

COMPUESTOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE FXR Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con el campo farmacéutico asociado con enfermedades mediadas por FXR. Específicamente, la presente invención se relaciona con los compuestos para modular la actividad de FXR, el método de preparación y los usos farmacéuticos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El receptor farnesoide X (FXR) es un miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que se expresa principalmente en hígado, riñón e intestino. Funciona como un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR) para unirse a los elementos de respuesta en los promotores de los genes diana para regular la transcripción génica. El heterodímero FXR-RXR se une con mayor afinidad a un elemento de respuesta de repetición invertida 1 (IR-1), en el que los hexámeros de unión al receptor de consenso se separan por un nucleótido. El FXR es una parte del proceso interrelacionado, en el que el FXR es activado por el ácido biliar (el producto final del metabolismo del colesterol), que sirve para inhibir el catabolismo del colesterol.

El FXR es un regulador clave de la homeostasis del colesterol, la síntesis de triglicéridos y la lipogénesis (Crawley, Expert Opinion Ther. Patents (2010), 20(8): 1047-1057). Además de la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades relacionadas con la vitamina D, las enfermedades intestinales, los efectos secundarios inducidos por fármacos y la hepatitis, las indicaciones relacionadas con el FXR incluyen enfermedades hepatobiliares, hepatitis crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), colestasis, fibrosis hepática, cirrosis, hepatitis B, enfermedades metabólicas, enfermedades del metabolismo de los lípidos, enfermedades metabólicas de los carbohidratos, enfermedades metabólicas cardiovasculares, aterosclerosis, diabetes tipo II y complicaciones de la diabetes.

Se han desarrollado una variedad de compuestos capaces de actuar como moduladores del FXR (o agonistas de FXR), por ejemplo, los moduladores del FXR de molécula pequeña que se describen en WO200037077, WO2003/015771, WO2004/048349, WO2007/076260, WO2007/092751, WO2007/140174, WO2007/140183, así como también los que se describen en WO2008/051942, WO2008/157270, WO2009/005998, WO2009/012125, WO2009/149795, WO2008/025539, WO2008/025540, WO2012/087520, WO2012/087521, WO2012/087519 y WO2015/036442.

Aunque se han logrado algunos avances en el desarrollo de nuevos agonistas de FXR, queda un espacio significativo para la mejora de los agonistas de FXR.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es el objetivo de la presente invención proporcionar nuevos compuestos para su uso como agonistas de FXR con excelente fisicoquímica, *in vitro* y/o *in vivo* propiedades ADME (adsorción, distribución, metabolismo y excreción) y excelente farmacocinética, y efectos secundarios reducidos, el método de preparación y usos farmacéuticos del mismo.

DEFINICIONES

Con el propósito de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos usados en singular incluirán además el plural, y viceversa.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo C₁₋₆" indica 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 la presente descripción, "alcoxi C₁₋₆" se refiere a "alquil-O-C₁₋₆", y es particularmente metoxi, etoxi, isopropiloxi o terc-butoxi.

Como se usa en la presente descripción, el término "cicloalquilo C₃₋₆" 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 C₃₋₆ puede estar opcionalmente sustituido por alquilo C₁₋₆ y/o halógeno. Como se usa en la presente descripción, el término "alquilocicloalquilo C₄₋₇" se refiere a una combinación de alquilo y un grupo cicloalquilo de manera que el número total de átomos de carbono es de 4 a 7. Por ejemplo, alquilocicloalquilo C₄ incluye metilenciclopropilo.

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

Como se usa en la presente descripción, el término "heteroarilo de 5-10 miembros" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico, bicíclico o tricíclico de 5-10 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 la presente descripción, puede abarcar heteroarilos monovalentes o divalentes.

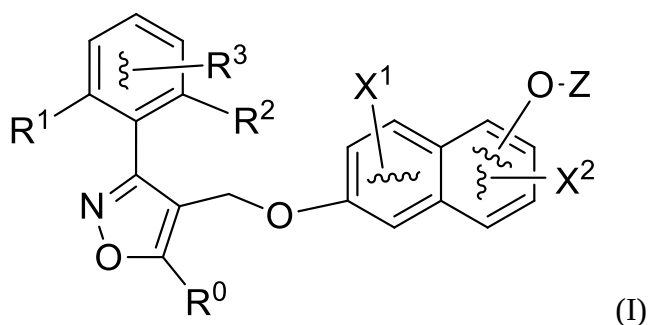
Como se usa en la presente descripción, el término "halógeno" o "halo" se refiere a uno o más de flúor, cloro, bromo y yodo, y más particularmente, flúor o cloro.

Como se usa en la presente descripción, el término "haloalquilo C₁₋₆" se refiere a un radical alquilo que está sustituido por uno o más radicales halo, y es particularmente fluoroalquilo C₁₋₆ o cloroalquilo C₁₋₆, tal como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "materiales auxiliares farmacéuticamente aceptables" puede incluir algunos o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, y similares y sus combinaciones, como conocería un experto en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas o terapéuticas.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad del compuesto de fórmula (I) que es suficiente para lograr los efectos terapéuticos indicados. En consecuencia, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) usada para el tratamiento de una afección mediada por FXR será una cantidad suficiente para el tratamiento de la afección mediada por FXR.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto para modular la actividad de FXR que tiene una estructura de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un éster o un estereoisómero del mismo:



en donde:

R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C₁₋₆ no sustituido o sustituido con halógeno y alcoxi C₁₋₆ no sustituido o sustituido con halógeno, siempre y cuando al

menos uno de R^1 , R^2 y R^3 no es hidrógeno, R^0 se selecciona de alquilo C_{1-6} no sustituido o sustituido con halógeno, cicloalquilo C_{3-6} , alquilcicloalquilo C_{4-7} ;

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

el resto $-O-Z$ (residuo Z unido al anillo de naftaleno a través de un átomo de oxígeno) se une al anillo de naftaleno, en donde Z es un residuo que se selecciona de arilo de 5-10 miembros o heteroarilo de 5-10 miembros que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos que se seleccionan de N, O y S, en donde el arilo de 5-10 miembros o el heteroarilo de 5-10 miembros está sustituido por R^4 y está opcionalmente sustituido además por R^5 ;

en 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 por 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} , tal como H, Cl, F y $-O-CF_3$. En una modalidad de la invención, tanto R^1 y R^2 son Cl y R^3 es H. En otra modalidad de la invención, tanto R^1 y R^2 son Cl y R^3 es F. En aún otra modalidad de la invención, tanto R^1 y R^2 son Cl y R^3 es $-O-CH_3$. Aun en otra modalidad de la invención, R^1 es $-O-CF_3$, y R^2 y R^3 ambos son H. Aun en otra modalidad 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 5-10 miembros que tiene uno o más heteroátomos que se seleccionan de N, O y S. En una modalidad preferida de la presente invención, Z es un heteroarilo de 5-6 miembros que tiene uno o más heteroátomos que se seleccionan de N, O y S. Aun en otra modalidad de la presente invención, Z es un piridilo sustituido por R^4 y opcionalmente R^5 .

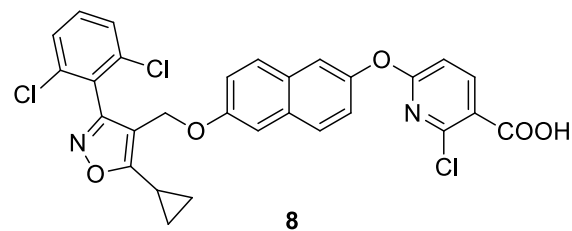
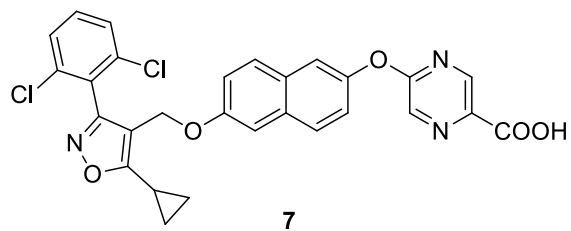
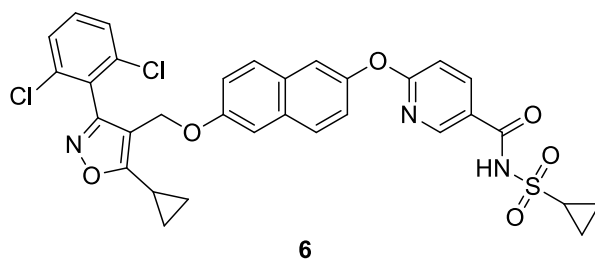
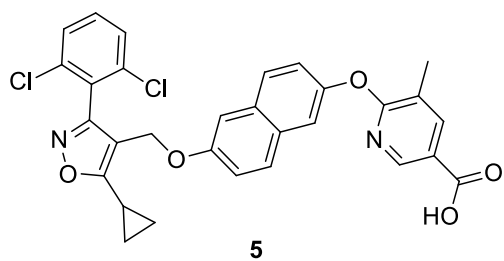
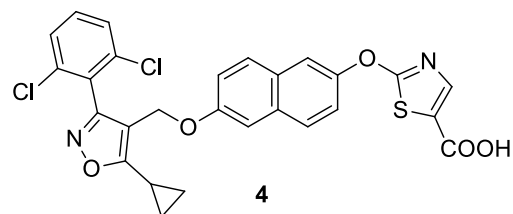
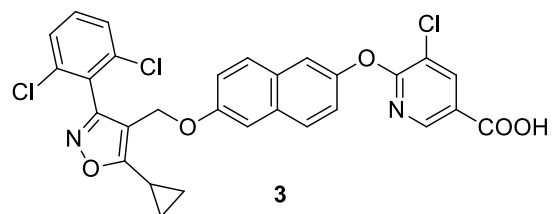
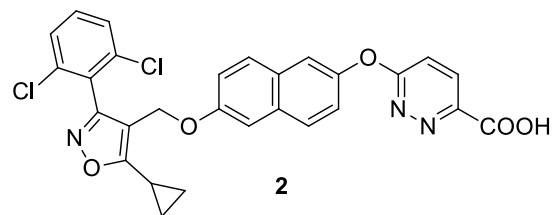
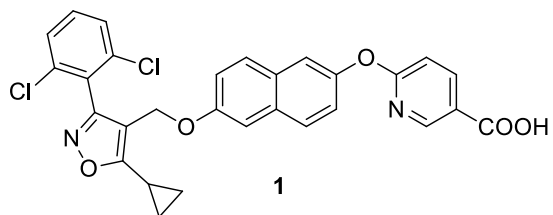
En modalidades preferidas de la presente invención, R^4 se selecciona de $-COOH$, $-CH_2COOH$, $-CONHSO_2$ -alquilo C_{1-6} y $-CONHSO_2$ -cicloalquilo C_{3-6} . En una modalidad más preferida de la presente invención, R^4 es $-COOH$ o $-CH_2COOH$. En una modalidad más preferida de la presente invención,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

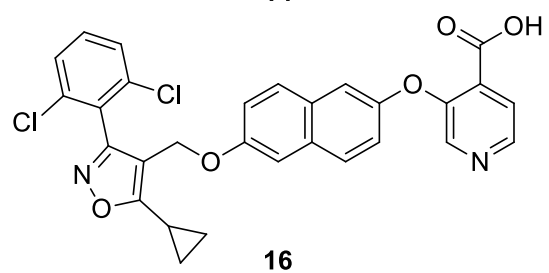
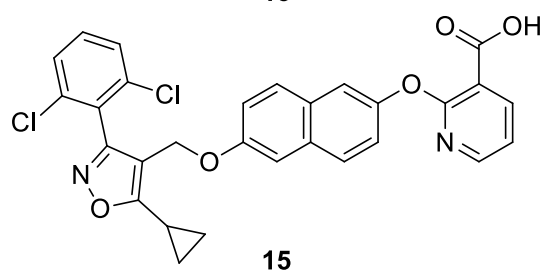
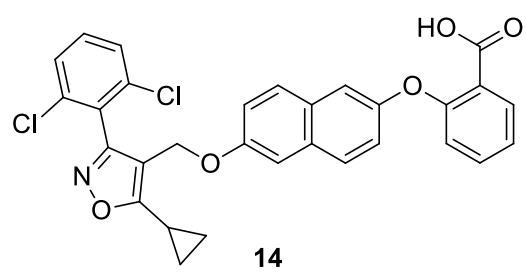
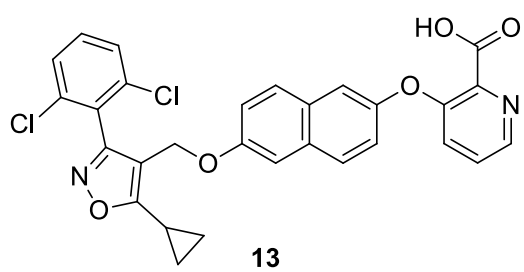
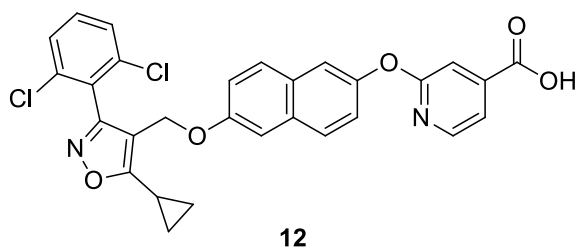
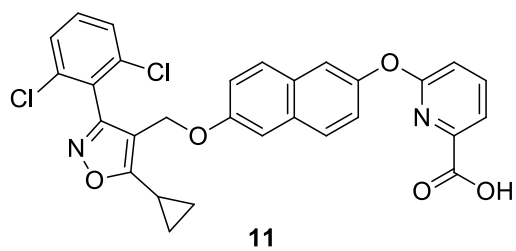
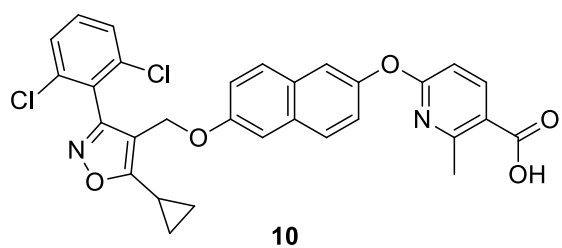
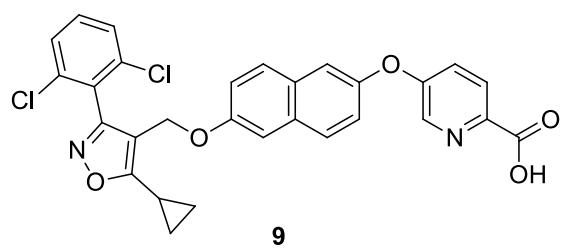
Preferentemente, R^5 es uno que se selecciona de H, alquilo C_{1-3} y halógeno.

