USO Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE DERIVADOS DE FENILISOXAZOLIL METILEN-NAFTALENO-ÉTER

Campo Técnico

La presente invención se refiere al campo de los productos farmacéuticos para tratar o prevenir la infección por el virus de la hepatitis B (VHB). Específicamente, la presente invención se refiere al uso de derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter para el tratamiento o prevención de la infección por VHB, composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter y otros agentes anti-VHB, y el uso farmacéutico de derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter.

Técnica anterior

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus de ADN hepatótropo, envuelto y parcialmente bicatenario. Se transmite más comúnmente de madre a hijo al nacer (transmisión perinatal) y también puede transmitirse por sangre o fluidos corporales.

El VHB genera un ADN circular cerrado covalentemente (cccDNA), secreta el antígeno de superficie del VHB para suprimir el sistema inmunitario y provoca una infección persistente (crónica) que es difícil de erradicar. La infección por VHB es una importante amenaza para la salud pública en el mundo, con más de 257 millones de personas crónicamente infectadas y provocando más de 887,000 muertes cada año. (Revill, P.A. et al, Lancet Gastroenterol. Hepatol. 2019, 4(7), 545-558). En la región de Asia-Pacífico, la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) causó más de la mitad de las muertes por cirrosis hepática y aproximadamente la mitad de los casos de carcinoma hepatocelular en la región (Sarin, S.K. et al. Lancet Gastroenterol. Hepatol., 2020, 5(2):167-228). En un metanálisis de 27 estudios, se informó que la prevalencia estimada combinada de la infección por VHB en la población general de China de 2013 a 2017 fue del 6.89% (Wang, H. et al. BMC Infect Dis 2019, 19(1), 811).

Actualmente, los tratamientos para la infección por VHB son muy limitados. Los tratamientos aprobados incluyen inhibidores de nucleótido(s), como Tenofovir disoproxil (Viread), Tenofovir alafenamida (Vemlidy), Entecavir (Baraclude), Telbivudina (Tyzeka o Sebivo), Lamivudina (Epivir-HBV, Zeffix o Heptodin) e inmunomoduladores, como el

interferón alfa-2a pegilado (Pegasys). Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevos tratamientos. (Fanning, G.C, Nat. Rev. Drug Discov, 2019, 18(11), 827-844).

El receptor farnesoide X (FXR) es un miembro de la familia de receptores nucleares, que incluye receptores de esteroides, receptores de retinoides y receptores de hormonas tiroideas (Radreau P, Porcherot M, Ramière C, et al. Regulación recíproca de la actividad del receptor farnesoide X α y replicación del virus de la hepatitis B en células HepaRG diferenciadas y hepatocitos humanos primarios FASEB J. 2016;30(9):3146-54). FXR se expresa principalmente en el hígado, los riñones, el intestino delgado y las glándulas suprarrenales. Después de que el VHB infecta las células, el cccDNA del VHB ingresa al núcleo y comienza a transcribir una variedad de ARNs del VHB. El ARN pregenómico se transcribe de forma inversa para formar el ADN del VHB, y los ARNs restantes se traducen para formar HBsAg, HBeAg, HBcAg, HBx, etc. Estas proteínas virales y los ácidos nucleicos se ensamblan juntos en el retículo endoplásmico y luego se forman las partículas virales y se liberan fuera de las células. En el ciclo de vida de VHB, la transcripción de cccDNA de VHB puede ser regulada por receptores nucleares, como HNF-4α y FXR. Los experimentos in vitro han confirmado que los agonistas de FXR inhiben la formación de complejos de transcripción estables entre cccDNA y HBx al activar FXR, afectando así la estabilidad de cccDNA, inhibiendo la actividad transcripcional de cccDNA y logrando el propósito de reducir el ADN viral y HBsAg (Mouzannar K, Fusil F, Lacombe B, et al. El receptor-α de farnesoide X es un factor huésped proviral para el virus de la hepatitis B que es inhibido por ligandos in vitro e in vivo. FASEB J. 2019; 33(2):2472-2483).

Divulgación de la invención

Los inventores de la presente invención descubrieron que los derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter representados por la fórmula (I), como un agonista de FXR de molécula pequeña eficaz, tienen actividad anti-VHB. Los resultados de la prueba de infección primaria de hepatocitos humanos in vitro muestran que los derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter representados por la fórmula (I) pueden inhibir eficazmente el ADN del VHB, el ARN del VHB y el HBsAg.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con el uso de derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter para el tratamiento o prevención de la infección por VHB, las

composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de fenilisoxazolil metilen -naftaleno-éter y otros agentes anti-VHB, y el uso farmacéutico de derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter.

Definiciones

A los efectos de interpretar esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando corresponda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural, y viceversa.

Como se usa aquí, el término "alquilo C_{1-6}" denota un radical alquilo que tiene de 1 a 6, particularmente hasta 4 átomos de carbono, siendo los radicales lineales o ramificados con ramificación simple o múltiple, por ejemplo, butilo, tal como n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo; propilo, tal como n-propilo o isopropilo; etilo o metilo; más particularmente, metilo, isopropilo o terc-butilo.

Como se usa en el presente documento, "alcoxi C_{1-6}" se refiere a "alquilo C_{1-6}-O-", y es particularmente metoxi, etoxi, isopropiloxi o terc-butoxi.

Como se usa aquí, el término "cicloalquilo C_{3-6}" se refiere a un radical alquilo cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. El cicloalquilo C_{3-6} puede estar opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6} y/o halógeno.

Como se usa aquí, el término "alquilcicloalquilo C_{4-7}" se refiere a una combinación de alquilo y un grupo cicloalquilo tal que el número total de átomos de carbono es de 4 a 7. Por ejemplo, alquilcicloalquilo C_4 incluye metilenciclopropilo.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo de 5-10 miembros" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o bicíclico o tricíclico de 5-10 miembros. Típicamente, el arilo es un sistema de anillo de 5 o 6 miembros.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo de 5 a 10 miembros" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o bicíclico o tricíclico de 5 a 10 miembros que tiene de 1 a 4 heteroátomos. Típicamente, el heteroarilo es un sistema de anillo de 5 o 6 miembros. Además, el término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, puede abarcar heteroarilos monovalentes o divalentes.

Como se usa aquí, el término "halógeno" o "halo" se refiere a uno o más de flúor, cloro,

bromo y yodo, y más particularmente, flúor o cloro.

Como se usa en este documento, el término “haloalquilo C_{1-6}” se refiere a un radical alquilo que está sustituido con uno o más radicales halo, y es particularmente fluoroalquilo C_{1-6} o cloroalquilo C_{1-6}, como trifluorometilo y 2,2,2- trifluoroetilo.

Como se usa en el presente documento, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición tanto de ácido como de base.

Como se usa en el presente documento, el término “materiales auxiliares farmacéuticamente aceptables” puede incluir cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares y combinaciones de los mismos, como sabrán los expertos en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Como se usa en el presente documento, “virus de la hepatitis B” o “VHB” se refiere a un miembro de la familia Hepadnaviridae que tiene un pequeño genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 3,200 pares de bases y un tropismo por las células hepáticas. El “VHB” incluye el virus de la hepatitis B que infecta a cualquiera de una variedad de huéspedes mamíferos (por ejemplo, humanos, primates no humanos, etc.) y aves (patos, etc.). El “VHB” incluye cualquier genotipo de VHB conocido, por ejemplo, serotipo A, B, C, D, E, F y G; cualquier serotipo de VHB o subtipo de VHB; cualquier aislado de VHB; variantes de VHB, por ejemplo, variantes negativas de HBeAg, variantes de VHB resistentes a fármacos (por ejemplo, variantes resistentes a lamivudina, mutantes resistentes a adefovir, mutantes resistentes a tenofovir, mutantes resistentes a entecavir, etc.); y similares.

Como se usa en este documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto o molécula de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, (i) trata o previene la enfermedad, condición o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, condición o trastorno en particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, condición o

trastorno en particular descritos en este documento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará según el compuesto, el estado de la enfermedad que se está tratando, la gravedad de la enfermedad tratada, la edad y la salud relativa del sujeto, la vía y forma de administración, el juicio del médico o veterinario tratante, y otros factores. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de HBsAg y un análogo de nucleós(t)ido, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

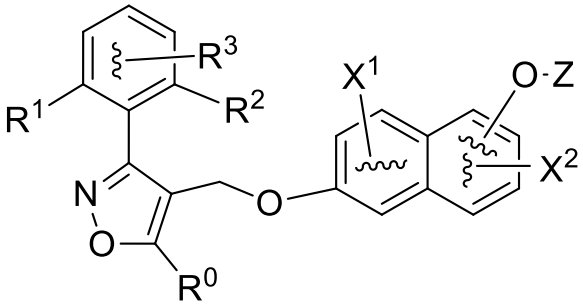
A menos que se especifique lo contrario, el término “compuesto de fórmula (I)” incluye derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter de fórmula (I), profármacos de los mismos, sales del compuesto y/o profármacos, hidratos o solvatos del compuesto, así como como todos los estereoisómeros (incluyendo los diastereoisómeros y enantiómeros), tautómeros, compuestos marcados isotópicamente (incluyendo sustituciones de deuterio) y polimorfos del compuesto.

Las sales del compuesto de fórmula (I) se pueden preparar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de un compuesto de fórmula (I) con una base o ácido apropiado en un solvente apropiado producirá la sal correspondiente.

Las sales englobadas dentro del término “sales farmacéuticamente aceptables” se refieren a sales no tóxicas del compuesto de fórmula (I). Se prefieren las sales alcalinas del ácido carboxílico, tales como sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, aluminio, zinc, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína. Otras sales, que no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de compuestos de fórmula (I) y se debe considerar que forman otro aspecto de la invención.

Todos los materiales de partida, reactivos, ácidos, bases, solventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de fórmula (I) están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en la materia. Todos los métodos descritos en este documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, como) proporcionado en el presente documento pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la infección por el virus de la hepatitis B en un ser humano o un animal, que comprende administrar al ser humano o al animal que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de derivados de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tienen una estructura de fórmula (I), y una de sus sales, ésteres o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables:



(I)

donde:

R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C_{1-6} no sustituido o sustituido con halógeno y alcoxi C_{1-6} no sustituido o sustituido con halógeno, siempre que por lo menos uno de R^1, R^2 y R^3 no sea hidrógeno, R^0 se selecciona de alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-6}, alquilcicloalquilo C_{4-7} no sustituido o sustituido con halógeno;

X^1 y X^2 se seleccionan independientemente de H y halógeno;

la fracción –O–Z (residuo Z unido al anillo de naftaleno a través de un átomo de oxígeno) se une al anillo de naftaleno, en el que Z es un residuo seleccionado entre arilo de 5 a 10 miembros o heteroarilo de 5 a 10 miembros que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, donde el arilo de 5-10 miembros o el heteroarilo de 5-10 miembros está sustituido con R^4 y está opcionalmente sustituido además con R^5;

donde R^4 se selecciona de –COOH, $–CH_2COOH$, $–NHSO_2CF_3$, $–SO_2NH$–alquilo C_{1-6}, $–SO_3H$, $–CONHSO_2$–alquilo C_{1-6}, $–CONHSO_2$–cicloalquilo C_{3-6}, $–CONHSO_2$–arilo de 5-10 miembros y $–CONHSO_2$ –arilo de 5-10 miembros sustituido con alquilo C_{1-6} en el arilo, y R^5 se selecciona de H, alquilo C_{1-6}, halógeno, haloalquilo C_{1-6}, –O–(alquilo C_{1-6}) y –NH–(alquilo C_{1-6}).

En modalidades preferidas de la presente invención, R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y perfluoroalcoxi C_{1-3}, como H, Cl, F y $–O–CF_3$. En una modalidad de la invención, tanto R^1 como R^2 son Cl y R^3 es H. En otra modalidad de la invención, tanto R^1 como R^2 son Cl y R^3 es F. En otra modalidad más de la invención, ambos

R^1 y R^2 son Cl y R^3 es –O–CH_3. En otra modalidad más de la invención, R^1 es –O–CF_3, y tanto R^2 como R^3 son H. En otra modalidad más de la invención, R^0 es isopropilo o ciclopropilo.

En una modalidad de la presente invención, Z es un fenilo, que está opcionalmente sustituido con 1-5 átomos de halógeno. En otra modalidad de la presente invención, Z es un heteroarilo de 5 a 10 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S. En una modalidad preferida de la presente invención, Z es un heteroarilo de 5 a 6 miembros que tiene uno o más más heteroátomos seleccionados de N, O y S. En otra modalidad más de la presente invención, Z es un piridilo R^4 y opcionalmente R^5 sustituido.

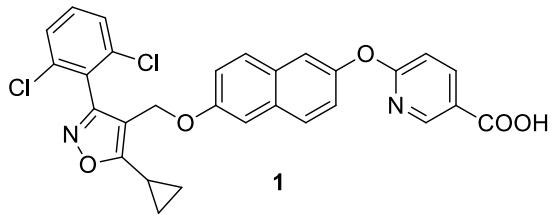
En modalidades preferidas de la presente invención, R^4 se selecciona de -COOH, -CH_2COOH, -CONHSO_2-alquilo C_{1-6} y -CONHSO_2-cicloalquilo C_{3-6}. En una modalidad más preferida de la presente invención, R^4 es –COOH o –CH_2COOH. En una modalidad más preferida de la presente invención, R^4 es -COOH.

Preferentemente, R^5 es uno seleccionado de H, alquilo C_{1-3} y halógeno.

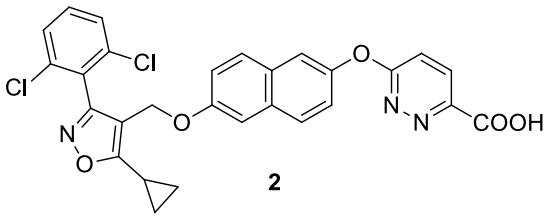
En una modalidad preferida de la presente invención, Z es piridilo; R^4 es –COOH; y R^5 es H o halógeno.

Preferentemente, el halógeno en los sustituyentes antes mencionados es flúor o cloro.

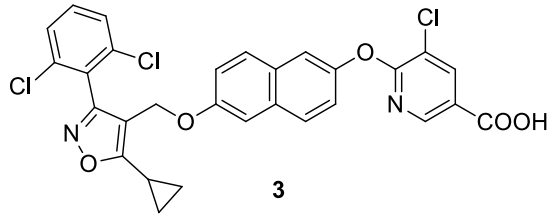
Específicamente, en modalidades preferidas de la presente invención, el compuesto que tiene la fórmula (I) tiene una de las siguientes estructuras:



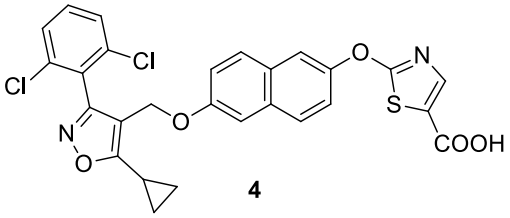
1



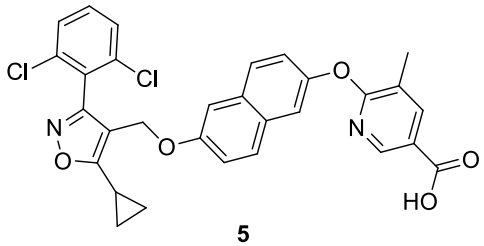
2



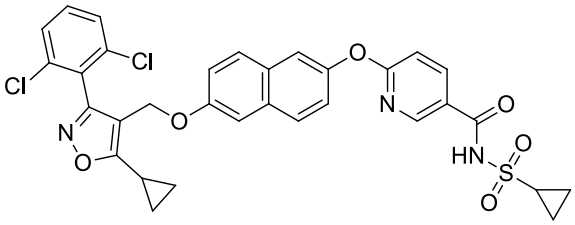
3



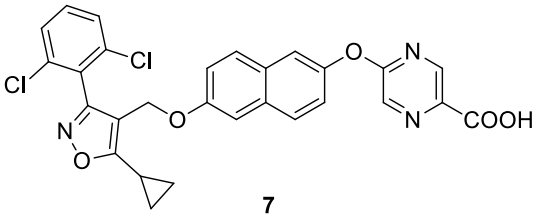
4



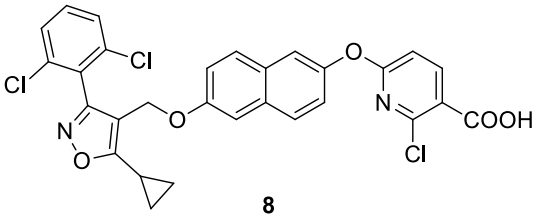
5



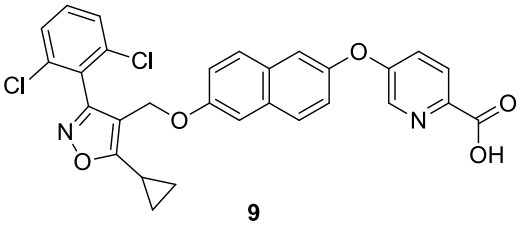
6



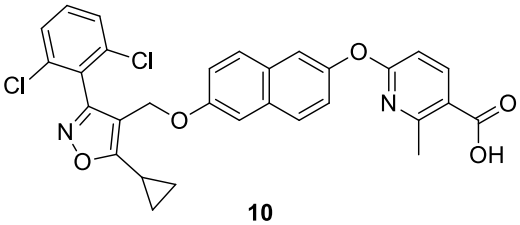
7



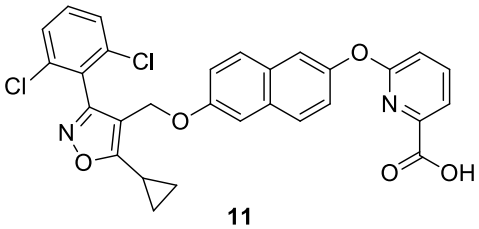
8



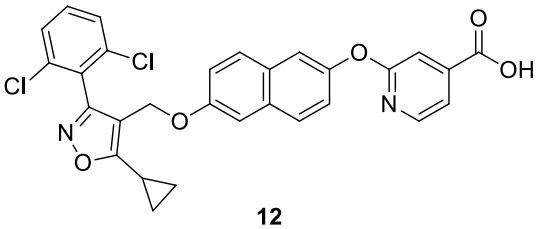
9



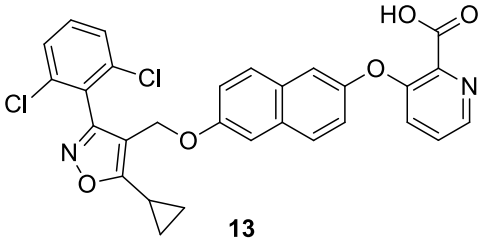
10



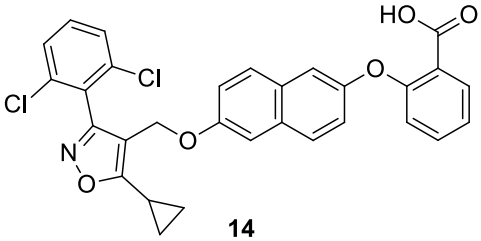
11



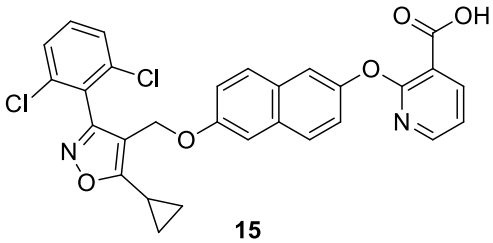
12



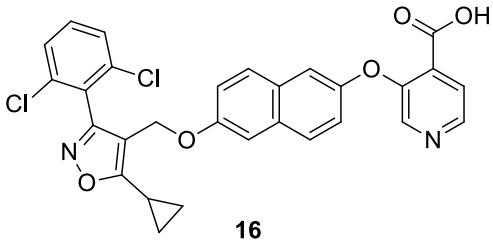
13



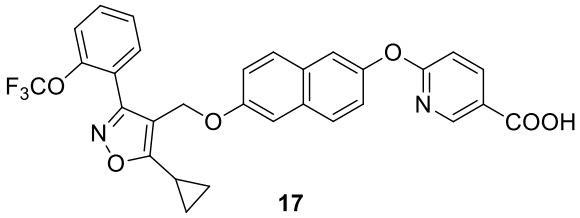
14



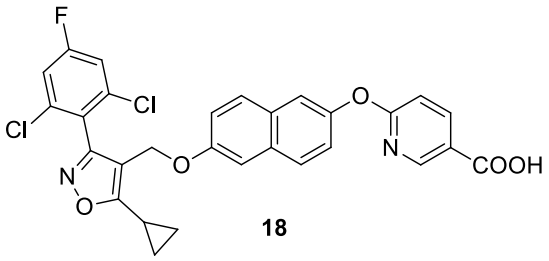
15



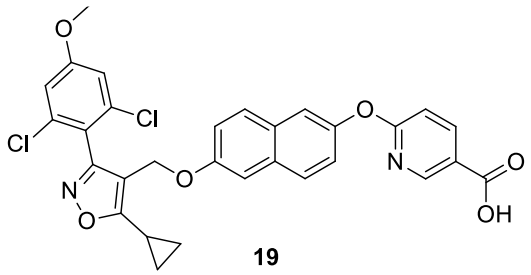
16



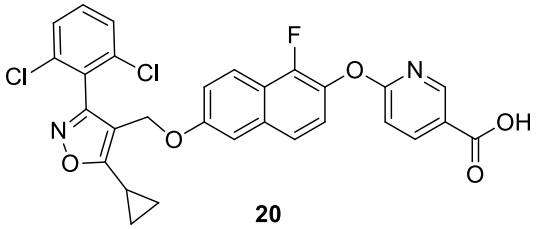
17



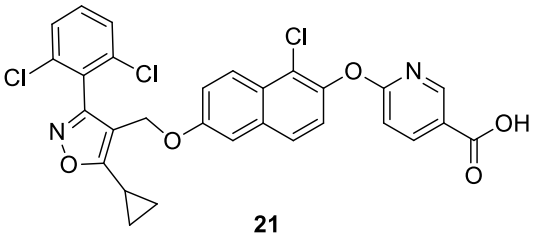
18



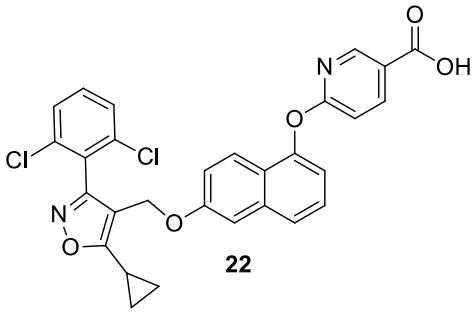
19



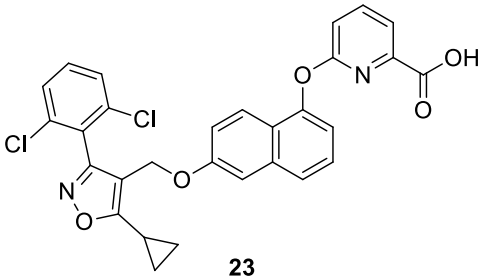
20



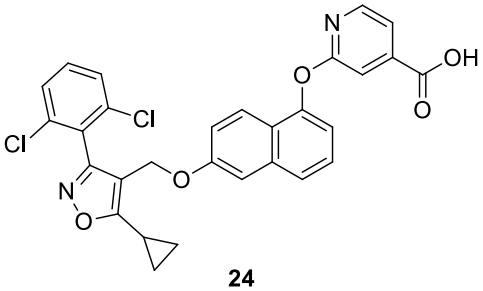
21



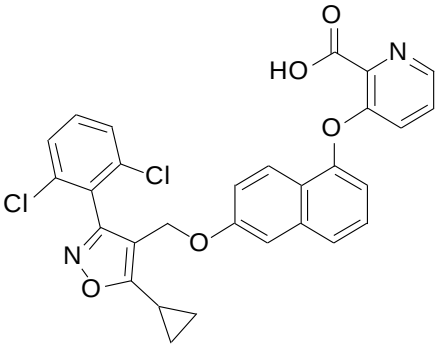
22



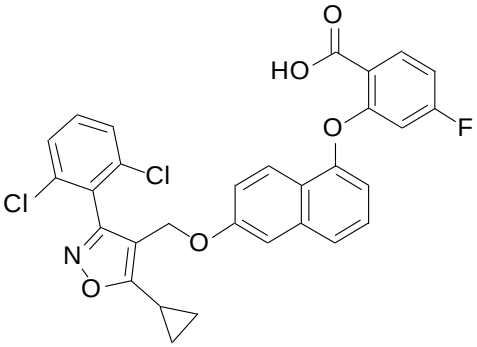
23



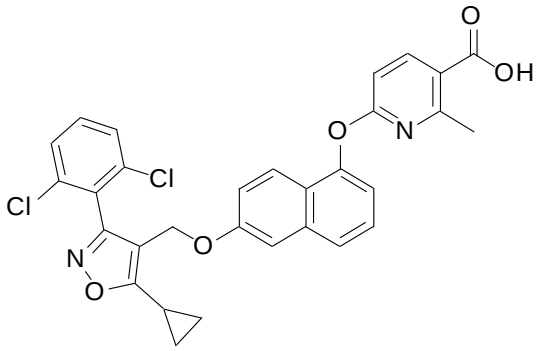
24



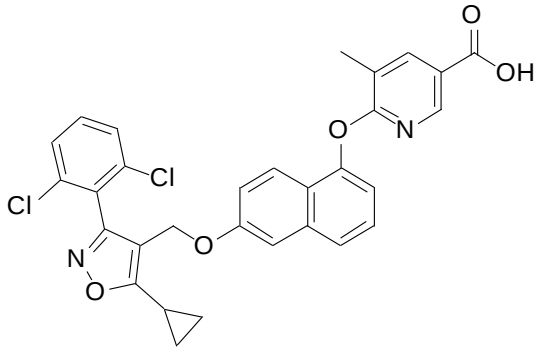
25



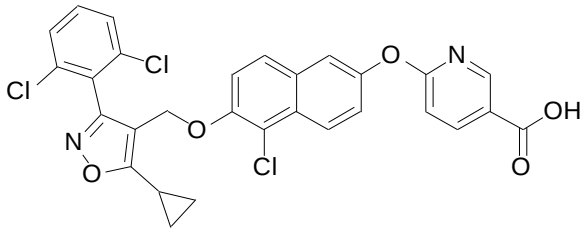
26



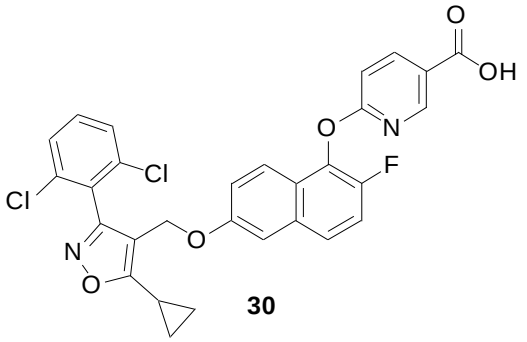
27



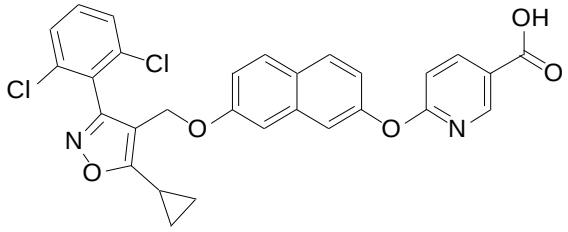
28



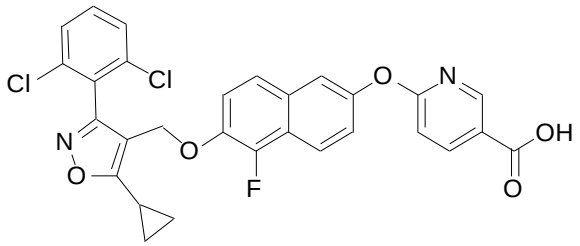
29



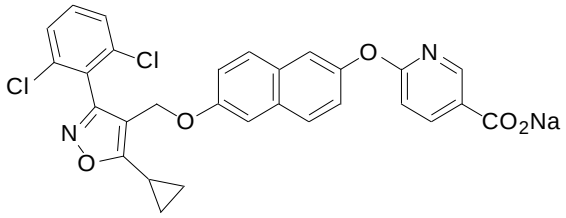
30



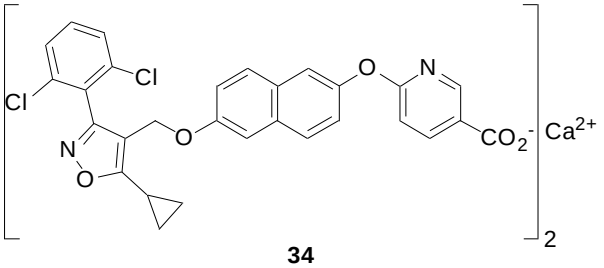
31



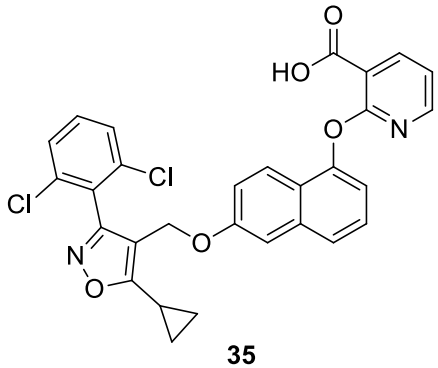
32



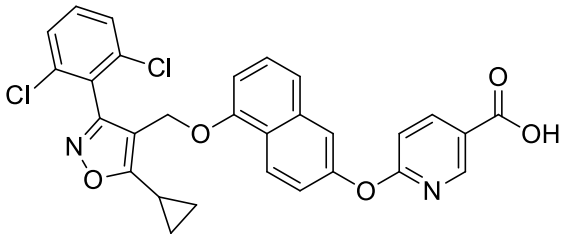
33



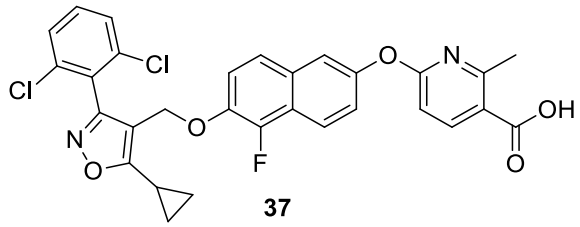
34



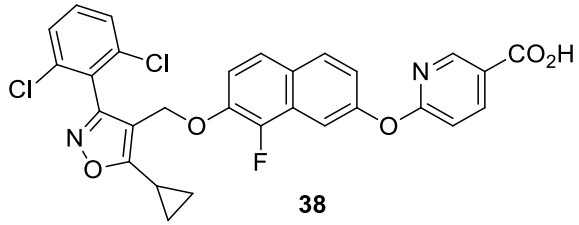
35



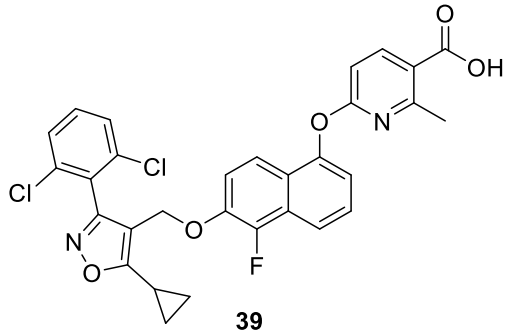
36



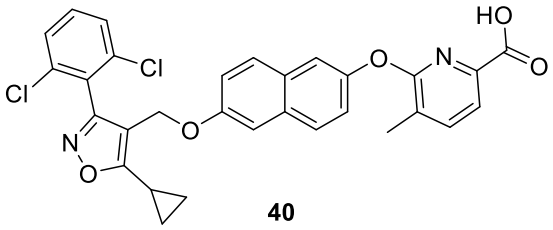
37



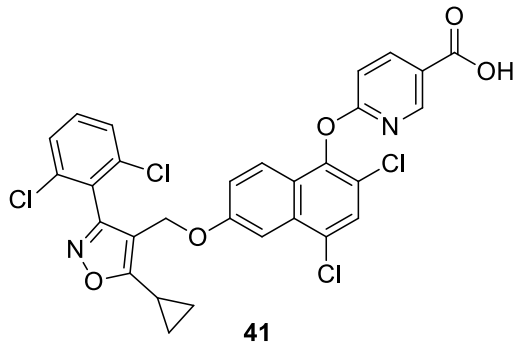
38



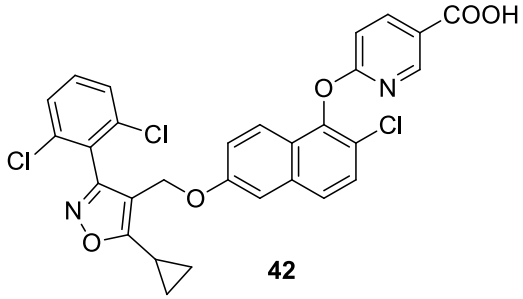
39



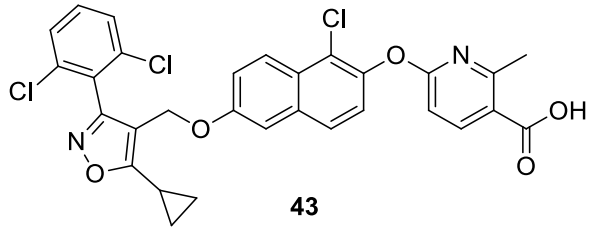
40



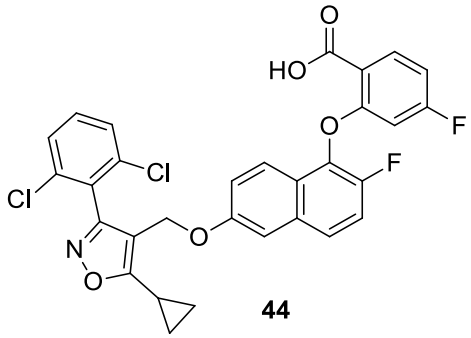
41



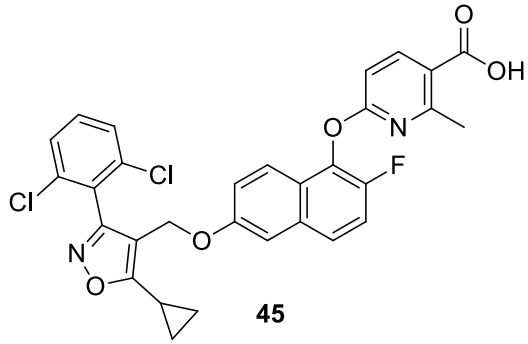
42



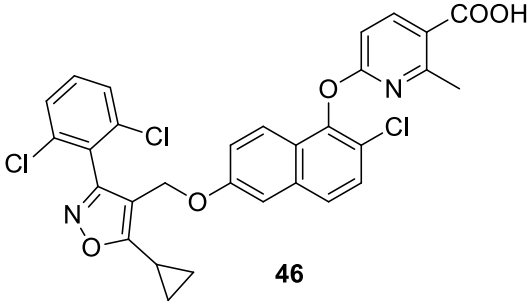
43



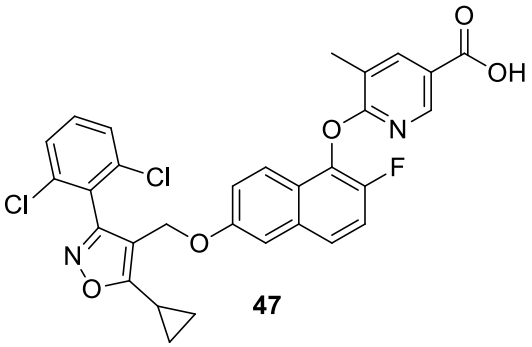
44



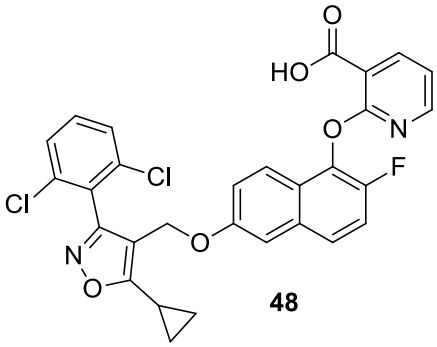
45



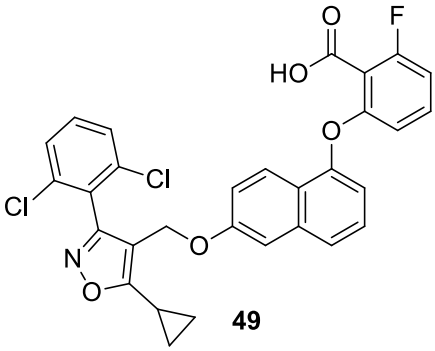
46



47



48

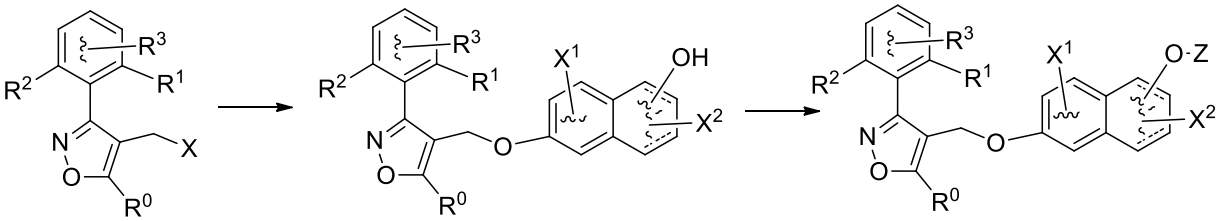


49

.

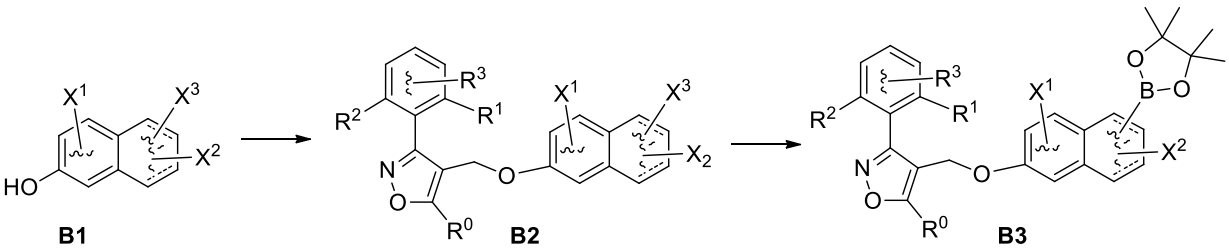
El método para preparar el compuesto de fórmula (I) puede incluir las siguientes cuatro rutas generales (Ruta A, Ruta B, Ruta C y Ruta D), entre las cuales:

Ruta A:

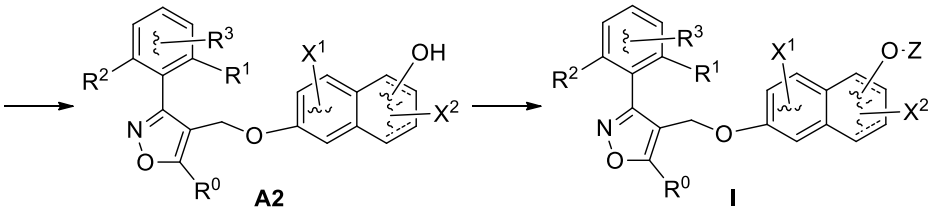


A1 **A2** **I**

Ruta B:

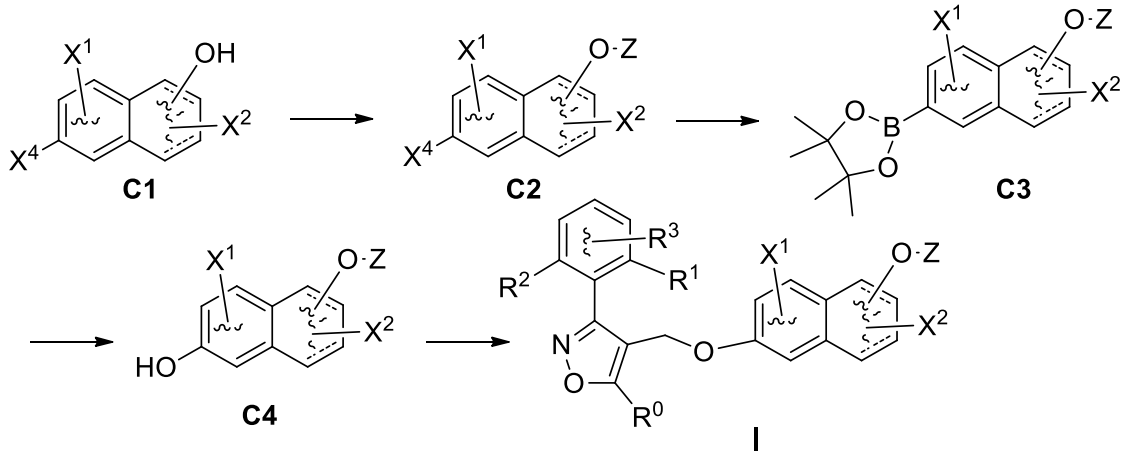


B1 **B2** **B3**

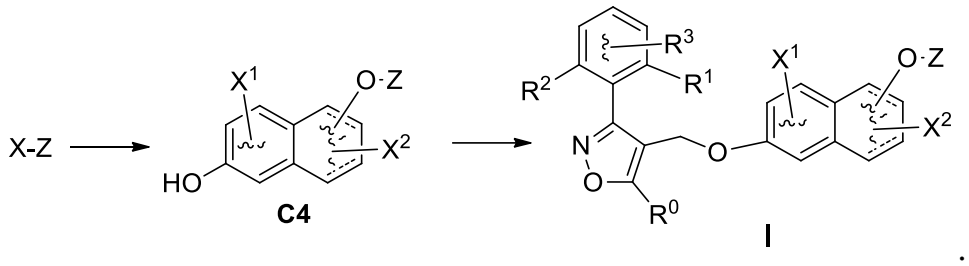


A2 **I**

Ruta C:



Ruta D:



A continuación, se describirán en detalle las cuatro rutas generales mencionadas anteriormente.

Ruta A:

(a) hacer reaccionar un compuesto halogenado de fórmula (A1) con un dinaftol para dar un éter de fórmula (A2). La reacción se realiza en un solvente polar con una base, preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similar con carbonato de cesio o carbonato de potasio o bases similares.

donde:

X es un halógeno;

R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C_{1-6} no sustituido o sustituido con halógeno y alcoxi C_{1-6} no sustituido o sustituido con halógeno, siempre que por lo menos uno de R^1, R^2 y R^3 no sea hidrógeno, R^0 se selecciona de alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-6}, alquilcicloalquilo C_{4-7} no sustituido o sustituido con halógeno;

(b) hacer reaccionar el éter resultante de fórmula (A2) con un compuesto halogenado X-Z para dar un compuesto de fórmula (I),

donde X es halógeno, Z es un resto seleccionado de heteroarilo de 5-10 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S, donde el residuo Z está sustituido por R^4 y opcionalmente sustituido además por R^5;

donde R^4 se selecciona de –COOH, $–CH_2COOH$, $–NHSO_2CF_3$, $–SO_2NH$–alquilo C_{1-6}, $–SO_3H$, $–CONHSO_2$–alquilo C_{1-6}, $–CONHSO_2$–cicloalquilo C_{3-6}, $–CONHSO_2$–arilo de 5-10 miembros y $–CONHSO_2$–arilo de 5-10 miembros sustituido con alquilo C_{1-6} en el arilo, y R^5 se selecciona de H, alquilo C_{1-6}, halógeno y haloalquilo C_{1-6}; opcionalmente

(c) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I) que contiene un sustituyente -COOH con un compuesto de amida para dar un compuesto de amida de fórmula (I); y opcionalmente

(d) cuando Z se sustituye por R^4 seleccionado de -COOH y $-CH_2COOH$, los precursores de éster se pueden convertir en ácidos libres por hidrólisis usando condiciones bien conocidas por los expertos en la técnica,

en la que el compuesto de fórmula (I) es como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con el método de preparación proporcionado por la presente invención, X es preferentemente bromo o yodo, y más preferentemente bromo.

Ruta B:

(a) hacer reaccionar un compuesto halogenado de fórmula (A1) con un naftol sustituido (B1) para dar un éter de fórmula (B2). La reacción se realiza en un solvente polar con una base, preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similar, con carbonato de cesio o carbonato de potasio o bases similares;

(b) el compuesto (B2) se convierte en éster borónico de fórmula (B3), preferentemente, en condiciones catalizadas por Pd;

(c) el compuesto (B3) se convierte en naftol (A2) por oxidación, con oxidantes tales como $NaClO_2$ o H_2O_2;

(d) el Compuesto (A2) se convierte en el Compuesto (I) utilizando las condiciones descritas en la Ruta A,

donde X^3 es un halógeno, preferentemente bromo o yodo, y más preferentemente bromo.

Ruta C:

(a) hacer reaccionar un naftol sustituido (C1) con un compuesto halogenado X-Z para dar un éter de fórmula (C2), donde la reacción se realiza en un solvente polar con una base, preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similar, con carbonato de cesio o carbonato de potasio o bases similares;

(b) el compuesto (C2) se convierte en éster borónico (C3), preferentemente, en condiciones catalizadas por Pd;

(c) el compuesto (C3) se convierte en naftol (C4) por oxidación, con oxidantes tales como $NaClO_2$ o H_2O_2;

(d) el compuesto (C4) se convierte en el Compuesto (I) utilizando condiciones similares descritas en la Ruta A;

donde X^4 es un halógeno, preferentemente bromo o yodo, y más preferentemente bromo.

Ruta D:

(a) hacer reaccionar un dinaftol con un compuesto halogenado X-Z para dar un éter de fórmula (C4) usando condiciones similares descritas en la Ruta C;

(b) el Compuesto (C4) se convierte en el Compuesto (I) usando una condición similar descrita en la Ruta C.

De acuerdo con el método de tratamiento o prevención de la infección por el virus de la hepatitis B en un ser humano o un animal, el derivado de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tiene la estructura de fórmula (I), o sus sales, ésteres o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables ("compuesto de fórmula (I)" para abreviar) puede administrarse por cualquier ruta adecuada a la afección a tratar. Las rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y similares. Se apreciará que la ruta preferida pueda variar con, por ejemplo, la condición del receptor.

