6, 7,0 Hz, 1H), 3,45 - 3,32 (m, 4H), 3,30 - 3,14 (m, 4H), 1,98 - 1,83 (m, 1H), 1,82 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |

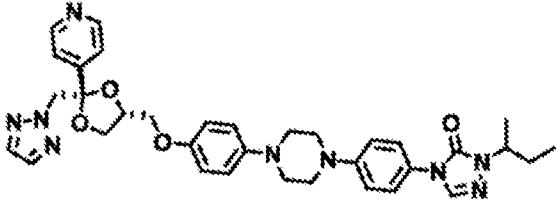
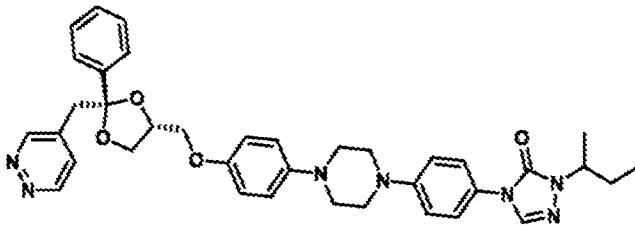
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |
| 20 | | | |
| 25 | | | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | | | |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 79 | | LC-MS: m/z 730,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,64 (m, 3H), 7,55 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,52-7,46 (m, 2H), 7,24 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 2H), 7,15 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,09 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,89 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 5,21 - 5,07 (m, 2H), 4,46 (m, 1H), 4,33 (m, 1H), 3,99 (dtd, J = 18,1, 8,9, 4,6 Hz, 3H), 3,52 (dd, J = 9,5, 7,6 Hz, 1H), 3,41 (m, 4H), 3,31 (m, 4H), 1,96 - 1,88 (m, 1H), 1,79 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | ++ |
| 80 | | LC-MS: m/z 733,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,69 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,61 (s, 2H), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,47 - 7,42 (m, 2H), 7,21 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,09 - 7,00 (m, 2H), 6,87 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,25 - 4,97 (m, 2H), 4,44 - 4,37 (m, 1H), 4,37 - 4,27 (m, 1H), 4,05 - 3,86 (m, 3H), 3,50 (dd, J = 9,4, 7,4 Hz, 1H), 3,39 (m, 4H), 3,32 - 3,25 (m, 4H), 2,58 (q, J = 7,5 Hz, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,81 - 1,72 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 1,17 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,2 Hz, 3H). | + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|---|-----------|
| 81 |  | LC-MS: m/z 733,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,65 (s, 1H), 7,62 (s, 2H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,47 - 7,40 (m, 2H), 7,23 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,11 - 7,01 (m, 3H), 6,75 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 6,65 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H), 5,27 - 5,00 (m, 2H), 4,40 (m, 1H), 4,32 (dt, J = 8,7, 6,4 Hz, 1H), 4,02 - 3,83 (m, 3H), 3,44 (dd, J = 9,4, 7,4 Hz, 1H), 3,41 - 3,28 (m, 4H), 3,09 - 2,91 (m, 4H), 2,74 (q, J = 7,5 Hz, 2H), 1,98 - 1,85 (m, 1H), 1,81 - 1,70 (m, 1H), 1,43 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 1,17 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,2 Hz, 3H). | + |
| 82 |  | LC-MS: m/z 638,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,10 (s, 1H), 7,67 (s, 2H), 7,54-7,38 (m, 3H), 7,34 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 7,24-7,09 (m, 4H), 6,94 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 4,44 (m, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,06 - 3,71 (m, 5H), 3,54-3,43 (m, 8H), 1,96 - 1,85 (m, 2H), 1,31, (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H). | + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|---|-----------|
| 83 |  | LC-MS: m/z 638,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): 8,62 (d, J = 8,63 Hz, 2H), 7,61 (s, 1H), 7,59 (s, 2H), 7,46-7,42 (m, 3H), 7,03 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 6,87 (m, 2H), 6,81 (m, 2H), 5,00 (dd, J = 24,4 Hz, 11,6 Hz, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,97-3,81 (m, 2H), 3,50 (dd, J = 7,6 Hz, 5,6 Hz, 1H), 3,37 (m, 4H), 3,25 (m, 4H), 1,87 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,38 (d, J = 5,2 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 6,0 Hz, 3H). | + |
| 84 |  | LC-MS: m/z 648,2 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 9,08 (dd, J = 2,4, 1,3 Hz, 1H), 9,01 (dd, J = 5,2, 1,3 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,50 - 7,30 (m, 8H), 7,09 - 7,02 (m, 2H), 6,99 - 6,93 (m, 2H), 6,81 - 6,71 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 3,93 - 3,67 (m, 5H), 3,61 - 3,50 (m, 2H), 3,39 (m, 4H), 3,27 (m, 4H), 3,19 (m, 2H), 1,89 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,42 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H). | ++ |

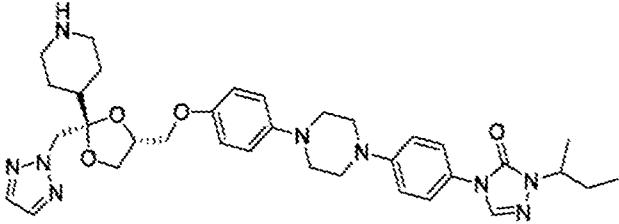
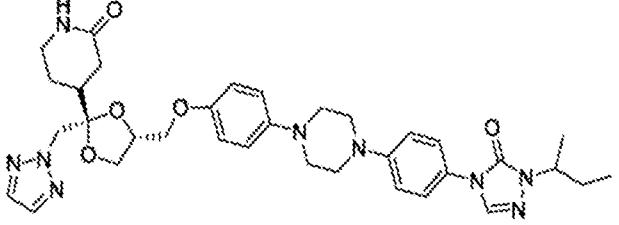
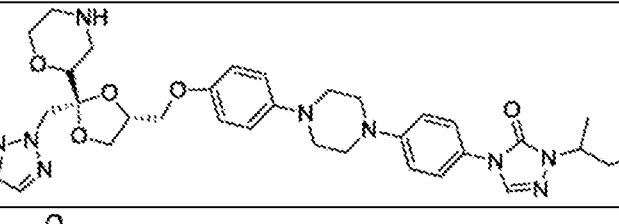
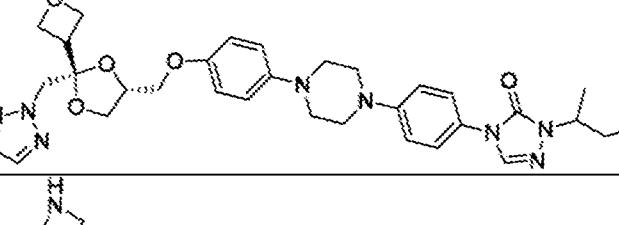
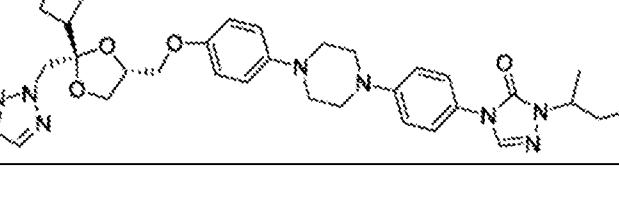
(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|---|-----------|
| 85 | | | |
| 86 | | | |
| 87 | | | |
| 88 | | LC-MS: m/z 615,2 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,66 (m, 3H), 7,47 (m, 2H), 7,07- 6,88 (m, 6H), 4,59-4,47 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,15 - 3,88 (m, 2H), 3,82 - 3,72 (m, 1 H), 3,60 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 3,41- 3,22 (m, 8H), 2,67 (m, 1H), 2,12-1,70 (m, 8H), 1,40 (m, 3H), 0,97 (m, 3H). | ++ |
| 89 | | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|---------|------------|---|-----------|
| 90 | | LC-MS: m/z 603,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,72 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 7,49 - 7,41 (m, 2H), 7,09 - 7,02 (m, 2H), 7,01 - 6,92 (m, 2H), 6,88 - 6,78 (m, 2H), 4,73 - 4,56 (m, 2H), 4,51 - 4,43 (m, 1H), 4,32 (dp, J = 8,6, 6,6 Hz, 1H), 4,19 (dd, J = 8,3, 6,5 Hz, 1H), 3,82 (dd, J = 10,0, 4,4 Hz, 1H), 3,61 (dd, J = 9,9, 5,2 Hz, 1H), 3,55 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,44 - 3,35 (m, 4H), 3,31 - 3,20 (m, 4H), 1,95 - 1,80 (m, 2H), 1,74 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,07 (dd, J = 11,5, 6,9 Hz, 6H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 91 | | | |
| 92 | | LC-MS: m/z 645,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 7,69 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,48 - 7,41 (m, 2H), 7,05 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,00 - 6,93 (m, 2H), 6,91 - 6,81 (m, 2H), 4,74 - 4,59 (m, 2H), 4,50 - 4,38 (m, 1H), 4,38 - 4,14 (m, 2H), 4,12 - 3,84 (m, 4H), 3,78 (dd, J = 9,9, 5,5 Hz, 1H), 3,60 (t, J = 8,3 Hz, 1H), 3,45 - 3,29 (m, 5H), 3,30 - 3,18 (m, 4H), 1,97 - 1,81 (m, 3H), 1,80 - 1,70 (m, 3H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|--|--|-----------|
| 93 |  | LC-MS: m/z 644,1 (M+H) ¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,11 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,50 (dd, J = 9,2, 2,7 Hz, 2H), 7,31 (dd, J = 16,7, 9,0 Hz, 2H), 7,19 (dd, J = 9,2, 3,1 Hz, 2H), 7,09 - 6,96 (m, 2H), 4,78 - 4,67 (m, 2H), 4,35 - 4,20 (m, 2H), 4,19 - 3,95 (m, 3H), 3,88 (m, 1H), 3,51 (m, 10H), 2,95 (m, 2H), 2,31 - 1,64 (m, 7H), 1,40 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | + |
| 94 |  | | |
| 95 |  | | |
| 96 |  | | |
| 97 |  | | |

(Continuación)

| Comp nº | Estructura | Datos de caracterización (RMN y LCMS) | Actividad |
|------------|------------|--|-----------|
| 98 | | | |
| 99 | | | |
| 100 | | LC-MS: m/z 719,2 (M+H) RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,10 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,51 - 7,42 (m, 3H), 7,28 - 7,24 (m, 1H), 7,10-7,03 (m, 2H), 7,00 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,96 - 6,87 (m, 2H), 4,53 - 4,21 (m, 4H), 4,19 - 4,03 (m, 3H), 3,90 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,40 (m, 4H), 3,27 (m, 4H), 2,82 - 2,64 (m, 2H), 1,98 - 1,84 (m, 1H), 1,83 - 1,64 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 3H). | +++ |
| 101 | | CL-EM: m/z 733,2 (M+H) | + |

60 *Ensayo de inhibición reversible Cyp*

El propósito de este ensayo fue determinar la inhibición reversible de la enzima Cyp con un compuesto dado usando consigue sonda sustrato como el sustituto de la inhibición. Esto se realizó con microsomas hepáticos humanos en lugar de una enzima aislada para dar cuenta de los metabolitos del fármaco original que conduce a una posible interacción fármaco-fármaco a través de la inhibición de Cyp. El recambio del sustrato (por ejemplo, la conversión de midazolam en hidroxil midazolam) se controló mediante LCMSMS (Q1/Q2 = 342,2/203,2). Los compuestos de prueba

se probaron en una curva de respuesta a la dosis de 7 puntos a partir de 50 μM a 50 nM (series de dilución ~3 veces). Para Cyp 3A4, el compuesto de control positivo fue ketoconazol con un IC_{50} ~25 nM.

El protocolo detallado fue el siguiente:

- 5 • Compuestos de prueba preparados y solución de trabajo de inhibidores estándar (100 x).
- Se trajeron los microsomas del congelador a -80°C para descongelarlos en hielo, etiquetados con la fecha y colocados nuevamente en el congelador inmediatamente después de usarlos.
- 10 • Se agregaron 20 μl de las soluciones de sustrato a los pozos correspondientes.
- Se agregaron 20 μl de PB a los pozos en blanco.
- 15 • Se agregaron 2 μl de los compuestos de prueba y la solución de trabajo de control positivo a los pozos correspondientes.
- Se agregaron 2 μl de MeOH a los pozos sin inhibidor y a los pozos en blanco.
- Solución de trabajo preparada de HLM.
- 20 • Se agregaron 158 μl de la solución de trabajo HLM a todos los pozos de la placa de incubación.
- Precalienta la placa durante aproximadamente 10 minutos a 37°C en un baño de agua.
- Solución de cofactor NADPH preparada.
- 25 • Se agregaron 20 μl de cofactor NADPH a todos los pozos de incubación.
- Mezclado e incubado durante 10 minutos a baño de agua a 37°C.
- En el punto de tiempo, finalizó la reacción agregando 400 μl de solución de parada fría (200 ng/ml de tolbutamida en ACN).
- Centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 20 minutos para precipitar la proteína.
- Se transfirieron 200 μl de sobrenadante a 200 ml de agua de HPLC y se agitó durante 10 minutos.
- Muestras analizadas por LC/MS/MS.

Datos de compuesto obtenidos por este ensayo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

| Compuesto nº | Cyp 3A4 midazolam LCMS IC_{50} (μM) | Cyp 3A4 testosterona LCMS IC_{50} (μM) |
|--------------|---|--|
| 1 | | 4,5 |
| 2 | | >30 |
| 15 | >50; >50 | >50 |
| 35 19 | 0,0031 | 0,0069 |
| 21 | 0,144 | 0,12 |
| 22 | >50,>50 | >50,>50 |
| 40 23 | 0,321 | |
| 24 | | >10,>30 |
| 26 | 0,18 | 0,283 |
| 45 27 | >50,>50 | >50,>50 |
| 30 | >50 | >50 |
| 32 | >50 | >50 |
| 36 | >50 | >50 |
| 41 | >50,>50 | >50 |
| 50 42 | >50,>50 | >50,>50 |
| 49 | >50 | >50 |
| 54 | >50 | >50 |
| 74 | >50 | >50 |
| 55 79 | >50 | >50 |
| 84 | 2,55,2,35 | 1,77 |
| 100 | 0,372 | 0,545 |
| ITZ | 0,0447, 0,0546 | 0,0127 |

60 Ensayo de inhibición dependiente del tiempo Cyp (TDI)

El propósito de este ensayo era determinar la capacidad de los compuestos para formar citocromo inhibido irreversiblemente Aductos P450 (también conocidos como inhibición basada en mecanismos (MBI)) en microsomas hepáticos humanos. En comparación con la inhibición competitiva de CYP, se ha reconocido que MBI es una preocupación mucho mayor en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, porque la inactivación de CYP puede

conducir a una farmacocinética no lineal y subestimar el potencial de interacción fármaco-fármaco. Los datos de este ensayo se usaron junto con el ensayo de inhibición reversible. El ensayo de TDI se realizó generalmente en microsomas hepáticos para evaluar el potencial de TDI del fármaco original y los metabolitos. La lectura fue un cambio IC₅₀ con NADPH (el conjunto de inactivación/TDI) para permitir que el compuesto se convierta en una especie reactiva y sin NADPH (conjunto de control para corregir la degradación de proteínas durante la preincubación de 20 minutos). Luego, ambos conjuntos de incubación se diluyeron con tampón de ensayo nuevo que contenía sustratos específicos NADPH Cyp (midazolam para Cyp3A4) y la inhibición de la hidroxilación de midazolam se midió por LC-MS/MS (Q1/Q2 = m/z 342,2/203,2). Se consideró que un desplazamiento de Cl₅₀ > 1,5 veces era positivo para la inhibición dependiente del tiempo, donde la preincubación de 20 minutos conduce a un aumento de la potencia. La troleandomicina se usó como un compuesto de control positivo, exhibiendo un cambio TDI IC₅₀ de > 20. Los compuestos de prueba se probaron en una curva de respuesta a la dosis de 7 puntos a partir de 50 µm a 50 nM (series de dilución <3 veces).

El protocolo detallado fue el siguiente:

- 15 • Compuestos de prueba preparados y solución de trabajo de control positivo (100 x) en DMSO/MeOH 1:1
- Se trajeron microsomas del congelador a -80°C para descongelarlos.
- Se preparó la mezcla de incubación y se agregó 147,5 µl a todos los pozos de la placa de incubación.
- Solución de cofactor preparada y solución de dilución de sustrato.
- 20 ○ Se agregaron 2,5 µl de los compuestos de prueba y la solución de trabajo de control positivo a los pozos correspondientes. Concentraciones finales del compuesto en una respuesta a la dosis de 7 puntos de 50 µm a 50 nM
- Se agregaron 2,5 µl 1:1 DMSO/MeOH a los pocillos NIC
- 25 • Se precalentó la placa durante aproximadamente 10 minutos a 37°C.
- Se agregaron 50 µl de cofactor a los pozos de preincubación.
- Se agregaron 50 µl de solución de dilución de sustrato a los pozos de incubación.
- Se mezclaron y preincubarán durante 20 minutos a 37°C en baño de agua.
- Se agregaron 50 µl de cofactor a los pozos de incubación;
- 30 ○ Se agregaron 50 µl de solución de dilución de sustrato a los pozos de preincubación.
- Se mezclaron e incubaron durante 5 minutos a baño de agua a 37°C
- En el punto de tiempo, finalizó la reacción agregando solución fría de parada fortificada con 250 µl de IS a todos los pozos.
- 35 • Se centrifugó la placa de incubación a 4000 rpm durante 20 min.
- Se transfirieron 200 µl de sobrenadante a 200 µl de agua de HPLC y se agitaron durante 10 minutos.
- Se analizaron las muestras por LCMS.

40 Los datos de compuesto obtenidos a partir de este ensayo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

| Comp. nº | 3A4-Midazolam Cl ₅₀ (-) NADPH | 3A4-Midazolam Cl ₅₀ (+) NADPH | Relación TDI: (-) NADPH/(+) NADPH |
|----------|---|---|-----------------------------------|
| 15 | > 50 µm | 41 µm | <1,2 (sin TDI) |
| 42 | > 50 µm | > 50 µm | <1 (sin TDI) |
| 22 | > 50 µm | > 50 µm | <1 (sin TDI) |

50 *Ensayo de activación PXR (CYP 3A4)*

El metabolismo CYP3A4 se evaluó mediante el uso del Ensayo P450 - Glo™ CYP3A4 con luciferina-IPA como el sustrato de CYP3A4 y se representó como RLU (unidades de luminiscencia relativa). La activación de PXR se evaluó mediante el uso de un reactivo de detección de luciferasa, ONA-Glo™ y se representó como RLU. La intensidad de la luz de luminiscencia fue directamente proporcional al alcance de la activación de PXR y la transcripción génica acompañante en las células DPX2. Los compuestos se probaron a 10, 1 y 0,1 µm en el ensayo. Pliegue de inducción = (RLU/RFU de muestra tratada compuesta)/(RLU/RFU de muestra tratada de vehículo), RFU fue la señal de viabilidad celular. RLU fue la señal del metabolismo CYP3A y la activación de PXR. Se usó 0,1% de DMSO como vehículo. La viabilidad celular se detectó utilizando CellTiter-FluorTM y se representó como RFU (Unidades de fluorescencia relativa).

65 La potencia de activación se definió como negativa, débil, moderada y fuerte. Los activadores negativos, débiles, moderados y fuertes son aquellos que dan <15%, <40%, <69% y >70%, respectivamente, de la respuesta producida por 10 µm RIF a 10 µm.

Datos de compuesto obtenidos de este ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

| Comp. nº | Activación de PXR (inducción de pliegues en comparación con rifampicina) |
|----------|--|
| 15 | <1x (sin inducción) |
| 42 | <1,5x (sin inducción) |
| 22 | <1,1 x (sin inducción) |

*Determinación de la potencia MIC antifúngica por *Candida albicans**

Se usó la *Candida albicans* de tipo salvaje (ATCC 10231) y se compraron Fluconazol, anfotericina B, itraconazol y terbinafina de Sigma y se usaron como controles positivos.

La concentración de ensayo más alta para todos los compuestos de ensayo y fluconazol fue de 100 µm. Fluconazol también se ensayó a la concentración más alta de 64 µg/ml, y anfotericina B y terbinafina a los 16 y 64 µg/ml. Los compuestos de prueba estaban en solución madre de DMSO a una concentración de 10 mM. Se prepararon dos soluciones madre en DMSO para fluconazol a 10 mM y 6,4 mg/ml. Se prepararon soluciones madre de anfotericina B y terbinafina en DMSO a 1,6 y 6,4 mg/ml.

