

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I**



TESIS DOCTORAL

**Diseño, síntesis y estudio de 1,3,4-tiadiazoles como
inhibidores de la enoil-ACP-reductasa (InhA) de
*M. tuberculosis***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Fernández Menéndez

DIRECTORAS

**Julia Castro Pichel
Esther Fernández Velando**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE 1,3,4-
TIADIAZOLES COMO INHIBIDORES DE LA
ENOIL-ACP-REDUCTASA (InhA) DE *M.*
*TUBERCULOSIS***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Raquel Fernández Menéndez

Bajo la supervisión de las Doctoras:

Julia Castro Pichel

Esther Fernández Velando

MADRID, 2015

A Orencio y Pilar,

A mis sobrinas, Cristina y Paula

Si te caes siete veces, levántate ocho

Proverbio chino

***El genio comienza las grandes obras,
pero sólo el trabajo las acaba***

Joseph Joubert

Agradecimientos

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el departamento química del Centro de Enfermedades de Países en Vías de Desarrollo (DDW), perteneciente a la compañía GlaxoSmithKline, S.L. Y ha sido posible gracias a la financiación de la Global Alliance for TB (GATB), institución a la que quiero mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Nicholas Cammack, Vicepresidente Senior y Director del Campus de Tres Cantos para las Enfermedades de Países en Vías de Desarrollo y al Dr. David Barros Aguirre, Director de la Unidad de Tuberculosis del DDW, por permitirme aprovechar la oportunidad de publicar este trabajo de investigación.

También quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. Julia Castro Pichel y Esther Fernández Velando, directoras de esta tesis, sin las cuales este trabajo no habría sido posible.

Esther, gracias por guiarme en los comienzos en el laboratorio y en los primeros pasos de esta memoria, por tu cariño, confianza y apoyo.

Julia, gracias por tu dedicación, esfuerzo personal y compromiso, por tus inestimables consejos y por tu apoyo durante estos años.

Quiero agradecer al Dr. Robert Bates, por su comprensión y ayuda.

A todo el personal del DDW que ha colaborado en los diferentes aspectos de esta tesis, en especial a Jesús Gómez, por su buen hacer y eficacia.

A todos los compañeros del DDW que me han mostrado su apoyo y amistad.

I want to specially thank Dr. Fraser Cunningham, for his support, help and good laboratory times over the last two years.

A todos mis amigos del Consejo y de Oviedo, con todo mi cariño.

Y a Juan, por su paciencia, comprensión y por animarme en los momentos difíciles.

Y finalmente a mi familia. A mis padres, por todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho por mí, por las enseñanzas que me han transmitido y por su cariño; a mis hermanas por su apoyo incondicional y a mis sobrinas, por transmitirme su energía e ilusión.

A todos, gracias.

ÍNDICE

NOTA SOBRE NOMENCLATURA, PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS.....	i
ABREVIATURAS	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TUBERCULOSIS: DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	1
1.2.EPIDEMIOLOGÍA	2
1.3.TRANSMISIÓN Y PATOGÉNESIS.....	3
1.4.TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS: FÁRMACOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA Y NUEVOS FÁRMACOS EN DESARROLLO CLÍNICO	6
1.4.1. Fármacos de primera línea.....	7
1.4.2. Tratamiento de la tuberculosis sensible	7
1.4.3. Tratamiento de la tuberculosis resistente.....	8
1.4.4. Fármacos antituberculosos en desarrollo clínico	9
1.4.5. Necesidad de nuevos medicamentos contra la tuberculosis	14
1.5.ENOYL-ACP REDUCTASA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> (InhA) COMO DIANA CONTRA LA TUBERCULOSIS	16
1.5.1. Isoniazida e inhibidores derivados.....	18
1.5.2. Triclosán e inhibidores derivados	20
1.5.3. Diazaborinas e inhibidores derivados	21
1.5.4. Inhibidores de InhA identificados en campañas de cribado de alto rendimiento (HTS).....	21
1.5.5. Modo de unión	28
1.6.TIADIAZOLES: NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DIRECTOS DE InhA.....	24
1.6.1. Modo de unión	25
1.6.2. La familia de los tiadiazoles	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.1. QUIRALIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PROTOTIPO GSK1 ..	30
3.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE LOS 1,3,4-TIADIAZOLES CON PIRAZOL EN LA PARTE DERECHA Y DISTINTOS <i>N</i> -BENCILPIRAZOLES EN LA PARTE IZQUIERDA	31