De acuerdo con el método de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) puede combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales en cualquier cantidad de dosificación del compuesto de fórmula (I), con cualquier dosis de otros agentes terapéuticos. En una modalidad, el compuesto de fórmula (I) se coadministra con otros agentes anti-VHB, ya sea como parte de la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. Estos agentes también pueden administrarse en su propio horario ya través de una ruta diferente. La coadministración incluye la administración de una dosis unitaria de un compuesto de fórmula (I) antes o después de la administración de una dosis unitaria de uno o más agentes anti-VHB. En algunas modalidades, el compuesto de fórmula (I) se puede administrar en segundos, minutos u horas después de la administración de uno o más agentes anti-VHB. En otras modalidades, se administra primero una dosis unitaria del compuesto de fórmula (I), seguida de la administración de uno o más agentes anti-VHB en segundos, minutos u horas.

En ciertas modalidades, cuando el compuesto de fórmula (I) se combina con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se describe en el presente documento, los componentes de la composición se administran como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

En modalidades preferidas de la presente invención, el método para tratar o prevenir la infección por el virus de la hepatitis B en un ser humano o un animal comprende administrar el derivado de fenilisoxazolilmetilen-naftaleno-éter que tiene la estructura de fórmula (I), su sal farmacéuticamente aceptable y éster o estereoisómero en combinación con uno o más agentes anti-VHB.

En las modalidades anteriores, en las que los otros agentes anti-VHB pueden seleccionarse entre oligonucleótidos antisentido que se dirigen a ARNm viral (ASO), ARNs de interferencia corta (siARN), inhibidores del atenuador de linfocitos B y T, antagonista de quimiocinas CCR2, compuestos que se dirigen a HBcAg, compuestos dirigido al antígeno central de la hepatitis B (HBcAg), inhibidores del ADN circular covalentemente cerrado (cccDNA), inhibidores de la sintasa de ácidos grasos, inhibidores de la ciclofilina, citocinas, modulador de endonucleasa, modificadores epigenéticos, modificadores o editores de genes, inhibidores de HBsAg, inhibidores de la secreción o ensamblaje de HBsAg, anticuerpos contra el VHB, inhibidores de la polimerasa del ADN del VHB, inhibidores de la replicación del VHB, inhibidores de la ARNasa del VHB, vacunas contra el VHB, inhibidores de la entrada viral del VHB, inhibidores de HBx , modulador de la proteína estructural de la hepatitis B, inhibidores del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores de la secreción o ensamblaje del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores del antígeno E del virus de la hepatitis B, inhibidores de la replicación del virus de la hepatitis B, inhibidor de la proteína estructural del virus de la hepatitis, agonista de IL-2, agonista de IL-7, inmunomoduladores, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, agonista de interferón, ligando de interferón alfa 1, ligando de interferón alfa 2, modulador de ligando de interferón alfa 5, ligando de interferón alfa, modulador de ligando de interferón alfa, ligandos del receptor de interferón alfa, ligando de interferón beta, ligando de interferón, modulador del receptor de interferón, ligando de interleucina-2, inhibidores de ipi4, inhibidores de lisina desmetilasa, agentes de terapia génica de microARN (miARN), moduladores de B7-H3, moduladores de B7-H4, moduladores de CD 160, moduladores de CD161, moduladores de CD27, moduladores de CD47, moduladores de CD70, moduladores de GITR, moduladores de TIGIT, moduladores de Tim-4, inhibidores del

polipéptido cotransportador de Na^+-taurocolato (NTCP), inhibidores del receptor de células asesinas naturales 2B4, estimulador del gen NOD2 , inhibidor de nucleoproteína, moduladores de nucleoproteína, inhibidores de PD-l, inhibidores de PD-L1, PEG-interferón lambda, inhibidor de peptidilprolil isomerasa, estimulador del gen 1 inducible por ácido retinoico, inhibidor de la transcriptasa inversa, inhibidor de la ribonucleasa, inhibidor de la polimerasa de ARN ADN, ARN de horquilla sintética corta (sshRNAs), estimulador de los agonistas del gen del interferón (STING), estimuladores de NOD 1, inhibidor de la glicoproteína CD28 de la superficie de las células T, agonista de TLR-3, agonista de TLR-7, agonista de TLR-8, agonista de TLR-9, estimulador del gen TLR9, moduladores del receptor tipo toll (TLR), inhibidor de la ribonucleótido reductasa viral, nucleasas con dedos de zinc o nucleasas sintéticas (TALENs).

En la solución preferida de la presente invención, los otros agentes anti-VHB pueden seleccionarse de vacunas contra el VHB, inhibidores de la ADN polimerasa del VHB, inmunomoduladores, moduladores del receptor tipo toll (TLR), ligandos del receptor del interferón alfa, inhibidores del antígeno de superficie de la hepatitis b (HBsAg), inhibidores de la ciclofilina, inhibidores de la entrada viral del VHB, oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm viral, ARNs de interferencia corta (siRNA) y moduladores de la endonucleasa ddRNAi, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, inhibidores del antígeno E del VHB, inhibidores del ADN circular covalentemente cerrado (cccDNA), inhibidores de la sintasa de ácidos grasos, anticuerpos del VHB, antagonistas de quimiocinas CCR2, estimuladores del gen 1 inducible por ácido retinoico, estimuladores de NOD2, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidores de KDM e inhibidores de la replicación del VHB.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es un nucleótido(s). Los ejemplos de inhibidores de la polimerasa del ADN del VHB incluyen adefovir (HEPSERA*), emtricitabina (EMTRIVA), tenofovir disoproxil fumarato (VIREAD®), tenofovir alafenamida, tenofovir, tenofovir disoproxil, tenofovir alafenamida fumarato, tenofovir alafenamida hemifumarato, tenofovir dipivoxil, tenofovir dipivoxil fumarato, tenofovir éster octadecil1oxietílico, CMX-157, besifovir, entecavir (BARACLUDE®), maleato de entecavir, telbivudina (TYZEKA), pradefovir, devudina, ribavirina, lamivudina (EPIV R-V®), fosfazida, famciclovir, fusolina, metacavir, SNC-0 19754, FMCA, AGX-1009, AR-II-04-26, HIP-1302, aspartato de disoproxilo de tenofovir, orotato de disoproxilo de tenofovir y HS-10234. Otros ejemplos de inhibidores de la ADN polimerasa del VHB incluyen filocilovir.