Dilución en serie de soluciones madre 100X: se añadieron 4 µl de solución madre a 196 µl de RPMI1640 (MOPS tamponado y libre de HEPES y bicarbonato de sodio) en el primer pozo de una placa de fondo en U estéril de 96 pocillos. El resto de los pozos se llenó con 100 µl de RPMI1640. La dilución en serie de 2 veces se realizó secuencialmente transfiriendo 100 µl de solución al siguiente pocillo y mezclando por pipeteo, hasta el 11º pocillo. Los 100 µl adicionales en el undécimo pozo se descartaron. Por lo tanto, los pozos compuestos contenían 100 µl de 2x de las concentraciones de prueba de drogas en RPMI1640. El duodécimo pozo se llenó con solo 100 µl de RPMI1640.

El material congelado de glicerol de *C. albicans* 3147 (ATCC 10231) se rayó en agar Sabouraud dextrosa (SDA). La placa se incubó a una atmósfera de 35°C durante 20 h. Las colonias individuales se suspendieron en solución salina estéril hasta que la turbidez alcanzó 0,1 (1-5 x 106 UFC/ml) usando un medidor de turbidez Siemens. Esta suspensión se diluyó 50 x en RPMI1640 en un cónico de 15 ml, y luego se diluyó adicionalmente 20 x en RPMI1640 en un cónico de 50 ml. Esto dio 1-5 x 103 UFC/ml de suspensión y se usó como inóculo. La densidad celular en el inóculo se contó en placa para que fuera 4,94 x 103 UFC/ml.

Determinación de MIC: en 15 minutos, se añadieron 100 µl de inóculo bacteriano preparado a cada pocillo de compuesto/placa que contiene RPMI1640. Las placas se incubaron a 35°C en atmósfera ambiente. Las fotos fueron tomadas a las 24 h y 48 h. Los puntos finales de MIC para fluconazol y anfotericina B se leyeron de acuerdo con el protocolo M27-A3 (Método de referencia para la prueba de susceptibilidad antimicótica de levadura de dilución de caldo; Estándar aprobado-Tercera edición, estándar M27-A3 publicado 01/01/2008 por el Clinical and Laboratory Standards Institute). El MIC para compuestos para compuestos de prueba y terbinafina (no mencionado en el protocolo M27-A3) se leyó como si fueran azoles.

Los datos para los compuestos probados en este ensayo se muestran en la Tabla 5.

50

55

60

65

Tabla 5

| | Compuesto nº | <i>C. Albicans</i> MIC90 a las 24 h (μ M) | <i>C. Albicans</i> MIC90 a las 48 h (μ M) |
|----|--------------|--|--|
| 5 | 15 | > 100 | > 100 |
| | 19 | 0,195 | 0,195 |
| 10 | 21 | > 100 | > 100 |
| | 22 | > 100 | > 100 |
| 15 | 23 | > 100 | > 100 |
| | 26 | > 100 | > 100 |
| 20 | 27 | > 100 | > 100 |
| | 30 | > 100 | > 100 |
| 25 | 32 | > 100 | > 100 |
| | 36 | > 100 | > 100 |
| | 41 | > 100 | > 100 |
| | 42 | > 100 | > 100 |
| 30 | 49 | > 100 | > 100 |
| | 54 | > 100 | > 100 |
| 35 | 79 | > 100 | > 100 |
| | 84 | > 100 | > 100 |
| 40 | 100 | 0,781 | 1,563 |
| | 101 | > 100 | > 100 |

Estudios farmacocinéticos de ratón (PK)

Los compuestos con propiedades ADME *in vitro* adecuadas progresaron a estudios PK *in vivo*. Se utilizó un formato de instantánea en ratones para evaluar rápidamente la posibilidad de que los candidatos principales sean biodisponibles por vía oral. El formato de instantánea incluía una dosis única (típicamente 20 mg/kg) administrada por vía oral en un vehículo estándar (5% de PEG/DMSO en agua, por ejemplo). Los compuestos se infundieron directamente en el análisis de MS para determinar la señal única de MRM (monitoreo de reacción múltiple) que depende de la concentración en los modos positivo o negativo de ESI. El análisis por HPLC usando diversos gradientes de solventes se realizó a partir de una solución orgánica y acuosa para asegurar una buena forma de pico de las masas Q1/Q2 deseadas. Las formulaciones incluyeron 45% de ciclodexrina en agua (como se usa clínicamente para el itraconazol). Otras formulaciones que pueden usarse son solutol, Eudragit, MC/Tween, etc. Se generaron curvas estándar usando plasma enriquecido con compuesto a varias concentraciones (10 ng/ml a 2000 ng/ml) para determinar el rango lineal de la señal de masa Q1/Q2 a concentración de compuesto usando plasma heparinizado de ratón hembra. Los ratones se dosificaron por vía oral con muestras compuestas de plasma recogidas por sangrados retroorbitales. Se recogieron cinco puntos de tiempo (30 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h) en tubos de recogida heparinizados. La precipitación de proteínas se realizó y el compuesto se extrajo en acetonitrilo frío y se analizó por MS. Nonwinlin se utilizó para modelar PK según sea necesario.

45 Los resultados del estudio se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

| | Compuesto nº | Resultados del estudio de PK |
|----|--------------|---|
| 50 | 42 | 20 mg/kg en ciclodexrina al 45% con agua: AUC _{0-24h} = 42,67 ± 4,90 μ m * h C _{max} = 3,16 ± 0,4 μ m |
| 55 | 22 | 20 mg/kg en 0,5% MC/0,5% TW80 vehículo de suspensión: AUC _{0-24h} = 2,21 ± 0,02 μ m * h C _{max} = 0,17 ± 0,03 μ m |
| | 22 | 20 mg/kg en ciclodexrina al 45% con agua: AUC _{0-24h} = 8,08 ± 1,72 μ m * h C _{max} = 1,71 ± 0,44 μ m |

EJEMPLO II: Modelos animales

Para demostrar la actividad antifibrótica *in vivo*, se establecieron modelos de fibrosis de pulmón y piel de roedores inducidos por tetracloruro de carbono (CCl₄) inducidos por hígado y bleomicina. Estos ensayos *in vivo* tardaron entre 6 y 8 semanas en completarse (incluido el análisis histológico completo). Los experimentos típicos consistieron en grupos de 6-8 animales tratados con itraconazol (2-4 dosis), 1 o 2 análogos de itraconazol (2-4 dosis),

vehículos y tratamientos de referencia (pirfenidona y AM-152). AM-152 (Amira Pharmaceuticals) es un antagonista del receptor LPA1 (ácido lisofosfatídico 1). Este objetivo se ha descrito como relevante para la exacerbación de los sistemas de IPF en un modelo de bleomicina de ratón (British Journal of Pharmacology (2010), 160, 1699-1713). AM-152 es un compuesto avanzado en este objetivo como se ha descrito previamente con más detalle en el documento 5 WO 2012/078805 y se usó como un control positivo y comparador del compuesto descrito en esta solicitud.

Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

Se implantaron quirúrgicamente ratones machos B6 de nueve semanas de edad (granjas tacónicas) con bombas osmóticas que administraban 25 mg/kg de bleomicina por siete días. 17 días después de la cirugía, los ratones fueron tratados con drogas durante 2 semanas. Los tratamientos farmacológicos se administraron como se describe en el diseño del estudio (Figura 14). Los fármacos antifibróticos previamente descritos AM-152 y pirfenidona se utilizaron como fármacos de control positivo. Las secciones de pulmón se tiñeron con tricromo de Masson y, después de la exploración, se tomaron ocho campos aleatorios por animal para su análisis. Los datos se representan como media y s.e.m. (Figura 15a). En la Figura 15b se muestra una representación gráfica del modelo utilizado para evaluar los fármacos antifibróticos. En la Figura 15c se muestran imágenes representativas del pulmón teñido con tricromo de Masson de los grupos de tratamiento indicados. Las secciones de pulmón teñidas se analizaron de acuerdo con un sistema de puntuación Ashcroft modificado (Figura 16) y usando un método de análisis de imagen automatizado imparcial. El área teñida con tricromo de Total Masson se generó utilizando una macro de análisis de imagen automatizada en ImageJ. Luego, cada imagen se convirtió en una pila RGB, y el umbral para el área manchada se estableció de tal manera que solo se incluyó tejido pulmonar en el análisis, mientras que se excluyeron los espacios vacíos como los conductos respiratorios y los alvéolos. El área manchada total se determinó utilizando la función de medición de área dentro de ImageJ. Las puntuaciones medias de Ashcroft y los valores de porcentaje medio de área manchada indicaron que el itraconazol y sus análogos disminuyeron de manera dependiente de la dosis la gravedad de la enfermedad de fibrosis pulmonar en este modelo (Figuras 17a y 17b). A una dosis de 10 mg/kg (SID), el compuesto 42 disminuyó la gravedad de la enfermedad de fibrosis pulmonar con una eficacia tan buena o mejor en comparación con los compuestos de control AM-152 (30 mg/kg BID) y pirfenidona (400 mg/kg, OFERTA).

Modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono

Los tratamientos farmacológicos se administraron como se describe en el diseño del estudio (Figura 18). Las secciones de hígado se tiñeron con solución de Sirius Red. Después del escaneo, se generaron 5 imágenes aleatorias por animal. El porcentaje total de área positiva para la tinción con Sirius Red se generó usando una macro de imagen automatizada en la Imagen J. Brevemente, cada imagen se convirtió en una pila RGB, y el umbral para el área manchada se estableció de tal manera que no se incluyeron núcleos en el análisis. El área roja total se determinó cuantitativamente usando la función de medición de área dentro de ImageJ (Figura 19a). Los datos numéricos del análisis de imagen del modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄ se muestran en la Figura 19b. En la Figura 19c se muestran imágenes representativas de secciones de hígado teñidas con rojo Sirius del modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄. Los niveles en hígados de actina de músculo liso alfa ((SMA) se analizaron mediante transferencia Western (Figura 19d). Se homogeneizaron piezas de hígado del modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄ en PBS con un homogeneizador y bolas de acero. Los desechos se descartaron por centrifugación y el lisado concentrado se determinó mediante mediciones de absorbancia de Nanodrop a 260 nm. Se cargaron cantidades iguales de lisado en 30 cada línea de gel y luego se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10% y luego se transfirieron por transferencia semiseca a membranas de PVDF. Después de bloquear la leche al 5% en solución salina tamponada 35 con TRIS con Tween-20 (0,1%), las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios apropiados. Las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se visualizaron usando película y sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce). La tinción con rojo de Sirius y el análisis de transferencia 40 Western indicaron que la dosis de itraconazol disminuyó de manera dependiente la gravedad de la enfermedad de fibrosis hepática.

Modelo de cicatrización de heridas de roedores

El efecto del itraconazol y sus análogos sobre la cicatrización normal de heridas se evaluó utilizando un modelo estándar de cicatrización de heridas de roedores (el diseño del estudio se muestra en la Figura 20; resultados 55 en la Figura 21). Cinco días antes del inicio del modelo, se anestesiaron los ratones y se eliminó el vello de la piel de la espalda con Nair. El día 1, se pesaron los ratones y se realizó un punzón de biopsia estéril (5 mm de diámetro) perforando todo el grosor de la piel doblada hacia atrás (2 x 5 mm en total). El tamaño de las heridas se midió diariamente usando calibradores. El peso corporal se controló dos veces por semana durante todo el estudio. El día 1 60 y hasta el final del estudio, el tratamiento farmacológico (25 mg/kg, SID de itraconazol, 25 mg/kg SID compuesto 42 o vehículo) se administró diariamente usando un volumen de dosificación de 5 ml/kg. Los días 7, 11 y 14, se sacrificaron los animales de cada grupo y se recogieron las heridas para el análisis histológico. Al recolectar las heridas, las heridas se cortaron incluyendo unos pocos mm de la piel circundante. Para cada animal, se recogieron dos piezas de herida 65 y se fijaron para el análisis histológico. El itraconazol y el compuesto 42 no tuvieron efecto sobre la arquitectura del tejido o las tasas de curación de heridas normales en comparación con los controles del vehículo, según el análisis histológico y las mediciones diarias del calibrador.

EJEMPLO III: Estudio clínico de fase II para la esclerodermia

Un ensayo clínico aleatorizado doble ciego controlado con placebo de fase II demuestra Prueba de Concepto para un análogo de itraconazol antifibrótico optimizado en pacientes con esclerodermia cutánea difusa o esclerodermia sistémica con compromiso cutáneo difuso. Los pacientes que satisfacen los criterios de inscripción constituyen dos grupos iguales de 30. El brazo experimental recibe una dosis alta única de medicamento todos los días durante 6 meses y el brazo comparador de placebo recibirá placebo todos los días durante 6 meses. La dosis única alta del fármaco se determina en función de la eficacia preclínica, diana en un estudio de toxicología preclínica de cinomolgo y un estudio de seguridad de fase I. La medida de resultado primaria es una comparación de la eficacia del fármaco versus placebo en función del porcentaje de variación en m-RSS (puntaje 0-51, 17 sitios) entre la inclusión y las visitas mensuales. Las medidas de resultado secundarias son una comparación de la eficacia del fármaco frente al placebo basada en la variación en m-RSS entre los puntos de inclusión y tiempo de seguimiento (1, 3 y 6 meses); evaluación del compromiso del objetivo según lo determinado por el perfil de expresión de genes objetivo de hedgehog y VEGFR utilizando biopsias de piel obtenidas en la inclusión y a los 6 meses; evaluación del grosor de la piel en la inclusión y 6 meses utilizando biopsias de piel; evaluación del tratamiento de síntomas no cutáneos en pacientes con esclerodermia sistémica; evaluación de la calidad de vida utilizando un cuestionario de evaluación de salud y el índice de calidad de vida de dermatología; y evaluación de la tolerancia al tratamiento mediante el monitoreo clínico y de laboratorio de los efectos secundarios (incluida la evaluación de los signos de efectos inotrópicos negativos mediante ultrasonido cardíaco). La prueba de concepto exitosa se establecerá si >40% de los pacientes tienen una mejora de m-RSS (definida como una disminución de mRSS de $\geq 5,3$ unidades entre el inicio y la última visita del estudio a los 6 meses).

La población de pacientes diana precisa consiste en pacientes diagnosticados con esclerodermia cutánea difusa (o grave) (puntuación de la piel de Rodnan modificada, m-RSS $\geq 16/51$). Los subgrupos de pacientes conocidos son los pacientes diagnosticados con esclerodermia cutánea difusa localizada o esclerodermia sistémica con afectación cutánea difusa, según lo definido por el American College of Rheumatology.

Los criterios de inclusión y exclusión para el reclutamiento de pacientes de un estudio de prueba de concepto de fase II son los siguientes. Los pacientes serán mayores de 18 años con diagnóstico documentado de esclerodermia cutánea o sistémica. Se requiere un m-RSS basal de $\geq 16/51$ indicativo de esclerodermia cutánea difusa. Se requiere una puntuación de fracción de eyección de ultrasonido cardíaco previa a la inclusión de más del 55% (es decir, normal) para la inclusión. Los pacientes serán excluidos si han sido tratados con un medicamento (p. ej., metotrexato, corticosteroides, ciclofosfamida, bosentán) que tiene el potencial de interferir con el curso de la enfermedad dentro de un período de 3 meses antes del inicio del ensayo. Los pacientes que sufren insuficiencia orgánica grave, enfermedad hepática crónica (p. ej., cirrosis hepática, hepatitis crónica), cáncer, enfermedades crónicas (p. ej., artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, diabetes, VIH) o que tengan una química sanguínea anómala. Los pacientes que hayan tenido una cirugía mayor menos de 4 semanas antes de la inclusión serán excluidos. Los pacientes contraindicados con itraconazol, como se especifica en las especificaciones del producto, serán excluidos. Específicamente, se excluirán los pacientes con evidencia de disfunción ventricular (p. ej., Insuficiencia cardíaca congestiva, CHF), con riesgo de CHF o haber sido tratados con fármacos inotrópicos. Se excluirán los pacientes que hayan sufrido infarto de miocardio menos de 6 meses antes de la inclusión.

Los pacientes incluidos en un estudio de prueba de concepto de fase II se identifican y seleccionan para el tratamiento en colaboración con médicos dermatólogos en múltiples sitios dentro de los Estados Unidos. Un investigador coordinador que es miembro del Consorcio de Ensayos Clínicos de Esclerodermia supervisa el reclutamiento de pacientes y sirve como presidente del estudio. Los pacientes son diagnosticados con esclerodermia cutánea difusa localizada o esclerodermia sistémica con afectación cutánea difusa. Los pacientes se estratifican según el diagnóstico de esclerodermia (es decir, localizado o sistémico), el sexo y la edad para garantizar una distribución equitativa dentro de las poblaciones de tratamiento. Además, los pacientes se estratifican según la gravedad de la afectación cutánea para garantizar un número igual de pacientes con afectación cutánea grave (m-RSS $\geq 20/51$) dentro de las poblaciones de tratamiento. Esta estratificación requiere una prueba de diagnóstico inicial con escala de induración cutánea y biopsia de piel. Se requiere que los pacientes se sometan a una prueba de diagnóstico de ultrasonido cardíaco antes de la inclusión para garantizar la función cardíaca normal (puntaje de fracción de eyección $> 55\%$).

Como actualmente no existe un tratamiento indicado directamente para inhibir la fibrosis en pacientes con esclerodermia, no existe un agente de comparación para ser utilizado en estudios de pacientes. El nuevo agente se dosifica solo. Los pacientes que toman cualquier medicamento son monitoreados para asegurar que el nuevo agente no altere las propiedades farmacocinéticas y del metabolismo del medicamento que se está tomando.

La puntuación de la piel de Rodnan modificada (m-RSS) es un biomarcador identificado, medible y validado utilizado para evaluar la eficacia clínica en pacientes con esclerodermia. Brevemente, la superficie total de la piel se divide arbitrariamente en 17 sitios. En cada área, la palpación manual se usa para evaluar la puntuación de la piel. La puntuación de la piel varía de 0 a 3 según el grado de engrosamiento de la piel (0, no involucrado; 1, leve; 2, moderado; 3, grave). La puntuación total de la piel es la suma de las puntuaciones de cada una de las 17 áreas

(puntuación máxima de 51). Los pacientes que tienen una puntuación de entre 16 y 19 se clasifican como difusos y los que tienen una puntuación de ≥ 20 se clasifican como graves. Se ha demostrado que este sistema de puntuación de la piel se correlaciona muy bien con el grado de fibrosis dérmica y también se correlaciona bien con el grado de fibrosis/disfunción en los órganos internos (en pacientes con esclerodermia sistémica). El compromiso de la diana en la piel se puede evaluar mediante el seguimiento de los cambios en la expresión de los genes diana de hedgehog y VEGFR mediante biopsias de la piel.

EJEMPLO IV: Estudio clínico de fase II para fibrosis pulmonar idiopática

El propósito de este estudio es determinar la seguridad y eficacia del compuesto de fórmula (I) y fórmula (II) para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, en comparación con placebo. El ensayo clínico es intervencionista. La asignación de los participantes del estudio clínico es aleatoria; el modelo de intervención es de asignación paralela; y hay un enmascaramiento doble ciego del estudio (sujeto, cuidador, investigador). El presente estudio clínico mide principalmente la tasa de cambio de la capacidad vital forzada y, en segundo lugar, mide la seguridad basada en EA, signos vitales y pruebas clínicas de laboratorio.

Los criterios de inclusión para el reclutamiento de pacientes son los siguientes:

- Ambos sexos entre las edades de 40 y 80 años, inclusive, al azar.
- Tiene síntomas clínicos consistentes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI).
- Primero recibió un diagnóstico de FPI al menos 6 meses y no más de 48 meses antes de la aleatorización. La fecha de diagnóstico se define como la fecha de la primera HRCT disponible o biopsia pulmonar quirúrgica compatible con IPF/UIP.
- Tener un diagnóstico de fibrosis pulmonar intersticial (UIP) o IPF habitual mediante tomografía computarizada de alta resolución (HRCT) o biopsia pulmonar quirúrgica (SLB)
- Extensión de los cambios fibróticos (panal, cambios reticulares) mayores que la extensión del enfisema en la exploración HRCT.
- No tiene características que respalden un diagnóstico alternativo en biopsia transbronquial, BAL o SLB, si se realiza.
- Tener un porcentaje predicho de FVC post-broncodilatador entre 50% y 80%, inclusive, en la evaluación.
- Tener un cambio en la FVC posterior al broncodilatador (medido en litros) entre el cribado y el día 1 que sea inferior a una diferencia relativa del 10%, calculado como: el valor absoluto del 100% (cribado FVC (L)- día 1 FVC (L))/cribado FVC (L).
- Tener monóxido de carbono capacidad (DLCO) entre el 30% y el 80% de difusión (ajustado por la hemoglobina y la altitud, ambos inclusive, en el cribado).
- No hay evidencia de mejora en las medidas de gravedad de la enfermedad IPF respecto al año anterior, en opinión del investigador.
- Ser capaz de caminar 150 metros o más durante la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) en el examen de detección.
- Demostrar una disminución de la saturación de oxígeno de 2 puntos porcentuales o más durante el 6MWT en el examen de detección (se puede realizar con titulación de oxígeno suplementaria para mantener la saturación de oxígeno) niveles $>88\%$.
- Pueden comprender y firmar un formulario de consentimiento informado por escrito.
- Son capaces de comprender la importancia de la adherencia al tratamiento del estudio y el protocolo del estudio y están dispuestos a cumplir con todos los requisitos del estudio, incluidas las restricciones de medicación concomitantes., durante todo el estudio.
- Mujeres en edad fértil (WOCBP) y los hombres que tienen relaciones sexuales con WOCBP deben utilizar aceptable(s) método(s) anticonceptivo(s).