3.2.1. Síntesis general de los 1,3,4-tiadiazoles con 3,5-dimetilpirazol y 3-metilpirazol como parte derecha.....	32
3.2.1.1. Reacción de bencilación del 3-acetamido- <i>N</i> -1 <i>H</i> -pirazol (4a)	33
3.2.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido- <i>N</i> -bencilpirazoles 5^a - 5^o	36
3.2.1.3. Síntesis de los isotiocianatos 7a-7q	38
3.2.1.4. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol 9-27 y 39-40	39
3.2.2. Actividad biológica y análisis de los resultados	41
3.3. NUEVOS DERIVADOS DE 1,3,4-TIADIAZOL CON 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETANOL COMO PARTE DERECHA.....	45
3.3.1. Síntesis de la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida (53b).....	46
3.3.2. Síntesis de nuevos derivados de 1,3,4-tiadiazol con 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha.....	47
3.3.3. Actividad biológica y análisis de los resultados	48
3.3.4. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros 58 y 59	50
3.3.5. Perfil biológico <i>in vitro</i> del compuesto 58	50
3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA REGIÓN IZQUIERDA: COMPUESTOS HETEROAROMÁTICOS	53
3.4.1. Síntesis de los 1,3,4-tiadiazoles con piridina como reemplazo del grupo arilo y 3,5-dimetilpirazol como región derecha.....	53
3.4.1.1. Reacción de alquilación del 3-acetamido- <i>N</i> -1 <i>H</i> -pirazol (4a).....	55
3.4.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido- <i>N</i> -bencilpirazoles (61a-61g).....	56
3.4.1.3. Síntesis de los isotiocianatos 63a-63h	57
3.4.1.5. Síntesis de los derivados del 1,3,4-tiadiazol 64-71	58
3.4.2. Actividad biológica, estabilidad microsomal <i>in vitro</i> y análisis de los resultados	58
3.4.3. Síntesis química de los 1,3,4-tiadiazoles con piridinas como reemplazo del grupo arilo y 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha	62
3.4.3.1. Síntesis de los mesilatos 75b , 75c	62
3.4.3.2. Reacción de alquilación de los 3-acetamido- <i>N</i> -1 <i>H</i> -pirazol 4a y 4b y del ftalimido- <i>N</i> -1 <i>H</i> -pirazol (34a)	63
3.4.3.3. Reacción de desprotección de los 3-acetamido- <i>N</i> -(1-(piridin-2-ilmetil)-1 <i>H</i> -pirazoles 78a-78c	64

3.4.3.4. Síntesis de los isotiocianatos 81a-81b, 81d-81h	65
3.4.3.5. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol 82-89	66
3.4.4. Actividad biológica, estabilidad microsomal <i>in vitro</i> y análisis de los resultados	67
3.4.5. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros 90 y 91	73
3.4.5.1. Perfil biológico <i>in vitro</i> del compuesto 90	74
3.5.OPTIMIZACIÓN DE LA REGIÓN IZQUIERDA: OTROS HETEROCICLOS	76
3.5.1. Síntesis química de otros heterociclos como reemplazo del grupo arilo....	76
3.5.1.1. Reacción de alquilación del 3-acetamido- <i>N</i> -1 <i>H</i> -pirazol (4a).....	76
3.5.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido- <i>N</i> -bencilpirazoles 93a-93f	77
3.5.1.3. Síntesis de los isotiocianatos 97a-97h	78
3.5.1.4. Síntesis de los derivados del 1,3,4-tiadiazol 98-105	78
3.5.2. Actividad biológica, estabilidad microsomal <i>in vitro</i> y análisis de los resultados	79
3.6.3. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros 106 y 107	82
3.6.4. Perfil biológico <i>in vitro</i> del compuesto 106	84
3.6.5. Modo de unión del compuesto 106	84
3.6.5. Perfil biológico <i>in vivo</i> del compuesto 106	85
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	88
5. CONCLUSIONES.....	205
6. REFERENCIAS	209
7. RESUMEN EN INGLÉS.....	219

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS

En esta memoria se ha usado el sistema de numeración inglesa, simplificando así la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de numeración inglesa. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, habiendo sido aceptado este sistema por la Real Academia Española de la Lengua, como se recoge en el Diccionario Panhispánico de Dudas, desde su primera edición en octubre de 2005.

Hay terminología científico-técnica que frecuentemente se utiliza de forma abreviada, pero para la cual en la versión en español no existe o no se utiliza una abreviatura; en estos casos se ha utilizado la abreviatura inglesa.

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado las abreviaturas y acrónimos comunes en química orgánica siguiendo las recomendaciones de “Guidelines for Authors” revisadas en el *Journal of Medicinal Chemistry*, en mayo 2015 (disponible en: http://pubs.acs.paragonplus/submission/jmcmr/jmcmr_abbreviations.pdf). Consultado el 26 de octubre de 2015), empleándose concretamente los indicados a continuación.

La nomenclatura y símbolos de aminoácidos empleados han sido los recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides”, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 56,595-674).