En una modalidad particular, el compuesto de fórmula (I) se administra en combinación con entecavir o tenofovir.

En una modalidad, el otro agente anti VHB es un inmunomodulador. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen el agonista de TLR RO7020531, GS-9620, GS-9688. Los ejemplos de inmunomoduladores también incluyen inhibidores de PD-1 como nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BGB-108, camrelizumab (SHR-1210), PDR-001, PF-06801591, IBI-308, cemiplimab, camrelizumab, sintilimab, tislelizumab (BGB-A317), BCD-100, JNJ-63723283, Zimberelimab (GLS-010, WBP-3055), Balstilimab (AGEN2034) y dostarlimab (TSR-042).

Los ejemplos de inmunomoduladores también incluyen inhibidores de PD-L1 como atezolizumab (RG-7446), avelumab, BGB-A333, BMS-936559 (MDX-1105), durvalumab, CX-072, GX-P2 y envafolimab (KN035, ASC022). Los inhibidores de PD-L1 incluyen inhibidores de moléculas pequeñas como GS-4224, INCB086550.

En una modalidad particular, el compuesto de fórmula (I) se administra en combinación con KN035 (ASC022).

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es una vacuna contra el VHB. Las vacunas contra el VHB incluyen tanto vacunas profilácticas como terapéuticas. Los ejemplos de vacunas profilácticas contra el VHB incluyen Vaxelis, Hexaxim, Heplisav, Mosquirix, vacuna DTwP-HBV, Bio-Hep-B, D/T/P/F1BV7M (LBVP-0101; LBVW-0101), vacuna DTwP-Hepb-FIib-IPV, Heberpenta L, DTwP-HepB-Hib, V-419, CVI-HBV-001, Tetrabhay, vacuna profiláctica contra la hepatitis B (Advax Super D), Hepatrol-07, GSK-223 192A, ENGERIX B®, vacuna recombinante contra la hepatitis B (intramuscular, Kangtai Biological Products), vacuna recombinante contra la hepatitis B (levadura Hansenual polymorpha, intramuscular, Hualan Biological Engineering), vacuna recombinante contra el antígeno de superficie contra la hepatitis B, Bimmugen, Euforavac, Eutravac, anrix-DTaP-IPV-Hep B, HBAI-20, Infanrix-DT aP-IPV-Hep B-Hib, Pentabio Vaksin DTP-HB-Hib, Comvac 4, Twinrix, Euvax-B, Tritanrix HB, Infanrix Hep B, Comvax, vacuna DTP-Hib-HBV, vacuna DTP-HBV, Yi Tai, Heberbiovac HB, Trivac HB, GerVax, vacuna DTwP-Hep B-Hib, Bilive, HepavaxGene, SUPERVAX, Comvac5, Shanvac-B, Hebsulin, Recombivax HB, Revac B mcf, Revac B+, Fendrix, DTwP-HepB-Hib, ADN-001, Shan5, Shan6, vacuna rhHBsAG, vacuna pentavalente HBI, LBVD, Infanrix HeXa y vacuna DTaP-rHB-Hib.

En una modalidad particular, el compuesto de fórmula (I) se administra en combinación con ABX203, AIC 649, INO-1800, HB-110, TG1050, HepTcell, VR-CHB01, VBI-2601 o CARG-201.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es un oligonucleótido antisentido dirigido a

ARNm viral (ASO). Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido incluyen Ionis-HBVRx e Ionis-HBV-LRx.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB son ARN de interferencia cortos (siRNA). Los ejemplos de ARN de interferencia cortos incluyen JNJ-3989 (ARO-HBV), Vir-2218 (ALN-HBV02) y DCR-HBVS.

En una modalidad, el otro agente anti VHB es un inhibidor del antígeno de superficie de la hepatitis (HBsAg). Los ejemplos de inhibidores de HBsAg incluyen HBF-0259, PBHBV-001, PBHBV-2-15, PBHBV-2-1, REP-9AC, REP-9C, REP-9, REP-2139, REP-2l39-Ca, REP-2165, REP-2055, REP-2163, REP-2165, REP-2053, REP-203 y REP-006, REP-9 AC, así como inhibidores dirigidos al PAPD 57.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es un inhibidor de entrada viral HB, como Myrcludex B, o un anticuerpo dirigido a preS.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es un inhibidor de la sintasa de ácidos grasos, como TVB-2640, TVB-3150, TVB-3199, TVB-3166, TVB-3567 y TVB-3664.

En una modalidad, el otro agente anti-VHB es un inhibidor de la cápside. Los ejemplos de inhibidores de HBsAg incluyen ABI-H0731, ABI-H2158, ABI-H3733, CB-HBV-001, JNJ-6379, JNJ-0440, QL-007, RG-7907 y RO7049389.

En aún otra modalidad, el otro agente anti-VHB es interferón ordinario o de acción prolongada. Los ejemplos incluyen Pegasys y PEG-INTRON.

En una modalidad específica, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se combina con Pegasys.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un derivado de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tiene una estructura de fórmula (I), o una de sus sales, ésteres o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables en la preparación de una composición farmacéutica para el virus de la hepatitis B. En esta modalidad, el derivado de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tiene la estructura de fórmula (I), o una de sus sales, ésteres o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables son como se definen anteriormente.

De acuerdo con el uso de la presente invención, la composición farmacéutica anti-VHB comprende como ingrediente activo un derivado de fenilisoxazolilmetilen-naftaleno-éter que tiene una estructura de fórmula (I), una sal, éster o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más de otros agentes anti-VHB. En esta modalidad, los otros agentes anti-VHB son como se definen anteriormente.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el virus de la hepatitis B que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tiene una estructura de fórmula (I), una sal, éster o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más agentes anti-VHB, y un material auxiliar farmacéuticamente aceptable. En esta modalidad, el derivado de fenilisoxazolil metilen-naftaleno-éter que tiene la estructura de fórmula (I), o una de sus sales, ésteres o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables son como se definen anteriormente, y los otros agentes anti-VHB son como se definen anteriormente.

La composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y similares, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de las condiciones a tratar y de la naturaleza del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia.

Las composiciones incluyen las adecuadas para diversas vías de administración, incluida la administración oral. Las composiciones se pueden presentar en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo (por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación o una de sus sales farmacéuticas) con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se pueden preparar asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con excipientes líquidos o excipientes sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto. Las composiciones descritas en el presente documento que son adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas (una forma de dosificación unitaria) que incluyen, entre otras, cápsulas, cachés o tabletas, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo. En una modalidad, la composición farmacéutica es una tableta.

El compuesto se puede administrar a un individuo en una cantidad eficaz. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los ingredientes inactivos para producir una forma de dosificación puede variar según el sujeto de tratamiento previsto y el modo particular de administración. Por ejemplo, en algunas modalidades, una forma de

dosificación para administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo formulado con una cantidad apropiada y conveniente de un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, el excipiente farmacéuticamente aceptable varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 95% de las composiciones totales.

La dosificación o frecuencia de dosificación de un compuesto de la presente divulgación puede ajustarse durante el curso del tratamiento, según el criterio del médico que lo administre. La frecuencia de dosificación del compuesto de la presente divulgación estará determinada por las necesidades del paciente individual y puede ser, por ejemplo, una vez al día o dos o más veces al día. La administración del compuesto continúa durante el tiempo que sea necesario para tratar la infección por VHB.

Breve descripción de los dibujos

Con el fin de explicar más claramente las modalidades de la presente invención o las soluciones técnicas en el estado de la técnica, a continuación, se describirán brevemente los dibujos necesarios para la descripción de las modalidades de la presente invención. Obviamente, los dibujos de la siguiente descripción son solo algunas modalidades de la presente invención.

La Figura 1 son curvas EC50 de inhibición del ADN del VHB en células PHH;

la Figura 2 son curvas EC50 de inhibición de HBsAg en células PHH;

La Figura 3 son curvas EC50 de inhibición del ARN del VHB en células PHH.

La Figura 4 es el nivel de ADN del VHB en suero de ratón AAV-VHB antes y después del tratamiento con el compuesto 33.

La Figura 5 es el nivel de ARN del VHB en suero de ratón AAV-VHB antes y después del tratamiento con el compuesto 33.

La Figura 6 es el nivel de HBsAg en suero de ratón AAV-HBV antes y después del tratamiento con el compuesto 33.

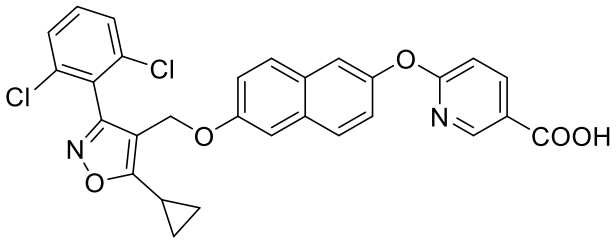
Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes. Es necesario señalar que, los ejemplos siguientes son sólo para ilustración, pero no para limitación de la presente invención. Diversas modificaciones realizadas por un experto en la materia de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención deberían estar

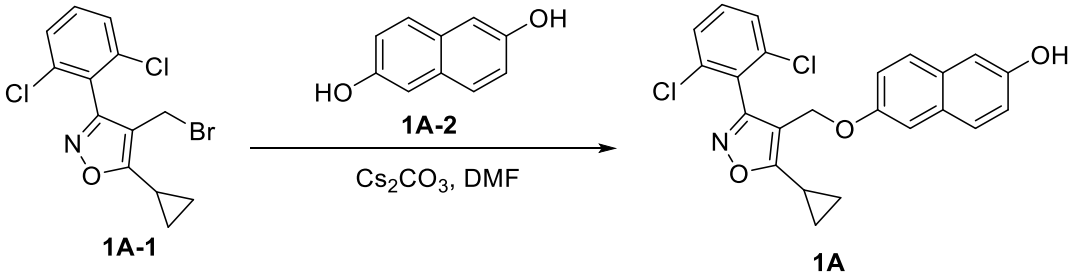
dentro del alcance reivindicado por las reivindicaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

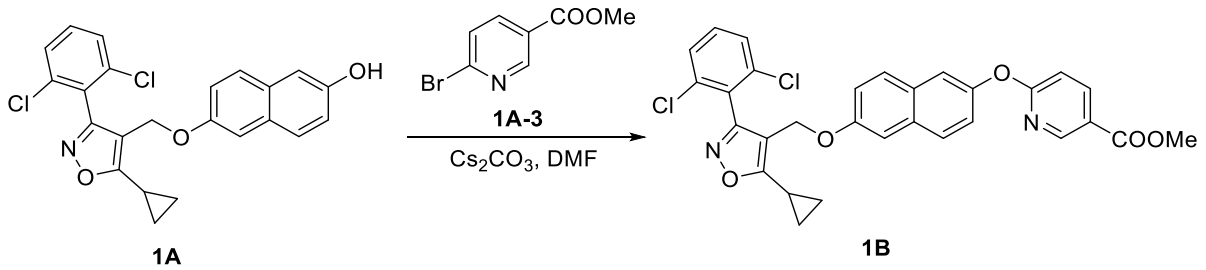
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 1)



(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta A), Compuesto 1A-1 (1.0 g, 2.88 mmol, 1 eq.), Compuesto 1A-2 (0.46 g, 2.88 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (1.88 g, 5.76 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA (acetato de etilo) para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 1A, 6-((5-ciclopropil-3-(2,6 -diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-2-ol, 0.8 g, rendimiento: 65.0%. LCMS (ESI): calculado para $C_{23}H_{17}Cl_2NO_3$; $[M+H]^+$: 426.1, encontrado: 426.1.

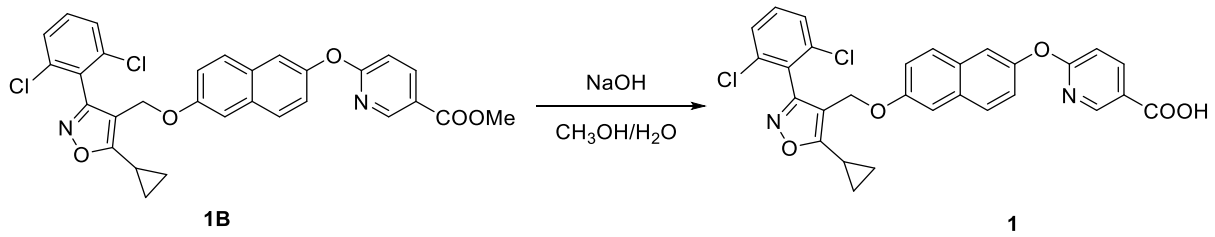


(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, Compuesto 1A (0.2 g, 0.47 mmol, 1 eq.), éster metílico del ácido 6-bromonicotínico (0.1 g, 0.47 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (0.306 g, 0.94 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 1B, metil 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2, 6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftaleno-2-il)oxi)nicotinato, 0.21 g, rendimiento: 80.0%. LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.



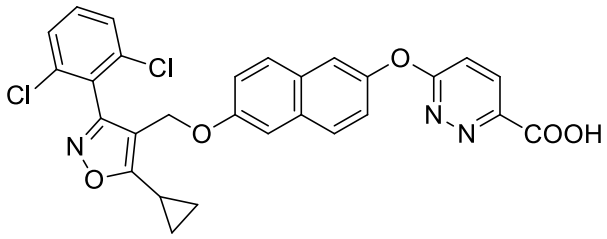
(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 1B (100 mg) se disolvió en metanol (2 ml), luego se agregó una solución acuosa de NaOH al 10% (1 ml), la temperatura se elevó a 60°C y la reacción se realizó durante 1 h. El pH de la solución de reacción se ajustó de 2 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1N y se añadieron 10 ml de EA (acetato de etilo) para la extracción. La fase orgánica se concentró y purificó en una columna (PE/EA/AcOH = elución 1/1/0.01, en la que PE es éter de petróleo) para dar el Compuesto 1 del título (36 mg, rendimiento: 37.0%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.57 (s, 1H), 8.23 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.51 (dd, J = 8.8, 7.2 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.57-2.50 (m, 1H), 1.19-1.11 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1. ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.79, 8.87, 8.87, 59.31, 107.74, 110.05, 110.97, 117.64, 119.43, 122.52, 127.55, 128.64, 128.89, 128.89, 129.18, 129.67, 131.73, 131.79, 132.94, 135.10, 135.10, 141.20, 149.11, 150.73, 155.79, 159.68, 163.82, 167.81, 172.61. IR (cm^{-1}): estiramientos principales en 1591.94 (estiramiento C=O), 1412.27, 1556.70 (estiramiento C-C), 1364.37, 1389.89 (deformación C-H), 1218.41, 1250.94 (estiramiento C=N), 791.88 (estiramiento C-Cl).



Ejemplo 2

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)piridazina-3-carboxílico (Compuesto 2)

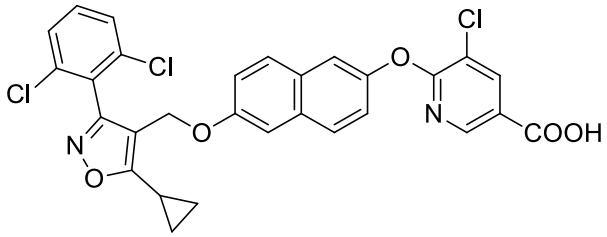


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 2 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 6-bromopiridazina-3-carboxilato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.52 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.52 (dd, *J* = 8.8, 7.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.59-2.50 (m, 1H), 1.21-1.11 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{28}H_{19}Cl_2N_3O_5$; $[M+H]^+$: 548.1, encontrado: 548.1.

Ejemplo 3

Preparación de ácido 5-cloro-6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 3)

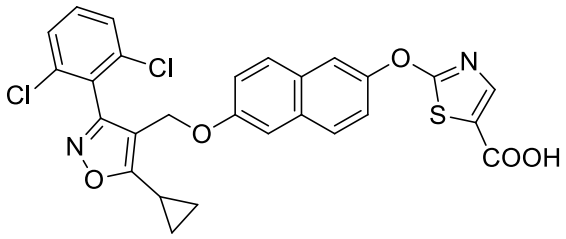


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 3 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 5,6-diclorónicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.60 (s, 1H), 7.73 (dd, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.51 (dd, *J* = 8.8, 7.2 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 1.26-1.12 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 581.0, encontrado: 581.0.

Ejemplo 4

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)tiazol-5-carboxílico (Compuesto 4)

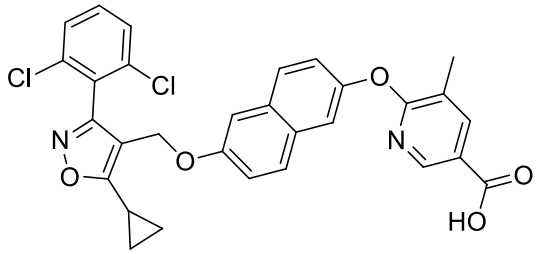


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 4 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2-bromotiazol-5-carboxilato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (s, 1H), 7.69 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz,2H), 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.53 (dd, J = 8.8, 7.2 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 1.25-1.12 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{27}H_{18}Cl_2N_2O_5S$; $[M+H]^+$: 553.0, encontrado: 553.0.