Los criterios de exclusión para el reclutamiento de pacientes son los siguientes:

i) Exclusiones de la enfermedad diana

- (1) Tiene un empeoramiento clínico significativo de la FPI entre el cribado y el día 1 (durante el proceso de cribado), en opinión del investigador.
- (2) Tiene un volumen respiratorio forzado en 1 segundo (FEV1)/relación FVC inferior a 0,8 después de la administración de broncodilatador en el cribado.
- (3) Tiene una respuesta broncodilatadora, definida por un aumento absoluto de 12% o más y un aumento de 200 ml en FEV1 o FVC o ambos después del uso de broncodilatadores en comparación con los valores antes del uso de broncodilatadores en la detección.

ii) Historial médico y enfermedades concurrentes

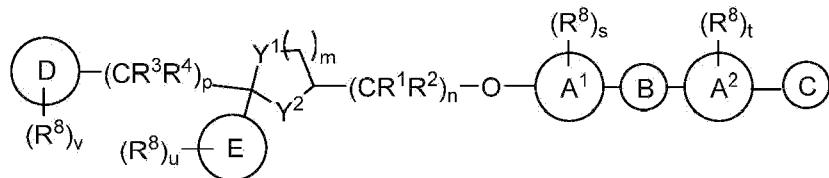
- (1) Tiene un historial de exposición ambiental clínicamente significativa que se sabe que causa fibrosis pulmonar.

- (2) Tiene una explicación conocida para la enfermedad pulmonar intersticial.
 (3) Tiene un diagnóstico clínico de cualquier enfermedad del tejido conectivo.
 (4) Actualmente tiene asma clínicamente significativa o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
 (5) Tiene evidencia clínica de infección activa.
- 5 (6) Tiene algún historial de malignidad que pueda resultar en una discapacidad significativa o que requiera una intervención médica o quirúrgica significativa en los próximos 2 años. Esto no incluye procedimientos quirúrgicos menores para el cáncer localizado (p. ej., Carcinoma basocelular).
- 10 (7) Tiene cualquier otra condición que no sea IPF que, en opinión del investigador, pueda ocasionar la muerte del sujeto en los próximos 2 años.
 (8) Tiene antecedentes de enfermedad hepática terminal.
 (9) Tiene antecedentes de enfermedad renal en etapa terminal que requiere diálisis.
 (10) Tiene antecedentes de enfermedad cardíaca o pulmonar inestable o deteriorada (que no sea FPI) en los últimos 6 meses.
 (11) Tiene antecedentes de abuso de alcohol o sustancias en los últimos 2 años.
 (12) Tiene antecedentes familiares o personales de síndrome de QT largo y/o Torsades de Pointes (taquicardia ventricular polimórfica).
 (13) Ha utilizado alguna de las siguientes terapias específicas dentro de los 7 días previos al examen:
- 20 (a) Terapia de investigación, definida como cualquier medicamento que no haya sido aprobado para comercialización para cualquier indicación en el país del sitio participante.
 (b) Cualquier agente citotóxico, inmunosupresor, modulador de la citocina o antagonista del receptor, que incluye, entre otros, azatioprina, bosetan, ambrisentan, ciclofosfamida, ciclosporina, etanercept, iloprost, infliximab, antagonistas de leucotrienos, metotrexato, micofenolato mofetil, tacrolimo, montelukast, tetratromolibdato, inhibidores alfa del factor de necrosis tumoral, NAC, mesilato de imatinib, interferón gamma-1b, pirfenidona e inhibidores de la tirosina quinasa.
 (c) Colchicina, heparina y warfarina. Sildenafil (uso diario) puede usarse si se administra para una indicación que no es IPF si no hay una terapia alternativa clínicamente aceptable para la misma indicación; se permite el uso intermitente para la disfunción eréctil.
- 25 (d) Se permite el uso intermitente de corticosteroides para el empeoramiento respiratorio agudo.
 (e) Se permite el uso de ketoconazol, ciclosporina y esteroides para uso tópico y oftálmico.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimero, N-óxido o estereoisómero del mismo:

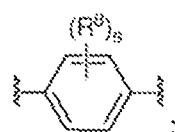
5



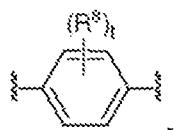
10

Formula (I)

para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, en donde:

20 A¹ es

25

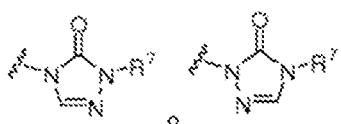
A² es

35

o piridina;
B es

40

C es



45

D es arilo o heteroarilo;
 E es arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico o alquilo;
 cada R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, haloalquilo o alcoxi;
 R⁷ es alquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquieno(NR¹³R¹⁴), cicloalquilo, heterociclico, -alquieno(cicloalquilo), o -alquieno(heterociclico);
 cada R⁸ se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, heterociclico, halo, hidroxi, nitrilo, azido, nitro, alcoxi, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, -alquieno(NR¹³R¹⁴), -alquieno(cicloalquilo), -alquieno(heterociclico), arilo, heteroarilo, -SR¹³, -SOR¹³, -SO₂R¹³, -SO₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³SO₂R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹³R¹⁴, o dos R⁸ adyacentes forman un anillo heterociclico;
 cada R¹³ y R¹⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, heterociclicoalquilo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo y heteroarilo; o R¹³ y R¹⁴ tomados juntos forman un heterociclo con los átomos a los que están unidos;
 Y¹ e Y² son O;
 n es 1 o 2;
 m es 1 o 2;
 p es 1, 2, 3 o 4;

60

65

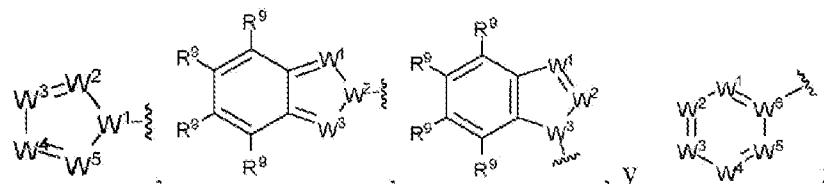
- s es 0 o 1;
t es 0 o 1;
u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y
v es 0, 1, 2, 3 o 4;
y en donde
- 5 "alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo;
- 10 "alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada, como se describe para alquilo;
- 15 "alcoxí" se refiere a un radical de la fórmula -OR^a donde R^a es un radical alquilo como se ha definido anteriormente;
- 20 "arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático;
- 25 "cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico que tiene de tres a quince átomos de carbono, que pueden incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que están saturados o insaturados;
- 30 2. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de la reivindicación 1, en donde A¹ es
- 35
- 40 3. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de la reivindicación 1, en donde A² es
- 45 4. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde C es
- 50
- 55 5. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde C es
- 60 6. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde E es arilo, en donde el arilo es:
- 65

y u es 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

7. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde D es arilo.

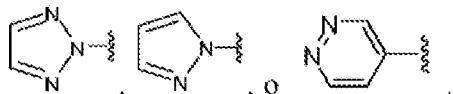
5 8. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, D es heteroarilo.

10 9. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para uso de la reivindicación 8, en donde D se selecciona entre:



15 20 W¹, W², W³, W⁴ y W⁵ se seleccionan independientemente entre N y CR⁹; W⁶ es N o C; y cada R⁹ se selecciona independientemente entre H, halógeno, CN, NO₂, alquilo, -SR¹⁰, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)alquilo, -NR¹⁰C(O)cicloalquilo, -NR¹⁰C(O)heterocicloalquilo, -NR¹⁰C(O)arilo, NR¹⁰C(O)heteroarilo, C(O)NR¹⁰R¹¹, -C(O)NR¹⁰(cicloalquilo), -C(O)NR¹⁰(heterocicloalquilo), -C(O)NR¹⁰(arilo), C(O) NR¹⁰(heteroarilo), NR¹⁰C(O)NR¹⁰R¹¹, -NR¹⁰C(O)NR¹¹(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹(heterocicloalquilo), NR¹⁰C(O)NR¹¹(arilo), -NR¹⁰C(O)NR¹¹(heteroarilo), -NR¹⁰C(O)O(alquilo), -NR¹⁰C(O)O(cicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(heterocicloalquilo), -NR¹⁰C(O)O(arilo), -NR¹⁰SO₂(cicloalquilo), -NR¹⁰SO₂(heterocicloalquilo), -N¹⁰SO²(arilo), -NR¹⁰SO₂(heteroarilo), SO₂NR¹⁰R¹¹, -SO₂NR¹⁰(cicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(heterocicloalquilo), -SO₂NR¹⁰(arilo), -SO₂NR¹⁰(heteroarilo), haloalquilo, arilo, y heteroarilo.

25 30 10. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de la reivindicación 7, en donde D es

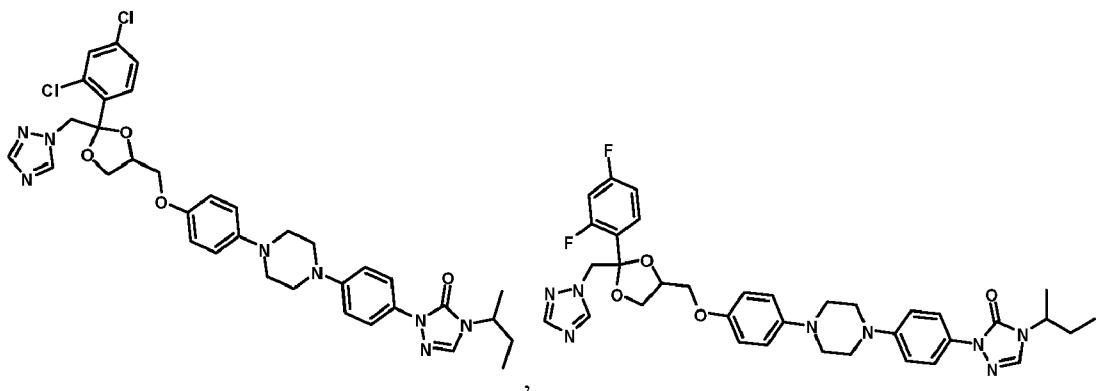


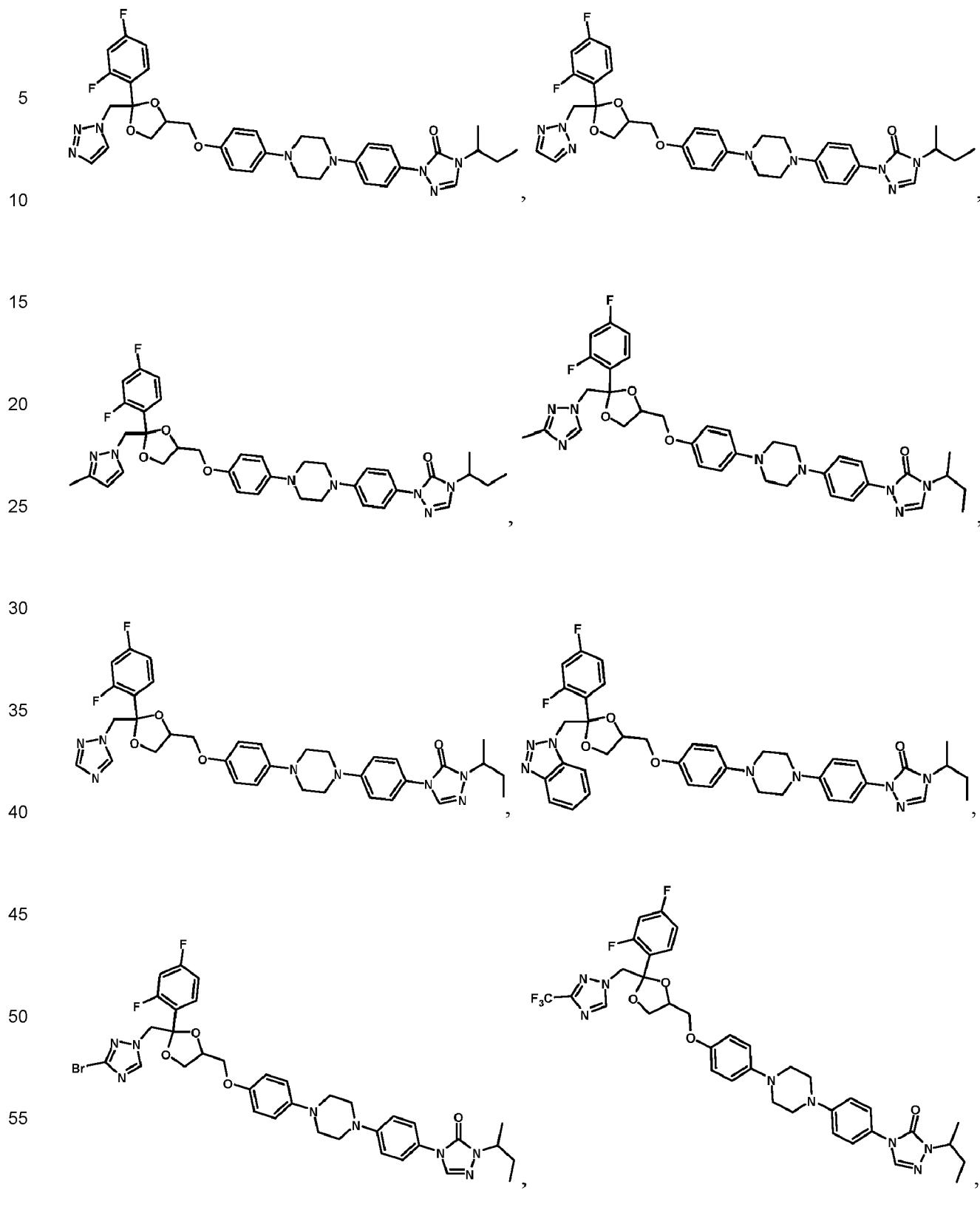
35 40 11. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde p es 1, 2 o 3.

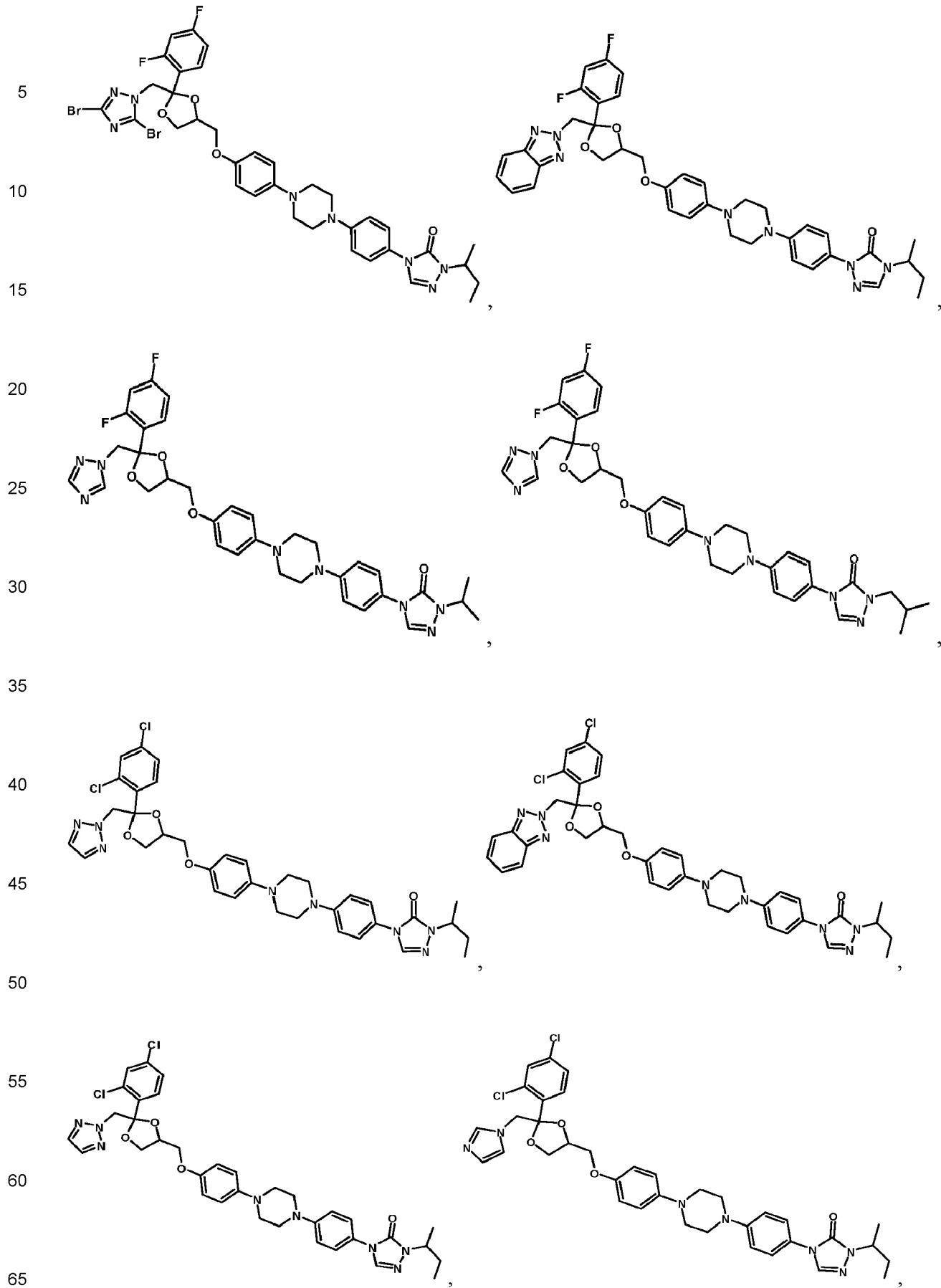
12. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de la reivindicación 11, en donde p es 1.

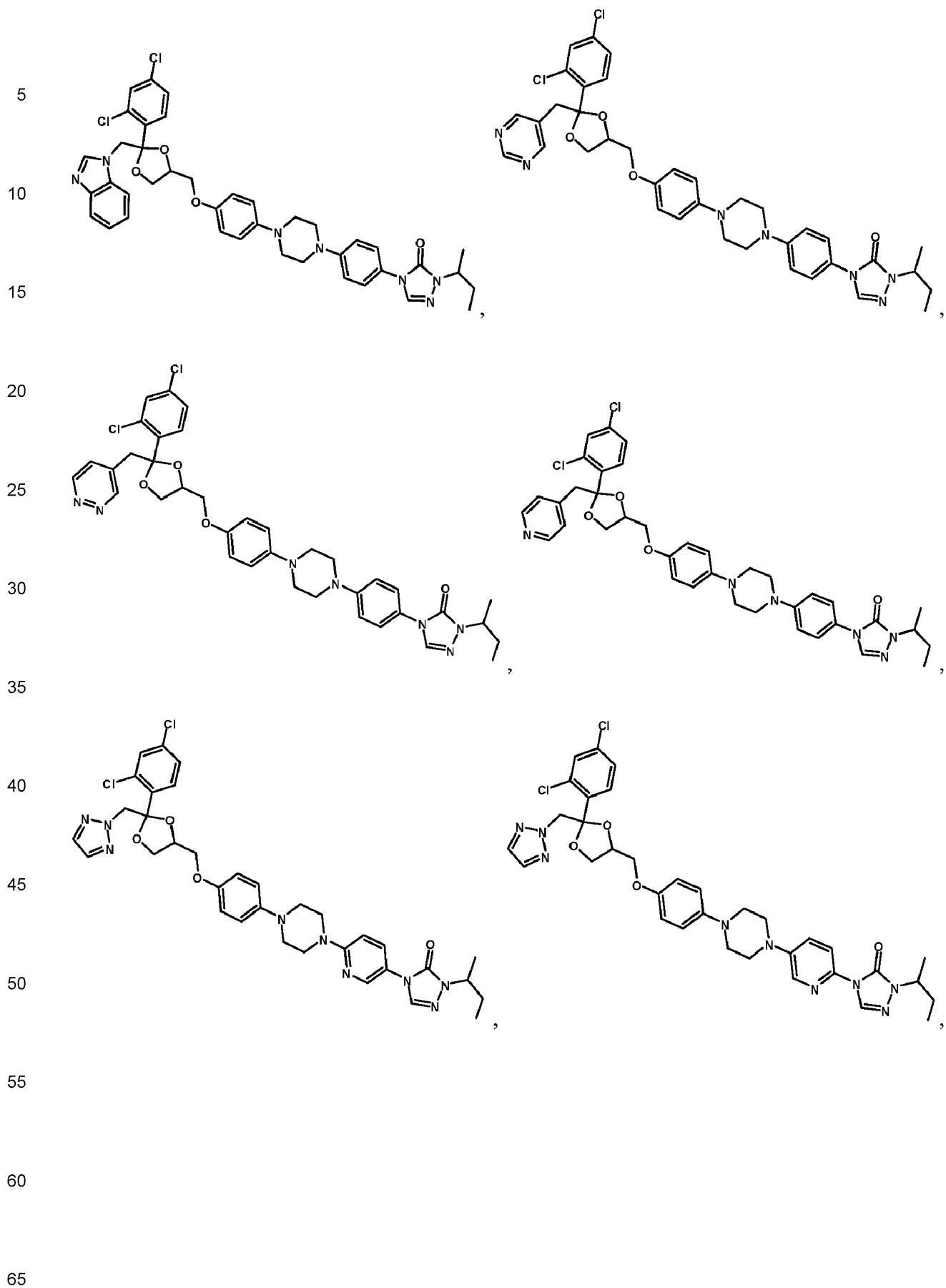
45 13. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno.