ABREVIATURAS

Å	amstrong(s)
ac.	acuoso
ACN	acetonitrilo
ADMET	absorción, distribución, metabolismo, excrección y toxicidad
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADPR	adenosina 5'-difosfato ribosa
AMP	(del inglés: artificial membrane permeability) = permeabilidad artificial de membrana
anh	anhidro
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
AUC	(del inglés: area under curve) = área bajo la curva
BCG	bacillus Calmette–Guérin
c.c.f	cromatografía de capa fina
CAR	(del inglés: constitutive androstane receptor) = receptor androstano constitutivo
CFUs	(del inglés: colony forming units) = unidades formadoras de colonias
CLND	(del inglés: chemiluminescent nitrogen detection) = detección de nitrógeno por quimioluminiscencia
cm	centímetro(s)
Cmax	concentración máxima
comp.	compuesto
conc.	concentrado
¹³C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono
cuant.	cuantitativo
CYP3A4	citocromos 3A4

DCM	diclorometano
DdCoA	dodecenoil coenzima A
Ddn	(del inglés: deazaflavine nitroreductase dependent) = nitroreductasa dependiente de deazaflavina
DDW	(del inglés: diseases of the developing world) = enfermedades de países en vías de desarrollo
DMF	dimetilformamida
DMSO-<i>d</i>₆	dimetilsulfóxido deuterado
DNAUC	(del inglés: dosed normalized area under curve) = área normalizada bajo la curva
DOTS	(del inglés: directly observed therapy short-course) = tratamiento directamente observado de corta duración
ED99	(del inglés: efficacious dose) = dosis efectiva 99
EMB	etambutol
eq.	equivalentes
EtOH	etanol
F	biodisponibilidad
FAS	(del inglés: fatty acid synthesis) = síntesis de ácidos grasos
FAD	(del inglés: food and drug administration) = agencia del medicamento y alimentación
g	gramo(s)
h	hora(s)
HB	(del inglés: hydrogen bond) = Enlace de hidrógeno
HMBC	(del inglés: heteronuclear multibond correlation) = correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	(del inglés: heteronuclear single quantum correlation) = correlación heteronuclear de cuanto sencillo
HPLC	(del inglés: High Performance Liquid Chromatography) = Cromatografía Líquida de Alta Resolución

hPXR	(del inglés: human pregnane X receptor) = receptor humano X pregnano
¹H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
HSA	(del inglés: human serum albumine) = albúmina de suero humano
HTS	(del inglés: high throughput screening) = campaña de cribado de alta densidad
Hz	hercio(s)
IC50	concentración inhibitoria 50
IC95%	intervalo de confianza 95%
IL-1	interleucina-1
INH	isoniazida
IPA	isopropanol
J	constante de acoplamiento
Kg	kilogramo(s)
Ki	constante de inhibición
LTBI	(del inglés: latent tuberculosis infection) = infección latente de tuberculosis
MDR	(del inglés: multidrug resistant) = multirresistente
MeOH	metanol
MHz	megahercio(s)
MIC	concentración mínima inhibitoria
mL	mililitro(s)
mmol	milimole(s)
MoA	(del inglés: mode of action) = modo de acción
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	concentración normal
NAD	(del inglés: nicotinamide adenine dinucleotide) = nicotinamida-adenin-dinucleótido

NADH	(del inglés: nicotinamide adenine dinucleotide reduced) = nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido
nM	concentración nanomolar
OMS	organización mundial de la salud
PAS	ácido <i>p</i> -aminosalicílico
ppm	partes por millón
PZA	pirazinamida
RIF	rifampicina
Rto.	rendimiento
SAR	(del inglés: structure activity relationship) = relación estructura actividad
sat.	saturada
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM	estreptomina
TB	tuberculosis
THF	tetrahidrofurano
Tmax	tiempo al que se alcanza la concentración máxima
TMS	trimetilsilil
tol	tolueno
TPSA	(del inglés: total polar surface area) = área total de la superficie polar
ug	Microgramo(s)
VCD	(del inglés: vibrational circular dichroism) = dicroísmo circular vibracional
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
XDR	(del inglés: extensively drug resistant) = ampliamente resistente

LISTADO DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Ácido Aspártico	Asp
Cisteína	Cys
Ácido Glutámico	Glu
Glutamina	Gln
Glicina	Gly
Histidina	His
Iso-leucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TUBERCULOSIS: DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a los pulmones, pero puede propagarse a otros órganos.

La especie de bacteria más importante y representativa causante de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 1).

En la actualidad sigue siendo la principal causa de mortalidad entre las enfermedades infecciosas, después del VIH y, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi un tercio de la población mundial, está infectada por la bacteria¹.

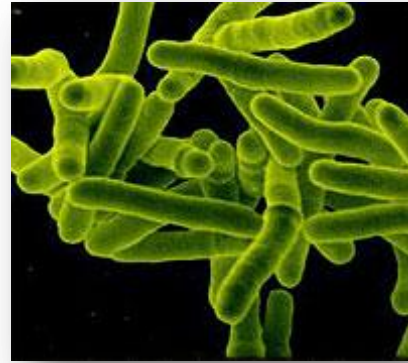


Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis*.