Ejemplo 5

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)-5-metilnicotínico (Compuesto 5)

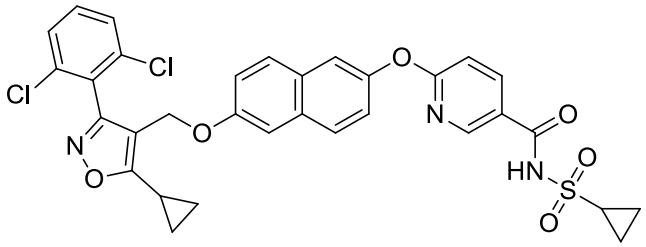


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 5 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 6-bromo-5-metilnicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.78 (s, 1H), 8.35 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.12-7.90 (m, 1H), 7.72-7.61 (m, 2H), 7.54 (s, 3H), 7.28 (m, 2H), 7.15-7.10 (m, 1H), 7.07 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.95 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 2.99-2.70 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.12-1.56 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.

Ejemplo 6

Preparación de 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)-N-(ciclopropilsulfonil)nicotinamida (Compuesto 6)

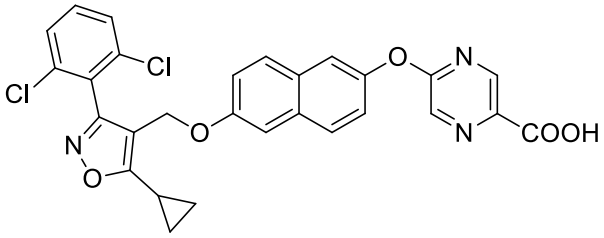


El compuesto 1 (70 mg) preparado en el Ejemplo 1 y ciclopropilsulfonamida (23 mg) se disolvieron en 2 ml de DCM (diclorometano), luego se añadió 40 mg de EDCI (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) y 26 mg de DMAP (dimetilaminopiridina). Una vez completada la reacción, se añadieron 10 ml de DCM y 10 ml de agua para la extracción. La fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad. El producto bruto se purifica en columna (PE/EA/AcOH=2/1/0.01) para dar el Compuesto 6 del título (8 mg, rendimiento: 9.6%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.30 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.59-7.62 (m, 3H), 7.49-7.53（m, 1H）, 7.35 (s, 1H), 7.26-7.29 (m, 1H), 7.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93-6.96 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.02-1.20 (m, 10H). LCMS (ESI): calculado para $C_{32}H_{25}Cl_2N_3O_6S$; $[M+H]^+$: 650.1, encontrado: 650.1.

Ejemplo 7

Preparación de ácido 5-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)pirazina-2-carboxílico (Compuesto 7)

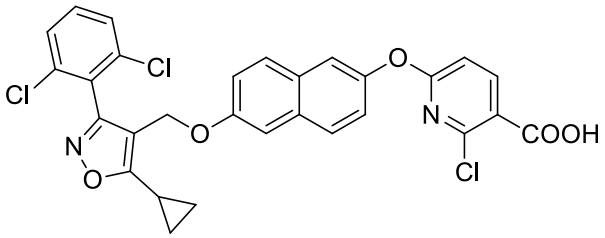


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 7 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 5-cloro-piridin-2-carboxilato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.58-7.63 (m, 4H), 7.49-7.53 (m, 1H), 7.34 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.11-1.22 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{28}H_{19}Cl_2N_3O_5$; $[M+H]^+$: 548.1, encontrado: 548.1.

Ejemplo 8

Preparación de ácido 2-cloro-6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 8)

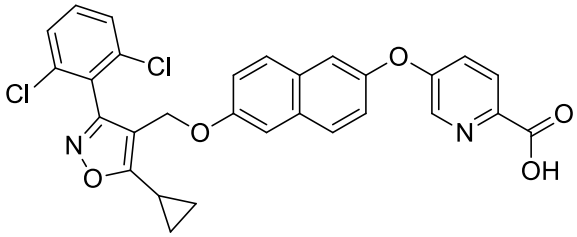


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 8 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2,6-diclorónicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.98 (br s, 1H), 7.70-7.79 (m, 2H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.47-7.55 (m, 2H), 7.18-7.33 (m, 2H), 6.90-6.95 (m, 2H), 4.98 (s, 2H), 1.11-1.22 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 581.0, encontrado: 581.0.

Ejemplo 9

Preparación de ácido 5-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)picolínico (Compuesto 9)



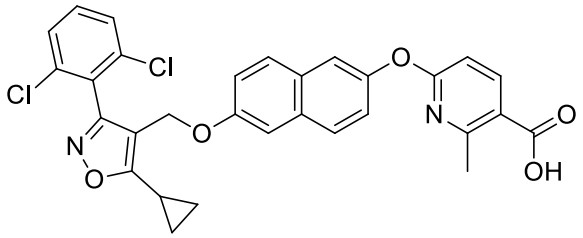
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 9 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 5-bromopicolinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.46 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.55 (dt, J = 28.7, 8.3 Hz, 4H), 7.43 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.24 (m, 2H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.23 – 1.02 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 10

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)

naftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico (Compuesto 10)

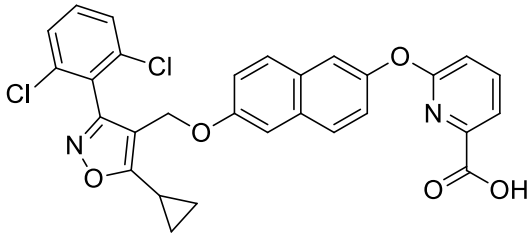


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 10 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 6-cloro-2-metilnicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.21 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.62 – 7.55 (m, 3H), 7.51 (dd, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.24 – 1.07 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.

Ejemplo 11

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)picolínico (Compuesto 11)

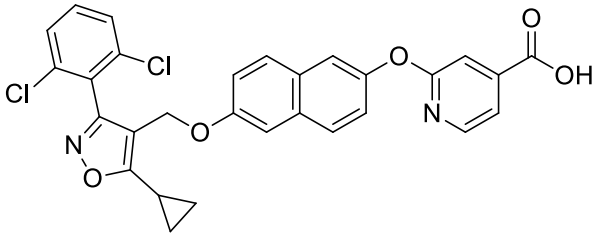


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 11 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2,6-dicloronicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.99 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.63 – 7.45 (m, 4H), 7.33 (s, 1H), 7.29 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.26 – 1.01 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 12

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)isonicotínico (Compuesto 12)

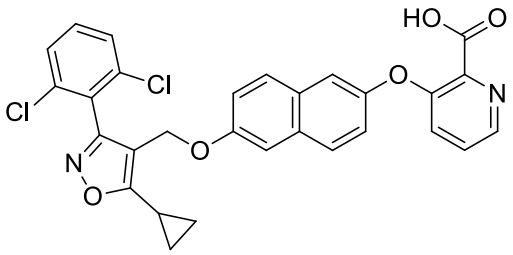


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 12 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2-fluoroisonicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.29 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7.7 Hz, 3H), 7.52 (m, 2H), 7.34 (s, 2H), 7.29 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.31-1.06 (m, 5H).LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 13

Preparación de ácido 3-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)picolínico (Compuesto 13)



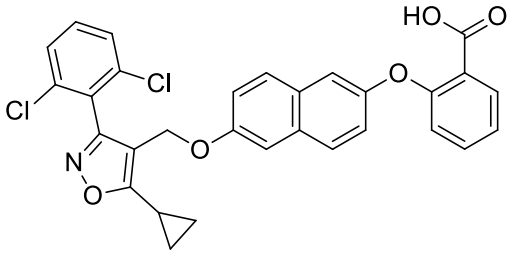
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 13 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 3-fluoropicolinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.39 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.54 – 7.43 (m, 3H), 7.30 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.26 – 7.16 (m, 1H), 6.95 – 6.85 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 1.24 – 1.06 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 14

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)

naftalen-2-il)oxi)benzoico (Compuesto 14)

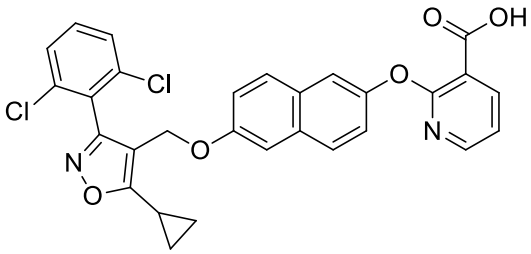


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 14 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2-fluorobenzoato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.82 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.66 – 7.57 (m, 3H), 7.55 – 7.45 (m, 2H), 7.26 (d, J = 10.6 Hz, 2H), 7.21 – 7.11 (m, 2H), 6.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 1.27 – 1.06 (m, 5H).LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2NO_5$; $[M+H]^+$: 546.1, encontrado: 546.1

Ejemplo 15

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 15)

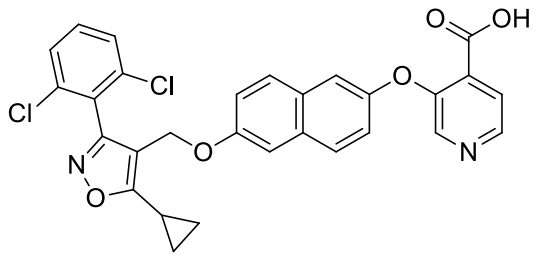


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto del título 15 sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 2-cloronicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.30 – 8.19 (m, 2H), 7.73 (dd, J = 19.2, 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.55 – 7.47 (m, 2H), 7.32 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 6.92 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.23 – 1.10 (m, 5H).LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 16

Preparación de ácido 3-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)isonicotínico (Compuesto 16)

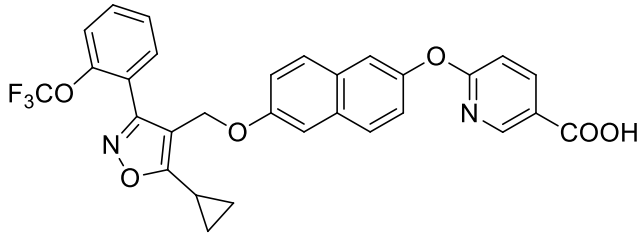


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 16 del título sustituyendo el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico por 3-fluoroisonicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.52 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.76 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.50 (dd, J = 9.0, 7.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.15 (m, 4H), 6.89 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 1.27 – 1.09 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 17

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2-(trifluorometoxi)fenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 17)

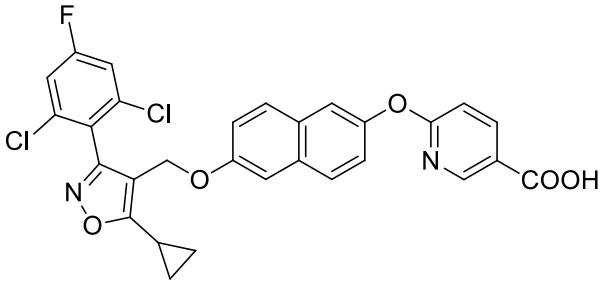


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 17 del título sustituyendo 1A-1 por 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2-(trifluorometoxi)fenil)isoxazol.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.62 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.75 (dt, J = 31.9, 15.9 Hz, 2H), 7.61 (s, 2H), 7.56-7.43 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 2.44-2.37 (m, 1H), 1.20-1.05 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}F_3N_2O_6$; $[M+H]^+$: 563.1, encontrado: 563.1.

Ejemplo 18

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-fluorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 18)

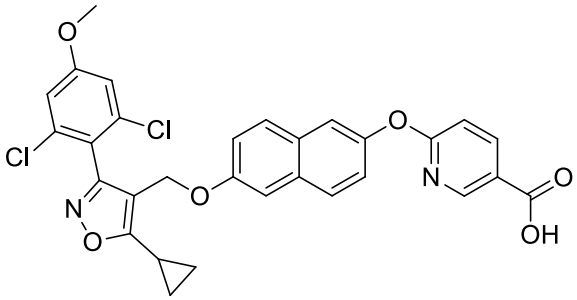


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 18 del título sustituyendo 1A-1 por 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-fluorofenil)isoxazol.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (s, 1H), 8.27 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.87-7.63 (m, 4H), 7.60 (s, 1H), 7.40-7.24 (m, 2H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.47-2.40 (m, 1H), 1.23-1.08 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

Ejemplo 19

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-metoxifenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 19)

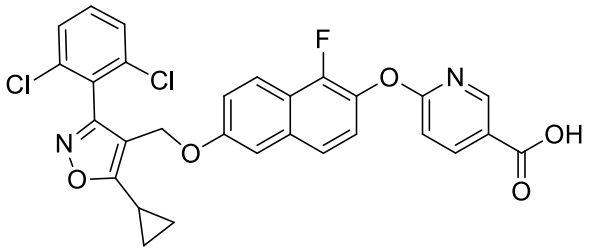


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 19 del título sustituyendo 1A-1 por 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-metoxifenil)isoxazol.

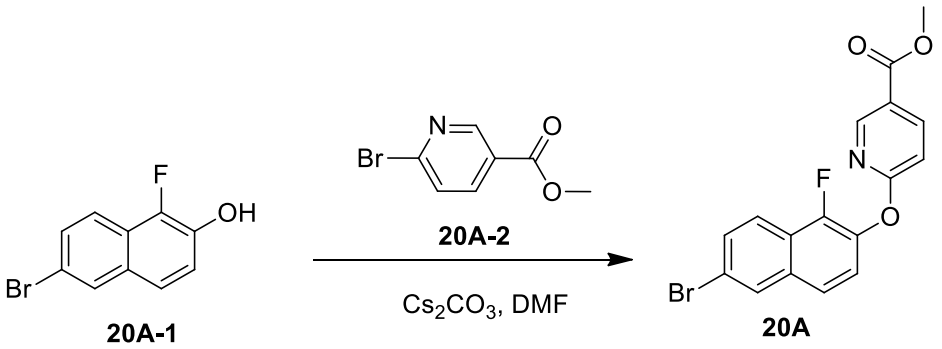
LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_6$; [M+H]+: 577.1, encontrado: 577.1.

Ejemplo 20

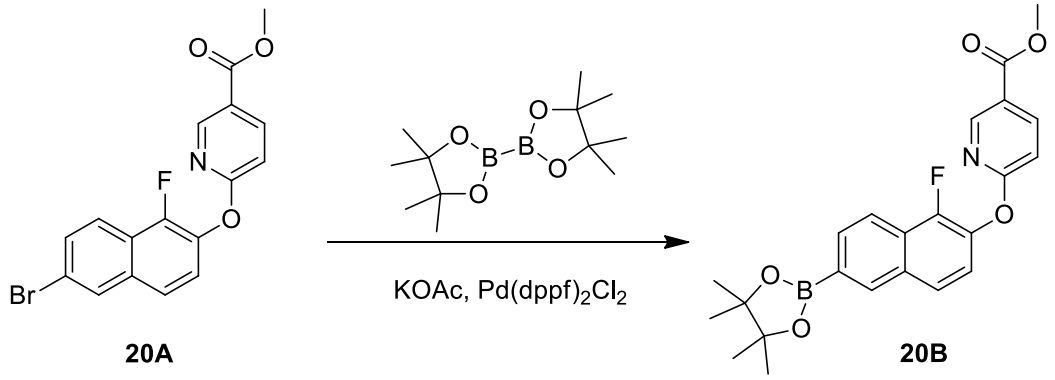
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -1-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 20)



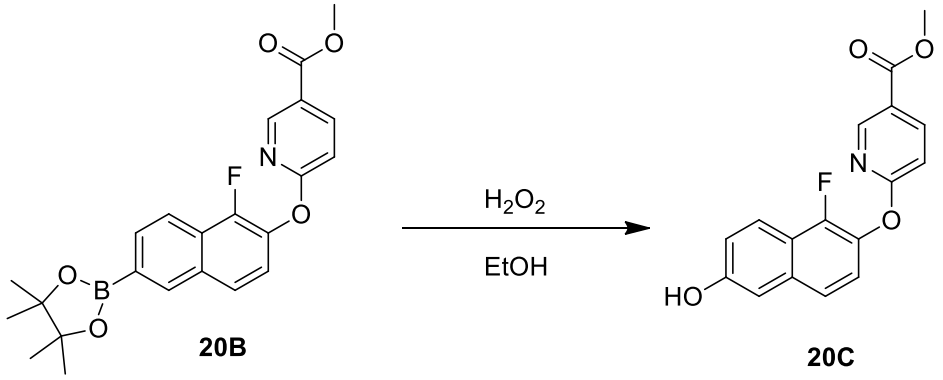
(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta C), Compuesto 20A-1 (1.0 g, 4.15 mmol, 1 eq.), Compuesto 20A-2 (0.90 g, 4.15 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (2.70 g, 8.30 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA (acetato de etilo) para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 20A, metil 6-((6-bromo-1-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotinato, 1.2 g, rendimiento: 77.0%. LCMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{11}BrFNO_3$; [M+H]+: 376.0, encontrado: 376.0.



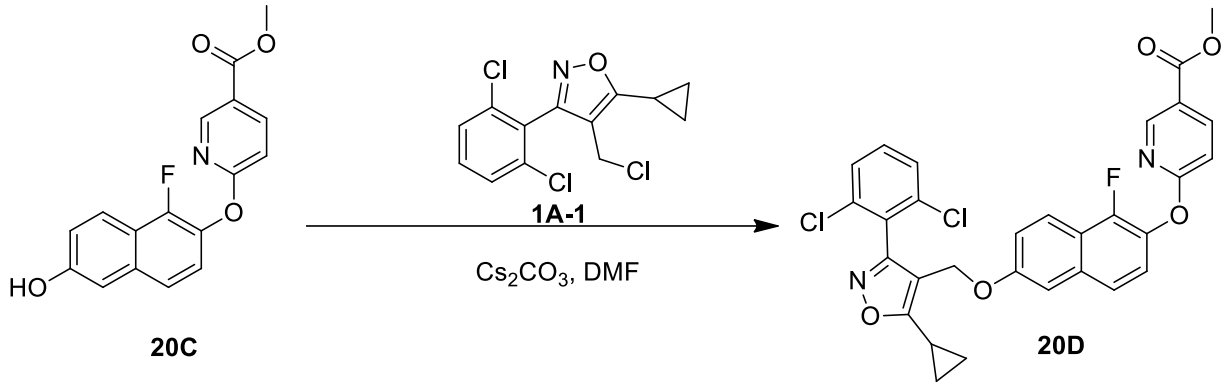
(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 20A (200 mg, 0.53 mmol, 1 eq) se disolvió en THF seco (2 ml), luego KOAc (104 mg, 1.06 mmol, 2 eq), $Pd(dppf)_2Cl_2$ (39 mg, 0.053 mmol, 0.1 eq) y bis(pinacolato)diboro (135 mg, 0.53 mmol, 1 eq) se añadieron bajo N_2 y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EtOAc para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo:EtOAc = 3:1) para dar el Compuesto 20B, metil 6-((1-fluoro-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborlan-2-il)naftalen-2-il)oxi)nicotinato, 151 mg, rendimiento: 67.1%. LCMS (ESI): calculado para $C_{23}H_{23}BFNO_5$; $[M+H]^+$: 424.2, encontrado: 424.2.