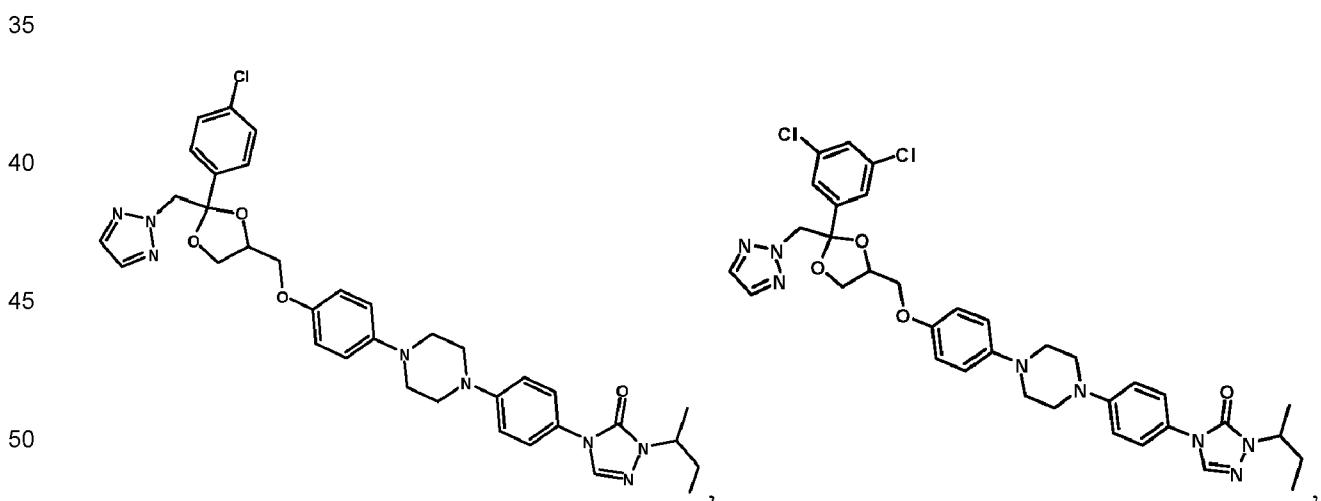
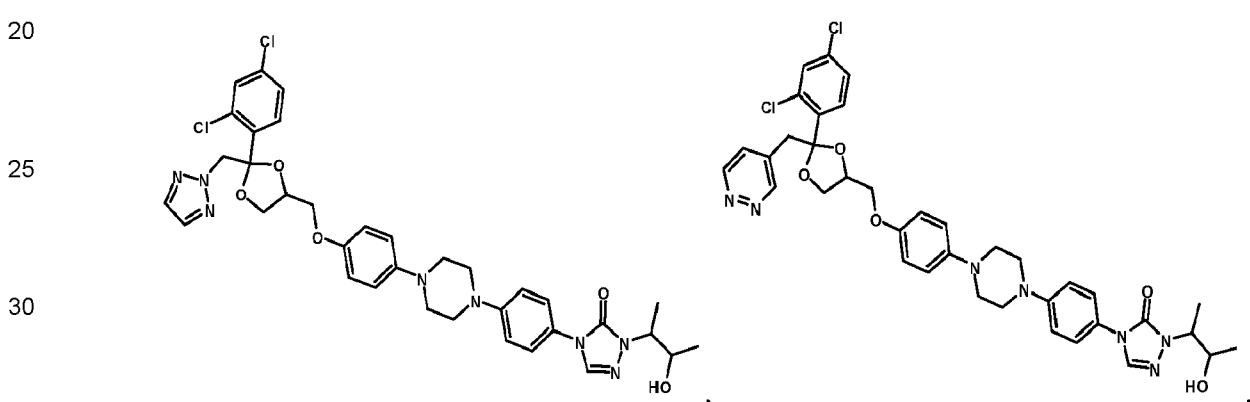
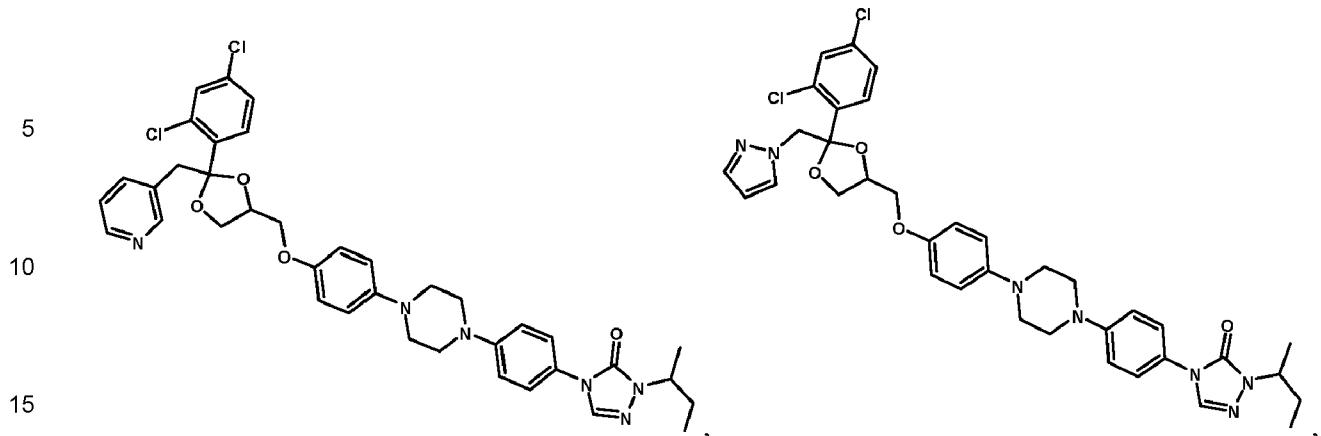
14. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el compuesto se selecciona entre:

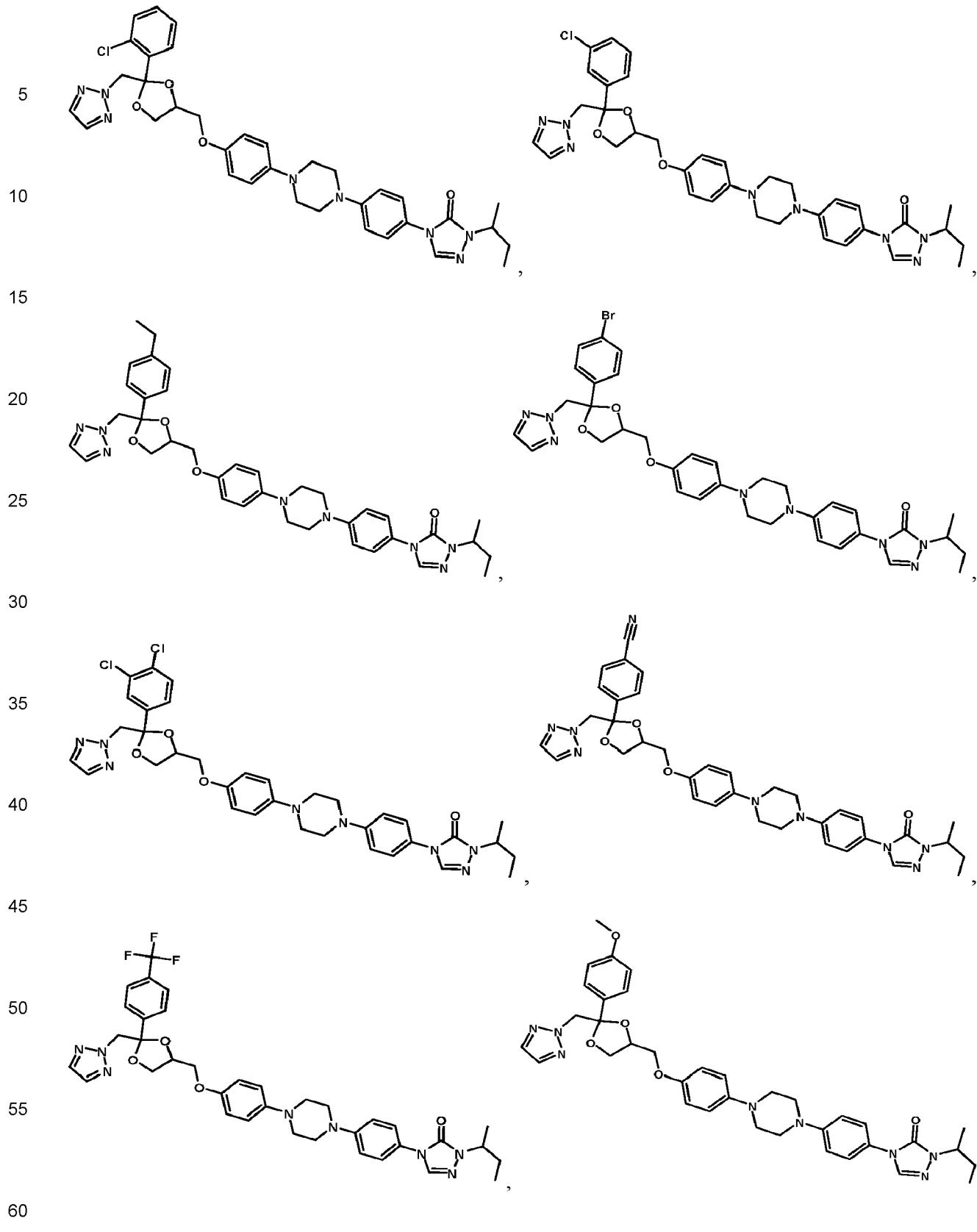


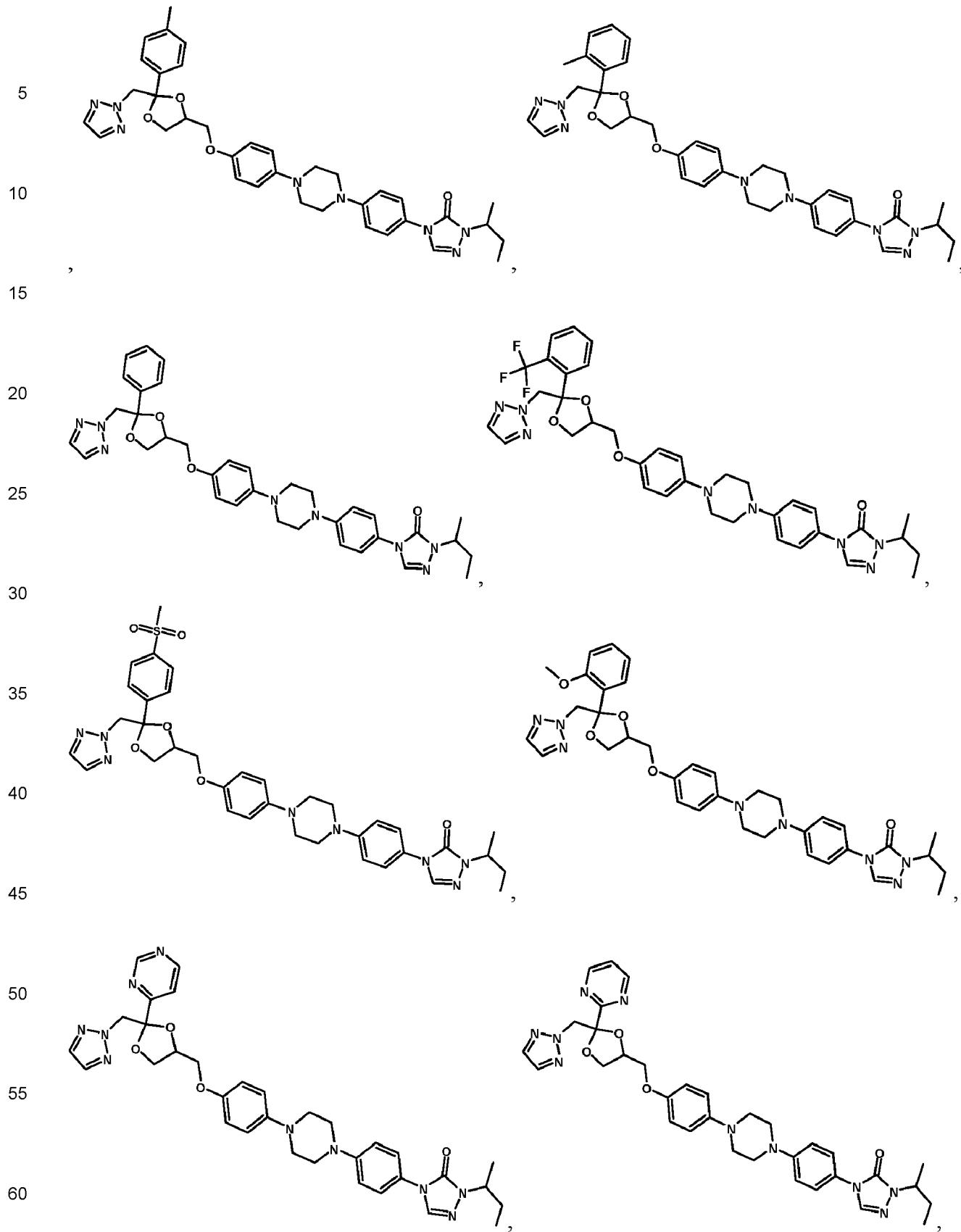


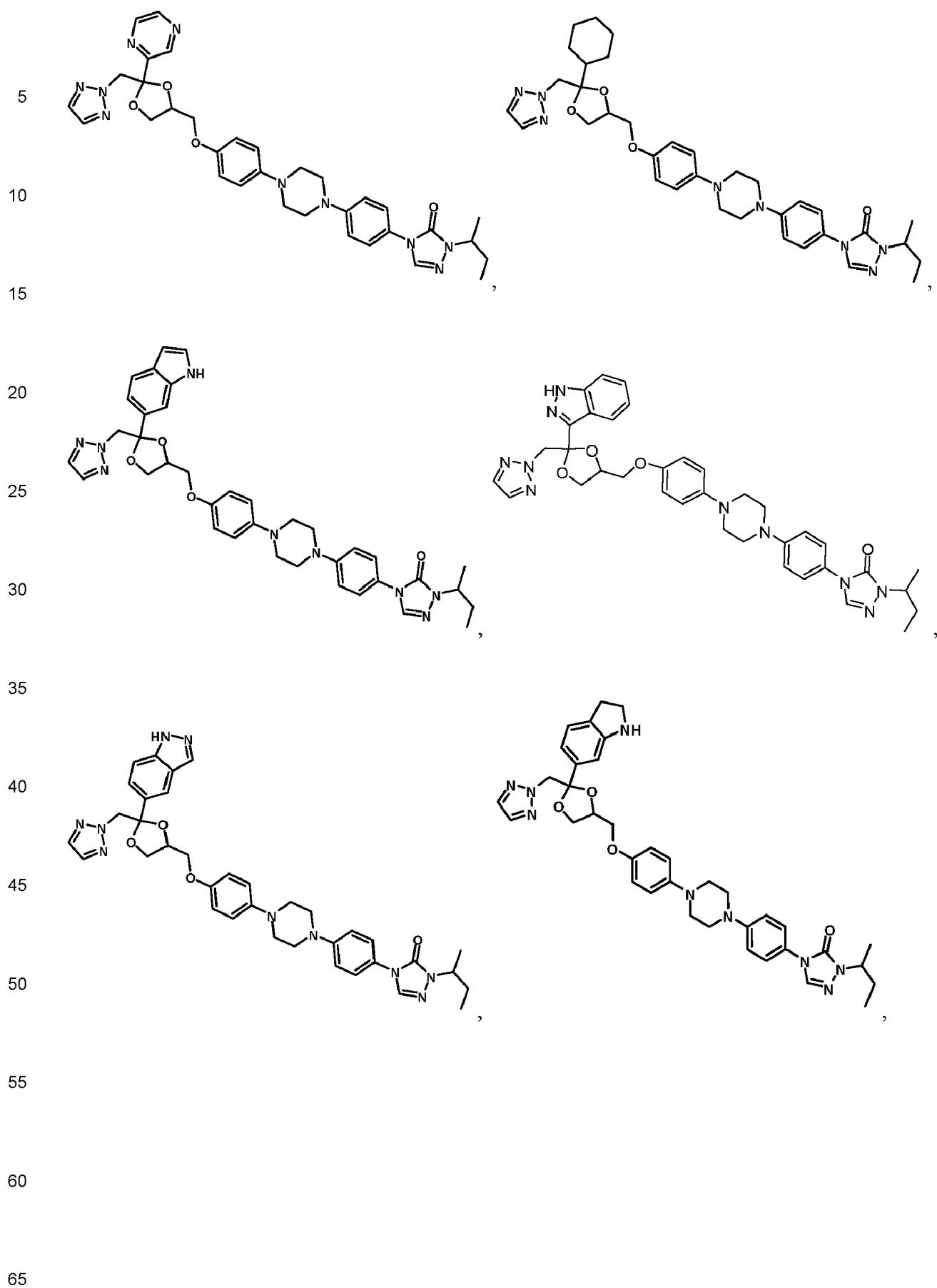


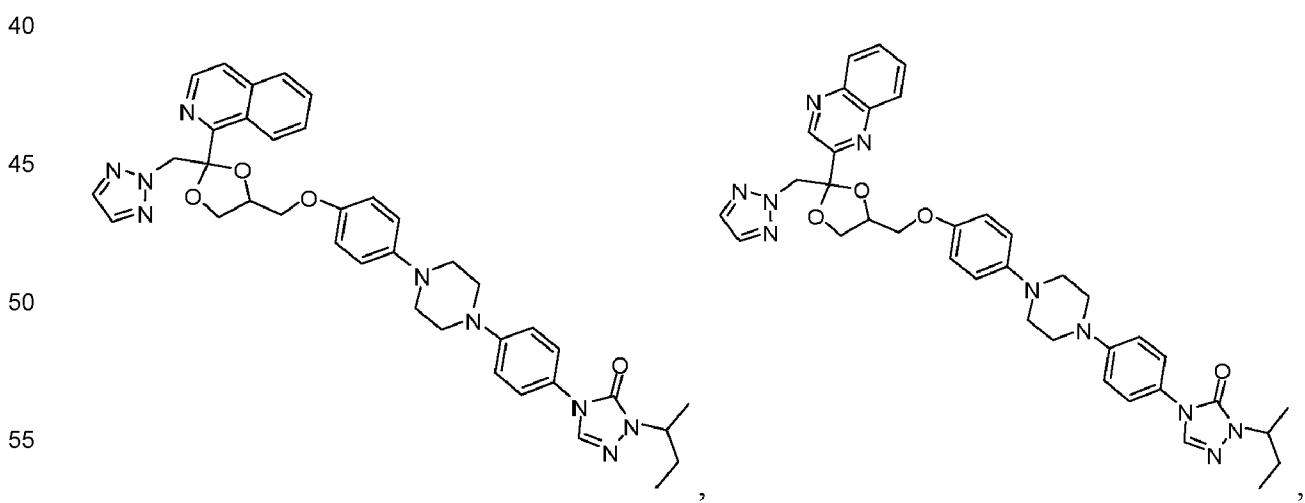
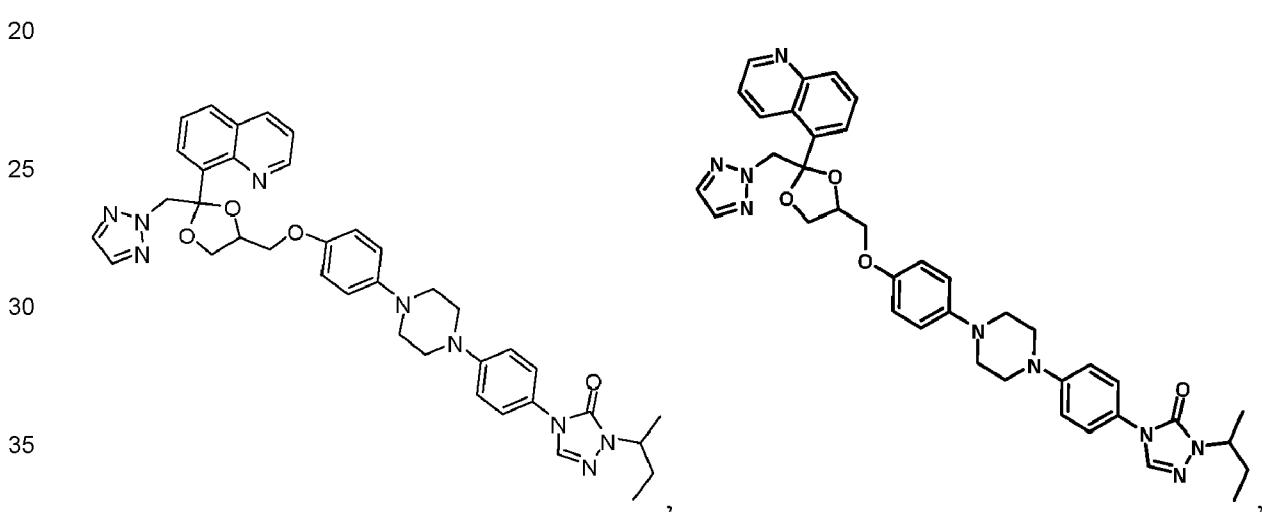
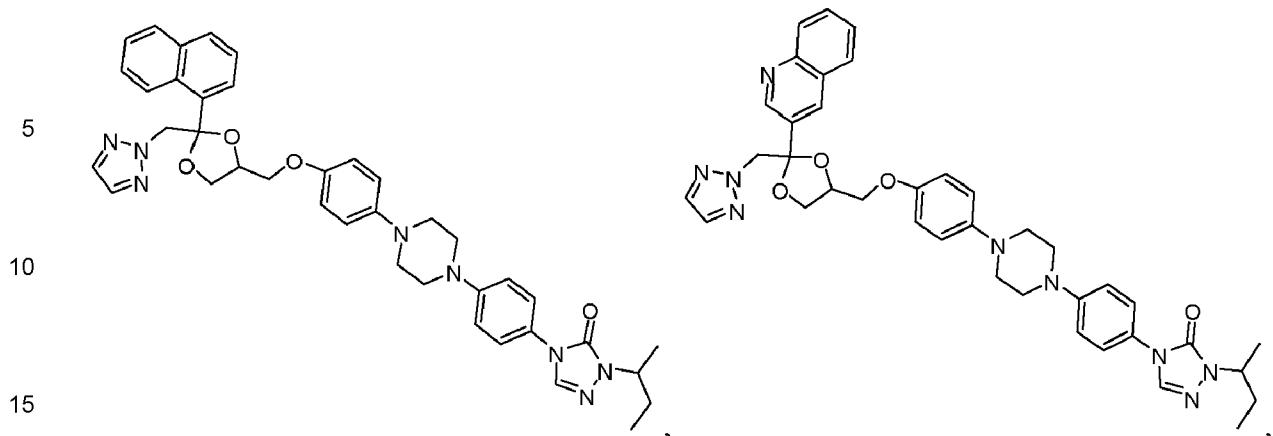


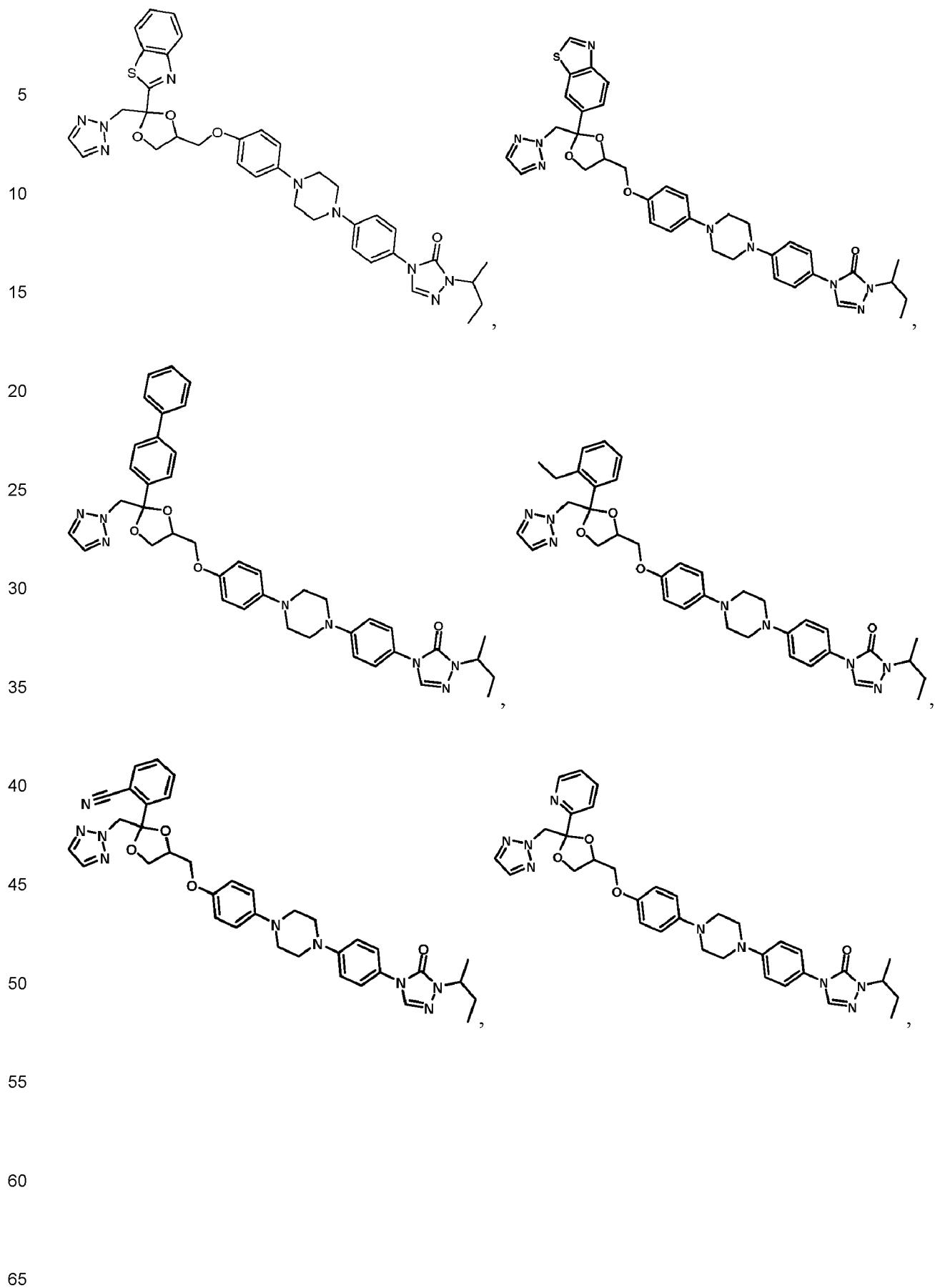


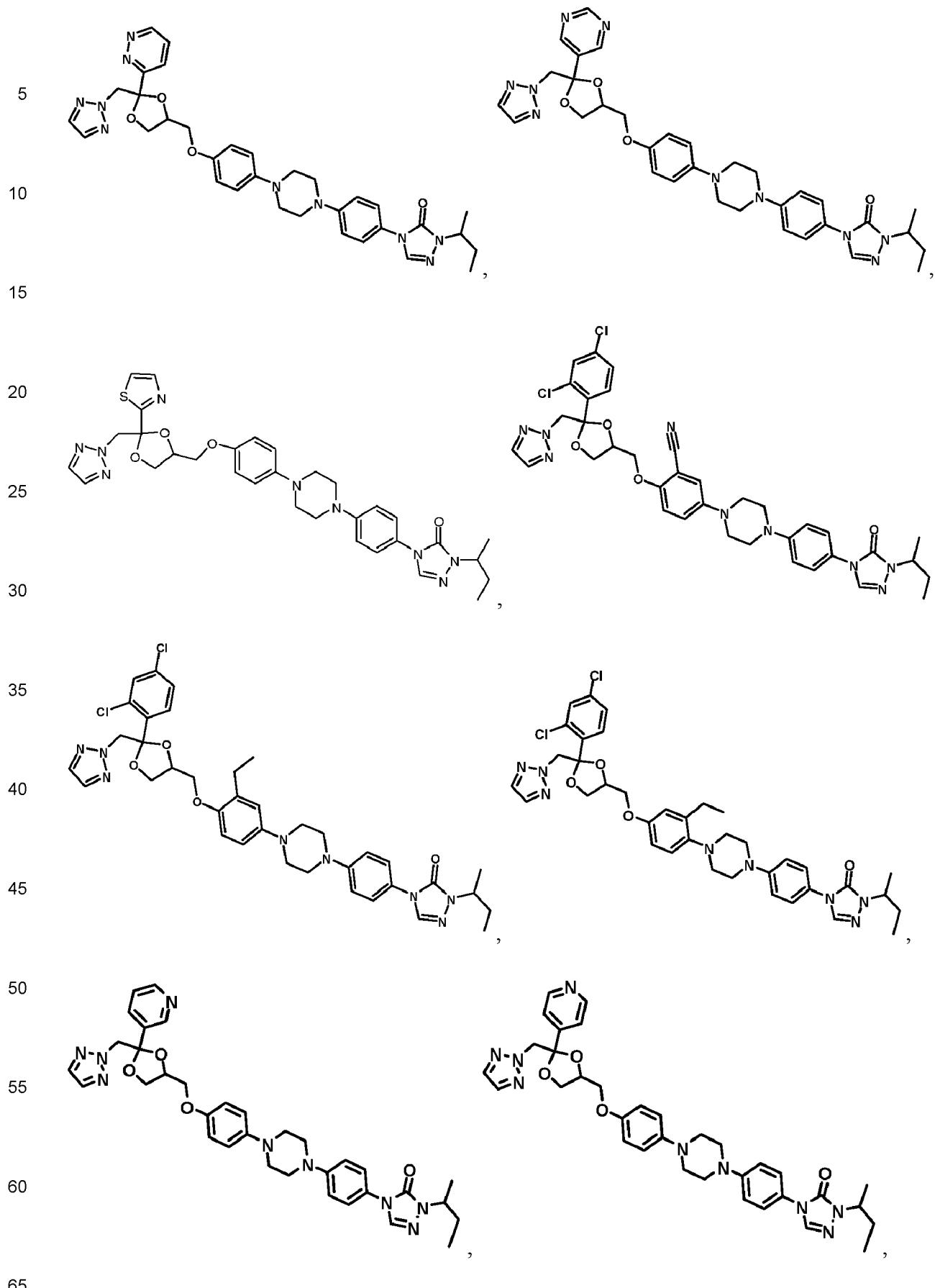


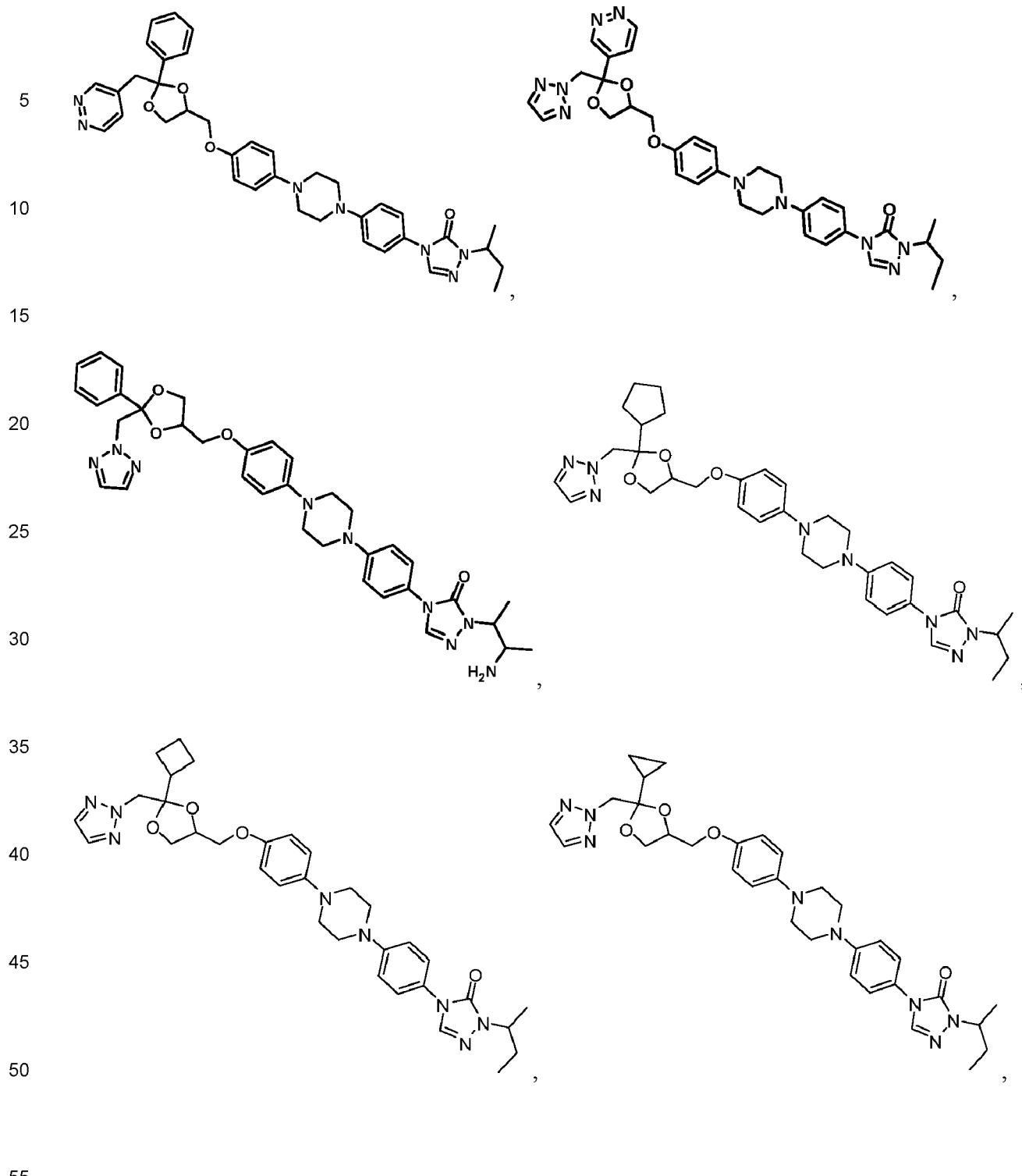


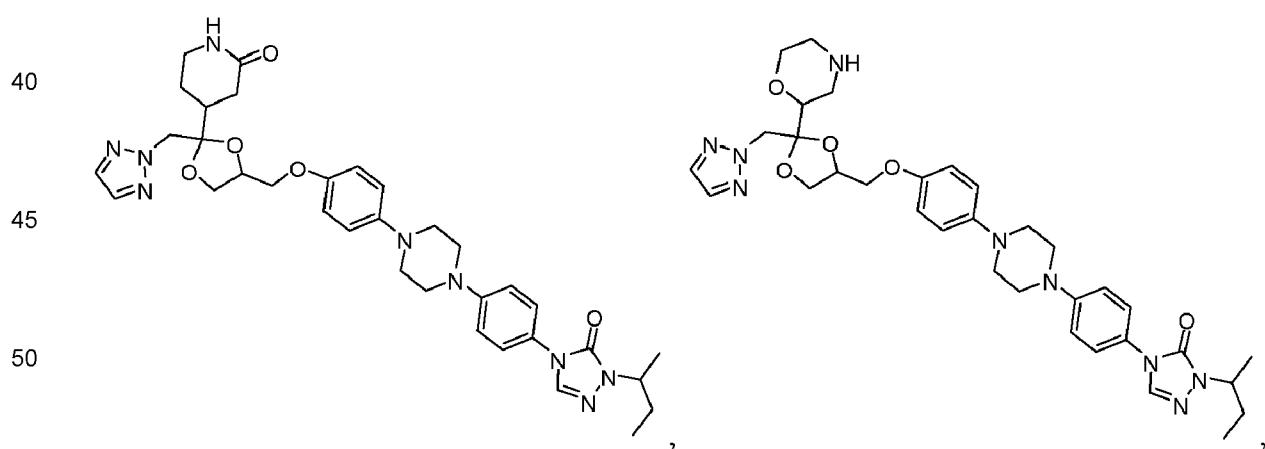
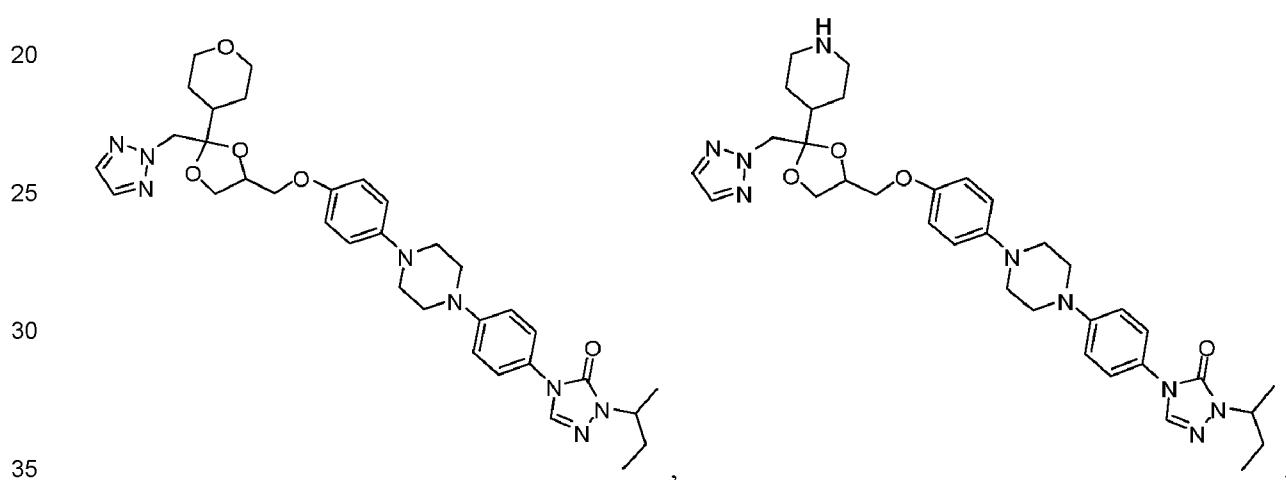
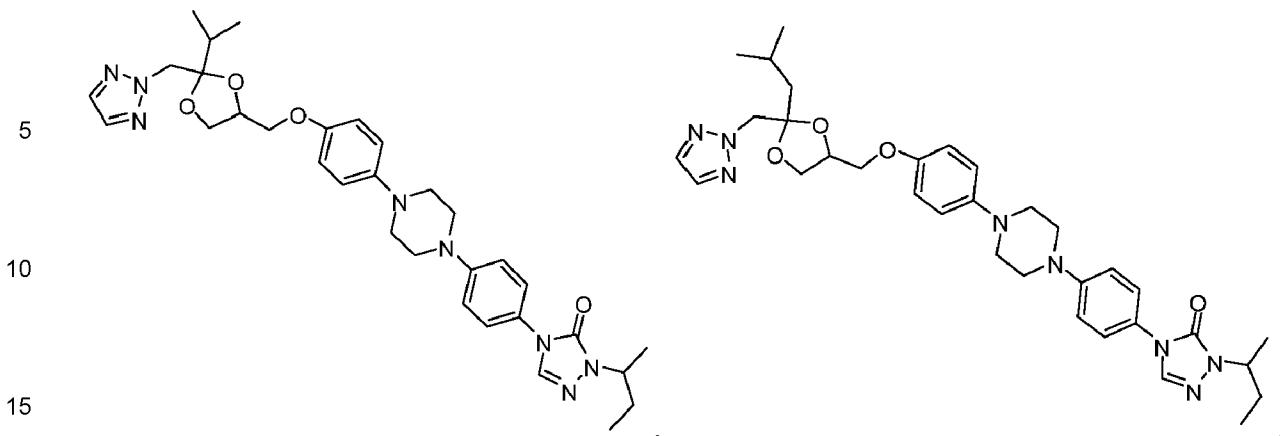