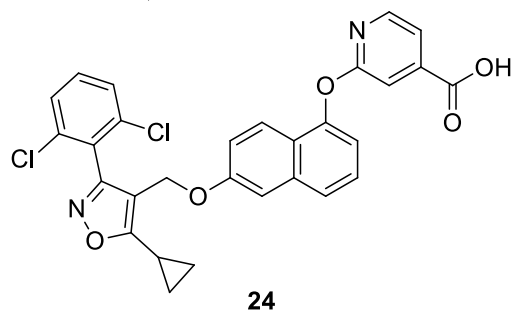
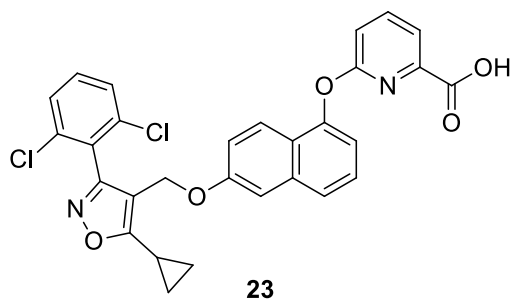
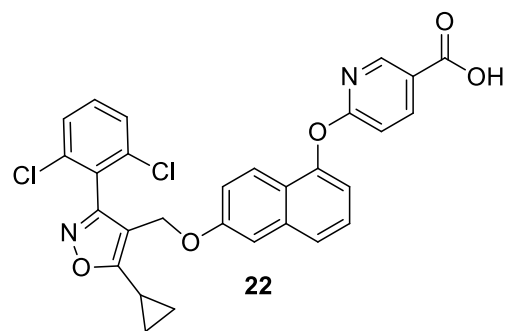
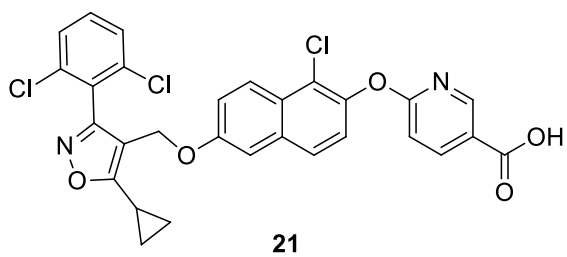
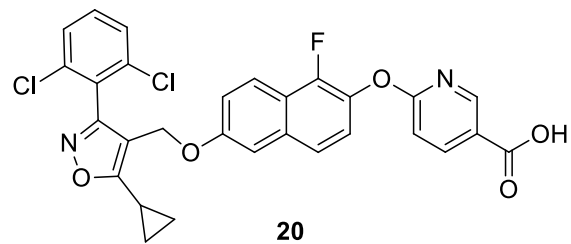
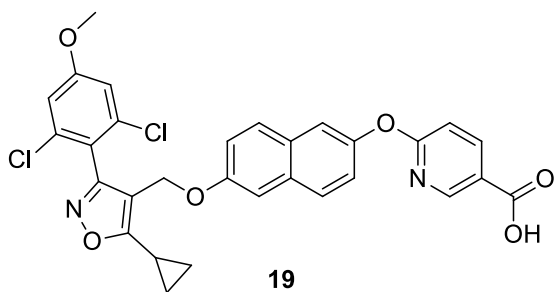
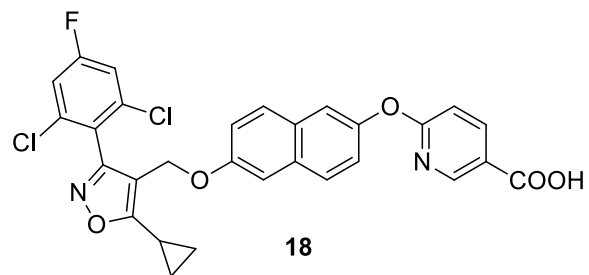
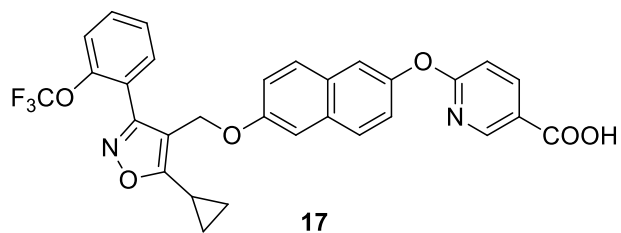
En una modalidad preferida de la presente invención, Z es piridilo; R^4 es $-COOH$; y R^5 es H o halógeno.

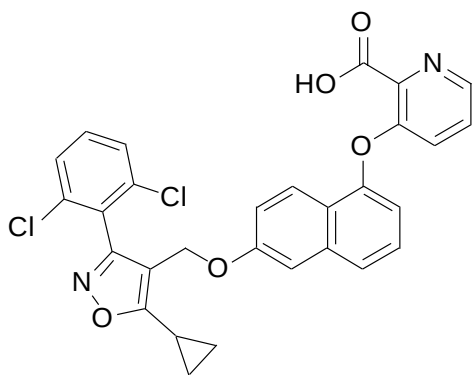
Preferentemente, el halógeno en los sustituyentes antes mencionados es flúor o cloro.

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

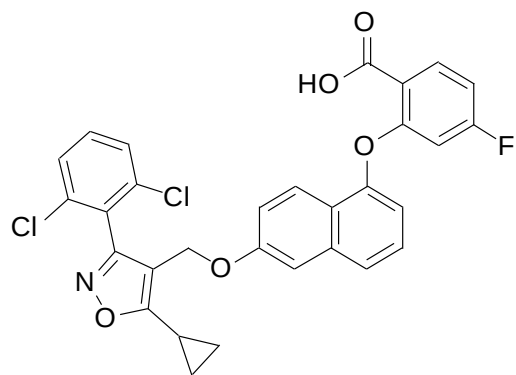




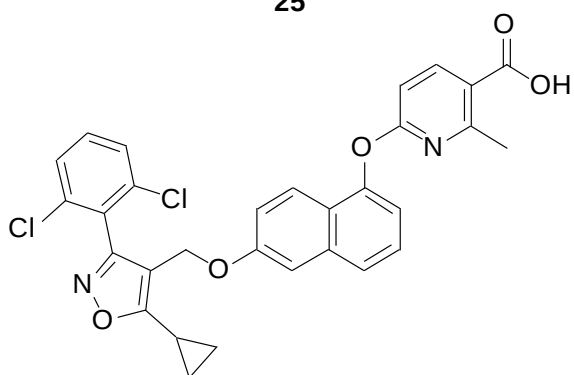




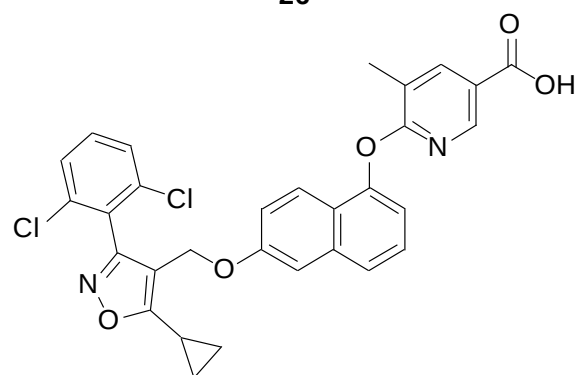
25



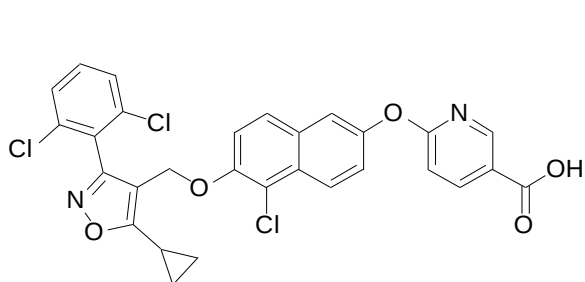
26



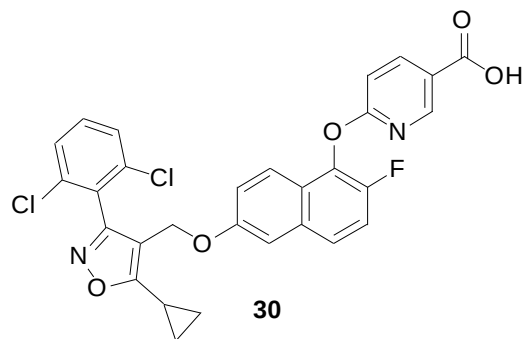
27



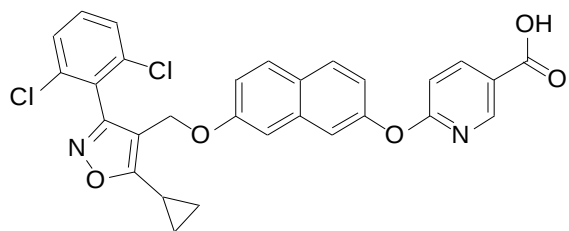
28



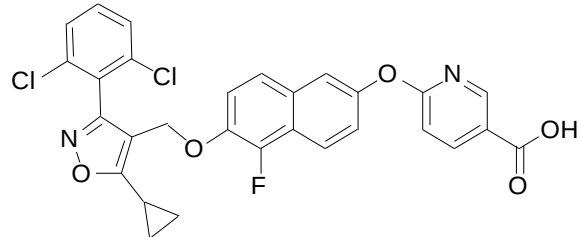
29



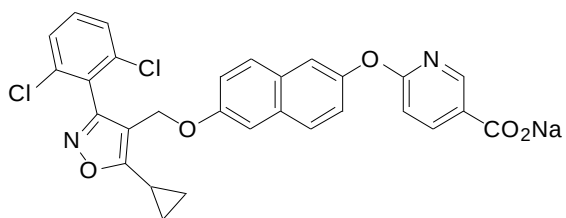
30



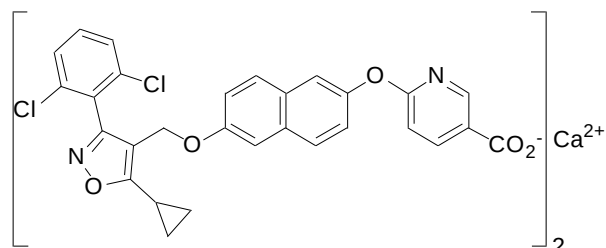
31



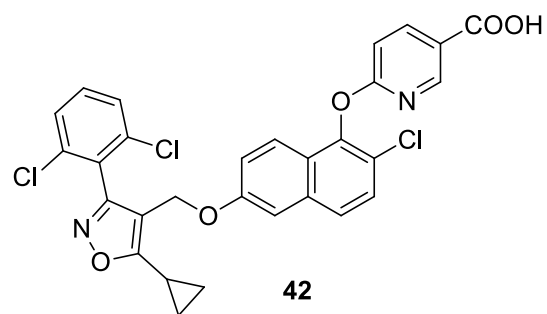
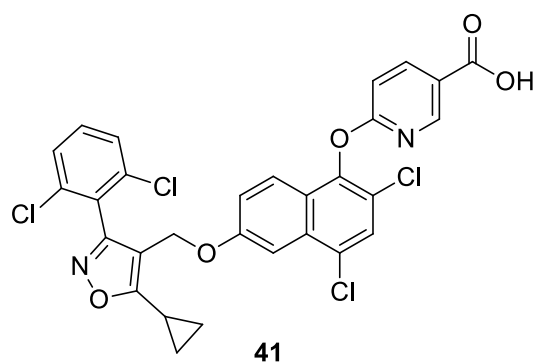
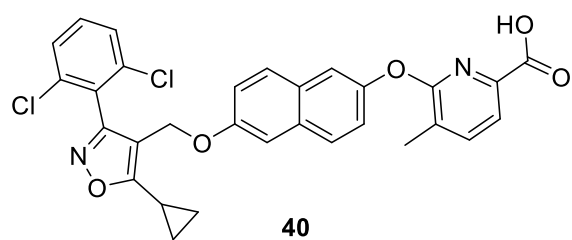
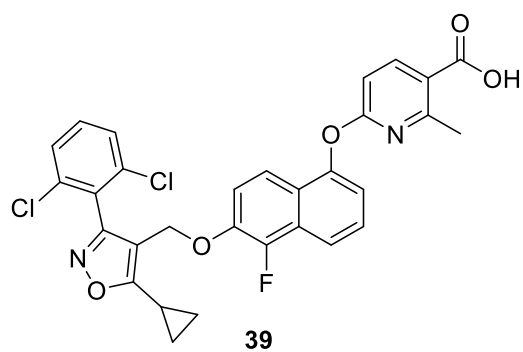
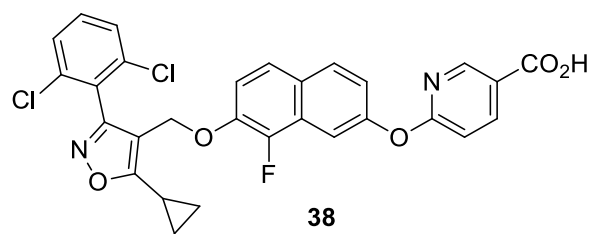
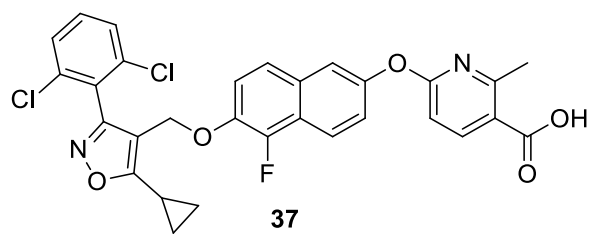
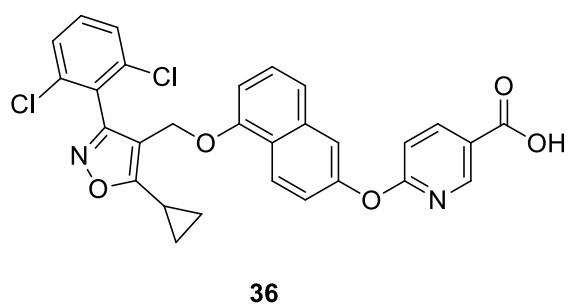
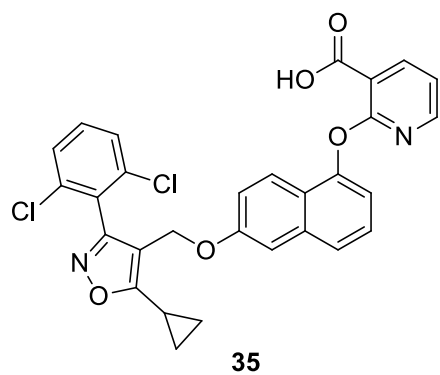
32