Es importante destacar que no todas las personas infectadas por la micobacteria desarrollan tuberculosis, sino que pueden generar dos tipos de infección: la infección latente de tuberculosis (LTBI) y la tuberculosis activa. La infección latente de tuberculosis es asintomática y las personas infectadas no son infecciosas aunque pueden desarrollar en un futuro tuberculosis activa. Alrededor del 10% de los pacientes con infección latente desarrollará tuberculosis activa en algún momento de sus vidas siendo el riesgo considerablemente mayor en los primeros dos años de infección y para las personas que tienen sistemas inmunológicos deprimidos, por ejemplo, los infectados con el VIH. Las personas con tuberculosis activa experimentan síntomas como tos, fiebre y pérdida de peso y necesitan tratamiento para su curación, además son infecciosas pudiendo contagiar la tuberculosis a los demás. La tuberculosis es una enfermedad grave y puede llevar a la muerte si no se la trata².

Desde el punto de vista histórico, existen evidencias de infección de tuberculosis en momias del antiguo Egipto (mal de Pott), sin embargo epidemiológicamente se convirtió en un problema grave durante los siglos XVIII-XIX, debido a distintos factores socio-económicos. El hacinamiento en los medios urbanos, asociado con la Revolución Industrial, generó circunstancias epidemiológicas que favorecieron su

propagación. La tuberculosis fue definida como entidad clínica con el término de “tuberculosis” en 1830 y el bacilo fue identificado por Koch en 1882. Durante el siglo XX, se produjo en Europa un declive “natural” de la enfermedad, seguramente debido a la mejora de las condiciones socio-económicas, con una disminución de casos de un 5-10% anual y a partir del descubrimiento de la estreptomina en 1946, este declive se hizo más patente, con disminución de un 12-20% anual. Sin embargo desde el año 1985 hubo un rebrote significativo de casos, coincidiendo con la epidemia de SIDA³.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad la tuberculosis continúa siendo un problema grave de salud a nivel mundial. Aunque el número de nuevos casos de TB se ha reducido a nivel mundial durante el último decenio cayendo un 2% por año, se estimó que había 9 millones de nuevos casos de tuberculosis en 2013 (Fig. 2) y 1.5 millones de muertes causadas por la enfermedad, de los cuales 400.000 fueron casos de personas coinfectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además se sitúa como una de las principales causas de muerte entre las mujeres, con 330.000 muertes en mujeres VIH-negativas y 180.000 VIH-positivas.

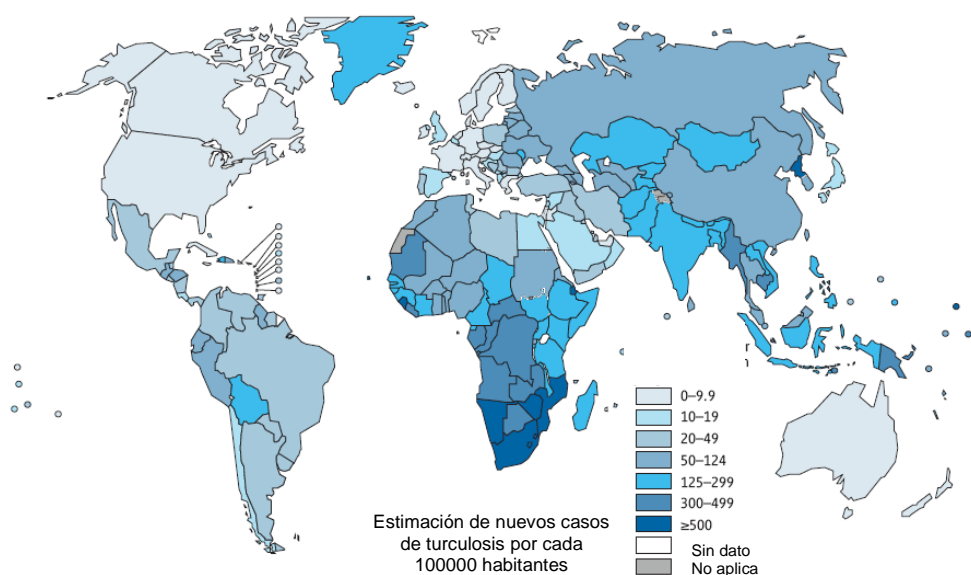


Figura 2. Estimación de la tasa de incidencia de nuevos casos de TB, 2013 (Informe mundial anual de la OMS, Tuberculosis 2014)¹.

En relación a la tuberculosis resistente se registraron a nivel mundial 480.000 nuevos casos de tuberculosis multirresistente (TB-MDR) en 2013 y 210.000 muertes causadas por TB-MDR, suponiendo una tasa de mortalidad del 44%. Si bien, se estima en promedio que el 9,0% de los pacientes que reportó TB-MDR presentaba tuberculosis ampliamente resistente (TB-XDR).

Mientras que en los países industrializados, con buenos sistemas públicos de asistencia sanitaria se puede esperar que la tuberculosis se mantenga bajo control, en la mayoría de los países en vías de desarrollo se presenta como un grave problema. Prueba de ello es que la mayoría de los casos detectados tuvieron lugar en Asia (58%) y África (27%), un menor número de casos tuvo lugar en la Región del Mediterráneo Oriental (8%), en Europa (4%) y en América (3%). A pesar de ello la tasa de mortalidad ha disminuído un 45% desde 1990 y el mundo está en camino de lograr el objetivo de desarrollo global de un 50% de reducción para el año 2015¹.