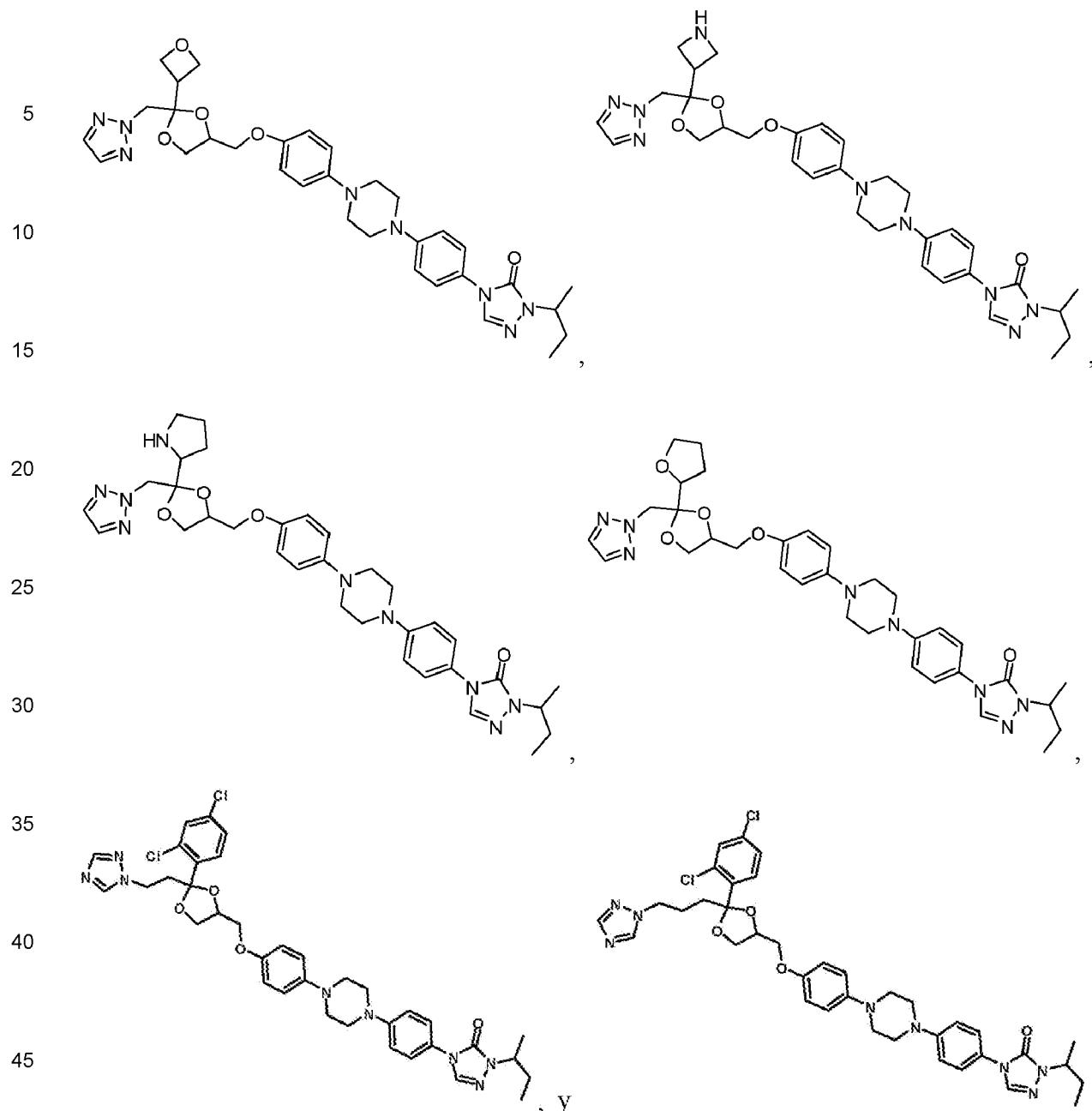












o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo.

50 15. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, polimorfo, N-óxido o estereoisómero del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la fibrosis hepática es fibrosis hepática asociada con las últimas etapas de cirrosis hepática alcohólica o no alcohólica.