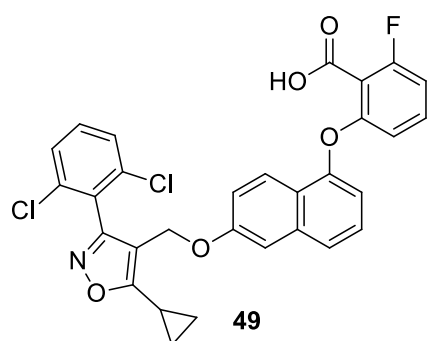
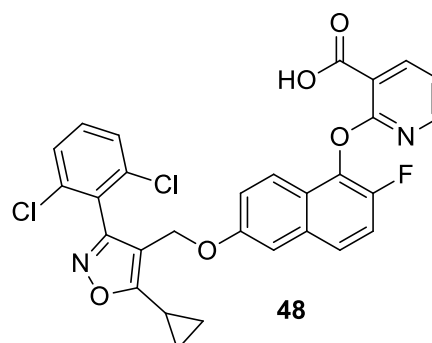
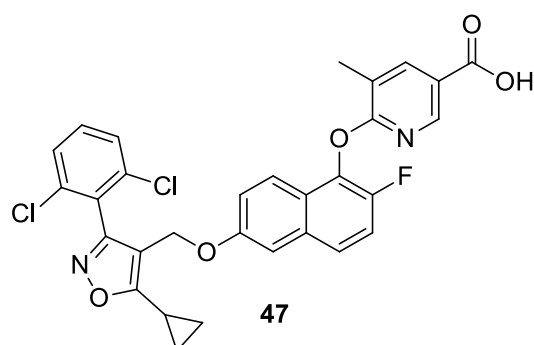
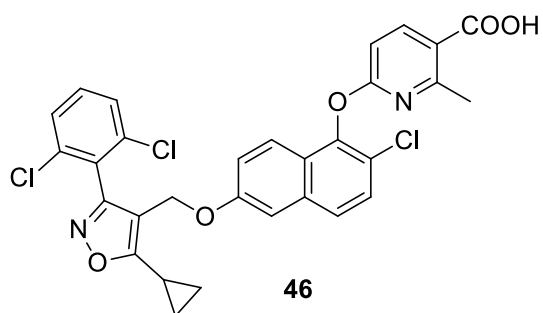
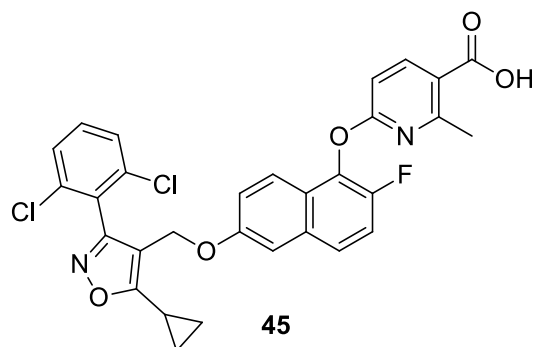
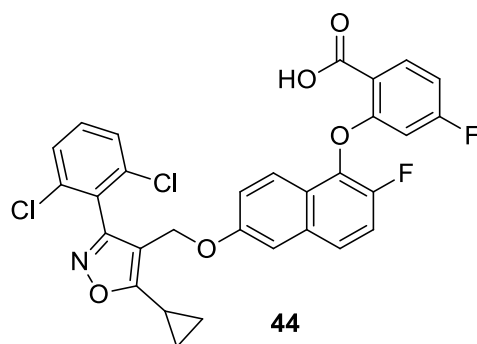
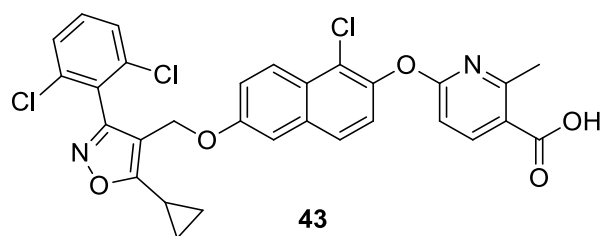


33



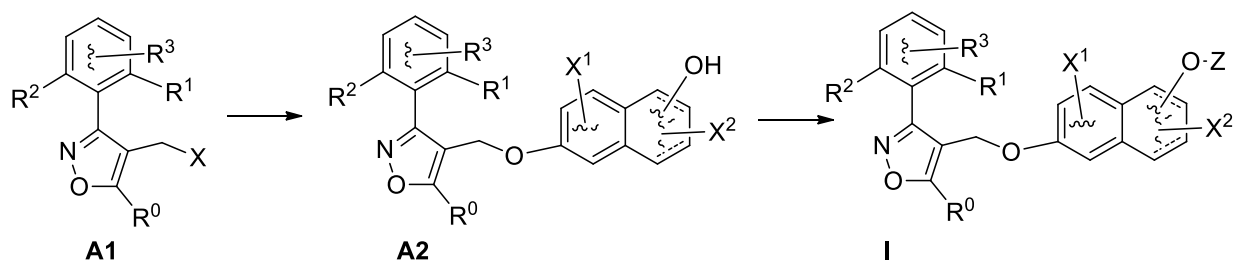
34



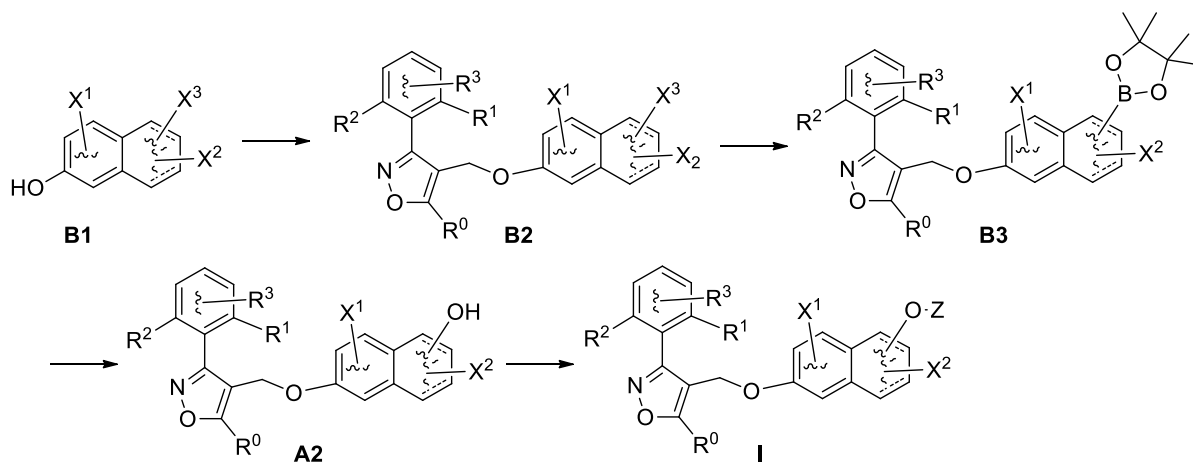


En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un éster o un estereoisómero del mismo, el método comprende cuatro rutas generales (Ruta A, Ruta B, Ruta C y Ruta D):

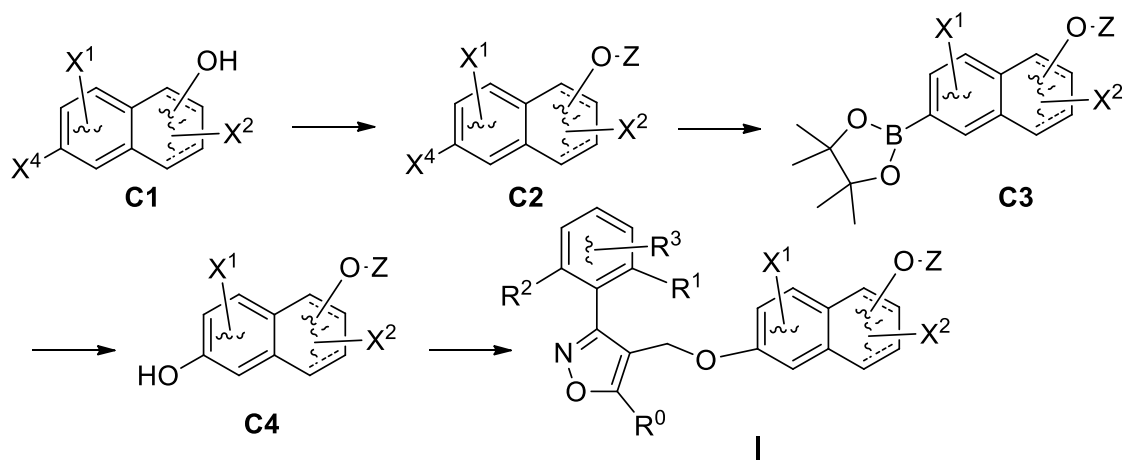
Ruta A:



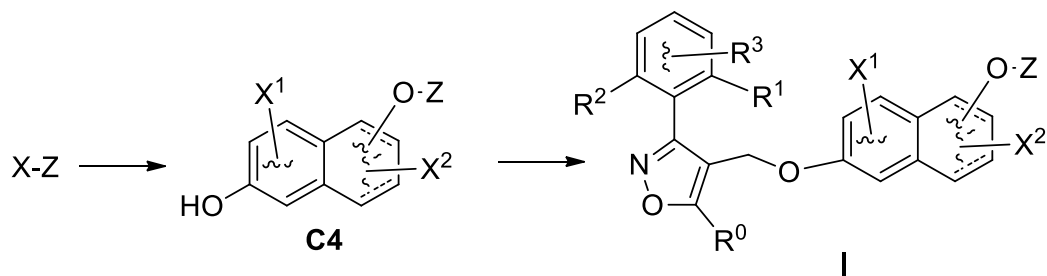
Ruta B:



Ruta C:



Ruta D:



A continuación, se explicarán 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 lleva a cabo en un solvente polar con una base, preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similares con carbonato de cesio o carbonato de potasio o bases similares.

en donde:

X es un halógeno;

R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C₁₋₆ no sustituido o sustituido con halógeno y alcoxi C₁₋₆ no sustituido o sustituido con halógeno, siempre y cuando al menos uno de R¹, R² y R³ no es hidrógeno, R⁰ se selecciona de alquilo C₁₋₆ no sustituido o sustituido con halógeno, cicloalquilo C₃₋₆, alquilcicloalquilo C₄₋₇;

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

en donde X es halógeno, Z es un residuo que se selecciona de heteroarilo de 5-10 miembros que tiene uno o más heteroátomos que se seleccionan de N, O y S, en donde el residuo Z está sustituido por R⁴ y opcionalmente sustituido además por R⁵;

en donde R⁴ se selecciona de -COOH, -CH₂COOH, -NHSO₂CF₃, -SO₂NH-alquilo C₁₋₆, -SO₃H, -CONHSO₂-alquilo C₁₋₆, -CONHSO₂-cicloalquilo C₃₋₆, -CONHSO₂-arilo de 5-10 miembros y -CONHSO₂-arilo de 5-10 miembros sustituido por alquilo C₁₋₆ en el arilo, y R⁵ se selecciona de H, alquilo C₁₋₆, halógeno y haloalquilo C₁₋₆; 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 R⁴ que se selecciona de -COOH y -CH₂COOH, los precursores de éster se pueden convertir en ácidos libres por hidrólisis mediante el uso de condiciones bien conocidas para los expertos en la técnica,

en donde el compuesto de fórmula (I) es como se definió anteriormente.

De acuerdo con el método de preparación que se proporciona por la presente invención, X es preferentemente bromo o yodo, y con mayor preferencia 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 lleva a cabo en un solvente polar con una base,

preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similares, 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 tal como NaClO_2 o H_2O_2 ;

(d) el compuesto (A2) se convierte en el compuesto (I) mediante el uso de las condiciones descritas en la Ruta A,

en donde X^3 es un halógeno, preferentemente bromo o yodo, y con mayor preferencia bromo.

Ruta C:

(a) hacer reaccionar un naftol sustituido (C1) con un compuesto halogenado X-Z para dar un éter de fórmula (C2), en donde la reacción se lleva a cabo en un solvente polar con una base, preferentemente, en DMF o acetonitrilo o similares, 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 tal como NaClO_2 o H_2O_2 ;

(d) el compuesto (C4) se convierte en el compuesto (I) mediante el uso de condiciones similares descritas en la Ruta A;

en donde X^4 es un halógeno, preferentemente bromo o yodo, y con mayor preferencia bromo.

Ruta D:

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

(b) El compuesto (C4) se convierte en compuesto (I) mediante el uso de condiciones similares descritas en la Ruta C.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o un compuesto profármaco del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster o un estereoisómero del mismo, y un material auxiliar farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más compuestos activos con un beneficio terapéutico adicional.

Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada en cada caso dependerá de la naturaleza y severidad de las afecciones a tratar y de la naturaleza del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y se puede preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos para los expertos en la técnica de farmacia.

Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables exhiben valiosas propiedades farmacológicas cuando se prueban *in vitro* ensayos de unión y en ensayos celulares, y por lo tanto son útiles como productos farmacéuticos. En particular, los compuestos de la invención son agonistas de FXR y son útiles como productos farmacéuticos para tratar afecciones mediadas por FXR tales como enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), enfermedad colestasis hepática, enfermedad hepática crónica, infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, fibrosis hepática, colangitis esclerosante primaria (PSC), cálculos biliares, atresia de las vías biliares, síntomas del tracto urinario inferior e hiperplasia prostática benigna (HPB), cálculos ureterales, obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis, daño hepático causado por la hipercolesterolemia y la hiperlipidemia. Los compuestos de la invención también son útiles para reducir el colesterol total, reducir el colesterol LDL, reducir el colesterol VLDL, aumentar los niveles de HDL y/o reducir los niveles de triglicéridos.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar, mejorar o prevenir un trastorno mediado por FXR en un sujeto que lo padece, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un análogo de isótopo estable, un éster o un estereoisómero del mismo, o una composición farmacéutica del mismo, y opcionalmente en combinación con un segundo agente terapéutico. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un éster o un estereoisómero del mismo y, opcionalmente, en combinación con un segundo agente terapéutico, en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno mediado por FXR tales como enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), colestasis del árbol hepático, enfermedad hepática crónica, infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, fibrosis hepática, colangitis esclerosante primaria (PSC), cálculos biliares, atresia de las vías biliares, síntomas del tracto urinario inferior e

hiperplasia prostática benigna (HPB), cálculos ureterales, obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis, aterosclerosis, daño hepático causado por hipercolesterolemia o hiperlipidemia.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, el término "compuestos de la presente invención" se refiere a los compuestos de fórmula (I), profármacos de los mismos, sales del compuesto y/o profármacos, hidratos o solvatos de los compuestos, así como también todos los estereoisómeros (que incluye diastereoisómeros y enantiómeros), tautómeros, compuestos marcados isotópicamente (que incluye sustituciones de deuterio) y polimorfos del compuesto.

Las sales de los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de un compuesto de la presente invención con una base o un ácido apropiado en un solvente apropiado producirá la sal correspondiente.

Las sales incluidas dentro del término "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de esta invención. 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 esta invención y deben considerarse como parte de un aspecto adicional de la invención.

Todos los materiales de partida, reactivos, ácidos, bases, solventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de la presente invención están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en la técnica. Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra forma en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, tal como) que se proporciona en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención que se reivindica de cualquier otra manera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Con el fin de explicar más claramente las modalidades de la presente invención o las soluciones técnicas en el estado de la técnica, se describirán brevemente más abajo las figuras necesarias para

la descripción de las modalidades de la presente invención. Obviamente, las figuras de la siguiente descripción son solo algunas modalidades de la presente invención.

La Figura 1 muestra la reducción de la puntuación NAS después del tratamiento con el compuesto 1 en estreptozocina (STZ) + dietilnitrosamina (DEN) + dieta rica en grasas (HFD) modelo de enfermedad en ratones.

La Figura 2 muestra la reducción de la fibrosis hepática después del tratamiento con el compuesto 1 en el modelo de enfermedad de ratones STZ+DEN+HFD.

La Figura 3 muestra la reducción de la puntuación NAS después del tratamiento con el compuesto 1 en dietilnitrosamina (DEN) + dieta rica en grasas (HFD)+ratas tratadas con colesterol/colato (CHOL).