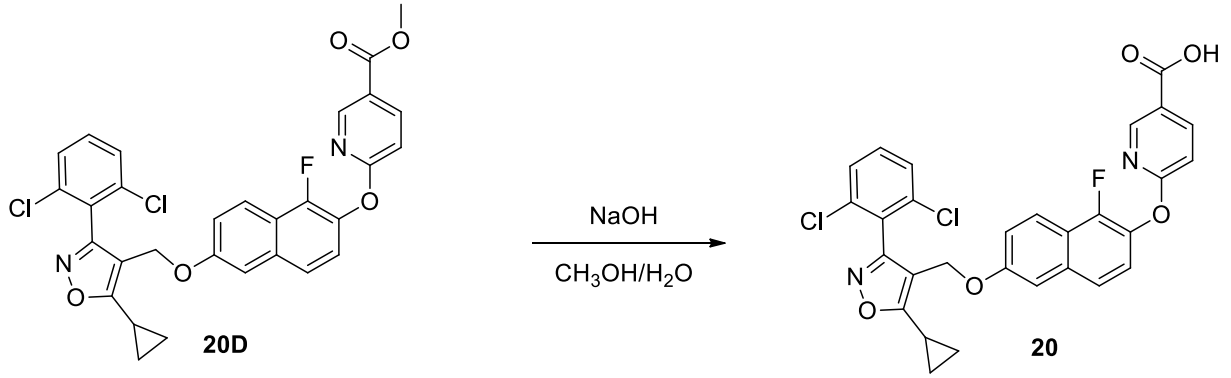
(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 20B (100 mg) se disolvió en EtOH (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de H_2O_2 al 30% (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se inactivó con Na_2SO_3 acuoso saturado y se extrajo con EA. La fase orgánica se concentró y purificó en una columna (PE/EA = 3/1) para dar el compuesto 20C (36 mg, rendimiento: 37.0%). LCMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{12}FNO_4$; $[M+H]^+$: 314.1, encontrado: 314.1.



(d) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, Compuesto 20C (0.2 g, 0.47 mmol, 1 eq.), 1A-1 (0.1 g, 0.47 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (0.306 g, 0.94 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml) para reaccionar. La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EtOAc para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 20D, 0.21 g, rendimiento: 80.0%. LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.



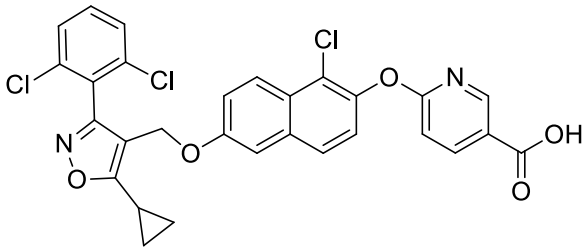
(e) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 20D (100 mg) se disolvió en THF seco (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de NaOH al 10% (1 ml) bajo N_2, y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora. El pH de la solución de reacción se ajustó a 3 a 4 agregando solución de HCl 1 N y se agregaron 10 ml de EA para la extracción. La fase orgánica se concentró y se purificó en una columna (PE/EA/AcOH = elución 1/1/0.01) para dar el compuesto 20 del título (36 mg, rendimiento: 37.0%).



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.30 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.64 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.17 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 1.22 – 1.06 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

Ejemplo 21

Preparación de ácido 6-((1-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 21)

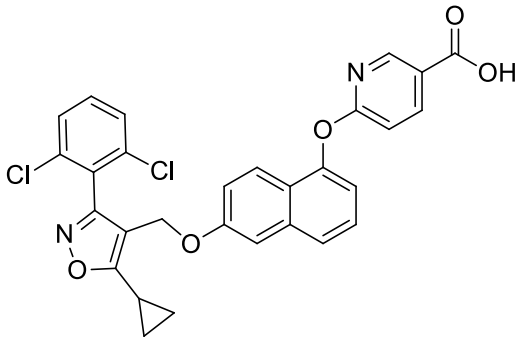


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20, se obtuvo el Compuesto 21 del título sustituyendo 20A-1 por 6-bromo-1-cloronaftaleno-2-ol.

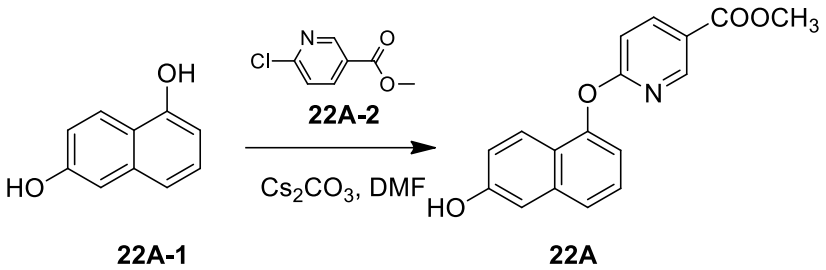
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (s, 1H), 8.27 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.87-7.63 (m, 4H), 7.60 (s, 1H), 7.40-7.24 (m, 2H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.47-2.40 (m, 1H), 1.23-1.08 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 581.0, encontrado: 581.0.

<u>Ejemplo 22</u>

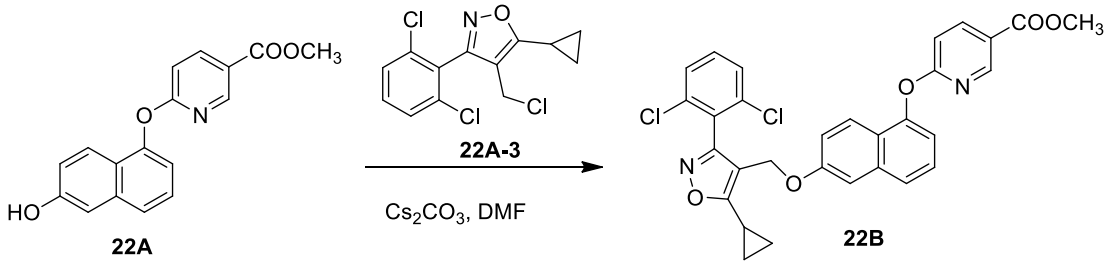
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico (Compuesto 22)



(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta D), Compuesto 22A-1 (2.0 g, 12.49 mmol, 1 eq.), Compuesto 22A-2 (1.71 g, 9.99 mmol, 0.8 eq.) y carbonato de cesio (6.09 g, 18.74 mmol, 1.5 eq.) se disolvieron en DMF (20 ml) para reaccionar. La reacción se realizó a 65°C durante 3 horas. Después de enfriar, se añadieron 30 ml de agua y 30 ml de EA (acetato de etilo) para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (petróleo:AcOEt = 5:1) para dar el Compuesto 22A, 6-((6-hidroxinaftalen-1-il)oxi)nicotinato de metilo, 1.1 g, rendimiento: 37.3%. LCMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{13}NO_4$; $[M+H]^+$: 296.1, encontrado: 296.1.

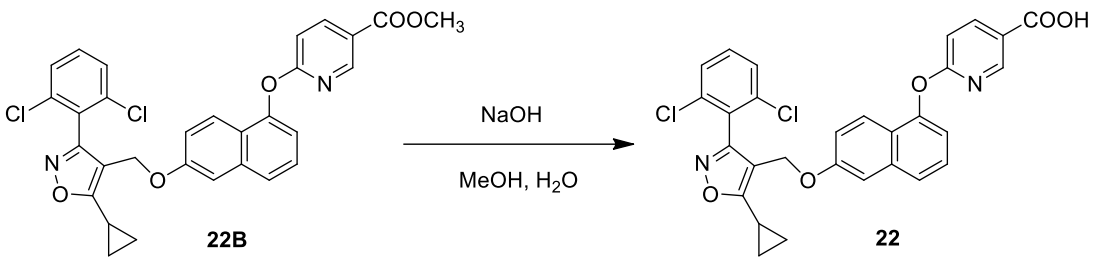


(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, Compuesto 22A (0.2 g, 0.68 mmol, 1 eq.), 22A-3 (0.2 g, 0.68 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (0.44 g, 1.36 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (5 ml) para reaccionar. La reacción se realizó a 40°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 22B, metil 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotinato, 0.31 g, rendimiento: 81.2%. LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.



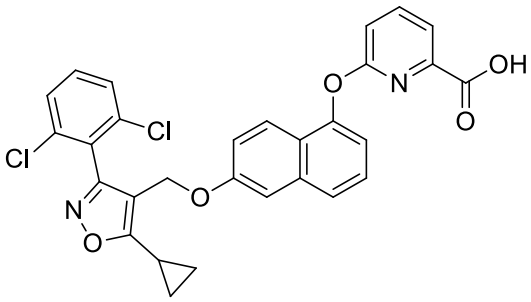
(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 22B (100 mg) se disolvió en metanol (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de NaOH al 10% (1 ml), la temperatura se elevó a 60°C y la reacción se realizó durante 0.5 hora. El pH de la solución de reacción se ajustó de 2 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1N y se añadieron 10 ml de EA para la extracción. La fase orgánica se concentró en una columna (PE/EA/AcOH = elución 1/1/0.01) para dar el compuesto 22 del título (42 mg, rendimiento: 43.2%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.11 (br s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.66 (d. J = 8.3 Hz, 1H), 7.56-7.61 (m, 3H), 7.45-7.53 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.15 (t, J = 9.6 Hz, 2H), 6.9 (d, J =9.2 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 1.09-1.28 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.



Ejemplo 23

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-1-il)oxi)picolínico (Compuesto 23)

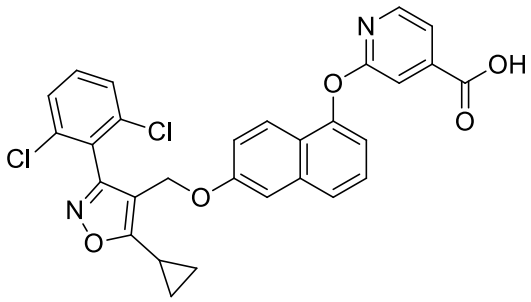


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 23 del título sustituyendo 22A-2 por 6-fluoropicolinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ7.99 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.60 – 7.55 (m, 2H), 7.52 – 7.44 (m, 2H), 7.40 – 7.37 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.94 – 6.90 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 1.23 – 1.09 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 24

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)isonicotínico (Compuesto 24)

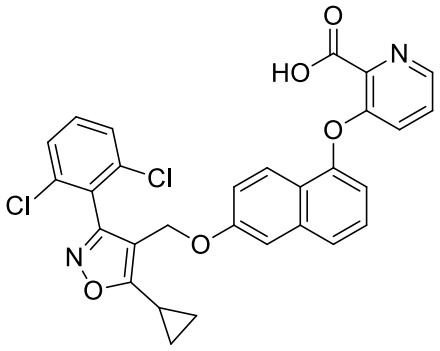


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 24 del título sustituyendo el 22A-2 por 2-fluoroisonicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.22 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.53 – 7.42 (m, 3H), 7.38 (s, 2H), 7.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.22 – 1.07 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 25

Preparación de ácido 3-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)picolínico (Compuesto 25)

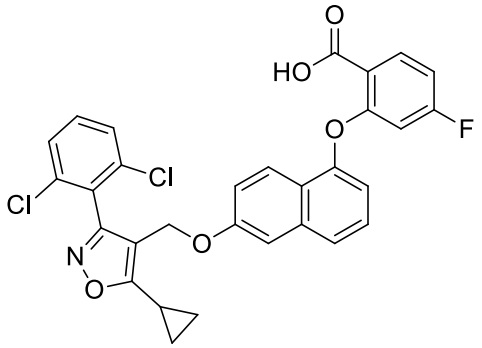


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 25 del título sustituyendo 22A-2 por 3-fluoropicolinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.41 – 8.37 (m, 1H), 7.90 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 3H), 7.53 – 7.47 (m, 2H), 7.43 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 6.99 – 6.94 (m, 1H), 6.77 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 1.21 – 1.10 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 26

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)-4-fluorobenzoico (Compuesto 26)

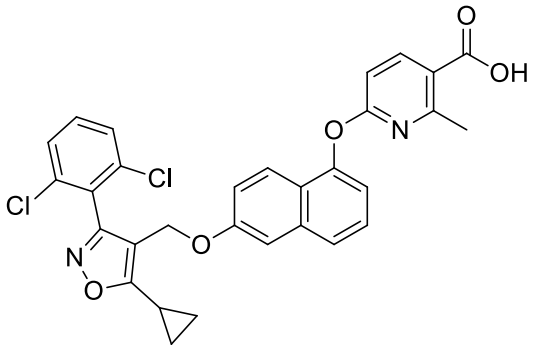


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 26 del título sustituyendo 22A-2 por 2,4-difluorobenzoato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.22 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.57 (s, 2H), 7.52 – 7.43 (m, 3H), 7.38 (s, 2H), 7.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.90 (s, 0H), 4.98 (s, 2H), 1.20 – 1.06 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{20}Cl_2FNO_5$; $[M+H]^+$: 564.1, encontrado: 564.1.

Ejemplo 27

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico (Compuesto 27)

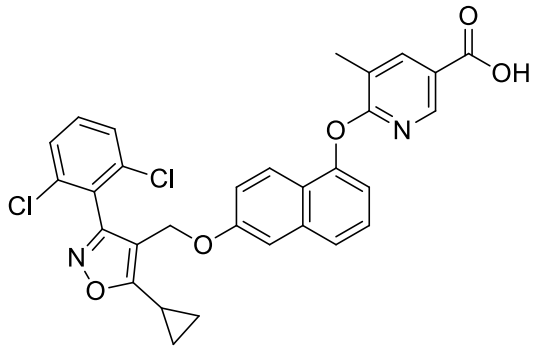


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 27 del título sustituyendo 22A-2 por 6-cloro-2-metilnicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 8.8, 4.5 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.52 – 7.43 (m, 1H), 7.38 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.23 – 1.00 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.

Ejemplo 28

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)-5-metilnicotínico (Compuesto 28)

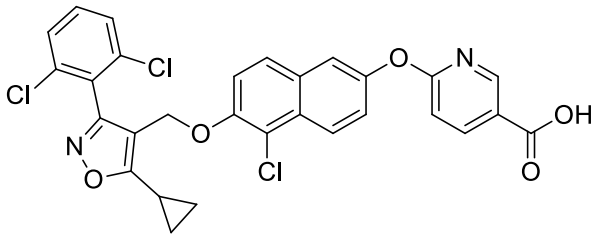


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22, se obtuvo el Compuesto 28 del título sustituyendo 22A-2 por 6-cloro-5-metilnicotinato de metilo.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.31 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 3H), 7.53 – 7.44 (m, 2H), 7.38 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.20 – 1.08 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.

Ejemplo 29

Preparación de ácido 6-((5-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)-isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 29)

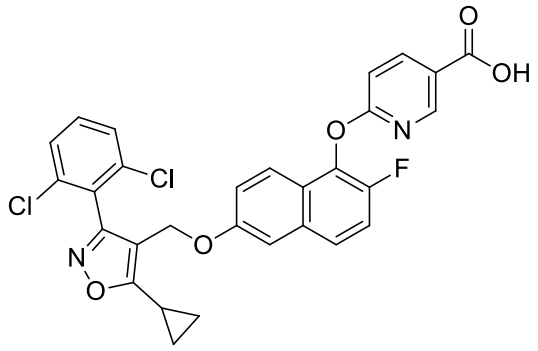


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32, se obtuvo el Compuesto 29 del título sustituyendo 32A-1 por 6-bromo-1-cloronaftaleno-2-ol.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.63 (s, 1H), 8.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.65 – 7.46 (m, 4H), 7.38 (s, 2H), 7.17 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 1.21 – 1.02 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 581.0, encontrado: 581.0.