1.3. TRANSMISIÓN Y PATOGÉNESIS

M. tuberculosis se transporta por el aire soportada en minúsculas gotitas (aerosoles) de 1-5 micras de diámetro. Estas partículas infectadas con la micobacteria se generan cuando las personas que presentan la enfermedad en su forma activa tosen, gritan o estornudan (Fig. 3).

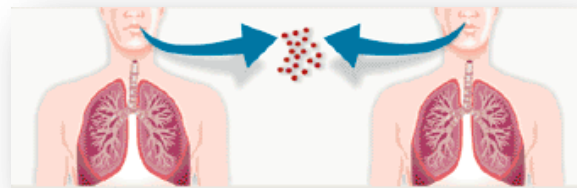


Figura 3. La tuberculosis se contagia fundamentalmente, por vía aérea a través de las secreciones que la persona infectada expulsa al toser, estornudar, hablar o reírse.

M. tuberculosis se transmite por el aire, no por contacto entre superficies y dependiendo de las condiciones medioambientales, esas gotas pueden permanecer suspendidas en el aire durante varias horas. La transmisión tiene lugar cuando una persona inhala las partículas infectadas, que a través de la boca o de las fosas nasales, alcanzan el tracto respiratorio y los bronquios llegando a los alvéolos pulmonares. Existen cuatro factores clave que controlan la transmisión de *M. tuberculosis*: la exposición, la susceptibilidad de la persona expuesta, el nivel de infección de la persona infectada y los factores medioambientales⁴.

Cuando *M. tuberculosis* consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria y en respuesta, los macrófagos alveolares acuden al lugar de la infección e ingieren los bacilos para ser luego transportados hacia el sistema de drenaje linfático. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí solos al bacilo tuberculoso en estas primeras etapas parece ser muy escasa, quizá porque su función se ve interferida por las sustancias liberadas por *M. tuberculosis*, de modo que los bacilos siguen dividiéndose a pesar de la acción macrofágica durante unas semanas, hasta que la interleucina 1 (IL-1) fabricada por el macrófago favorece que los linfocitos T reconozcan los antígenos bacilares procesados por los macrófagos. Cuando estos linfocitos T encuentran el complejo macrófago-antígeno, son activados produciéndose una expansión clonal de linfocitos T que producen citoquinas, activando y atrayendo más macrófagos al sitio de la infección para constituir un granuloma. Estos granulomas están constituidos por macrófagos transformados en células epitelioides, que tienen una mayor capacidad microbicida y por células gigantes multinucleares tipo Langhans, que son macrófagos cuyos núcleos se disponen periféricamente rodeando al antígeno tuberculoso. Las células epitelioides segregan una sustancia estimuladora de los fibroblastos que produce colágeno y contribuye a limitar la periferia del granuloma mediante un área de fibrosis. Cuando los linfocitos T activados alcanzan un cierto número, los macrófagos comienzan a producir una gran cantidad de enzimas líticas con capacidad bactericida y capaz de producir necrosis celular, característica del granuloma tuberculoso (Fig. 4). La necrosis se refiere a células muertas que, bajo el microscopio aparecen como una masa de escombros sin forma, sin presentar núcleos. Un término relacionado, "caseificación" se refiere a una forma de necrosis que, a simple vista, parece similar al queso ("caseosa"), y por lo general una característica de los granulomas de la tuberculosis. La identificación de la necrosis en los granulomas es importante porque los granulomas con necrosis suelen tener causas infecciosas. Hay varias excepciones a esta regla general, pero no deja de ser útil para el día a día de los diagnósticos.

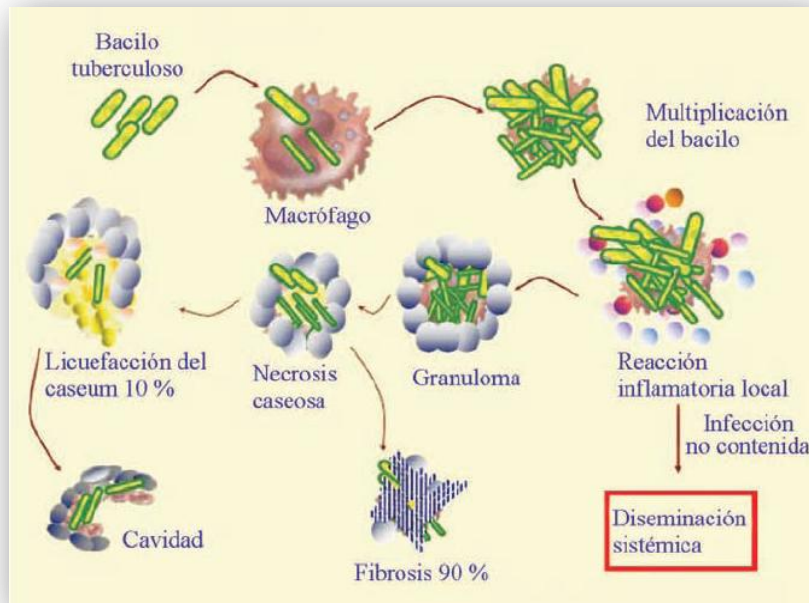


Figura 4. Patogénesis de *M. tuberculosis*⁵.