55

60

65

Figura 1

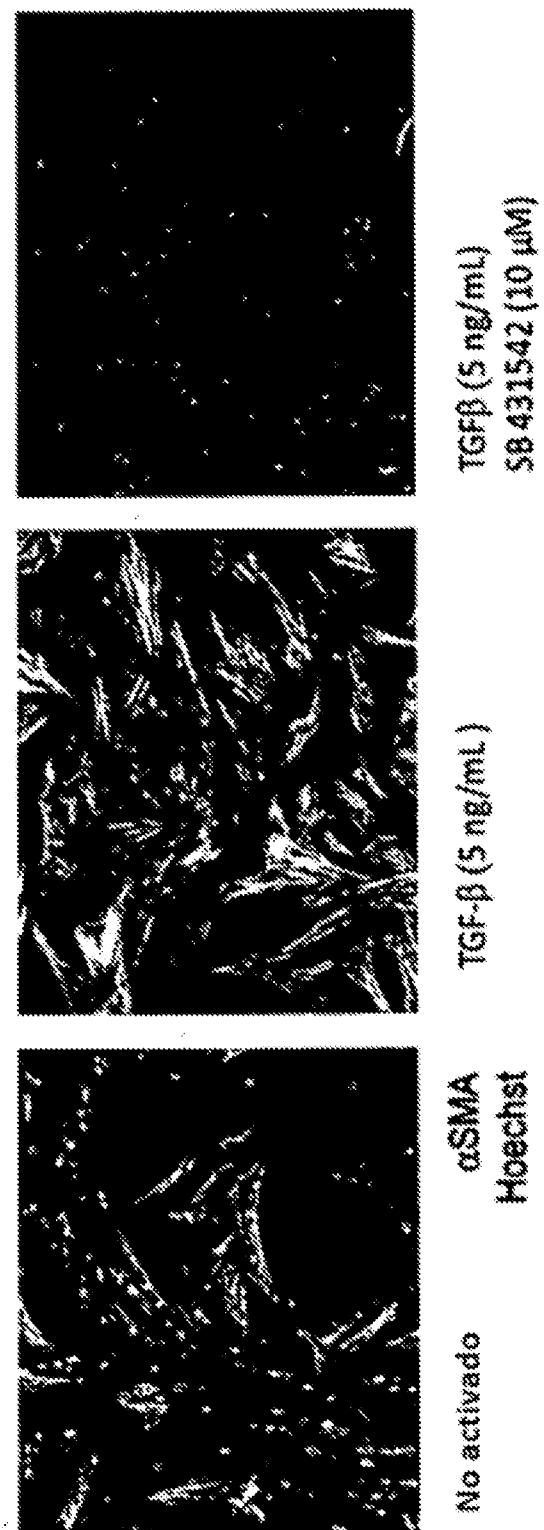


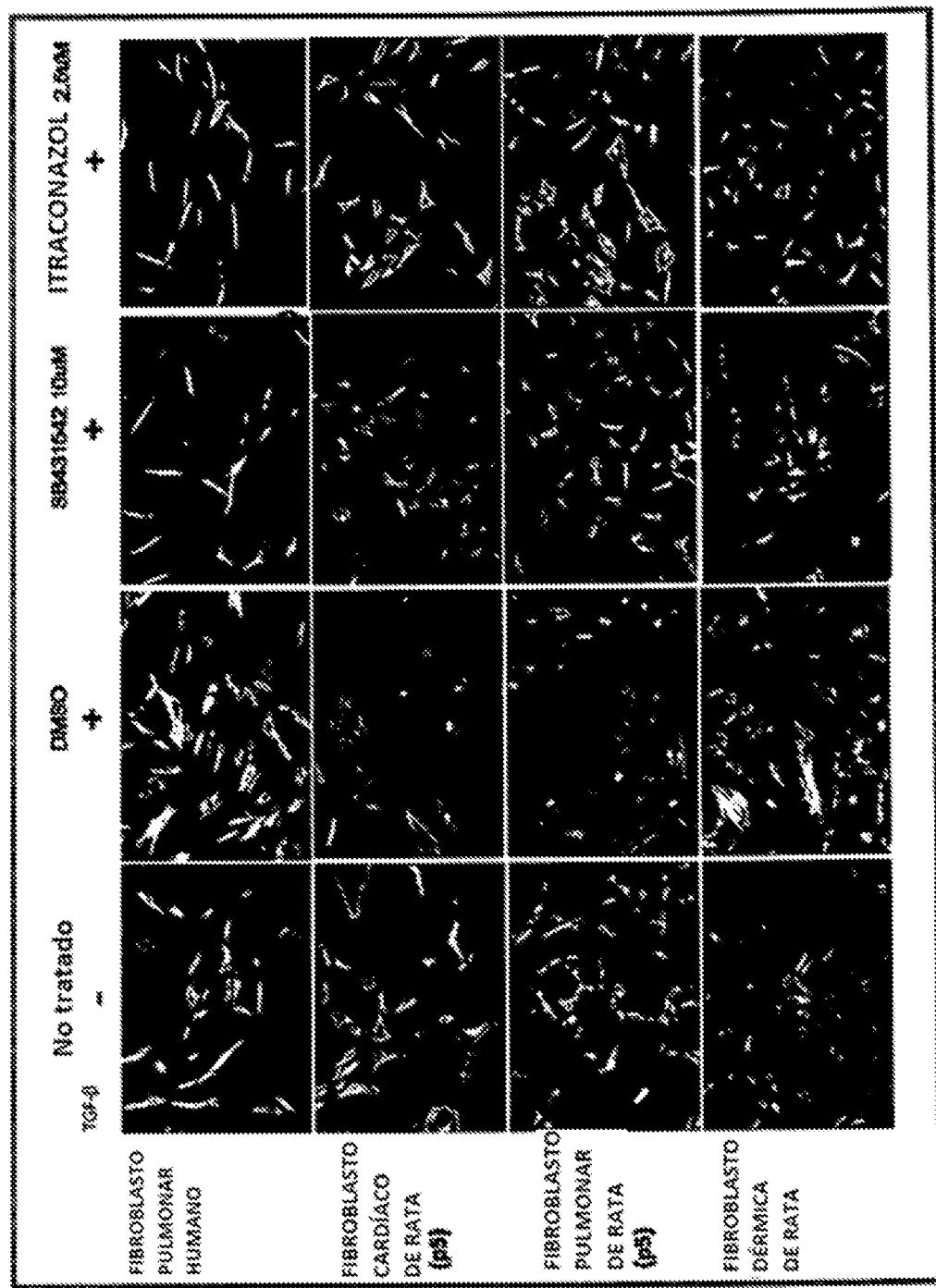
Figura 2

Figura 3

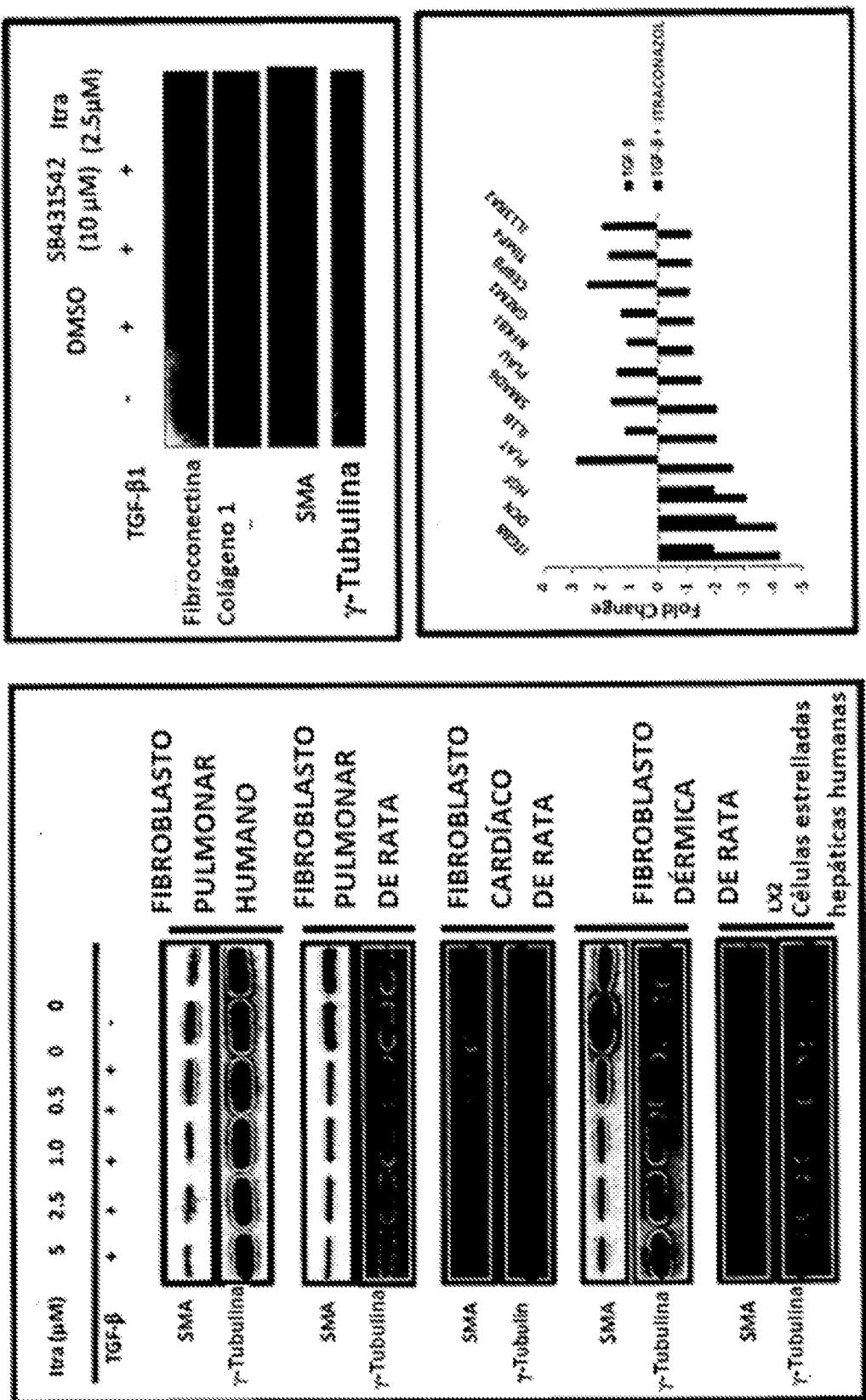


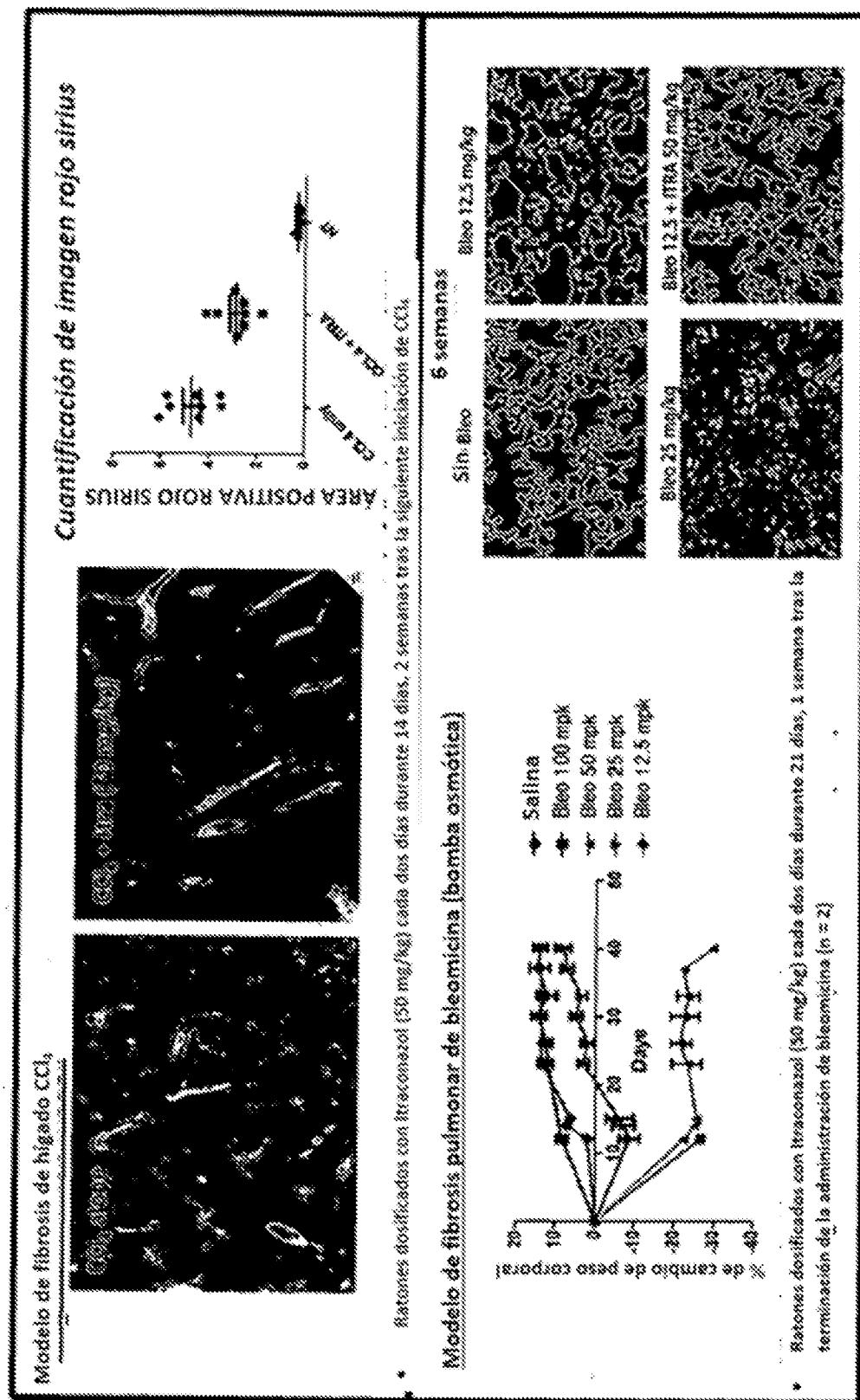
Figura 4a

Figura 4b

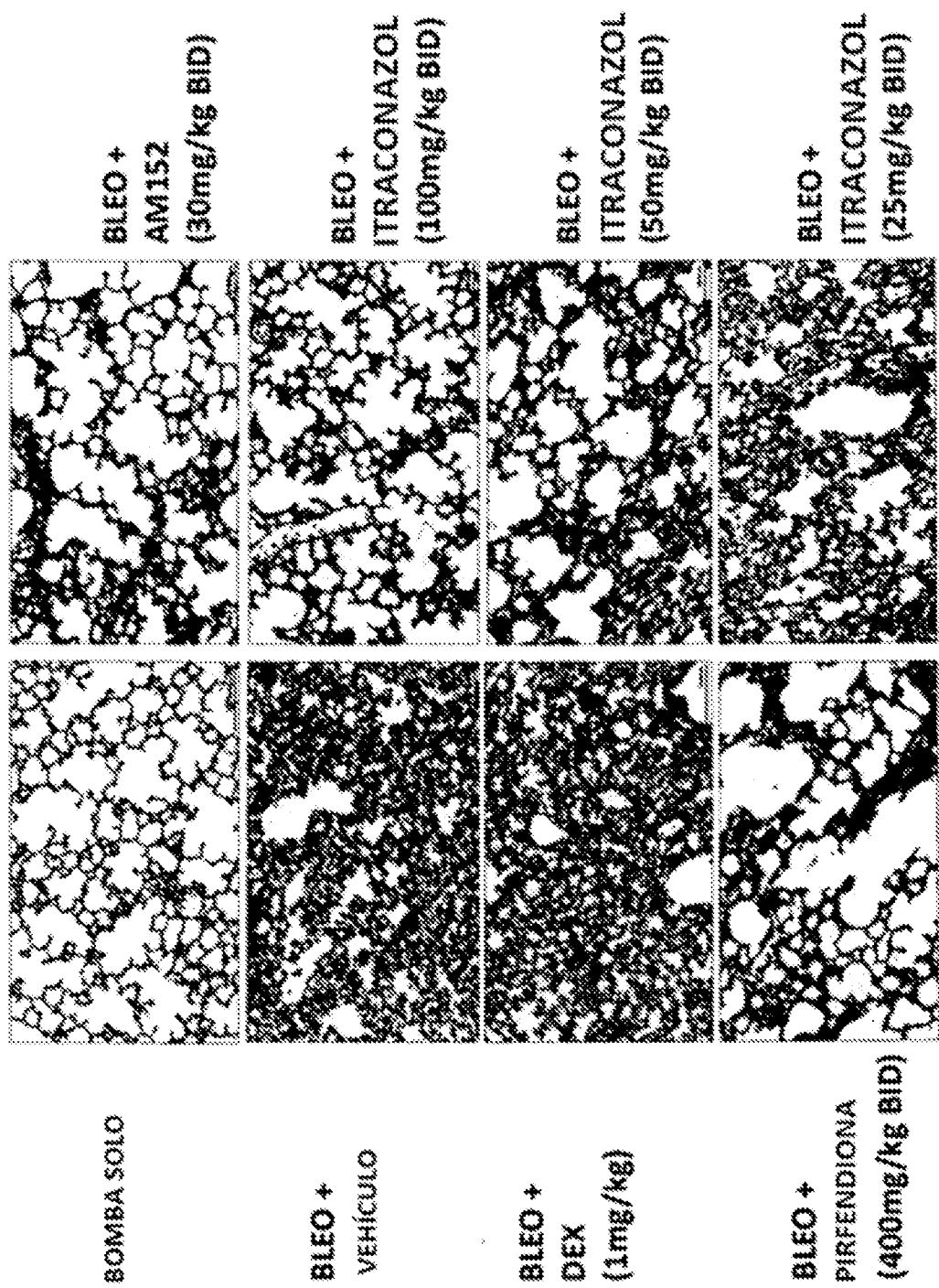


Figura 4c

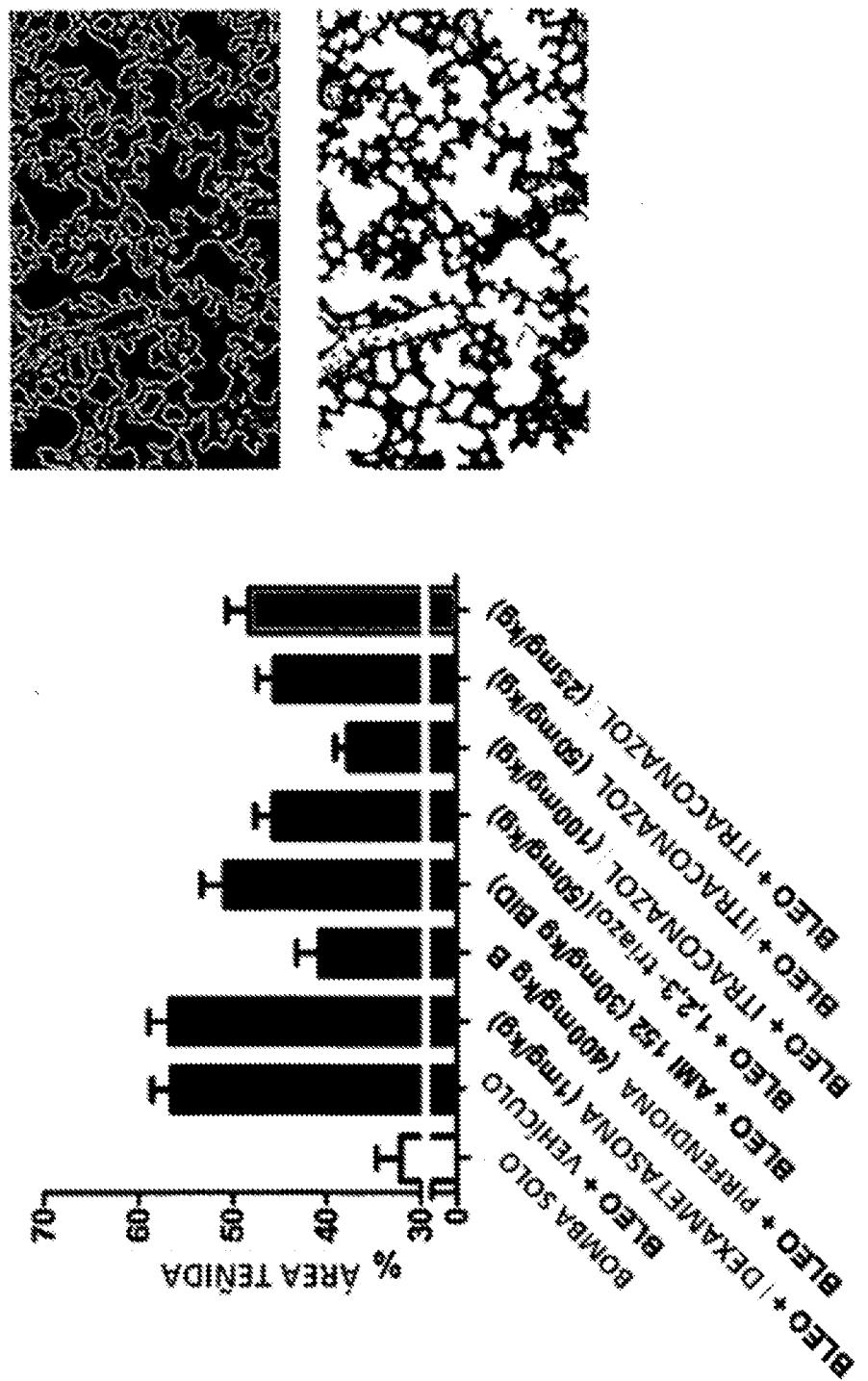


Figura 5

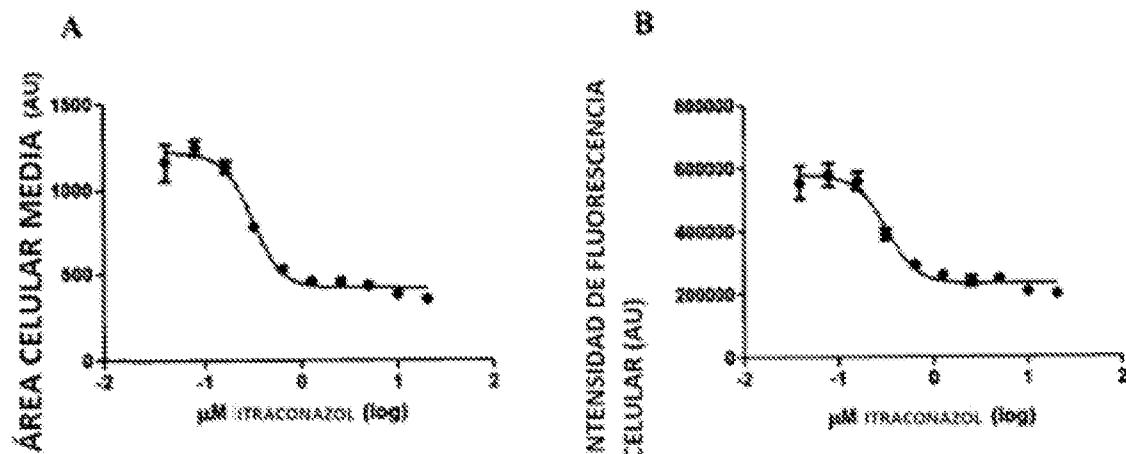


Figura 6

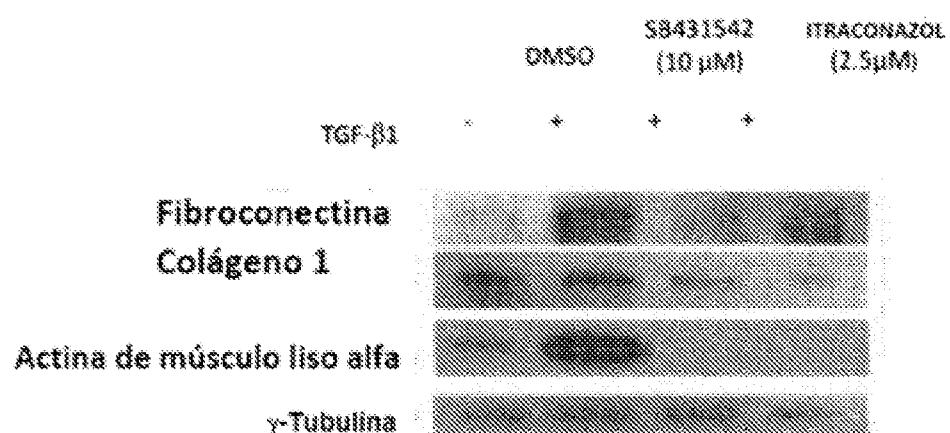
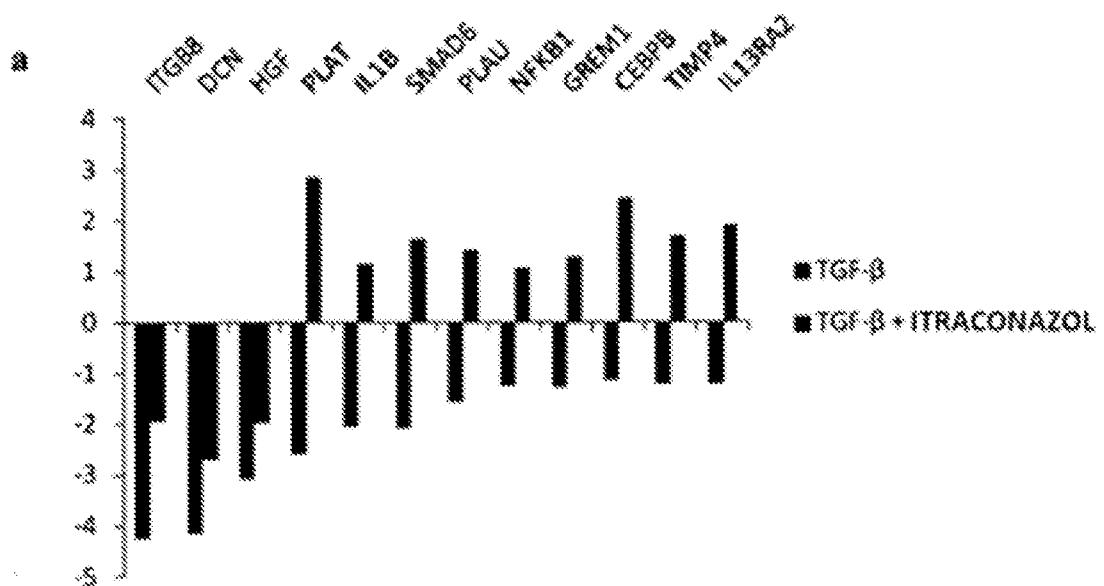


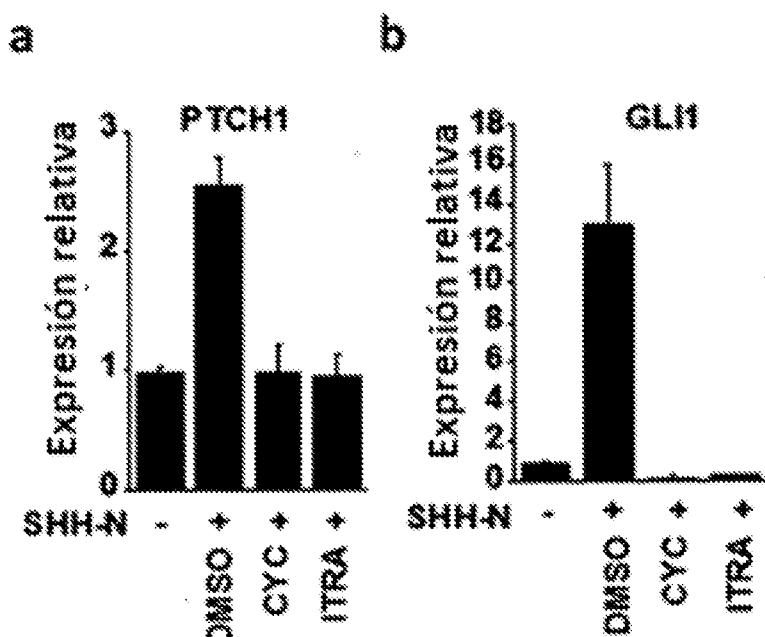
Figura 7



b

| | TGF- β | TGF- β + CBR-034-1 |
|---------|--------------|--------------------------|
| TGBB | -4.26 | -1.96 |
| DCN | -4.14 | -2.72 |
| HGF | -3.09 | -2.00 |
| PLAT | -2.61 | 2.84 |
| IL1B | -2.06 | 1.15 |
| SMAD6 | -2.11 | 1.61 |
| PLAU | -1.58 | 1.41 |
| NFKB1 | -1.26 | 1.05 |
| GREM1 | -1.28 | 1.28 |
| CEBPB | -1.16 | 2.44 |
| TIMP4 | -1.25 | 1.67 |
| IL13RA2 | -1.25 | 1.90 |

Figura 8

**c**

| Expresión de gen PTCH1 | | | | |
|---------------------------|-----------------|----------|---------------------|---|
| Estímulo de inducción Shh | Inhibidor | RQ medio | Desviación estándar | N |
| No tratado | No tratado | 1,00 | 0,03 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | DMSO | 2,55 | 0,24 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | SpM Ciclopamina | 1,00 | 0,22 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | 1µM Itraconazol | 0,96 | 0,18 | 3 |

| Expresión de gen GLH | | | | |
|---------------------------|-----------------|----------|---------------------|---|
| Estímulo de inducción Shh | Inhibidor | RQ medio | Desviación estándar | N |
| No tratado | No tratado | 1,00 | 0,04 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | DMSO | 13,00 | 2,32 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | SpM Ciclopamina | 0,21 | 0,15 | 3 |
| Shh-N (1mg/ml) | 1µM Itraconazol | 0,32 | 0,02 | 3 |

Figura 9

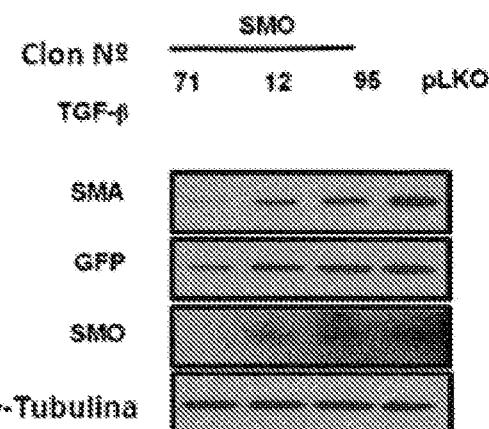


Figura 10

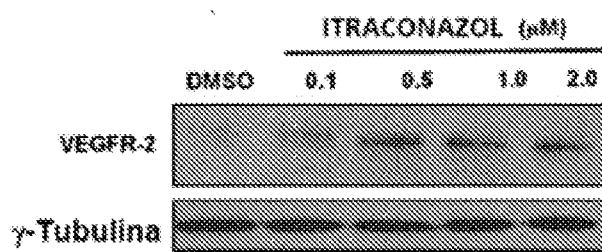


Figura 11

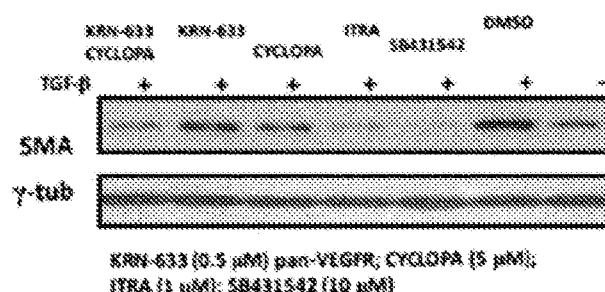


Figura 12

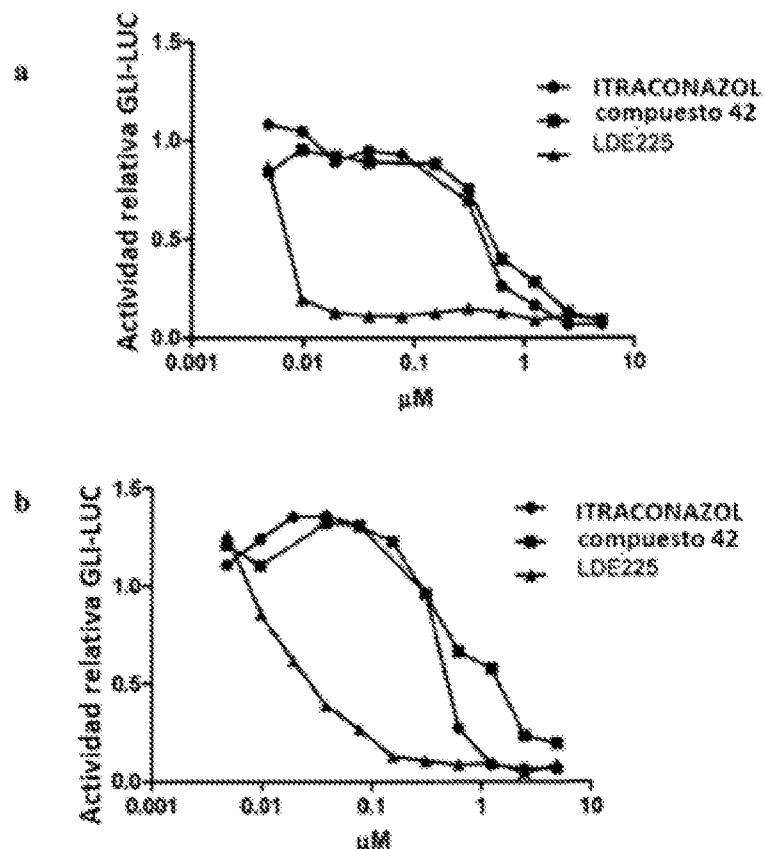
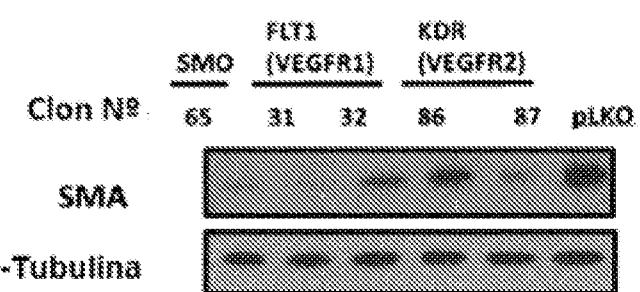


Figura 13



Grupos experimentales:

- * A- Imparne de vehículo
 - * B: 25 mg/kg Bleo + vehículo 1 (45% veta-oxidoetano) 1 SD
 - * C: 25 mg/kg Bleo + vehículo 2 (0.5% MCA 0.5% Tween-40) 1 SD
 - * D: 25 mg/kg Bleo + Ira 5 mg/kg SD
 - * E: 25 mg/kg Bleo + Ira 10 mg/kg SD
 - * F: 25 mg/kg Bleo + Ira 25 mg/kg SD
 - * G: 25 mg/kg Bleo + Ira 50 mg/kg SD
 - * H: 25 mg/kg Bleo + Comp #42 @ 5 mg/kg SD
 - * I: 25 mg/kg Bleo + Comp#42 @ 10 mg/kg SD
 - * J: 25 mg/kg Bleo + Comp #42 @ 25 mg/kg SD
 - * K: 25 mg/kg Bleo + Comp #42 @ 50 mg/kg SD
 - * L: 25 mg/kg Bleo + Phenacetina 400 mg/kg SD
 - * M: 25 mg/kg Bleo + AMI 152 38 mg/kg SD

Diseño experimental:

Día 1-9: sem 36 ratones machos ferrijas reproductivas, no-estériles y no parientes.
2 días antes: pelear y aislar ratones. Día 10-14: sexual & parientes.

Día 1 - Pesar, Hegar 25mg/kg Bleo en 2ml/d 7 días horina Alum Cosmetic, preparar bombas Heridas
Día 1-2: Infiltración heridas quirúrgicamente, 8 ratones con salina, 36 ratones con Bleo.
Días 1-10: Control post quirúrgico/pesos ratones 3 veces por semana

Día 17-31: tratamiento farmacológico

Día 30: Sangrar a 3, 6, 8, 24 horas tras peníntima dosificación

Día 31: Extracción urinaria y moco en moldeables orgánicos. La mitad de los padronnes serán fijos para estudios histológicos, la mitad de los padronnes serán recogidos en líquido #42 y almacenados en -20 grados Celsius. Un trozo del yeso será fijado para estudios histológicos y otro trozo de yeso será recocido en líquido #42 y almacenado en -20 para estudios bioquímicos.