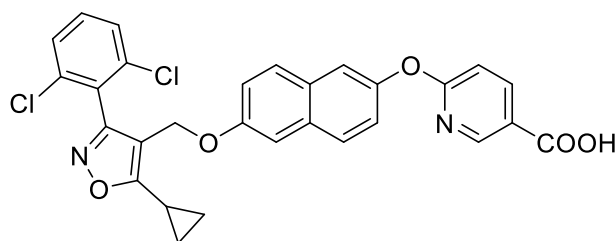
La Figura 4 muestra la reducción de la fibrosis hepática después del tratamiento con el compuesto 1 en ratas tratadas con DEN+HFD+CHOL.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los ejemplos más abajo. Es necesario señalar que, los ejemplos más abajo son sólo para ilustración, pero no para limitación de la presente invención. Varios cambios realizados por un experto en la técnica de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención deberían estar dentro del alcance que se reivindica en las reivindicaciones de la presente invención.

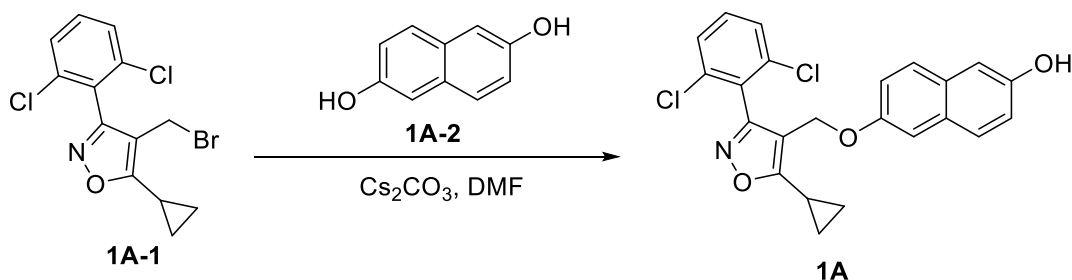
Ejemplo 1

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

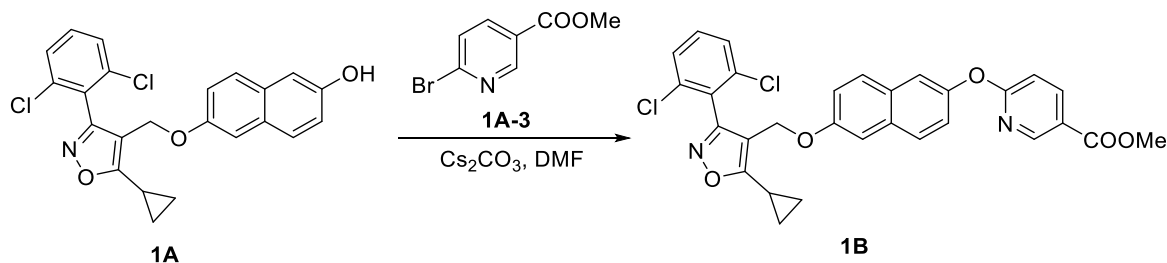


(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta A), el compuesto 1A-1 (1.0 g, 2.88 mmol, 1 eq.), el compuesto 1A-2 (0.46 g, 2.88 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (1.88 g, 5.76 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. Después de enfriar, 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 hasta 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, se encontró: 426.1.



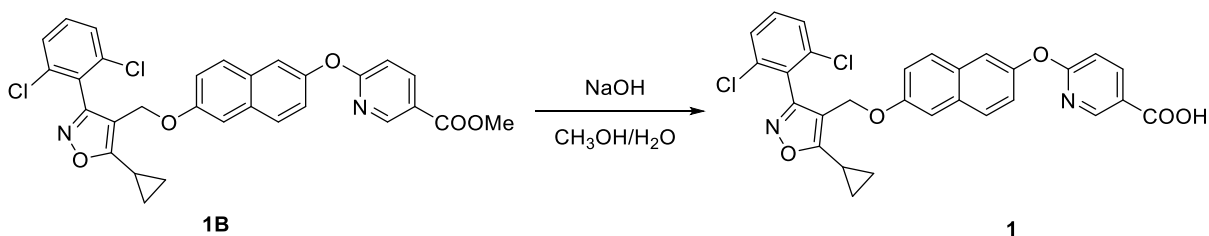
(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto **1A** (0.2 g, 0.47 mmol, 1 eq.), el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico (0.1 g, 0.47 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (0.306 g, 0.94 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. 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 hasta sequedad para dar el compuesto **1B**, 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftaleno-2-il)oxi)nicotinato de metilo, 0.21 g, rendimiento: 80.0 %. LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 561.1, se encontró: 561.1.



(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto **1B** (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 llevó a cabo durante 1 h. El pH de la solución de reacción se ajustó de 2 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1 N 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 donde PE es éter de petróleo) para dar el compuesto del título **1** (36 mg, rendimiento: 37.0 %).

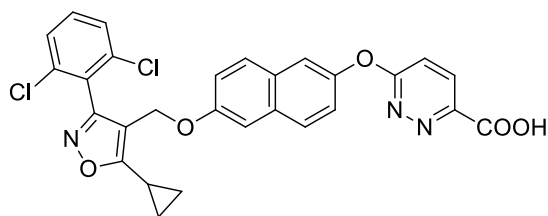
^1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.57 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.8, 7.2$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.57-2.50 (m, 1H), 1.19-1.11 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_5$; $[M+H]^+$: 547.1, se encontró: 547.1. ^{13}C RMN (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): tramos principales en 1591.94 (tramo C=O), 1412.27, 1556.70 (tramo C-C), 1364.37, 1389.89 (deformación C-H), 1218.41, 1250.94 (tramo C=N), 791.88 (tramo C-Cl).



Ejemplo 2

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

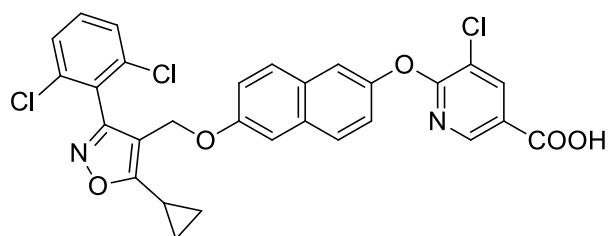


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 2 del título mediante la sustitución del 6-bromopiridazin-3-carboxilato de metilo por éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

¹H RMN (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 C₂₈H₁₉Cl₂N₃O₅; [M+H]⁺: 548.1, se encontró: 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)

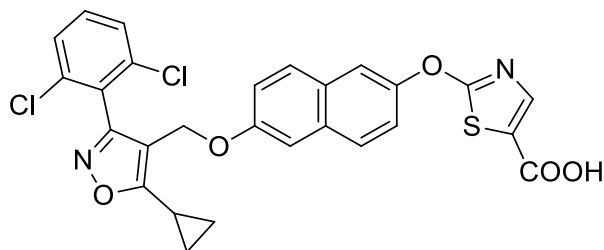


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 3 del título mediante la sustitución del 5,6-dicloronicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.0, se encontró: 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)

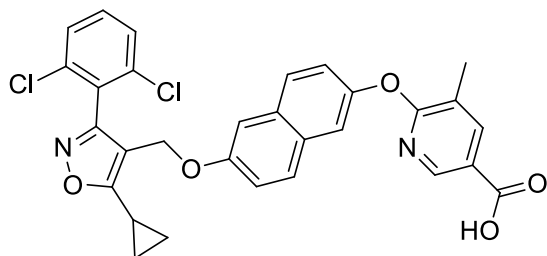


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 4 del título mediante la sustitución del 2-bromotiazol-5-carboxilato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 553.0, se encontró: 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)

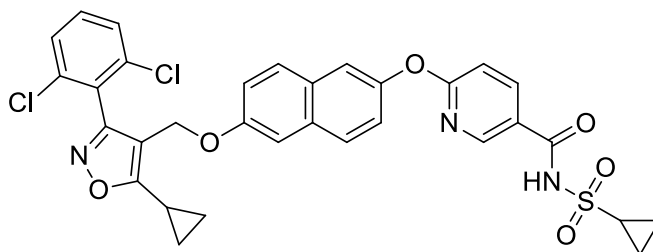


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 5 del título mediante la sustitución del 6-bromo-5-metilnicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561.1, se encontró: 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)

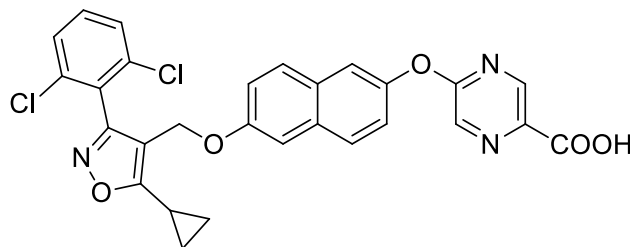


El compuesto 1 (70 mg) como se preparó en el ejemplo 1 y la ciclopropilsulfonamida (23 mg) se disolvieron en 2 ml de DCM (diclorometano), luego se añadieron 40 mg de EDCI (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) y 26 mg de DMAP (dimetilaminopiridina). Después que terminó la reacción, se añadieron 10 ml de DCM y 10 ml de agua para la extracción. La fase orgánica se lavó con agua y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purifica mediante columna (PE/EA/AcOH=2/1/0.01) para dar el compuesto 6 del título (8 mg, rendimiento: 9.6 %).

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{32}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 650.1, se encontró: 650.1.

Ejemplo 7

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

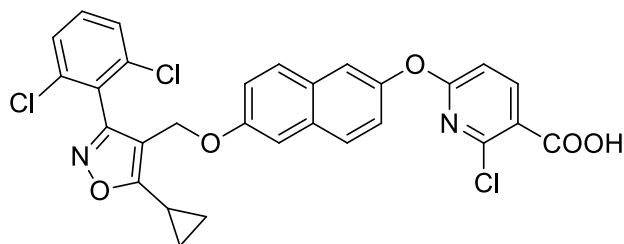


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 7 del título mediante la sustitución del 5-cloro-piridin-2-carboxilato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 548.1, se encontró: 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)

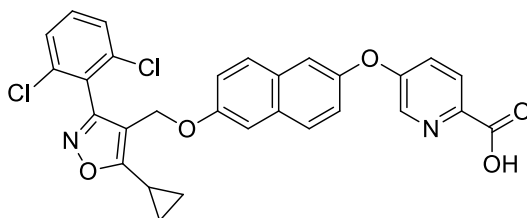


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 8 del título mediante la sustitución del 2,6-dicloronicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.98 (s amplio, 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.0, se encontró: 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)

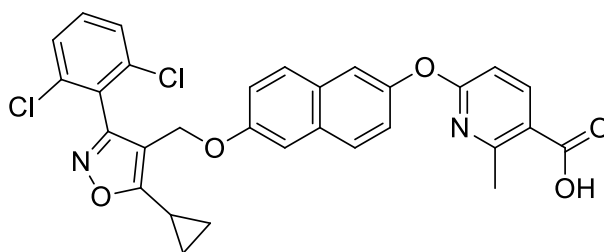


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 9 del título mediante la sustitución del 5-bromopicolinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 547.1.

Ejemplo 10

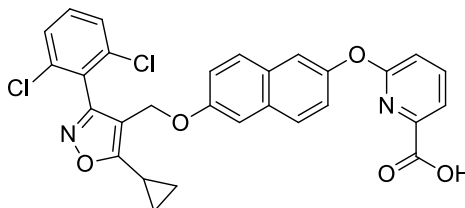
Preparación de ácido 6-(((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico (compuesto 10)



Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 10 del título mediante la sustitución del 6-cloro-2-metilnicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561.1, se encontró: 561.1.

Ejemplo 11

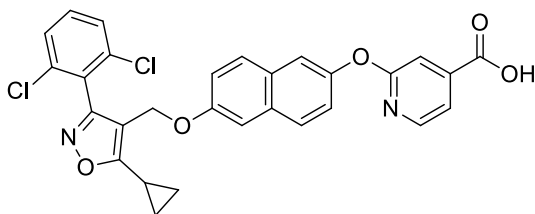
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-2-il)oxi)picolínico (compuesto 11)



Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 11 del título mediante la sustitución del 2,6-dicloronicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

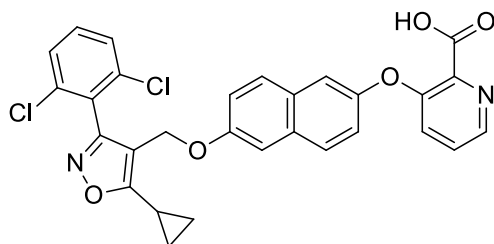


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 12 del título mediante la sustitución del 2-fluoroisonicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

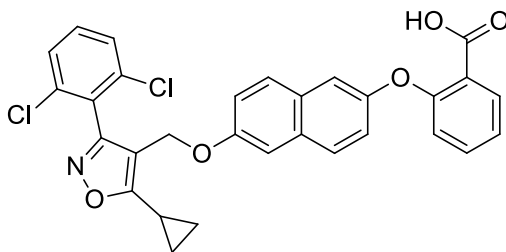


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 13 del título mediante la sustitución del 3-fluoropicolinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

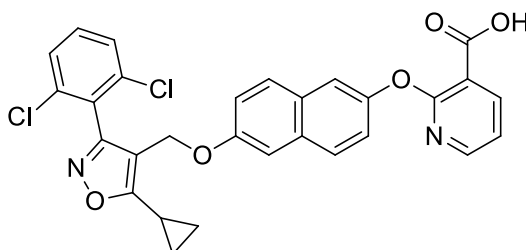


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 14 del título mediante la sustitución del 2-fluorobenzoato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{NO}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 546.1, se encontró: 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)

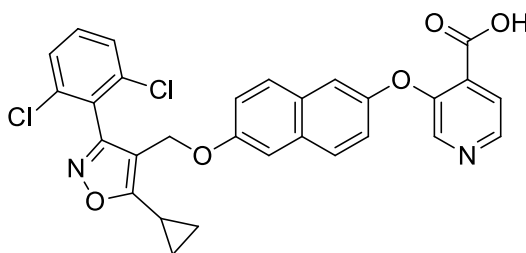


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 15 del título mediante la sustitución del 2-cloronicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)



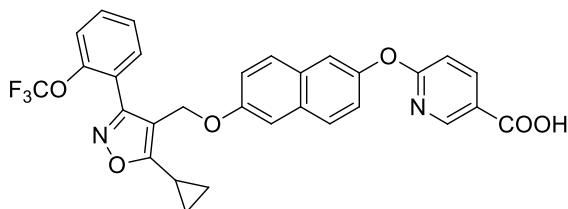
Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 16 del título mediante la sustitución del 3-fluoroisonicotinato de metilo por el éster metílico del ácido 6-bromonicotínico.

^1H RMN (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, se encontró: 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)

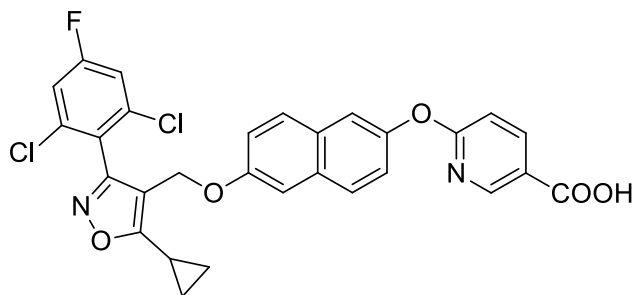


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 17 del título mediante la sustitución del 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2-(trifluorometoxi)fenil)isoxazol por 1A-1.