En la mayoría de los individuos inmunocompetentes (90%) la respuesta inmunitaria frena la infección limitándola al foco primario de la invasión, el parénquima pulmonar y los ganglios linfáticos locales que drenan ("complejo de Ghon"). En el 10% restante de los individuos inmunocompetentes, la infección no es contenida por el sistema inmunitario y la replicación de los bacilos continúa (tiempo de duplicación de 25 a 32 h). En estos casos aparecen los síntomas de la enfermedad y la patología asociada, incluyendo necrosis de los tejidos y la cavitación. En la mayoría de estos casos (95%), los pacientes responden al tratamiento con antibióticos alcanzando la curación clínica⁶.

Puede ocurrir que antes del desarrollo de la respuesta inmunitaria celular se produzca una diseminación vía sistema linfático-circulatorio dando lugar a siembra de bacilos en diversos tejidos: zonas apicales de pulmón, vértebras, epífisis de huesos largos etc. y a lesiones secundarias donde se forman pequeños núcleos caseosos. En estas lesiones caseosas residen los bacilos, cuya replicación y difusión está controlada por la respuesta inmune del huésped y que condiciona la posterior evolución a la enfermedad en su forma activa tras períodos largos de latencia. Este fenómeno ocurre en el aproximadamente 5% de los individuos infectados de forma latente y se define como la reactivación de la enfermedad^{6,7}.

1.4. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS: FÁRMACOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA Y NUEVOS FÁRMACOS EN DESARROLLO CLÍNICO

Después de 130 años del descubrimiento del agente etiológico de la tuberculosis, la enfermedad aún sigue siendo una amenaza. Una de las principales razones es la extraordinaria capacidad de adaptación a medios adversos que presenta la micobacteria. Un ejemplo es la habilidad para generar resistencias a fármacos antituberculosos. Cuando la micobacteria se expone a una presión selectiva de fármacos es capaz de provocar las mutaciones genéticas pertinentes que le confieren resistencia a dichos fármacos⁸. Debido a la aparición de estas resistencias se hizo necesario el uso de la terapia de combinación para tratar la enfermedad. Por ello, hoy en día los regímenes de tratamiento consisten en diferentes combinaciones de medicamentos dependiendo de las circunstancias⁹. Por ejemplo, algunos medicamentos para la tuberculosis sólo se utilizan para el tratamiento de la tuberculosis sensible, como es el caso de pacientes nuevos en los que es muy poco probable tengan resistencia a alguno de los fármacos utilizados. En el caso de presentar resistencias se utilizan fármacos de segunda línea, que generalmente son menos eficaces o más tóxicos con efectos secundarios graves. En la Figura 5 se describe la cronología del desarrollo de fármacos antituberculosos así como los hechos claves en la historia de la tuberculosis.

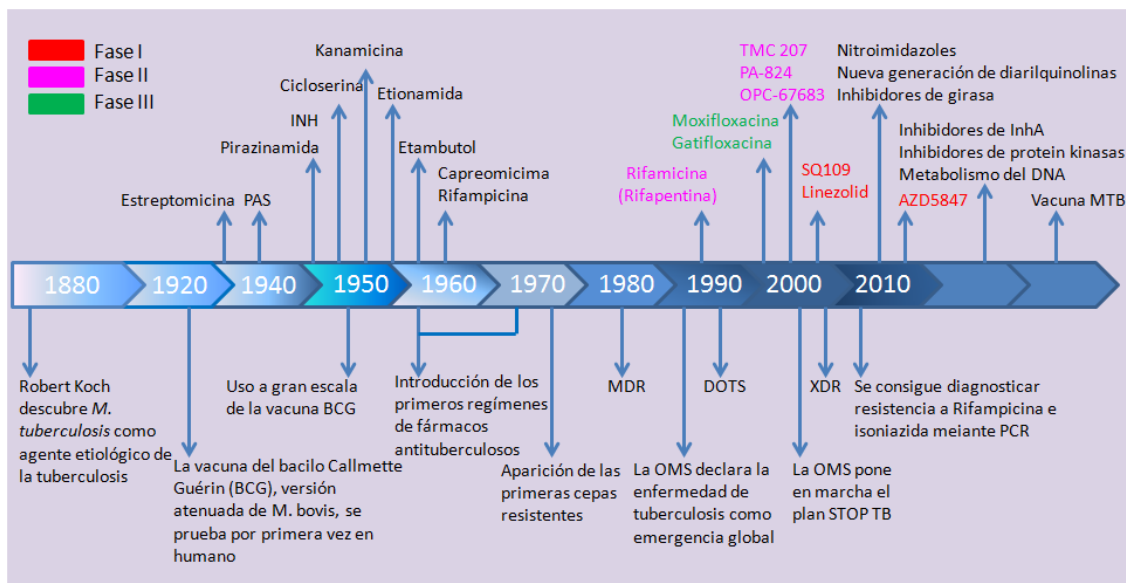


Figura 5. Historia de la tuberculosis y desarrollo de los fármacos antituberculosos.