Ejemplo 30

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)-2-fluoronaftalen-1-il)oxi)nicotínico (Compuesto 30)

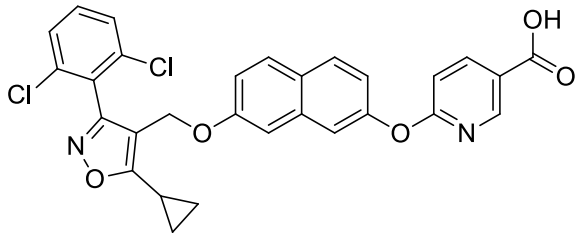


Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20, se obtuvo el Compuesto 30 del título sustituyendo 20A-1 por 6-bromo-2-fluoronaftalen-1-ol.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.59 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.56 (dd, J = 5.7, 3.3 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 2H), 7.25 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 1.28 – 1.08 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

Ejemplo 31

Preparación de ácido 6-((7-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 31)



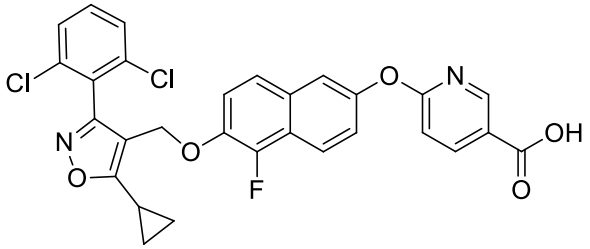
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se obtuvo el Compuesto 31 del título sustituyendo 1A-2 por naftaleno-2,7-diol.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.64 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.55 – 7.43 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.13 (t, J = 9.9 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.9 Hz, 1H),

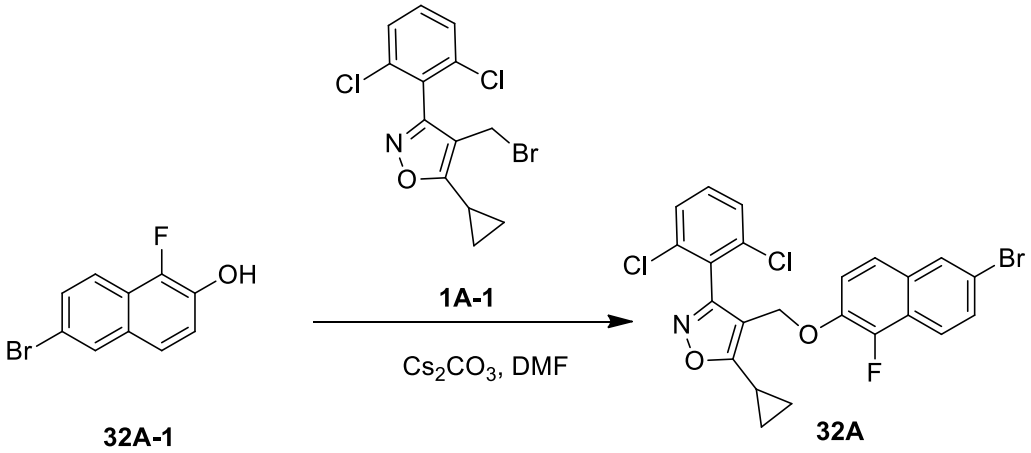
4.95 (s, 2H), 1.29 – 1.06 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 32

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -5-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico (Compuesto 32)

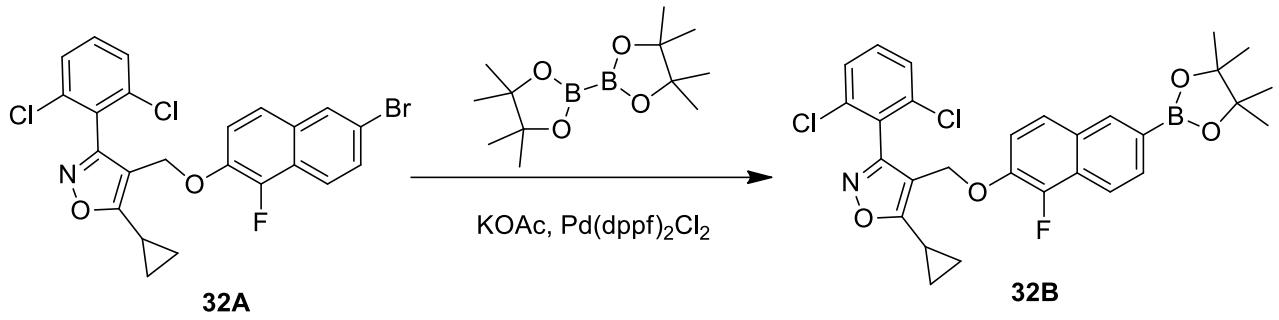


(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta B), Compuesto 32A-1 (1.0 g, 4.15 mmol, 1 eq.), Compuesto 1A-1 (1.44 g, 4.15 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (2.70 g, 8.30 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml) para reaccionar. La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA (acetato de etilo) para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 32A, 4-(((6-bromo-1-fluoronaftalen-2 -il)oxi)metil)-5-ciclopropil -3-(2,6-diclorofenil)isoxazol, 1.51 g, rendimiento: 71.9%. LCMS (ESI): calculado para $C_{23}H_{15}BrCl_2FNO_2$; $[M+H]^+$: 506.0, encontrado: 506.0.

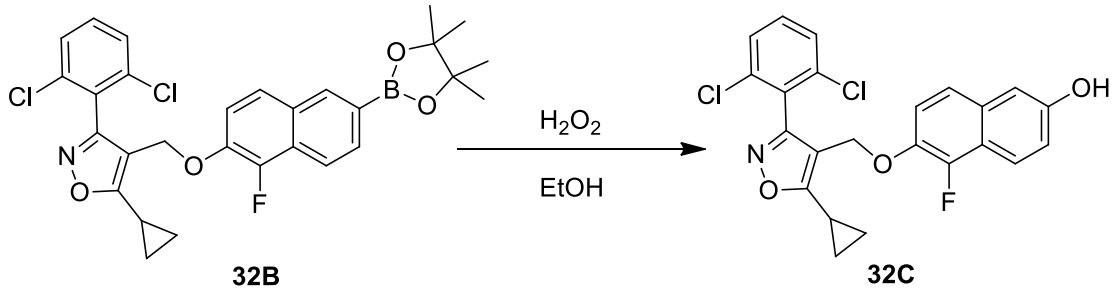


(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32A (200 mg, 0.39 mmol, 1 eq) se disolvió en THF seco (2 ml), luego KOAc (76 mg, 0.78 mmol, 2 eq), $Pd(dppf)_2Cl_2$ (28 mg, 0.039 mmol, 0.1 eq) y bis(pinacolato)diboro (100 mg, 0.39 mmol, 1 eq) se añadieron bajo N_2 y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de

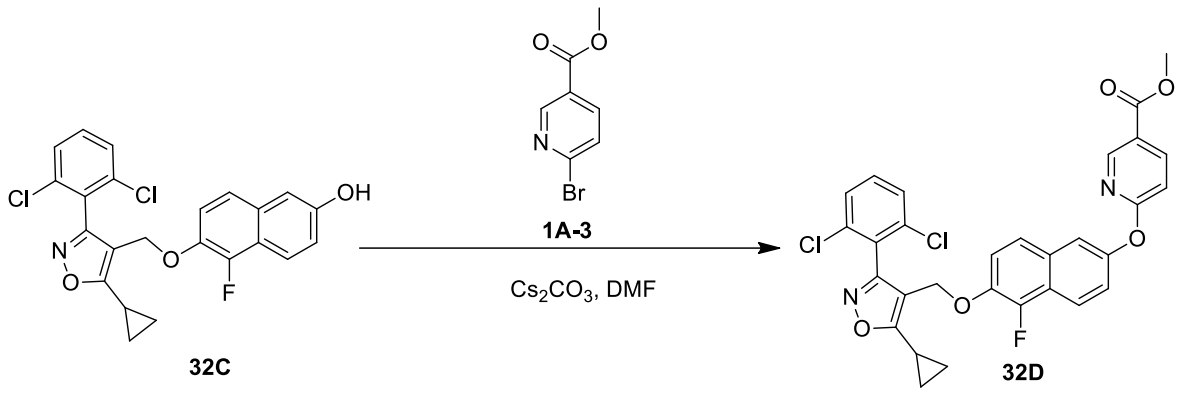
enfriar, se añadieron 10 ml de agua y 10 ml de EA para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (petróleo:AcOEt = 3:1) para dar el Compuesto 32B, 5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)-4-(((1-fluoro-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) naftalen-2-il)oxi)metil)isoxazol, 137 mg, rendimiento: 62.8%. LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{27}BCl_2FNO_4$; $[M+H]^+$: 554.1, encontrado: 554.1.



(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32B (100 mg) se disolvió en EtOH (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de H_2O_2 al 30% (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se inactivó con Na_2SO_3 acuoso saturado y se extrajo con EA. La fase orgánica se concentró y purificó en una columna (PE/EA = 3/1) para dar el compuesto 32C (61 mg, rendimiento: 76.2%). LCMS (ESI): calculado para $C_{23}H_{16}Cl_2FNO_3$; $[M+H]^+$: 444.1, encontrado: 444.1.

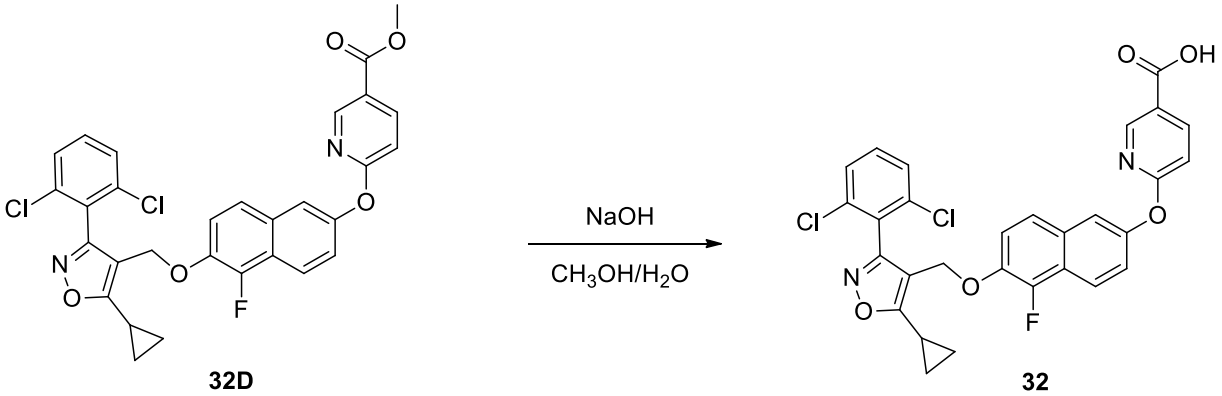


(d) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, Compuesto 32C (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), 1A-3 (24.3 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (71.5 mg, 0.22 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (1 ml) para reaccionar. La reacción se realizó a 65°C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadieron 5 ml de agua y 5 ml de EA para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 32D, 40 mg, rendimiento: 61.5%. LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.



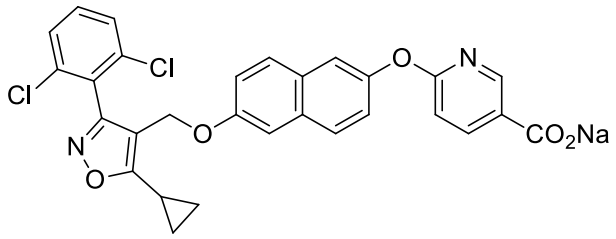
(e) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32D (30 mg) se disolvió en MeOH (1 ml), luego se añadió una solución acuosa de NaOH al 10 % (0.5 ml) bajo N_2 y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora. El pH de la solución de reacción se ajustó entre 3 y 4 agregando una solución de HCl 1 N y se agregaron 5 ml de EA para la extracción. La fase orgánica se concentró y se purificó en una columna (PE/EA/AcOH = elución 1/1/0.01) para dar el compuesto 32 del título (21 mg, rendimiento: 71.7%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.59 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.56 (dd, J = 5.7, 3.3 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H), 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.25 (d, J = 8.6 Hz, 1H),7.06 (dd, J = 5.7, 4.3 Hz, 1H) ,5.02 (s, 2H), 1.26 – 1.09 (m, 5H).LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

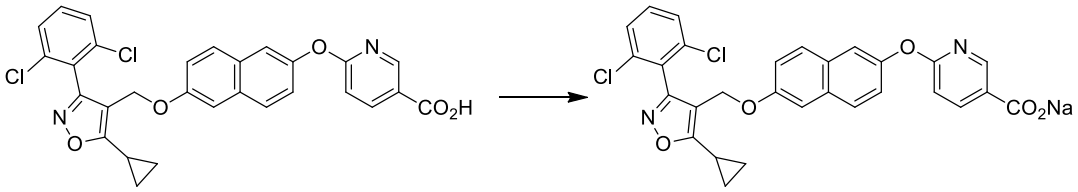


<u>Ejemplo 33</u>

Preparación de 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)nicotinato de sodio.

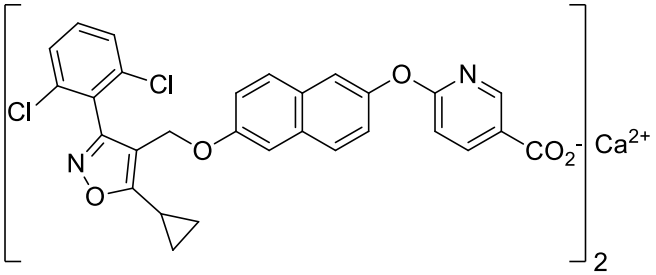


Una solución acuosa de NaOH (30%, 1.44 g, 1.2 eq) se añadió a una solución del Compuesto 1 (4.99 g, 9.12 mmol) en EtOH a temperatura ambiente. Después de calentar la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente. El sólido se recogió por filtración, se lavó con EtOH (10 ml) y se secó para dar un sólido gris (4.07 g, rendimiento: 78.3%).

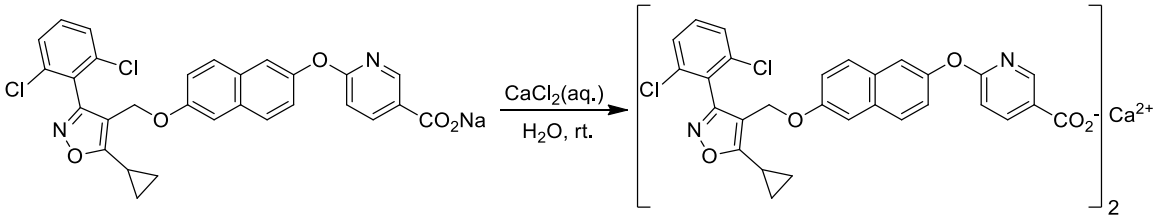


<u>Ejemplo 34</u>

Preparación de 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen -2-il)oxi)nicotinato de calcio.

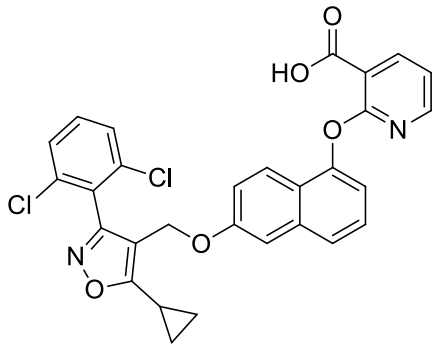


A una solución del Compuesto 35 (1.00 g, 1.76 mmol) en agua (10 ml) se añadió una solución de $CaCl_2$ (1.0 g, 20%) en agua. Se formaron precipitados blancos. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas, el sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (2.0 ml) para dar el producto como un sólido blanco (0.80 g, 76.7%).



Ejemplo 35

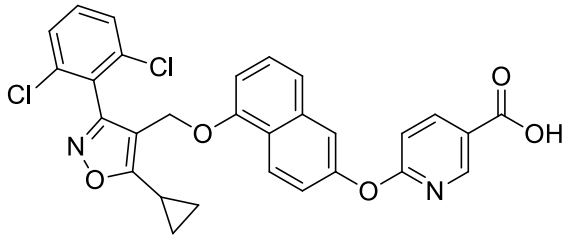
Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 35 del título se preparó según la Ruta D, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.31 (s, 1H), 8.29– 8.24 (m, 1H), 8.15–8.10 (m, 1H), 7.67 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.64–7.56 (m, 3H), 7.53–7.47 (m, 1H), 7.47–7.42 (m, 1H), 7.36 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.22–7.17 (m, 1H), 7.06 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.92–6.87 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.24–1.08 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 36

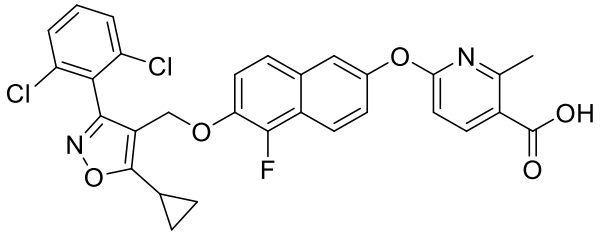
Preparación de ácido 6-((5-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-2-il)oxi)nicotínico



El compuesto 36 del título se preparó según la Ruta B, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.19 (s, 1H), 8.65 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.29 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.65–7.54 (m, 3H), 7.51–7.44 (m, 1H), 7.44–7.34 (m, 2H), 7.19 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 1.31–1.07 (m, 6H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, encontrado: 547.1.

Ejemplo 37

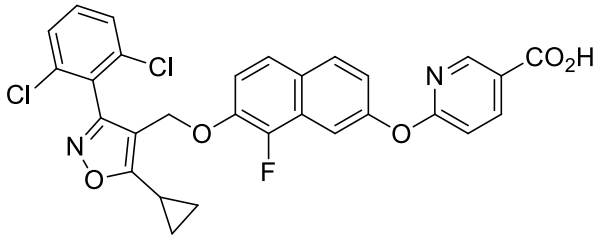
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -5-fluoronaftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 37 del título se preparó según la Ruta B, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.01 (s, 1H), 8.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.62 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.55–7.51 (m, 1H), 7.43-7.34 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.19 – 1.08 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.