^1H RMN (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, se encontró: 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)

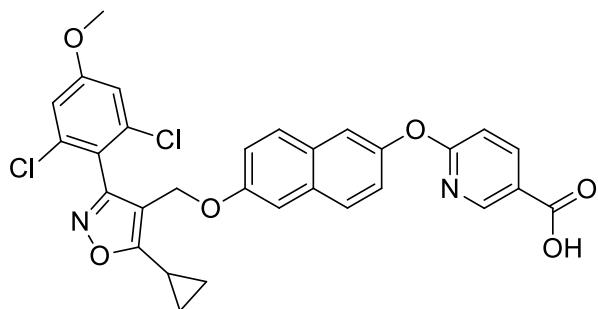


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 18 del título mediante la sustitución del 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-fluorofenil)isoxazol por 1A-1.

^1H RMN (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, se encontró: 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)

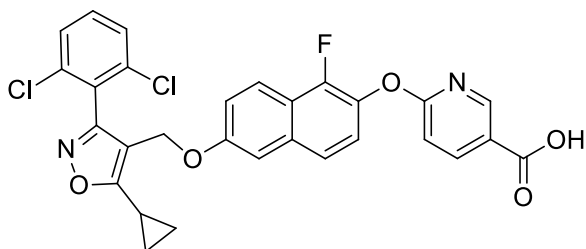


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 19 del título mediante la sustitución del 4-(clorometil)-5-ciclopropil-3-(2,6-dicloro-4-metoxifenil)isoxazol por 1A-1.

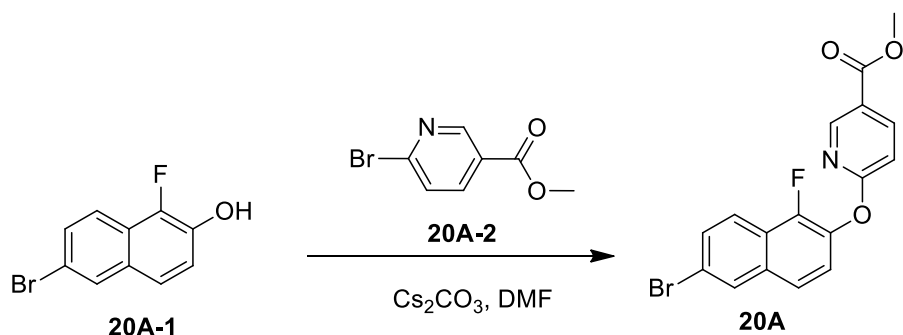
LCMS (ESI): calculado para $C_{30}H_{22}Cl_2N_2O_6$; $[M+H]^+$: 577.1, se encontró: 577.1.

Ejemplo 20

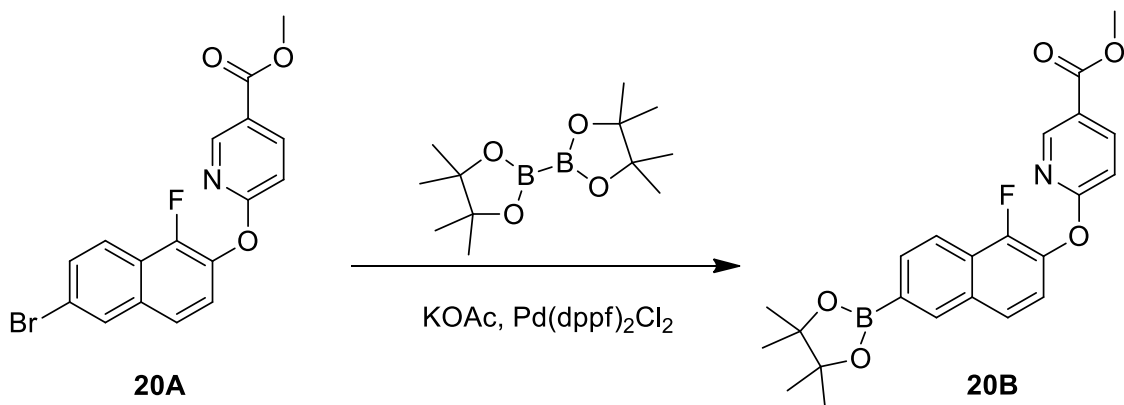
Preparación de ácido 6-(((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-1-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico (compuesto 20)



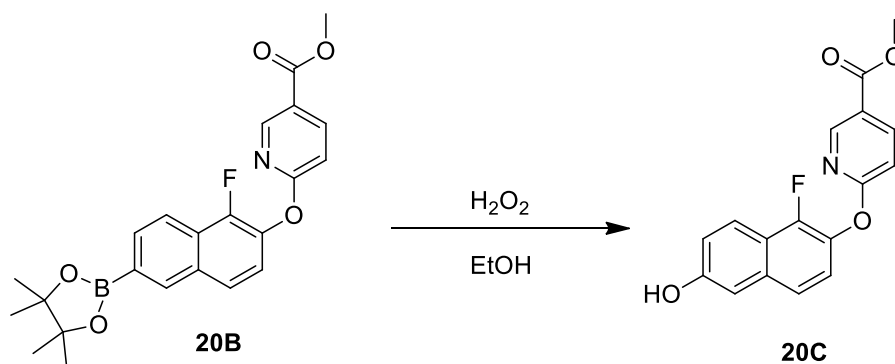
- (a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta C), el compuesto 20A-1 (1.0 g, 4.15 mmol, 1 eq.), el compuesto 20A-2 (0.90 g, 4.15 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (2.70 g, 8.30 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml). La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. Después de enfriar, 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 hasta sequedad para dar el compuesto 20A, 6-(((6-bromo-1-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotinato de metilo, 1.2 g, rendimiento: 77.0 %. LCMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{11}BrFNO_3$; $[M+H]^+$: 376.0, se encontró: 376.0.



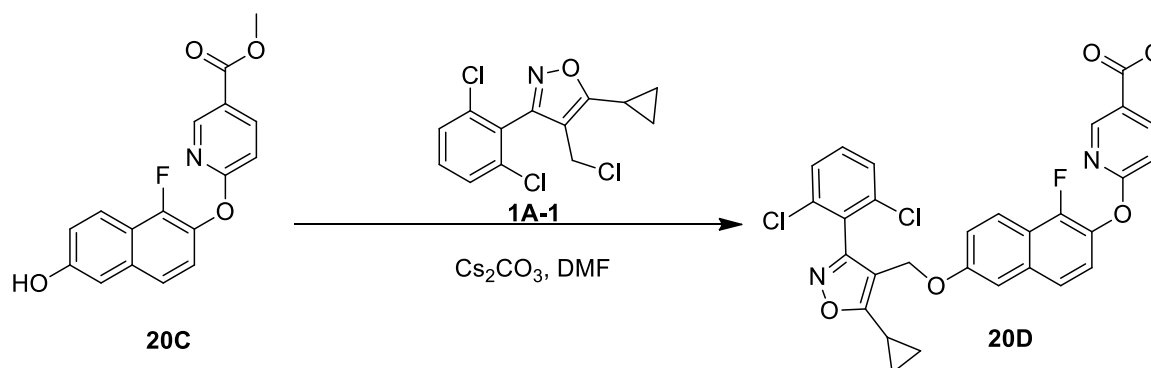
(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto **20A** (200 mg, 0.53 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF seco (2 ml), luego se añadieron KOAc (104 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ (39 mg, 0.053 mmol, 0.1 eq.) y bis(pinacolato)diboro (135 mg, 0.53 mmol, 1 eq.) bajo N_2 y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. 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 hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo:EtOAc = 3:1) para dar el compuesto **20B**, 6-((1-fluoro-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)naftalen-2-il)oxi)nicotinato de metilo, 151 mg, rendimiento: 67.1 %. LCMS (ESI): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{BFNO}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 424.2, se encontró: 424.2.



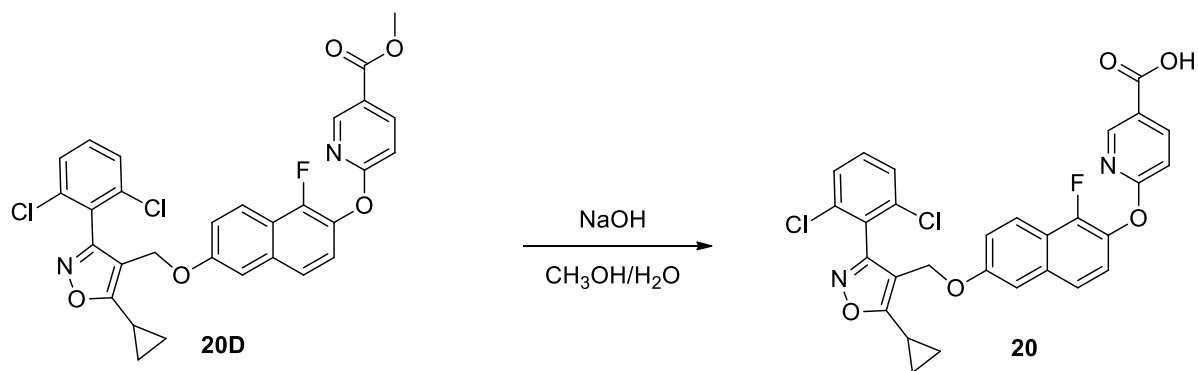
(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto **20B** (100 mg) se disolvió en EtOH (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de H_2O_2 al 30 % (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se inactivó con Na_2SO_3 acuoso saturado, y se extrajo con 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 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FNO}_4$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 314.1, se encontró: 314.1.



(d) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el 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 llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. 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 hasta sequedad para dar el compuesto 20D, 0.21 g, rendimiento: 80.0 %. LCMS (ESI): calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 579.1, se encontró: 579.1.



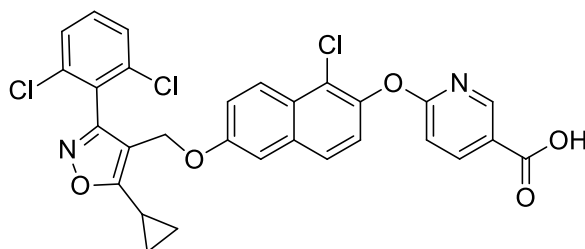
(e) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 20D (100 mg) se disolvió en THF seco (2 ml), luego se añadió una solución acuosa de NaOH al 10% (1 ml) bajo N_2 y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h. El pH de la solución de reacción se ajustó de 3 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1 N y se añadió 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 %).



^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 565.1, se encontró: 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)

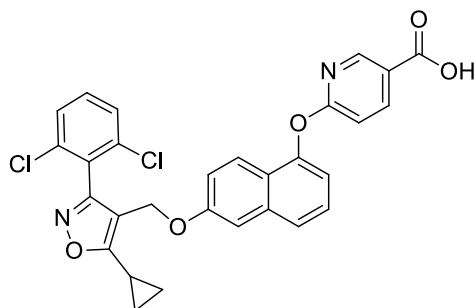


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 20, se obtuvo el compuesto 21 del título mediante la sustitución del 6-bromo-1-cloronaftaleno-2-ol por 20A-1.

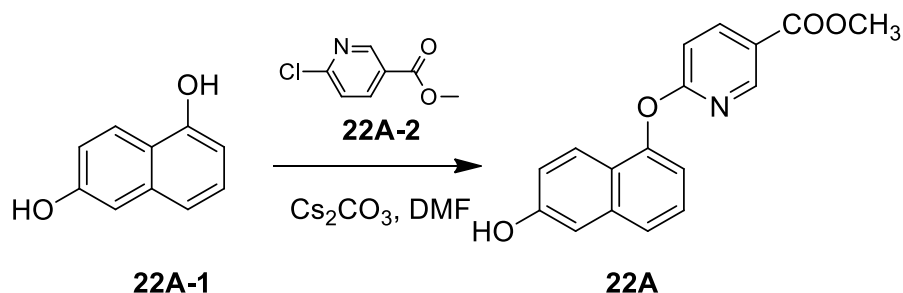
^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.63 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.87-7.63 (m, 4H), 7.60 (s, 1H), 7.40-7.24 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.47-2.40 (m, 1H), 1.23-1.08 (m, 4H). LCMS (ESI): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.0, se encontró: 581.0.

Ejemplo 22

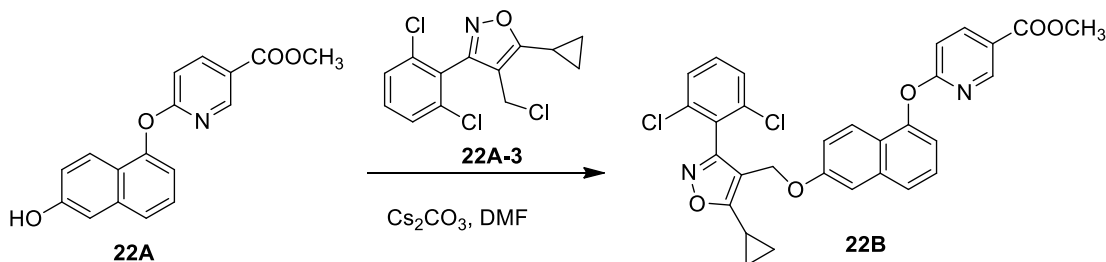
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico (compuesto 22)



(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 llevó a cabo a 65 °C durante 3 h. 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 hasta sequedad. El residuo se purificó mediante 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, se encontró: 296.1.

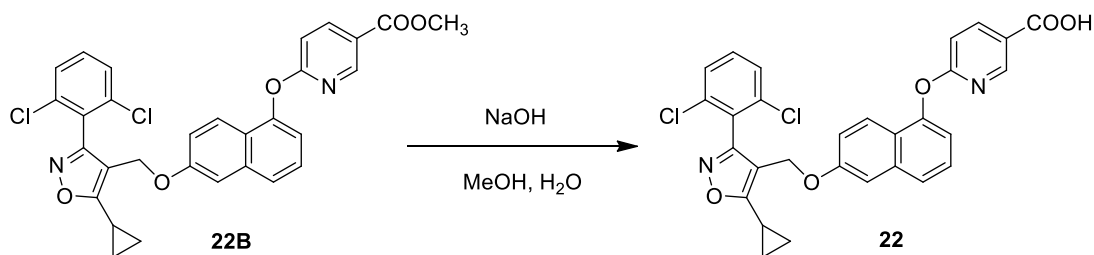


(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 22A (0.2 g, 0.68 mmol, 1 eq.), 22A-3 (0.2 g, 0.68 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (0.44 g, 1.36 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (5 ml) para reaccionar. La reacción se llevó a cabo a 40 °C durante 2 h. Después de enfriar, se añadieron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



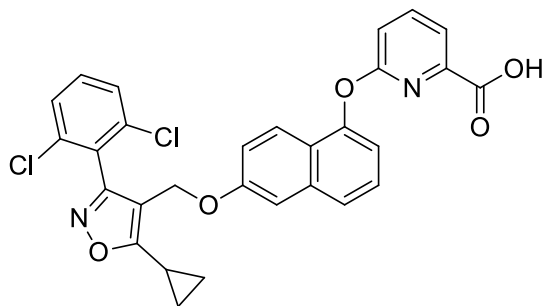
(c) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 22B (100 mg) se disolvió en metanol (2 ml), luego se añadió solución acuosa de NaOH al 10 % (1 ml), la temperatura se elevó a 60 °C y la reacción se llevó a cabo durante 0.5 h. El pH de la solución de reacción se ajustó de 2 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1 N y se añadió 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 %).