1.4.1. Fármacos de primera línea

Los cinco fármacos antituberculosos básicos o de primera línea son: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomicina¹⁰, Figura 6.

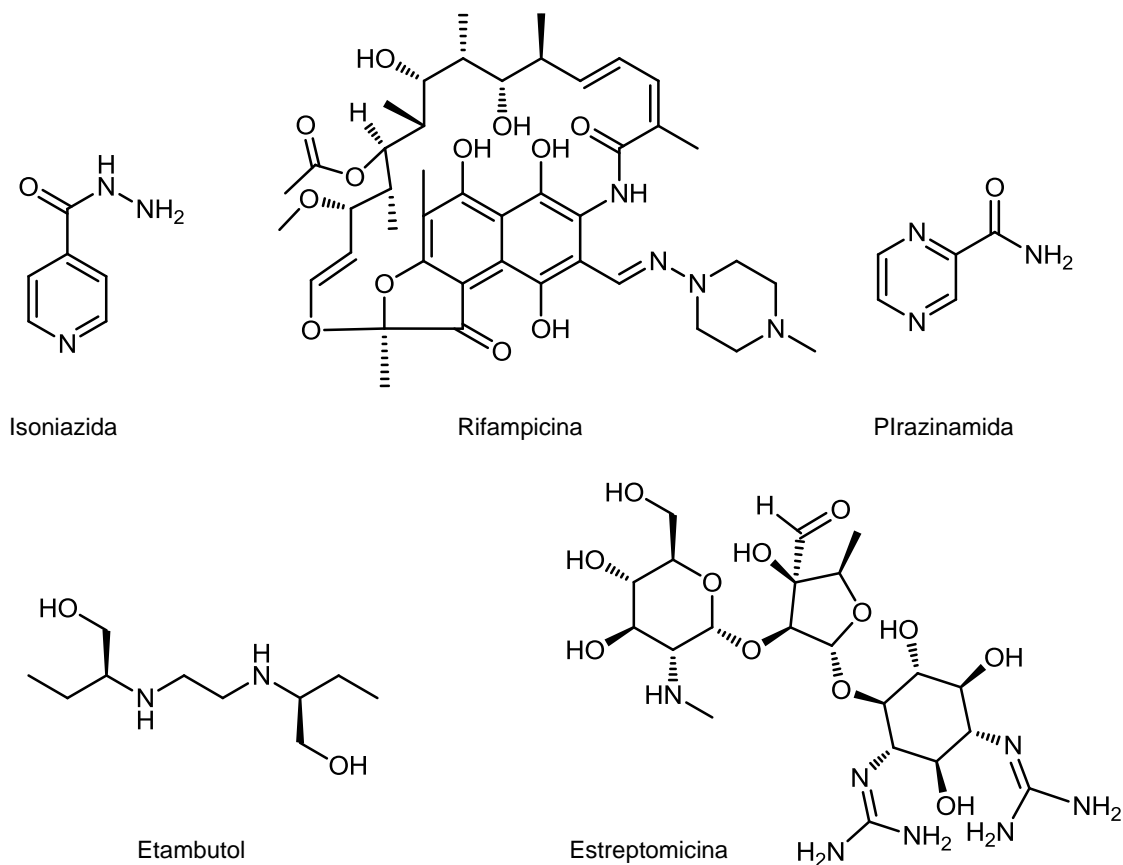


Figura 6. Estructura de los fármacos de primera línea.

Generalmente estos fármacos son los más eficaces en el tratamiento de la tuberculosis. Se emplean sobre todo en el tratamiento de la tuberculosis en forma activa que no ha sido tratada previamente con antituberculosos.

1.4.2. Tratamiento de la tuberculosis sensible

La tuberculosis sensible es aquella que no presenta resistencias a ninguno de los fármacos antituberculosos. En el caso de pacientes nuevos, que o bien no han recibido ningún tipo de tratamiento contra la tuberculosis, o que sólo han recibido menos de un mes de medicación se presupone que presentan este tipo de tuberculosis a menos que haya un alto nivel de resistencia a isoniazida en la zona, o si el paciente ha desarrollado tuberculosis activa después de que haya tenido contacto con un paciente que presenta tuberculosis resistente¹⁰.

En el caso de pacientes con tuberculosis sensible el tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) consiste en una fase intensiva de dos meses de tratamiento, seguida de una fase de continuación de cuatro meses.

La fase intensiva del tratamiento es crucial para prevenir la aparición de resistencias a fármacos y es determinante en el resultado final del tratamiento. En esta fase se emplea un cóctel de cuatro fármacos de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) o estreptomina (SM). En la fase de continuación se combinan INH y RIF.