Ejemplo 38

Preparación de ácido 6-((7-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -8-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico

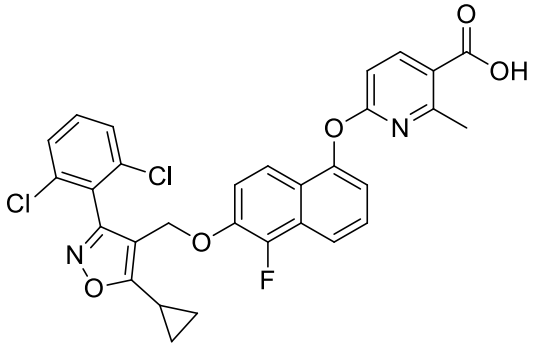


El compuesto 38 del título se preparó según la Ruta B, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.64 (s, 1H), 8.30 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.64–7.48 (m, 3H), 7.37 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 2.07–1.89 (m, 1H), 0.94–0.76 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

Ejemplo 39

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)

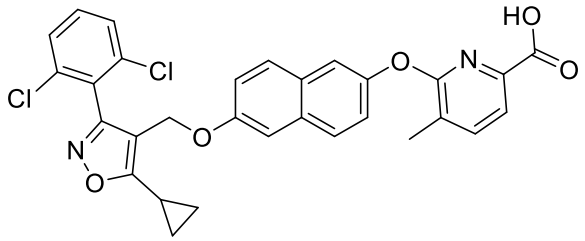
-5-fluoronaftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 39 del título se preparó según la Ruta B, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (dd, *J* = 7.9, 5.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.72–7.59 (m, 2H), 7.58–7.49 (m, 2H), 7.49–7.38 (m, 2H), 7.25–6.97 (m, 1H), 6.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 2.70-2.96 (M, 1H), 2.61 (s, 3H), 1.05–0.89 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.

Ejemplo 40

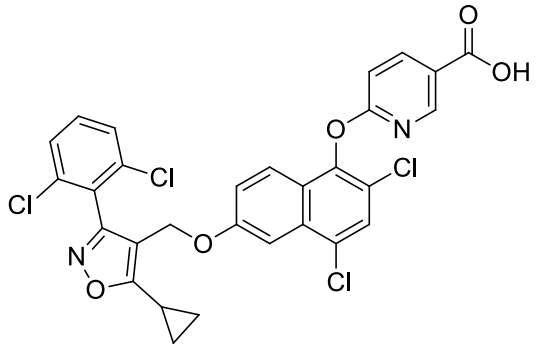
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)-5-metilpicolínico



El compuesto 40 del título se preparó según la Ruta D, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.65–7.55 (m, 2H), 7.54–7.49 (m, 2H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.22 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.03–6.93 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 2.95–2.58 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.01 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, encontrado: 561.1.

Ejemplo 41

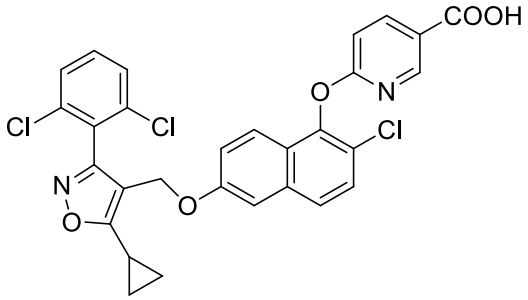
Preparación de ácido 6-((2,4-dicloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 41 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.17 (s, 1H), 8.66 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.84–7.78 (m, 2H), 7.70–7.65 (m, 2H), 7.64–7.56 (m, 2H), 7.38 (dd, J = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 2.45–2.41 (m, 1H), 1.22–1.10 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{18}Cl_4N_2O_5$; $[M+H]^+$: 615.0, encontrado: 615.0.

Ejemplo 42

Preparación de ácido 6-((2-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) naftalen-1-il)oxi)nicotínico

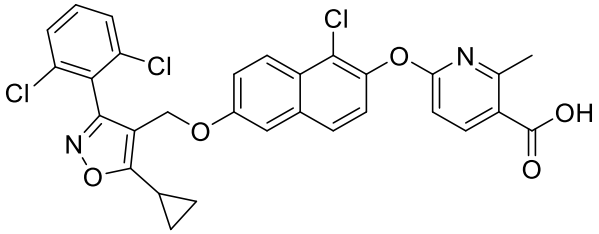


El compuesto 42 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.15 (s, 1H), 8.65 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.8 Hz, 3H), 7.66–7.59 (m, 1H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.87 (s, 2H), 2.46-2.40 (m, 1H), 1.30–1.09 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 581.0, encontrado: 581.0.

Ejemplo 43

Preparación de ácido 6-((1-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)

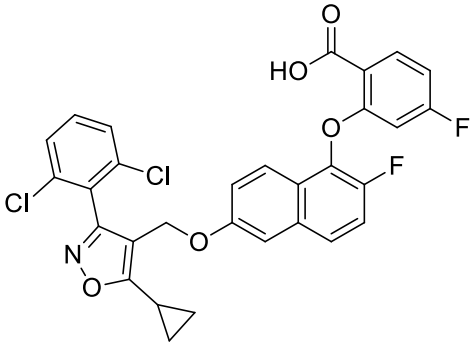
naftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 43 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.97 (s, 1H), 8.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.55–7.49 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.23–1.11 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 595.1, encontrado: 595.1.

Ejemplo 44

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-4-fluorobenzoico

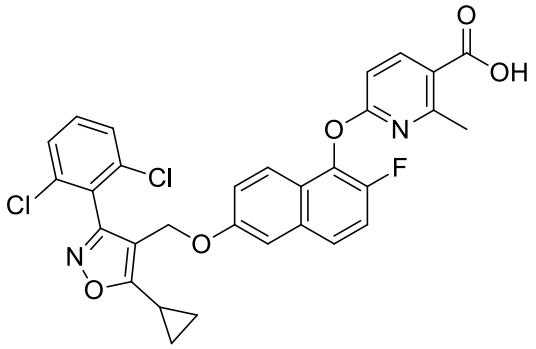


El compuesto 44 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.04 (s, 1H), 7.82 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.52–7.46 (m, 1H), 7.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.37–7.31 (m, 1H), 7.15-7.10 (m, 1H), 7.01 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 12.3, 2.4 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 1.28–1.05 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{19}Cl_2F_2NO_5$; $[M+H]^+$: 582.1, encontrado: 582.1.

Ejemplo 45

Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)

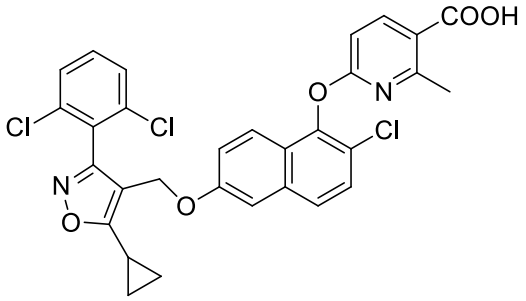
-2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 45 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.98 (s, 1H), 8.21 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.65 (dd, J = 9.3, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.51–7.44 (m, 1H), 7.37 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.35–7.29 (m, 1H), 7.16–7.11 (m, 1H), 6.98 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 1.22–1.09 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.

Ejemplo 46

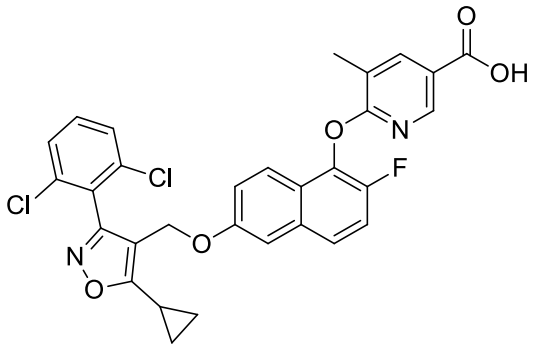
Preparación de ácido 6-((2-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il) metoxi)naftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 46 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.03 (s, 1H), 8.25 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.49–7.44 (m, 1H), 7.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.59-2.54 (m, 1H), 2.48 (s, 3H), 1.27–1.15 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_3N_2O_5$; $[M+H]^+$: 595.1, encontrado: 595.1.

Ejemplo 47

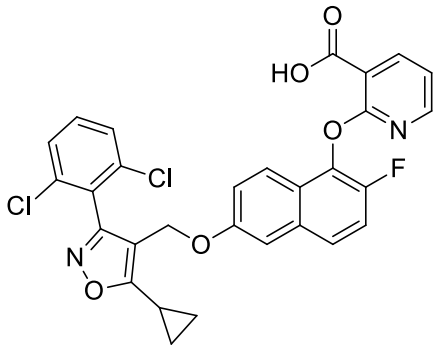
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-5-metilnicotínico



El compuesto 47 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.09 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.67–7.55 (m, 3H), 7.55–7.45 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.37–7.30 (m, 1H), 7.20–7.09 (m, 1H), 7.03–6.93 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.41–1.00 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{21}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 579.1, encontrado: 579.1.

Ejemplo 48

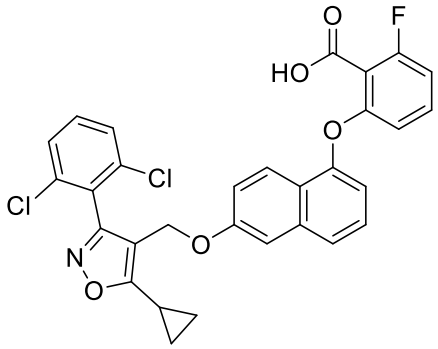
Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -2-fluoronaftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 48 del título se preparó según la Ruta C, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.29–8.27 (m, 1H), 8.22 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.09–8.06 (m, 1H), 7.53–7.47 (m, 3H), 7.46–7.42 (m, 1H), 7.30–7.25 (m, 2H), 7.08–7.05 (m, 1H), 6.96 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 2.79 (p, J = 6.4 Hz, 1H), 1.20–1.09 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{19}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 565.1, encontrado: 565.1.

Ejemplo 49

Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi) -2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-4-fluorobenzoico



El compuesto 49 del título se preparó según la Ruta D, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.62 (s, 1H), 7.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.63–7.55 (m, 3H), 7.54–7.49 (m, 1H), 7.42 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.40-7.32 (m, 2H), 7.06 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 1.23–1.09 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{20}Cl_2FN_2O_5$; $[M+H]^+$: 564.1, encontrado: 564.1.

Ejemplos de Biología

Compuesto de fórmula (I) en ensayo basado en células de VHB

Ensayo de PHH (hepatocito humano primario): línea celular y tratamiento compuesto

Las células PHH se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 1.32 x 10^5 células/pocillo. La fecha de siembra de las células PHH se definió como el día 0. Las células PHH se infectaron con VHB (tipo D) a 1600 GE/célula el día 1. El medio de cultivo que contenía compuestos se actualizó los días 2, 4, 6 y 8. El día 9, las células se trataron con CCK8 y el sobrenadante de cultivo y se recogieron las células.

Los compuestos FXR se probaron a 10000.0, 3000.0, 1000.0, 300.0, 100.0, 30.0 y 10.0 nM, y ETV se probó a 0.2000, 0.0667, 0.0222, 0.0074, 0.0025, 0.0008 y 0.0003 nM Se usó DMSO al 1% como control sin tratamiento. Los sobrenadantes del día 9 se recogieron y se analizaron en busca de ADN del VHB mediante qPCR, ARN del VHB mediante RT-qPCR, HBsAg y HBeA mediante ELISA.

Ensayo de ADN de VHB, ARN y antígeno

El ADN de los sobrenadantes del cultivo se aisló con el QIAamp 96 DNA Blood Kit según el manual y se cuantificó mediante qPCR. Se usaron 80 µl de la muestra de

sobrenadantes de cultivo para extraer el ADN. El volumen de elución fue de 120 µl. La mezcla de PCR (8 µl/pocillo) y las muestras (2 µl/pocillo) o los estándares de plásmido (2 µl/pocillo) se agregaron a la placa de reacción óptica de 384 pocillos y se realizaron con el siguiente programa: 95°C durante 10 minutos, luego ciclando a 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto por 40 ciclos.

El ARN de los sobrenadantes del cultivo se aisló con el kit de ARN viral PureLink™ Pro 96 de acuerdo con el manual. Se usaron 35 µl de la muestra de sobrenadantes de cultivo para extraer el ARN. El volumen de elución fue de 100 µl. El ARN del VHB se cuantificó mediante RT-qPCR.

Para el ensayo HepG2-NTCP, HBsAg y HBeAg en las muestras recolectadas el día 9 se midieron con el kit HBsAg ELISA (Autobio) y el kit HBeAg ELISA (Autobio) de acuerdo con el manual. Para el ensayo de PHH, se utilizó un aparato de quimioluminiscencia para medir el HBsAg de acuerdo con el manual del kit Antu HBsAg ELISA.

Después de recolectar los sobrenadantes de cultivo en el último día para cada placa, se agregó solución de trabajo CCK-8 (diluida con medio de cultivo fresco en una proporción de 1:9) a las placas de células. Las placas se incubaron a 37°C, una incubadora con CO2 al 5% durante aproximadamente 30 minutos. Las ODs se midieron con un lector de microplacas (OD450nm/OD630nm).

Curvas de respuesta a la dosis

% de inhibición del ADN del VHB = (Número de copias de ADN del 1-VHB de la muestra de prueba/promedio del número de copias de ADN del VHB del control con DMSO al 1%) × 100 %

% de inhibición del ARN del VHB = (Número de copias de ARN del 1-VHB de la muestra de prueba/promedio del número de copias de ARN del VHB del control con DMSO al 1%) × 100 %

% de inhibición de HBsAg = (cantidad de 1-HBsAg de la muestra/cantidad de HBsAg del control de DMSO al 1%) × 100 %

% de inhibición de HBeAg = (cantidad de 1-HBeAg de la muestra/cantidad de HBeAg del control de DMSO al 1%) × 100 %

% de viabilidad celular = valor de la muestra/un valor de DMSO al 1% × 100 %.

Los valores de EC50 y CC50 se determinaron mediante curvas de dosis-respuesta

ajustadas por GraphPad Prism utilizando “log (agonista) frente a respuesta - pendiente variable”.

Resultados

Como se muestra en las Figuras 1, 2 y 3, en el ensayo de PHH, los Compuestos 1, 22 y 27 tenían una inhibición dependiente de la dosis del HBsAg del ADN del VHB extracelular y del ARN del VHB. Como control, ETV mostró una inhibición significativa del ADN del VHB, pero ninguna inhibición significativa del HBsAg del VHB y el ARN del VHB.

Compuesto de fórmula (I) en modelo animal AAV/VHB

Modelo de ratón AAV/VHB y tratamiento compuesto

A ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (obtenidos de Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co., Ltd) se les administró rAAV8-1.3HBV (1 x 10^{11} v.g.) a través de la vena de la cola para establecer la infección el día -28. Después de 14 días, 21 días y el día -4, se extrajo sangre de la vena submandibular para determinar el nivel de ADN de VHB y HBsAg. En el día 4, se eligieron 40 ratones según el ADN del VHB y los resultados de HBsAg, y se asignaron aleatoriamente a 5 grupos. Después de que los ratones se infectaran con el virus VHB durante 28 días, el tratamiento se administró por vía oral una vez al día, durante 4 semanas. El grupo 1 recibió un vehículo (0.5% CMC-Na, 10 ml/kg), el grupo 2 recibió ETV de control positivo (0.1 mg/kg). Los grupos 3, 4 y 5 recibieron el Compuesto 33 a 10 mg/kg, 30 mg/kg y 60 mg/kg, respectivamente. Se extrajo sangre de la vena submandibular cada semana para determinar la concentración de ADN del VHB, ARN del VHB y HBsAg. El día 28, se extrajo sangre del corazón.

Análisis de muestras de sangre

Determinación del ADN del VHB por qPCR. El ADN en el plasma de los ratones se aisló con el kit de sangre de ADN QIAamp 96 de acuerdo con el manual y se cuantificó mediante qPCR, y se realizó con el siguiente programa: 95°C durante 10 minutos, luego ciclos a 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto durante 40 ciclos.

Determinación del ARN del VHB por qPCR. El ARN en el plasma de los ratones se aisló con el kit de ARN/ADN viral PureLink™ Pro 96 de acuerdo con el manual. Se usaron 20 µl del plasma para extraer el ARN.

Determinación de HBsAg por ELISA. El HBsAg en las muestras se midió con el kit HBsAg ELISA (Autobio) de acuerdo con el manual. Brevemente, después de que el plasma se diluyó 1200x en una placa recubierta, se incubó con la enzima conjugada (30°C, 60 minutos), y la placa se lavó 5 veces. Se añadió sustrato y se mantuvo alejado de la luz a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la intensidad con un lector de placas.

Análisis de los datos

Se calculó la desviación promedio ± estándar para cada grupo y se analizó con la prueba t de Student.

Resultados

Como se muestra en la Figura 4, después de administrar el Compuesto 33 a los ratones durante 28 días, el ADN del VHB en el grupo de dosis alta (60 mg/kg) fue significativamente menor que el del grupo del vehículo. En promedio, el log10[DNA copy/uL] del grupo de dosis alta fue 0.77-1.12 más bajo que el grupo del vehículo ($p<0.05$).

Como se muestra en la Figura 5, después de administrar el Compuesto 33 a los ratones durante 28 días, el ARN del VHB en el grupo de dosis alta (60 mg/kg) fue significativamente menor que el del grupo del vehículo. En promedio, el log10[copia de ARN/uL] del grupo de dosis alta fue 0.60-0.66 más bajo que el grupo del vehículo ($p<0.01$). El tratamiento con ETV no mostró ningún efecto significativo sobre el ARN del VHB en comparación con el grupo del vehículo.

Como se muestra en la Figura 6, después de administrar el Compuesto 33 a los ratones durante 28 días, el HBsAg en el grupo de dosis alta (60 mg/kg) se redujo en 0.38 log10 [UI/ml] en comparación con el grupo del vehículo. El tratamiento con ETV no mostró ningún efecto significativo sobre el HBsAg en comparación con el grupo del vehículo.