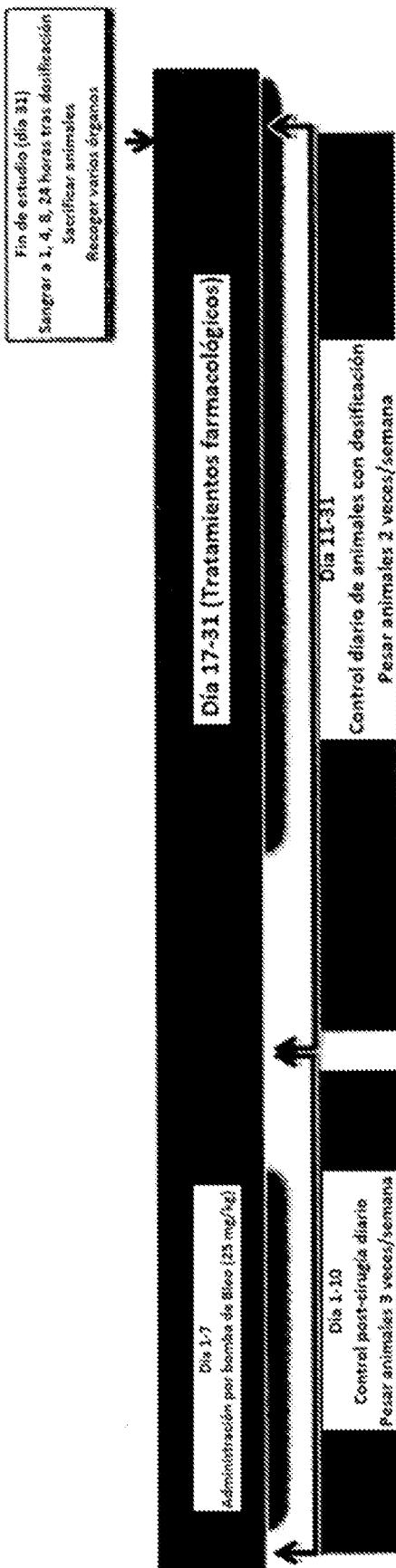


Figure 15

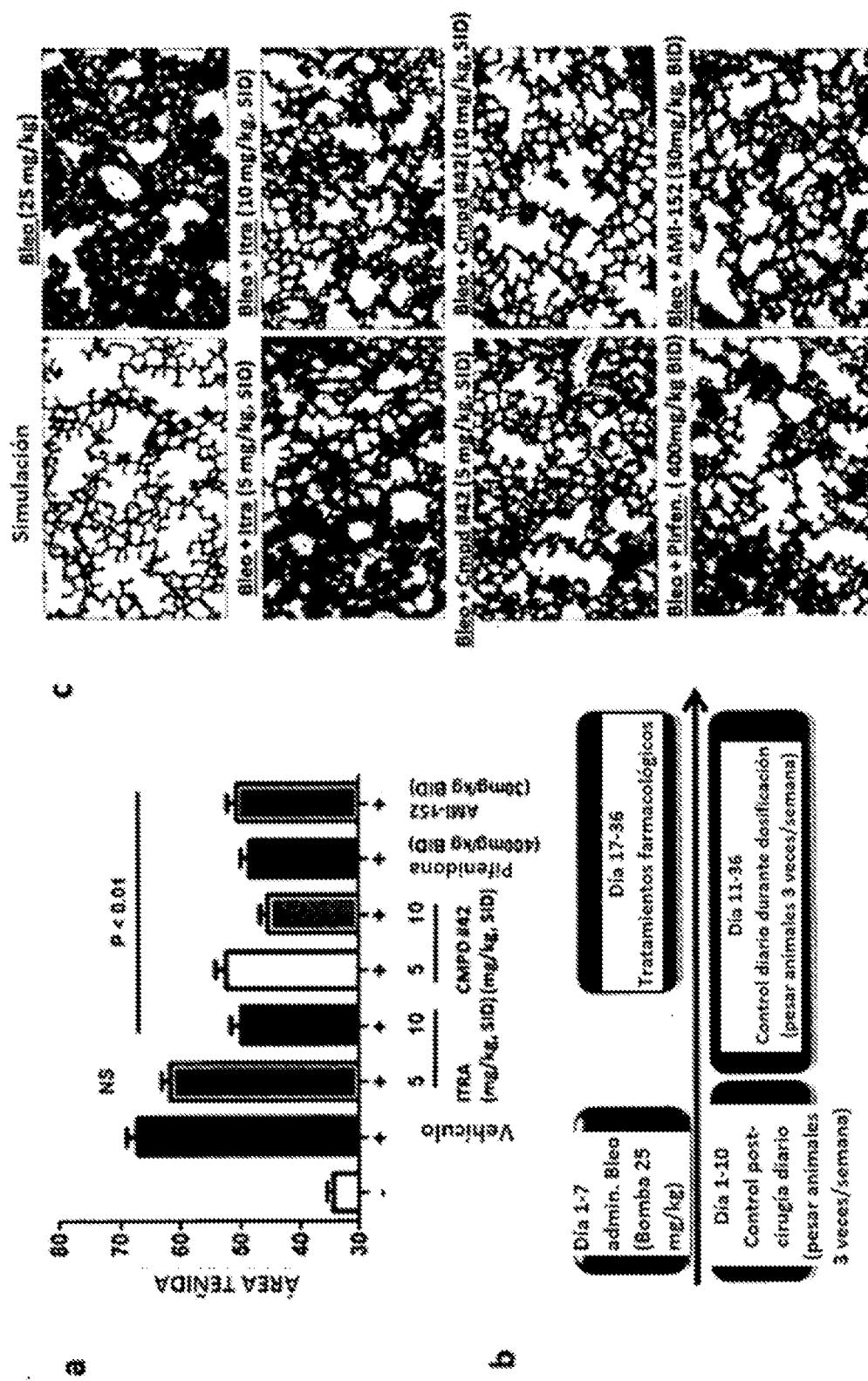
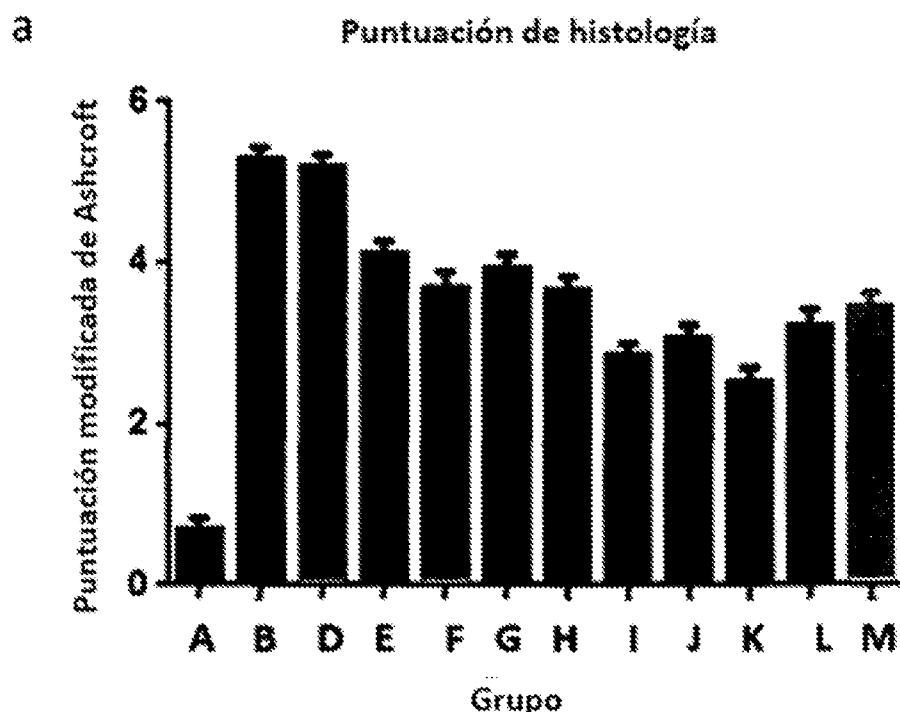


Figura 16

Caracterización de la escala modificada de Ashcroft

| Grado de fibrosis | Escala modificada de Ashcroft |
|--------------------------|---|
| 0 | Septa alveolar: Sin carga fibrotica en las fibras pequeñas más frágiles en algunas paredes alveolares Estructura pulmonar: Pulmán normal |
| 1 | Septa alveolar: Cárboles fibroticos sésiles suaves {septo ≤ espeso que normal} Estructura pulmonar: Alvéolos parcialmente agrandados y ralificados, pero masas fibroticas no están presentes |
| 2 | Septa alveolar: Cambios claramente fibroticos (sesto > 3x más espesos que normal) con formación de tipo nudillo per sin conectarse entre si Estructura pulmonar: Alvéolo parcialmente agrandado y ralificado, pero sin masas fibroticas |
| 3 | Septa alveolar: Paredes fibroticas contiguas (septo > 3x más espesos que normal) predominantemente en campo entero microscópico Estructura pulmonar: Alvéolo parcialmente agrandado y ralificado, pero sin masas fibroticas |
| 4 | Septa alveolar: Variable Estructura pulmonar: Masas fibroticas únicas (< 10% de campo microscópico) |
| 5 | Septa alveolar: Variable Estructura pulmonar: Masas fibroticas confluentes (> 10% y ≤ 50% de campo microscópico). Estructura pulmonar severamente dañada pero todavía conservada |
| 6 | Septa alveolar: Variable, mayoritariamente no existente Estructura pulmonar: Masas fibroticas grandes contiguas (> 50% de campo magnético). Arquitectura pulmonar mayoritariamente no preservada |
| 7 | Septa alveolar: No existente Estructura pulmonar: Alvéolos casi eliminados con masas fibroticas pero todavía hasta cinco burbujas de aire |
| 8 | Septa alveolar: No existente Estructura pulmonar: Microscópica llenada de compleja fibronectina con masas fibroticas |

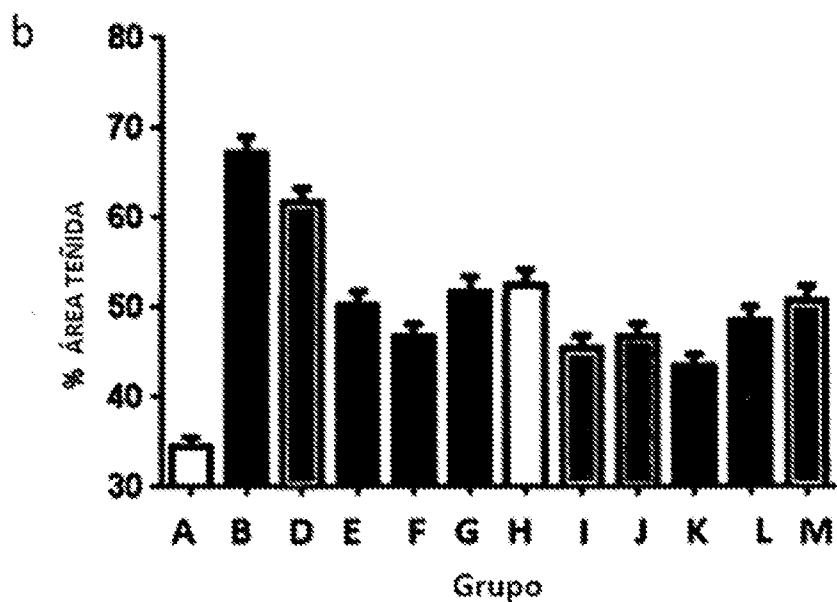
Figura 17a



A- Implante de vehículo

- B-25 mg/kg Bleo + vehículo 1 (45% beta-ciclodextrina) SID
- D-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL₁ 6 mg/kg SID
- E-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL₁ 10 mg/kg SID
- F-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL₁ 25 mg/kg SID
- G-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL₁ 50 mg/kg SID
- H-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 5 mg/kg SID
- I-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 10 mg/kg SID
- J-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 25 mg/kg SID
- K-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 50 mg/kg SID
- L-25 mg/kg Bleo + Pifenidona: 400 mg/kg BID
- M-25 mg/kg Bleo + AMI 162 30 mg/kg BID

Figura 17b

**A. Implante de vehículo**

- B-25 mg/kg Bleo + vehículo 1 (48% beta-ciclodextrina) SID
- D-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL: 6 mg/kg SID
- E-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL: 10 mg/kg SID
- F-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL: 25 mg/kg SID
- G-25 mg/kg Bleo + ITRACONAZOL: 50 mg/kg SID
- H-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 6 mg/kg SID
- I-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 10 mg/kg SID
- J-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 25 mg/kg SID
- K-25 mg/kg Bleo + Compl #42 @ 50 mg/kg SID
- L-25 mg/kg Bleo + Pifendidona: 400 mg/kg BID
- M-25 mg/kg Bleo + AMI 152 30 mg/kg BID

Figura 18

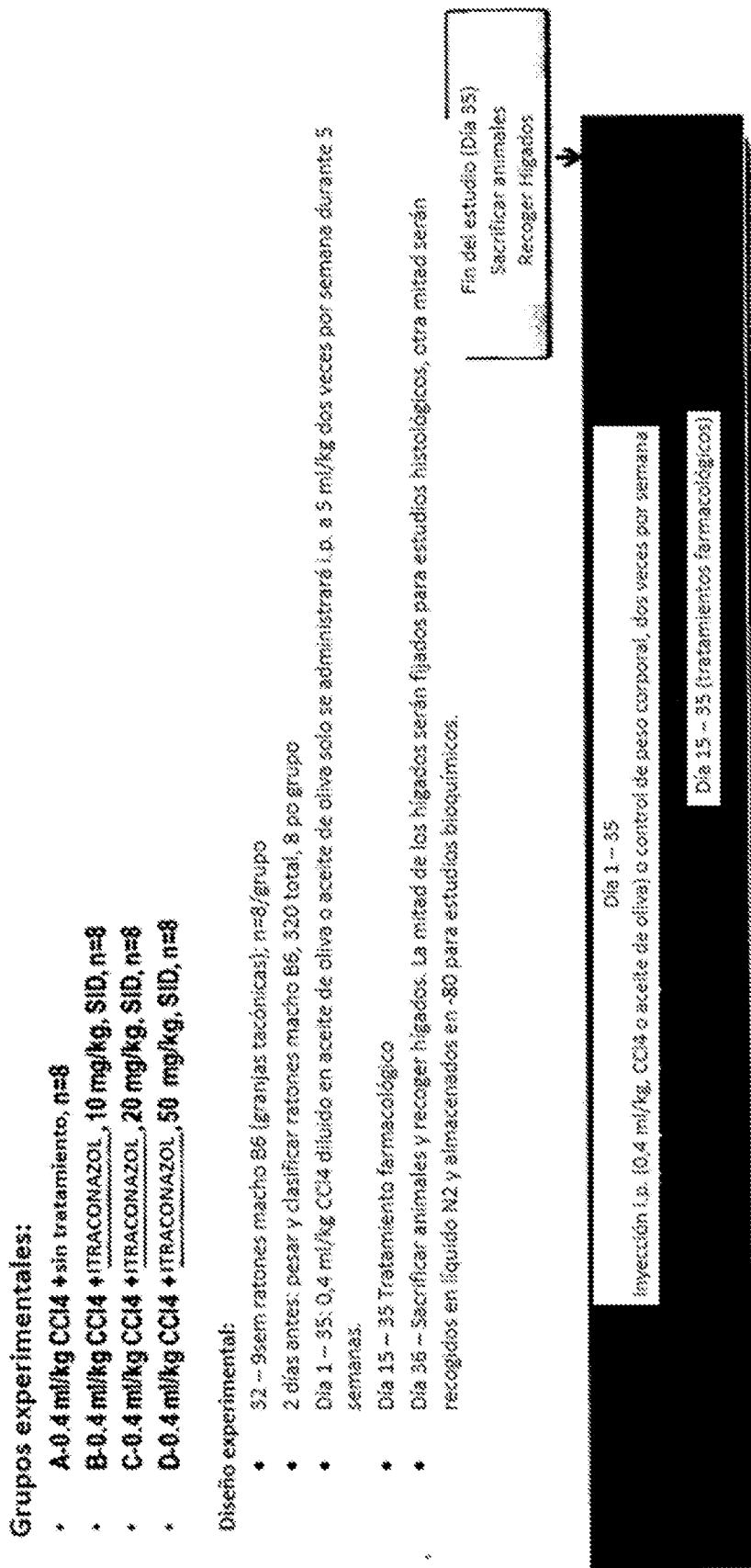


Figura 19

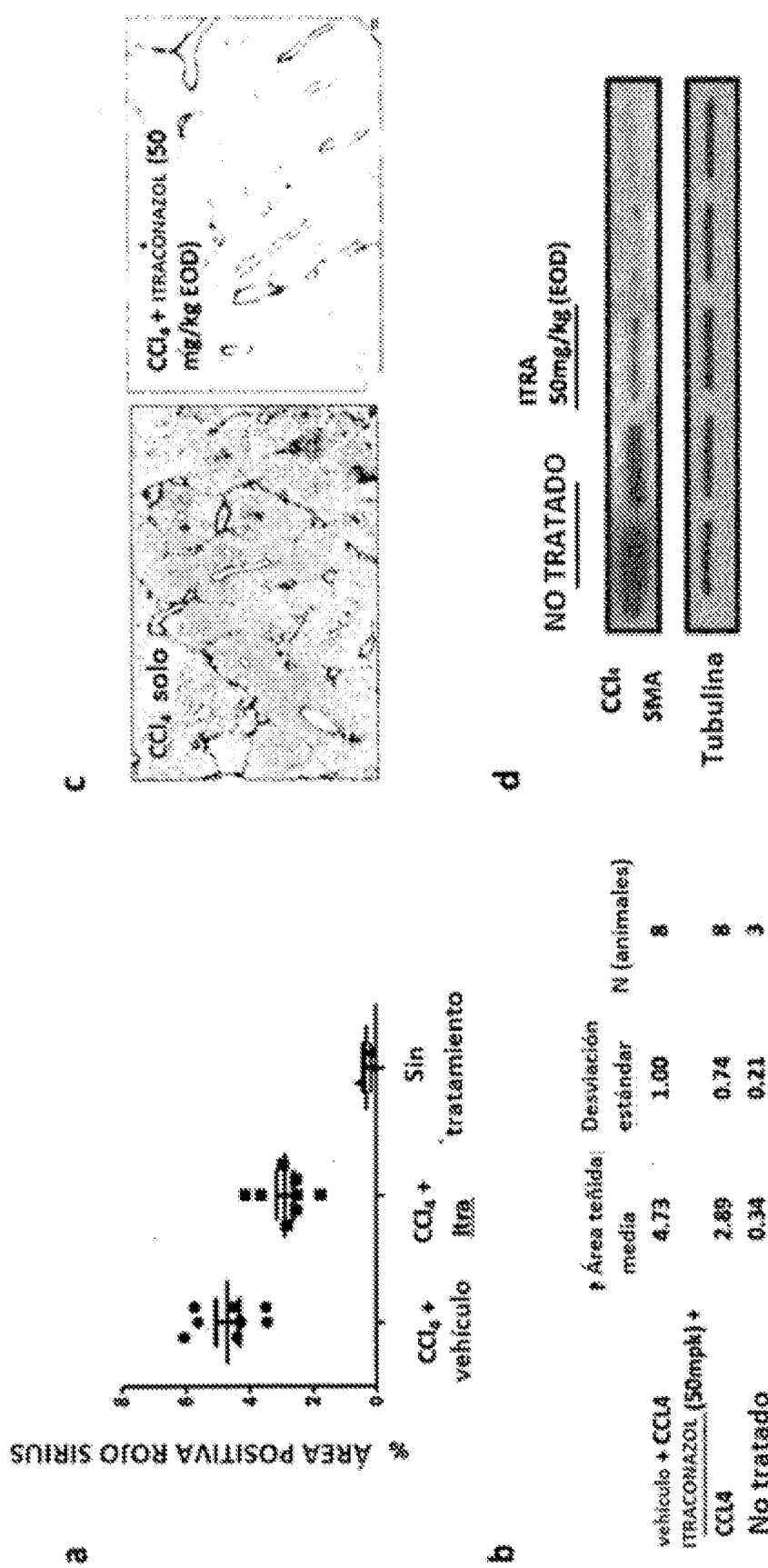


Figura 2b

Grupos experimentales:

- A. Vehículo (40% hexa-ciclohexatrina), SD, n=6
- B. Itraconazol 25 mg/kg, SD, n=6
- C. Comp n842 a 25 mg/kg, SD, n=6

Diseño experimental:

- 3 días antes, los ratones serán anestesiados y se extirpará el cabello trasero de la piel con Nair
- Día 1 - Pesar. Un punto de biopsia estéril (5 mm diámetro) será realizado perforando todo el espesor de la piel plegada (2×5 mm agujeros diarios en total)
- El tamaño de las heridas será medido diariamente con piezas
- El peso corporal será medido dos veces a la semana
- Día 1 - fin. Tratamiento farmacológico diariamente utilizando similar volumen de dosificación
- Día 7: Sangrar PK todos los animales 1 hora después de la dosificación de ese día. Sacrificar 2 animales de cada grupo y recoger heridas
- Día 11: Sangrar PK todos los animales 1 hora después de la dosificación de ese día. Sacrificar 2 animales de cada grupo y recoger heridas
- Día 14: Sangrar PK todos los animales 1 hora después de la dosificación de ese día. Sacrificar 2 animales de cada grupo y recoger heridas
- Cuando se recogen heridas, recortar las heridas incluyendo unos mm de la piel circundante. Para cada animal, dos trozos de herida serán recogidos y fijados para análisis histológico

Día 1:

Perfora la piel
↓

Día 7:

Sangrar PK y recoger
 tejido
↓

Día 11:

Sangrar PK y recoger
 tejido
↓

Día 14:

Sangrar PK y recoger
 tejido
↓

Día 1 - 14:

Vigilar la herida a diario, vigilar el peso corporal dos veces a la semana.

Figure 21