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.11 (s amplio, 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

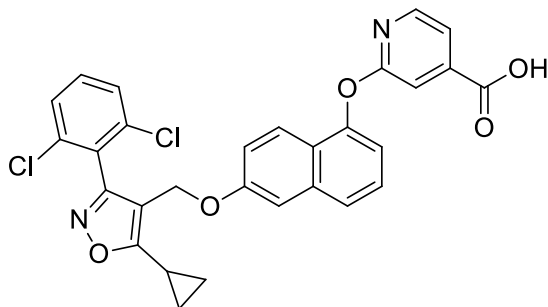


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 23 del título mediante la sustitución del 6-fluoropicolinato de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.99 (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

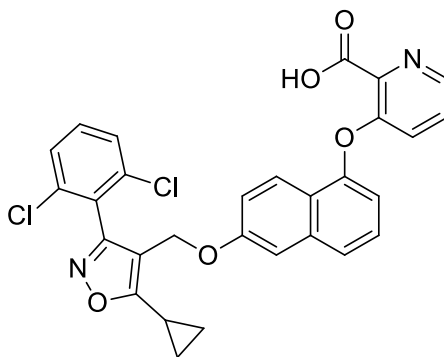


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 24 del título mediante la sustitución del 2-fluoroisonicotinato de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)

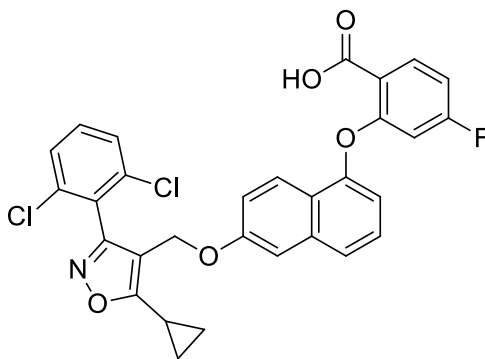


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 25 del título mediante la sustitución del 3-fluoropicolínico de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 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)



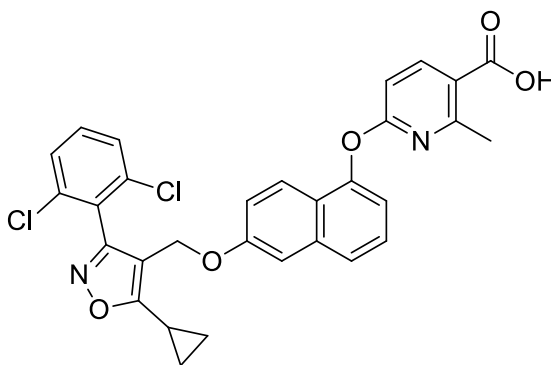
Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 26 del título mediante la sustitución del 2,4-difluorobenzoato de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{FNO}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 564.1, se encontró: 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)

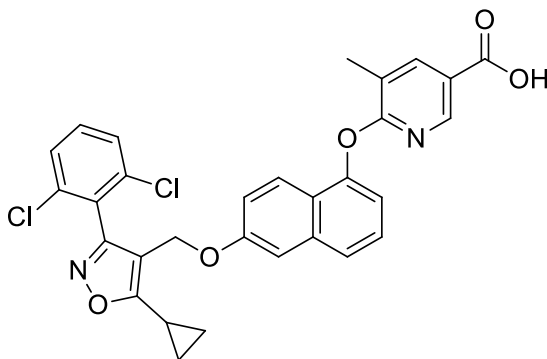


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 27 del título mediante la sustitución del 6-cloro-2-metilnicotinato de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561.1, se encontró: 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)

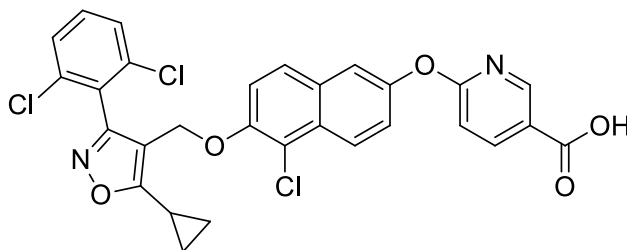


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 22, se obtuvo el compuesto 28 del título mediante la sustitución del 6-cloro-5-metilnicotinato de metilo por 22A-2.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561.1, se encontró: 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)

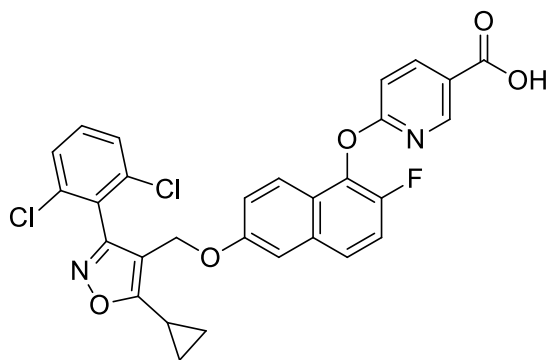


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 32, se obtuvo el compuesto 29 del título mediante la sustitución del 6-bromo-1-cloronaftaleno-2-ol por 32A-1.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.0, se encontró: 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)

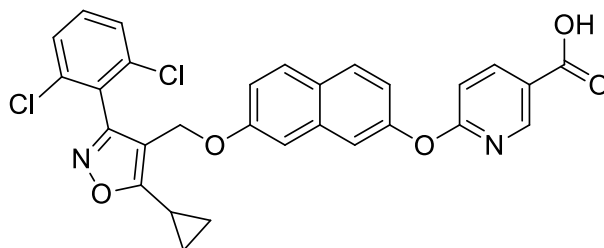


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 20, se obtuvo el compuesto 30 del título mediante la sustitución del 6-bromo-2-fluoronaftalen-1-ol por 20A-1.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 565.1, se encontró: 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)

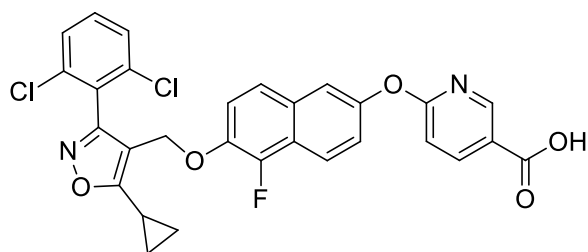


Siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, se obtuvo el compuesto 31 del título mediante la sustitución del naftalen-2,7-diol por 1A-2.

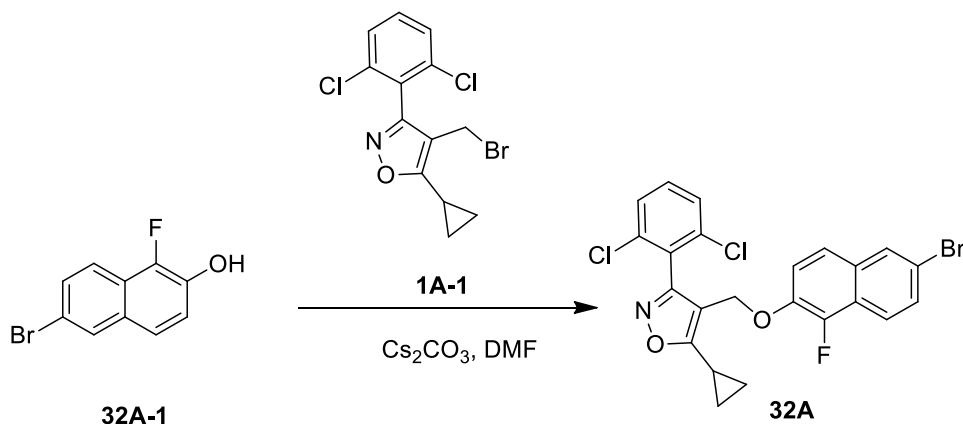
^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.64 (s, 1H), 8.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.55 – 7.43 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.13 (t, $J = 9.9$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 1.29 – 1.06 (m, 5H). LCMS (ESI): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 547.1.

Ejemplo 32

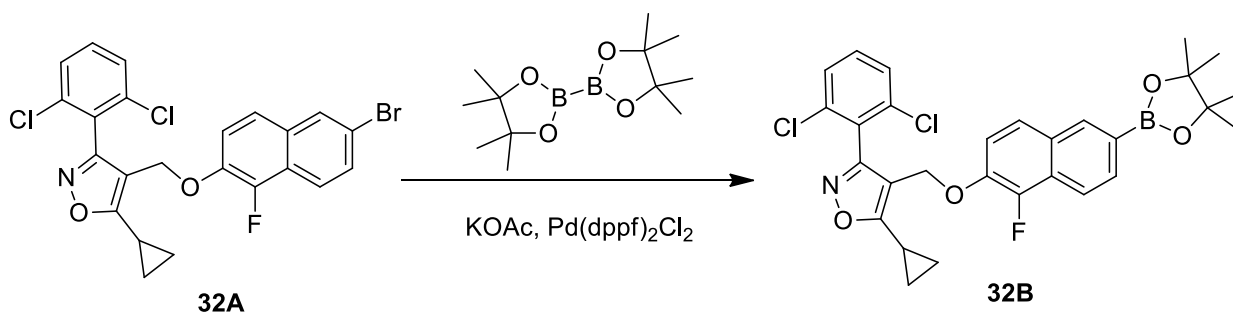
Preparación de ácido 6-(((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-5-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico (compuesto 32)



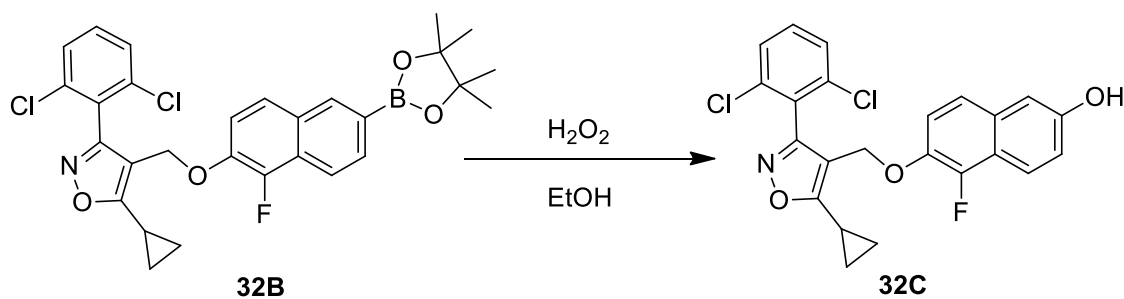
(a) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción (Ruta B), el compuesto 32A-1 (1.0 g, 4.15 mmol, 1 eq.), el compuesto 1A-1 (1.44 g, 4.15 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (2.70 g, 8.30 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (10 ml) para reaccionar. La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. Después 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 hasta 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, se encontró: 506.0.



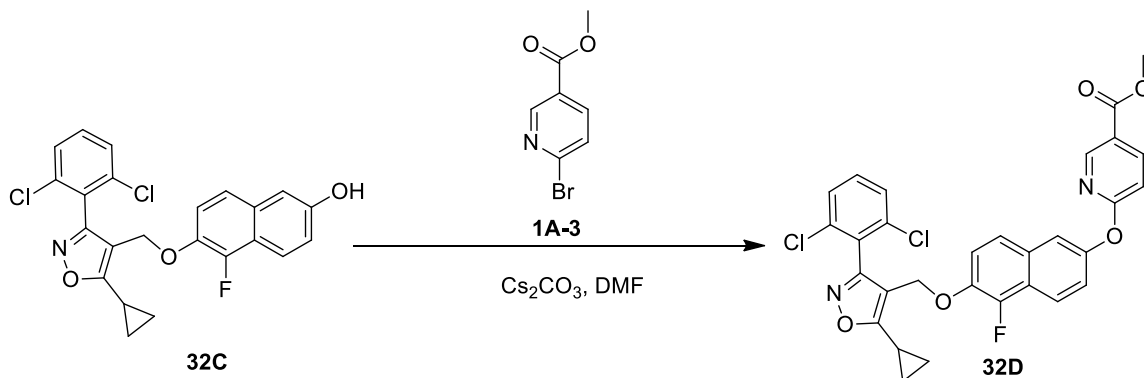
(b) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32A (200 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF seco (2 ml), luego se añadieron KOAc (76 mg, 0.78 mmol, 2 eq.), $Pd(dppf)_2Cl_2$ (28 mg, 0.039 mmol, 0.1 eq.) y bis(pinacolato)diboro (100 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) bajo N_2 la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. 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 hasta 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, se encontró: 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 H₂O₂ al 30 % (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se inactivó con Na₂SO₃ 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 C₂₃H₁₆Cl₂FNO₃; [M+H]⁺: 444.1, se encontró: 444.1.

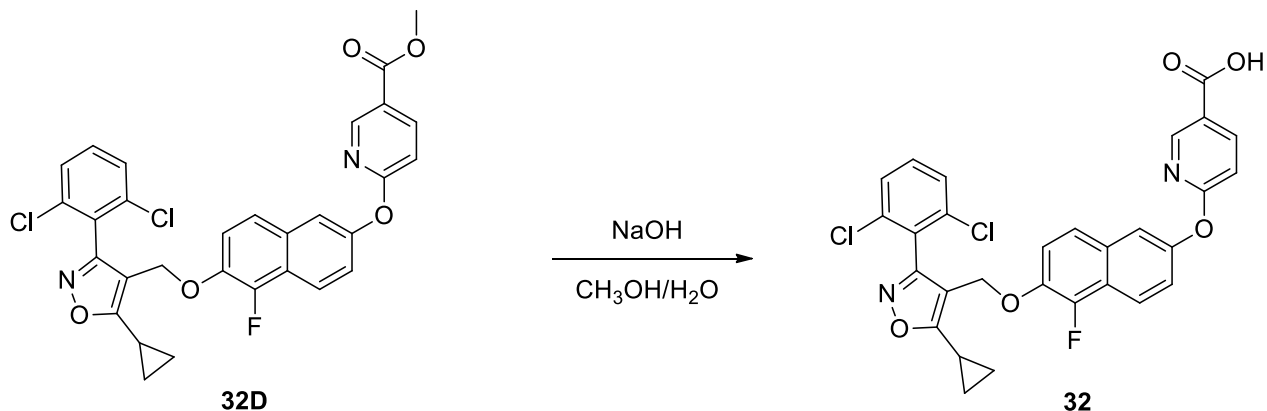


(d) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32C (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), 1A-3 (24.3 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) y carbonato de cesio (71.5 mg, 0.22 mmol, 2 eq.) se disolvieron en DMF (1 ml) para reaccionar. La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 2 h. Después de enfriar, se añadieron 5 ml de agua y 5 ml de EA para la extracción, y la fase orgánica se lavó con agua y se concentró hasta sequedad para dar el compuesto 32D, 40 mg, rendimiento: 61.5 %. LCMS (ESI): calculado para C₃₀H₂₁Cl₂FN₂O₅; [M+H]⁺: 579.1, se encontró: 579.1.



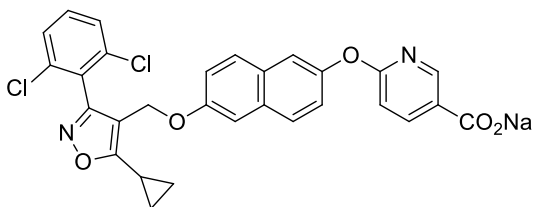
(e) Con referencia a la siguiente ecuación de reacción, el compuesto 32D (30 mg) se disolvió en MeOH (1 ml), luego se añadió una solución acuosa de NaOH al 10 % (0.5 ml) bajo N₂ y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h. El pH de la solución de reacción se ajustó de 3 a 4 mediante la adición de una solución de HCl 1 N y se añadió 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 %).

¹H RMN (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 C₂₉H₁₉Cl₂FN₂O₅; [M+H]⁺: 565.1, se encontró: 565.1.

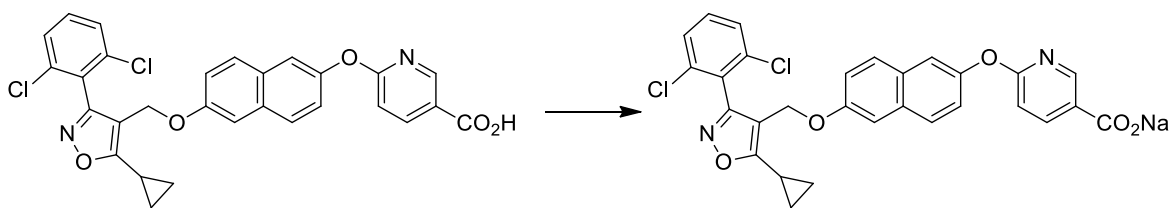


Ejemplo 33

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

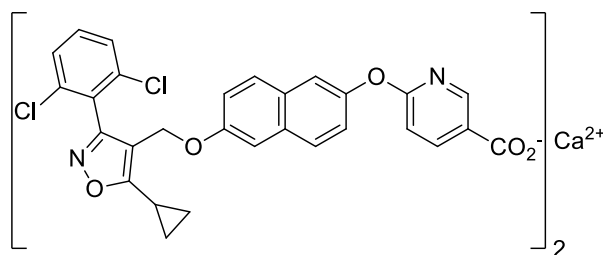


Se añadió una solución ac. de NaOH (30 %, 1.44 g, 1.2 eq.) a una solución del compuesto 1 (4.99 g, 9.12 mmol) en EtOH a TA. Después de calentar la mezcla de reacción a reflujo durante 6 h, se enfrió a TA. El sólido se recogió por filtración, se lavó con EtOH (10 ml) y se secó para dar un sólido gris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

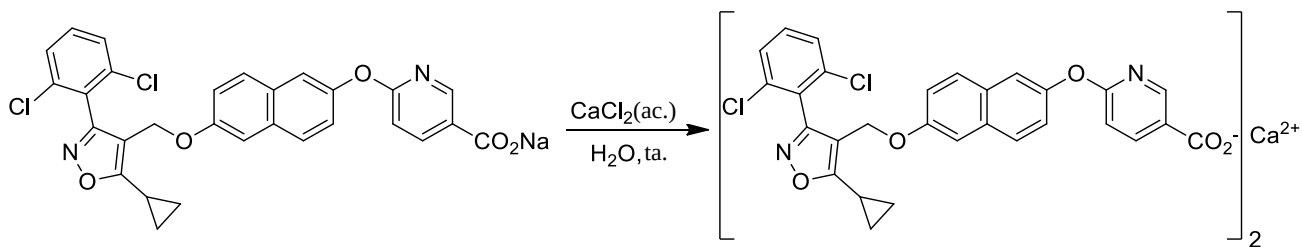


Ejemplo 34

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

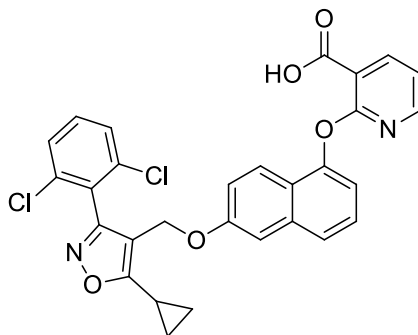


A una solución del compuesto 35 (1.00 g, 1.76 mmol) en agua (10 ml) se añadió una solución de CaCl_2 (1.0 g, 20 %) en agua. Se formaron precipitados blancos. Después de agitar la mezcla de reacción a TA durante 4 h, el sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (2.0 ml) para dar el producto como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



Ejemplo 35

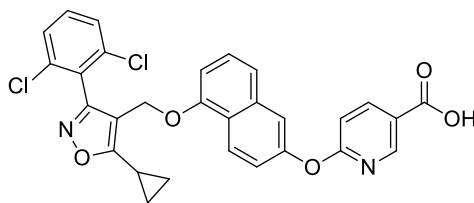
Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 35 del título se preparó de acuerdo con la Ruta D, siguiendo el procedimiento del ejemplo 22. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 547.1.

Ejemplo 36

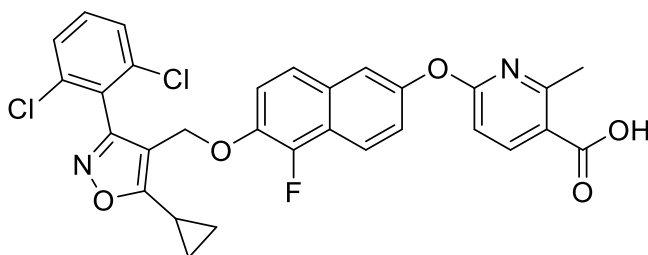
Preparación de ácido 6-((5-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-2-il)oxi)nicotínico



El compuesto 36 del título se preparó de acuerdo con la Ruta B, siguiendo el procedimiento del ejemplo 32. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 547.1, se encontró: 547.1.

Ejemplo 37

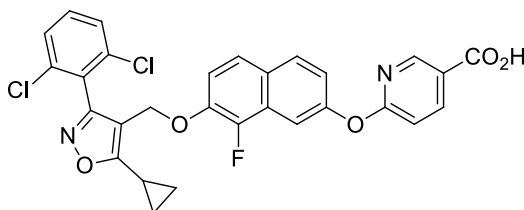
Preparación de ácido 6-(((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-5-fluoronaftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 37 del título se preparó de acuerdo con la Ruta B, siguiendo el procedimiento del ejemplo 32. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 579.1, se encontró: 579.1.

Ejemplo 38

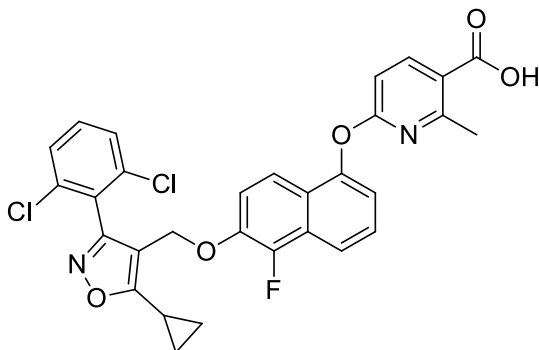
Preparación de ácido 6-((7-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-8-fluoronaftalen-2-il)oxi)nicotínico



El compuesto 38 del título se preparó de acuerdo con la Ruta B, siguiendo el procedimiento del ejemplo 32. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 565.1, se encontró: 565.1.

Ejemplo 39

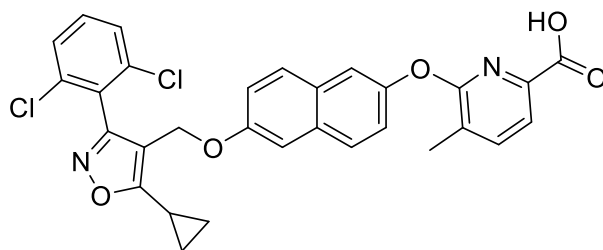
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-5-fluoronaftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 39 del título se preparó de acuerdo con la Ruta B, siguiendo el procedimiento del ejemplo 32. ^1H RMN (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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 579.1, se encontró: 579.1.

Ejemplo 40

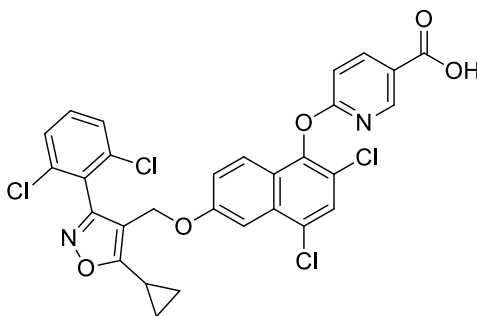
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)-5-metilpicolínico



El compuesto 40 del título se preparó de acuerdo con la Ruta D, siguiendo el procedimiento del ejemplo 22. ^1H RMN (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 $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561.1, se encontró: 561.1.

Ejemplo 41

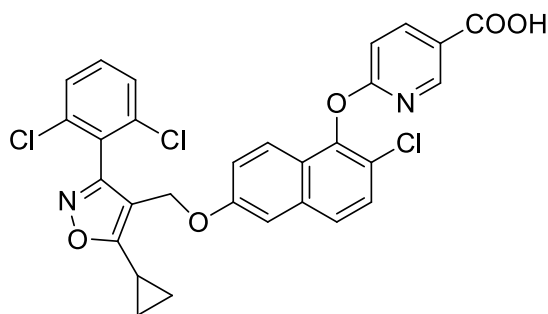
Preparación de ácido 6-((2,4-dicloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 41 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 615.0, se encontró: 615.0.

Ejemplo 42

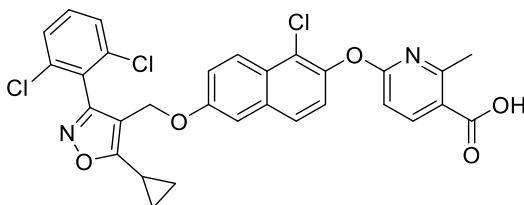
Preparación de ácido 6-((2-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 42 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.0, se encontró: 581.0.

Ejemplo 43

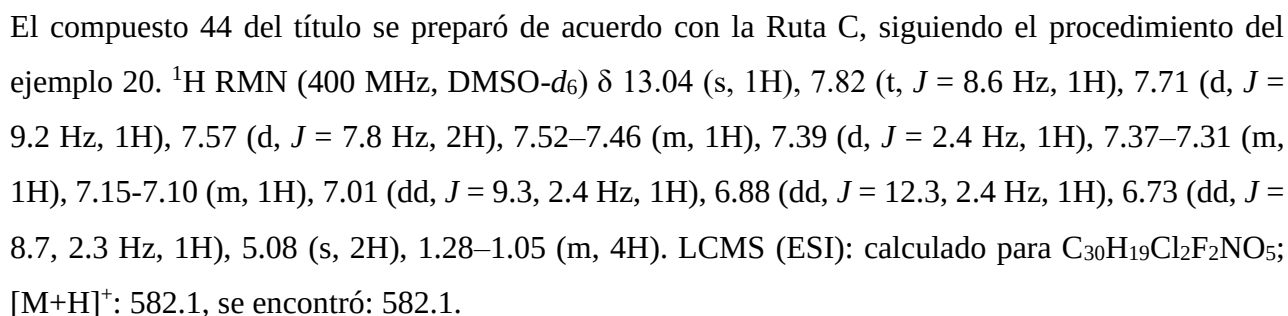
Preparación de ácido 6-((1-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-2-il)oxi)-2-metilnicotínico



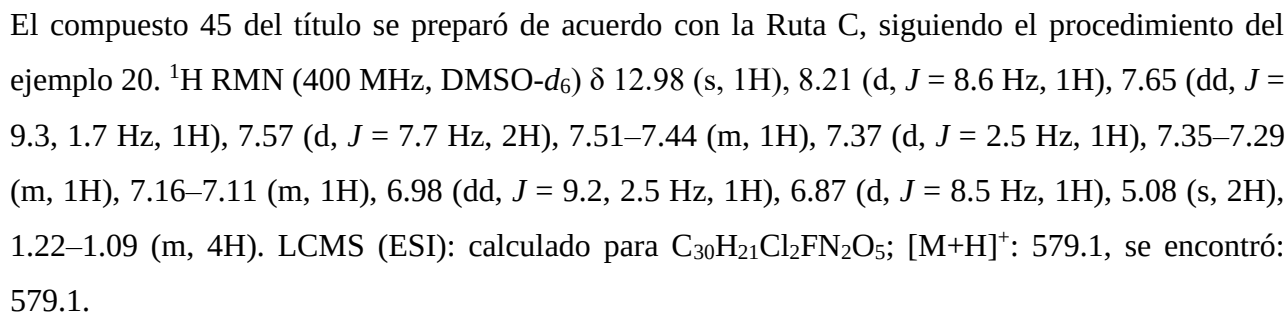
El compuesto 43 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.97 (s, 1H), 8.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.55–7.49 (m, 1H), 7.47 (s, 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 595.1, se encontró: 595.1.

Ejemplo 44

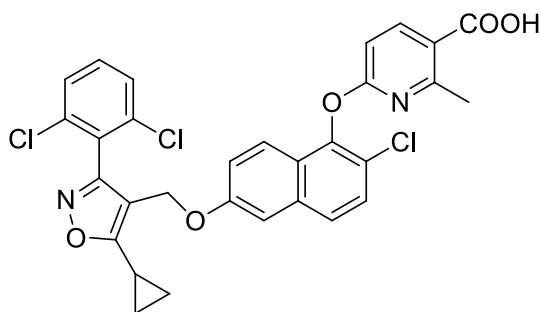
Preparación de ácido 2-(((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-4-fluorobenzoico



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



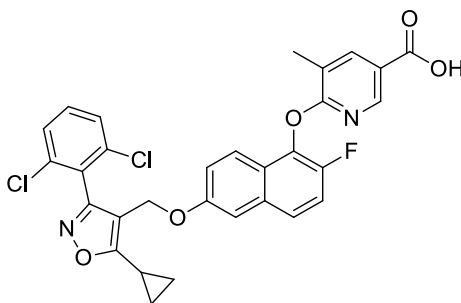
Preparación de ácido 6-((2-cloro-6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)naftalen-1-il)oxi)-2-metilnicotínico



El compuesto 46 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 595.1, se encontró: 595.1.

Ejemplo 47

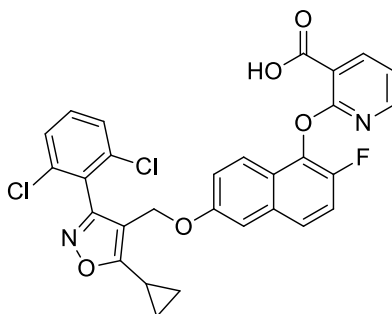
Preparación de ácido 6-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-2-fluoronaftalen-1-il)oxi)-5-metilnicotínico



El compuesto 47 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 579.1, se encontró: 579.1.

Ejemplo 48

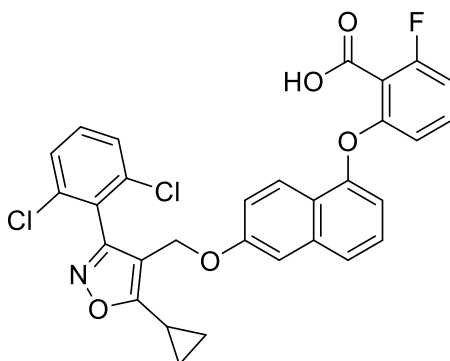
Preparación de ácido 2-((6-((5-ciclopropil-3-(2,6-diclorofenil)isoxazol-4-il)metoxi)-2-fluoronaftalen-1-il)oxi)nicotínico



El compuesto 48 del título se preparó de acuerdo con la Ruta C, siguiendo el procedimiento del ejemplo 20. ^1H RMN (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 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 565.1, se encontró: 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 de acuerdo con la Ruta D, siguiendo el procedimiento del ejemplo 22. ^1H RMN (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 $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 564.1, se encontró: 564.1.

EJEMPLOS BIOLÓGICOS

Ejemplo A

Capacidad de unión del agonista FXR

La evaluación del efecto de activación del compuesto de la presente invención con respecto a la unión de FXR a su factor coestimulador SRC-1 se llevó a cabo mediante el uso de técnicas analíticas de resolución temporal. Los resultados se enumeran en la tabla 1.

Materiales experimentales

1. Proteína: proteína FXR humana marcada con glutatión-S-transferasa (GST) (Invitrogen)
2. Coactivador: Coactivador del receptor de esteroides marcado con fluoresceína (SRC2-2) (Invitrogen)
3. Reactivo de detección: Kit de análisis de fluorescencia de resolución temporal LanthaScreen (Invitrogen)

Métodos experimentales

1. El compuesto se preparó en una solución madre de DMSO 10 mM y se almacenó en un refrigerador a -20 °C durante mucho tiempo.
2. El compuesto se diluyó hasta 1 mM antes del experimento y luego el compuesto se diluyó 3 veces a 10 puntos de concentración mediante el uso de DMSO. Luego use el tampón G (Invitrogen, PV4553) para diluir estos 10 puntos de concentración 50 veces para convertirse en un fluido de trabajo. Añada 10 µl de cada solución de trabajo a cada pocillo de una placa de 384 pocillos.
3. Prepare una solución de proteína FXR humana (concentración final 20 nM) en tampón G refrigerado y añada 5 µl de solución de proteína FXR humana a cada pocillo de una placa de 384 pocillos.
4. Prepare una mezcla de tampón G que contenga 2 µM de coactivador de receptor de esteroides marcado con fluoresceína y anticuerpo GST 20 nM.
5. Añada 5 µl de la mezcla preparada en la etapa 4 a una placa de 384 pocillos.
6. Centrifugue la placa de 384 pocillos a 1000 g durante 1 minuto.
7. Incube durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.
8. Lea la placa de 384 pocillos a 520 nm y 495 nm en un lector de placas Envision 2104.
9. Calcule la EC₅₀ valor del efecto de activación del compuesto.

Ejemplo B

Capacidad de transactivación del agonista de FXR

La evaluación de la capacidad del compuesto de la presente invención para promover la transactivación de FXR se llevó a cabo mediante el uso de la tecnología de expresión del gen reportero de luciferasa. Los resultados se enumeran en la tabla 1.

Materiales experimentales

1. Línea celular: HEK293T (Invitrogen)
2. Plásmido de expresión: pBIND-hFXR-LBD-GAL4 (Promega), pGL4.35-luciferasa (Promega)
3. Medios de cultivo celular: Suero al 10 % y doble anticuerpo de penicilina/estreptomicina en medio DMEM
4. Reactivo de detección: Sistema de detección de fluorescencia Steady-Glo (Promega).
5. Reactivo de transfección: Reactivo de transfección TransIT-293 (MIRUS BIO)

Métodos experimentales

1. El compuesto se preparó en una solución madre de DMSO 10 mM y se almacenó en un refrigerador a -20 °C durante mucho tiempo.
2. Se sembraron células HEK293T de reanimación en placas de cultivo de 10 cm a una concentración de 5.5×10^6 y se incubó durante 16 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %.
3. Devuelva el reactivo de transfección a temperatura ambiente antes de la transfección. La solución Trans-IT se añadió gota a gota a Opti-MEM y se mezcló por inversión durante 5 minutos; se añadió el plásmido de expresión, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.
4. Añada la mezcla de transfección de la etapa 3 a la placa de 10 cm preparada en la etapa 2 e incube durante 5-6 horas en una incubadora de CO₂ al 5 %.
5. Diluya el compuesto 3 veces a 10 puntos de concentración mediante el uso de DMSO; añada 25 nl de compuesto por pocillo en una placa de 384 pocillos mediante el uso de una pipeta sónica Echo 550; añada células HEK293T a la placa de 384 pocillos a una concentración de 15 000 células/pocillo; incube durante 16-20 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %.
6. Añada 25 µl de reactivo fluorescente Steady-Glo a cada pocillo y lea la fluorescencia en un lector de placas Envision 2104.
7. Calcule la EC₅₀ valor de la activación del compuesto.

Tabla 1: Valores de actividad de unión del agonista de FXR agrupados en el siguiente intervalo: A indica $EC_{50} < 50 \text{ nM}$; B indica $50 < EC_{50} < 500 \text{ nM}$; C indica $EC_{50} > 500 \text{ nm}$.

Compuesto	Actividad de unión de FXR
Compuesto 1	B
Compuesto 2	B
Compuesto 3	C
Compuesto 4	B
Compuesto 5	C
Compuesto 6	B
Compuesto 7	C
Compuesto 8	B
Compuesto 9	B
Compuesto 10	B
Compuesto 11	A
Compuesto 12	A
Compuesto 13	B
Compuesto 14	B
Compuesto 15	B
Compuesto 16	A
Compuesto 17	C
Compuesto 18	B
Compuesto 19	C
Compuesto 20	B
Compuesto 21	B
Compuesto 22	A
Compuesto 23	C
Compuesto 24	A
Compuesto 25	B
Compuesto 26	A
Compuesto 27	A
Compuesto 28	A
Compuesto 29	B
Compuesto 30	A
Compuesto 31	A
Compuesto 32	A
Compuesto 33	B
Compuesto 34	B
Compuesto 35	A
Compuesto 36	B
Compuesto 37	B
Compuesto 38	A
Compuesto 39	A
Compuesto 40	C
Compuesto 41	C
Compuesto 42	C

Compuesto 43	B
Compuesto 44	A
Compuesto 45	A
Compuesto 46	B
Compuesto 47	A
Compuesto 48	A
Compuesto 49	B

Tabla 2: valores de actividad celular agrupados en el siguiente intervalo: A indica $EC_{50} < 200$ nM; B indica $500 < EC_{50} < 1000$ nM; C indica $EC_{50} > 1000$ nm.

Compuesto	Actividad celular
Compuesto 1	A
Compuesto 2	C
Compuesto 3	C
Compuesto 4	C
Compuesto 5	C
Compuesto 6	C
Compuesto 7	C
Compuesto 8	B
Compuesto 9	C
Compuesto 10	A
Compuesto 11	B
Compuesto 12	C
Compuesto 13	C
Compuesto 14	C
Compuesto 15	C
Compuesto 16	C
Compuesto 17	C
Compuesto 18	C
Compuesto 19	C
Compuesto 20	B
Compuesto 21	A
Compuesto 22	A
Compuesto 23	C
Compuesto 24	A
Compuesto 25	C
Compuesto 26	A
Compuesto 27	A
Compuesto 28	A
Compuesto 29	B
Compuesto 30	A
Compuesto 31	A
Compuesto 32	A
Compuesto 33	A

Compuesto 34	A
Compuesto 35	A
Compuesto 36	C
Compuesto 37	C
Compuesto 38	B
Compuesto 39	A
Compuesto 40	C
Compuesto 41	C
Compuesto 42	C
Compuesto 43	B
Compuesto 44	A
Compuesto 45	A
Compuesto 46	A
Compuesto 47	A
Compuesto 48	A
Compuesto 49	C

Ejemplo C

Estudios farmacocinéticos de ratón

Procedimiento típico de estudio PK. Para los estudios PK i.v., se administró el compuesto a un grupo de tres ratones macho CD-1 en ayunas (2.0 mg/kg, 0.50 mg/ml en solutol al 5 % en solución salina, solución transparente) y se recogieron 0.02 ml de sangre a 0.0830, 0.250, 0.500, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 24.0 h. Para los estudios PK PO, se administró el compuesto a un grupo de tres ratones macho CD-1 en ayunas (10 mg/kg, 1 mg/ml en solutol al 5 % en solución salina, solución transparente), y se recogieron 0.02 ml de sangre a 0.250, 0.500, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 24.0 h. La sangre se recogió en tubos EP (que contienen 0.85-1.15 mg de EDTA K2) y se centrifugó a 3000 g o 3200 g a 4 °C durante 10 min) y el plasma se aisló y dividió en dos viales. Uno se usó para bioanálisis y el otro se mantuvo como respaldo. Las muestras se mantuvieron a -60 °C o menos, hasta que se analizaron por LC MS/MS. Las muestras se analizaron con AB SCIEX INSTRUMENTS LC-MS/MS_AU-Triple Quad 6500 Plus y los datos se procesaron con Phoenix WinNonlin 6.3 (modelo no compartimental IV y modelo no compartimental PO).

Resultados PK

Los resultados farmacocinéticos en ratones se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados farmacocinéticos de ratón

Compuesto	IV				PO			
	T1/2 (h)	Cl (ml/min/kg)	Vd (L/kg)	AUC _{0-t} (ng.h/ml)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} (h)	AUC _{0-t} (ng.h/ml)	F (%)
1	0.85	47.4	1.75	705	641	0.83	1159	33 %
10	1.6	9.26	0.66	3553	5503	0.417	9361	52.6 %
11	1.44	6.66	0.294	4977	5726	0.5	8329	33.3 %
21	1.28	35.8	1.75	969	1480	0.5	2220	46.2 %
22	0.837	73.8	1.84	448	894	0.5	718	32 %
24	0.94	105	2.94	330	209	0.3	198	12 %
26	0.62	35	0.745	969	900	0.5	830	17 %
27	1.61	19.7	0.897	1690	2078	0.5	2785	33.2 %
28	0.977	28.4	0.663	1177	2130	0.5	1743	29.9 %
31	0.614	110	2.77	304	133	0.333	140	9.74 %
32	1.03	24	1.36	1395	1395	0.5	3810	54.7 %
44	1.23	60.4	2.06	559	384	0.933	646	23.7 %
45	1.4	22.1	1.04	1501	627	1.00	1140	15.7 %
47	0.638	22.2	0.495	1500	2146	0.5	2140	28.6 %

Ejemplo D.

La eficacia terapéutica de los compuestos FXR se evaluó en el modelo NASH inducido por STZ+DEN+HFD en ratones macho C57BL/6. Brevemente, se inyectó estreptozocina (STZ) en la semana 2 a ratones C57BL/6 macho recién nacidos para introducir diabetes y dietilnitrosamina (DEN) en la semana 4 para promover la fibrosis hepática. Los ratones que no recibieron STZ ni DEN se usaron como control negativo (Grupo 1, n=12) y se alimentaron con una dieta normal. En la semana 6, se seleccionaron 60 ratones diabéticos (glucosa en sangre >12mmol/l después de 6 h de ayuno) y se alimentaron con una dieta rica en grasas (HFD, dieta que contiene 60 kcal % de grasa). Después de una semana en HFD, los animales se asignaron al azar en 5 grupos según el peso corporal: Grupo 2 (n=12), grupo de enfermedad modelo, sin tratamiento con compuestos; Grupo 3 (n=10), grupo de control positivo, tratado con OCA (30 mg/kg); Grupo 4 (n=12), tratado con el compuesto 1 (3 mg/kg); Grupo 5 (n=12), tratado con el compuesto 1 (10 mg/kg); Grupo 6 (n=12), tratado con el compuesto 1 (30 mg/kg). Los OCA y los compuestos 1 fueron PO QD, durante 7 semanas. El día después de la última dosis, se sacrificaron todos los animales y se fijaron los tejidos hepáticos con formalina para la evaluación patológica.

La Figura 1 muestra la reducción de la puntuación NAS después del tratamiento con el compuesto 1 en el modelo de enfermedad de ratones STZ+DEN+HFD. La Figura 2 muestra la reducción de la fibrosis hepática después del tratamiento con el compuesto 1 en el modelo de enfermedad de ratones

STZ+DEN+HFD. Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento del compuesto 1 a dosis baja (3 mg/kg), dosis media (10 mg/kg) y dosis alta (30 mg/kg), respectivamente, mostró una disminución dependiente de la dosis en la esteatosis de los hepatocitos ($p<0.001$). El grupo de 30 mg/kg mostró una puntuación NAS disminuida en un 46.2 % en comparación con el grupo modelo. El grupo de control positivo (OCA 30 mg/kg) también mostró una disminución en la puntuación NAS. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento del compuesto 1 a dosis bajas (3 mg/kg) y altas (30 mg/kg) inhibió significativamente el progreso de la fibrosis hepática y el grupo de dosis de 30 mg/kg redujo el porcentaje de cirrosis en un 15.2 %. En conclusión, después de un tratamiento de 7 semanas a 30 mg/kg por día, el compuesto 1 disminuye significativamente la puntuación NAS y la fibrosis hepática.

Ejemplo E

La eficacia terapéutica de los compuestos FXR se evaluó en el modelo NASH inducido por DEN+HFD+CHOL en ratas macho SD.

Las ratas macho recién nacidas recibieron una inyección de DEN en la semana 2 después del nacimiento para generar el modelo NASH. Los animales de control negativo (Grupo 1, $n=10$) no recibieron inyección de DEN. En la semana 4, 50 ratas que recibieron inyecciones de DEN comenzaron la dieta HFD+CHOL (60 kcal % de grasa + 1.25 % de colesterol + 0.5 % de colato) durante 8 semanas, mientras que los animales de control negativo seguían con una dieta normal. En la Semana 5, las ratas tratadas con DEN se asignaron aleatoriamente a 5 grupos (Grupo 2-6) según el peso corporal. Grupo de enfermedad (Grupo 2, $n=10$), no recibió tratamiento; grupo OCA (Grupo 3, $n=10$) recibió OCA a 30 mg/kg. Los grupos 4-6 ($n=10$ cada uno) recibieron el compuesto 1 en dosis bajas (3 mg/kg), medias (10 mg/kg) y altas (30 mg/kg). Los OCA y el compuesto 1 se administraron PO QD, durante 7 semanas. El día después de la última dosis, se sacrificaron todos los animales y se fijaron los tejidos hepáticos con formalina para la evaluación patológica.

La Figura 3 muestra la reducción de la puntuación NAS después del tratamiento con el compuesto 1 en ratas tratadas con DEN+HFD+CHOL. La Figura 4 muestra la reducción de la fibrosis hepática después del tratamiento con el compuesto 1 en ratas tratadas con DEN+HFD+CHOL.

Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento del compuesto 1 a dosis bajas (3 mg/kg), medias (10 mg/kg) y altas (30 mg/kg), respectivamente, mostró una disminución dependiente de la dosis en la puntuación NAS (todas $p<0.001$). La puntuación NAS del grupo de 30 mg/kg se redujo en un 42.9 % en comparación con el grupo modelo (Grupo 2). El control positivo (OCA 30 mg/kg) también mostró una disminución en la puntuación NAS ($p<0.001$). Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento

del compuesto 1 a dosis baja (3 mg/kg), media (10 mg/kg) y alta (30 mg/kg), inhibió significativamente el progreso de la fibrosis hepática (ambos $p < 0.01$). El grupo de tratamiento con 30 mg/kg redujo el porcentaje de cirrosis en un 28.0 %.