El seguimiento rutinario después del tratamiento no es necesario para aquellos pacientes que han tenido una respuesta satisfactoria pero si el tratamiento fracasa como resultado de la resistencia bacteriana, o intolerancia a uno o más medicamentos, se utilizan fármacos de segunda línea, como el ácido *para*-aminosalicílico (PAS), kanamicina, fluoroquinolonas, capreomicina, etionamida y cicloserina, que generalmente son menos eficaces o más tóxicos con efectos adversos.

Para el correcto funcionamiento del tratamiento por quimioterapia, así como la prevención de la generación de cepas resistentes durante el mismo, es imprescindible un suministro ininterrumpido de medicamentos de alta calidad y un diagnóstico altamente fiable. Aunque la tuberculosis se puede curar con quimioterapia, el tratamiento es excesivamente largo (6-9 meses). La larga duración de la terapia conlleva aparte de una toxicidad significativa, el incumplimiento por los pacientes de la misma, siendo ésta la razón principal para la aparición de las multiresistencias. Desde este punto de vista, el compromiso político y administrativo de muchos países ha propiciado el denominado programa DOTS¹¹ (tratamiento directamente observado de corta duración). Este programa consiste en comprobar mediante observación directa que el enfermo ha ingerido la medicación de la forma prescrita. Esta observación debe realizarla personal especializado y acompañarse de un sistema de registro e información exhaustiva con sistemas de alarma que identifiquen el incumplimiento o el abandono del tratamiento.

1.4.3. Tratamiento de la tuberculosis resistente

Se habla de tuberculosis resistente cuando las bacterias causantes de la infección presentan resistencia al menos a uno de los fármacos de primera línea. La tuberculosis multiresistente (TB-MDR) es la tuberculosis resistente a por lo menos dos de los fármacos más eficaces en el tratamiento de tuberculosis: isoniazida y rifampicina. En el

caso de que la tuberculosis sea resistente a isoniazida y rifampicina, a todas las fluoroquinolonas y al menos a uno de los medicamentos inyectables de segunda línea (Tabla 1) se habla de tuberculosis ampliamente resistente (TB-XDR).

La resistencia a fármacos se demuestra mediante pruebas de susceptibilidad. Sin embargo, ya que esta prueba puede tardar semanas, el tratamiento debe iniciarse con un régimen experimental indicado por expertos en cuanto se sospeche de la posible resistencia. Cuando se conozcan los resultados de las pruebas, el régimen debe ser ajustado. Los pacientes deben ser monitorizados durante todo el tratamiento mediante terapia de observación directa (DOTS)¹¹.

Los medicamentos empleados en el tratamiento de la tuberculosis resistente, se agrupan en función de su eficacia, de la experiencia en su uso, y de la familia de fármacos a la que pertenecen. La clasificación se muestra a continuación.

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la tuberculosis resistente.

Grupo	Fármacos	Grupo	Fármacos
Grupo 1: Agentes orales de primera línea	pirazinamida etambutol rifabutina	Grupo 4: Agentes bacteriostáticos orales de segunda línea.	ácido para-aminosalicílico cicloserina terizidona etionamida protionamida
Grupo 2: Agentes inyectables	kanamicina amikacina capreomycin estreptomina	Grupo 5: Agentes eficaces pero sin un claro papel en el tratamiento	clofazimina linezolid amoxicilina / ácido clavulánico tioacetazona imipenem / cilastatina altas dosis de isoniazida claritromicina
Grupo 3: Fluoroquinolonas	levofloxacino moxifloxacina ofloxacina		

1.4.4. Fármacos antituberculosos en desarrollo clínico

A pesar de la situación mundial actual, los medicamentos contra la tuberculosis se han mantenido prácticamente sin cambios durante las últimas cuatro décadas.

En la actualidad, al menos diez compuestos se encuentran en diversas etapas de desarrollo clínico. Cuatro de ellos son fármacos que ya existían y se han utilizado con

distintas formulaciones para el tratamiento de TB. Los seis compuestos restantes, que se detallan a continuación, se están desarrollando específicamente para TB.

Diarilquinolinas: TMC207 (Bedaquilina)

La bedaquilina ha sido aprobada recientemente por la FDA para ser utilizada como parte de la terapia de combinación para el tratamiento de adultos con TB-MDR en el caso de que no haya otras alternativas disponibles¹². Este fármaco desarrollado en los laboratorios de Janssen Therapeutics es efectivo frente a cepas de *M. tuberculosis* tanto sensibles como resistentes.

La bedaquilina pertenece al grupo de las diarilquinolinas (Fig. 7) y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la subunidad c de la proteína ATP sintasa, disminuyendo así los niveles de ATP intracelulares¹³. Una característica atractiva de la bedaquilina es que resulta igualmente activa frente a las micobacterias tanto en estado de replicación como frente a aquéllas en estado latente¹⁴.

El grupo de Rao y colaboradores¹⁵ demostró que la síntesis *de novo* de ATP es esencial para la viabilidad de las micobacterias no replicantes, altamente susceptibles a la bedaquilina *in vitro*, un hallazgo que fue confirmado posteriormente utilizando un novedoso modelo de infección latente en ratón.

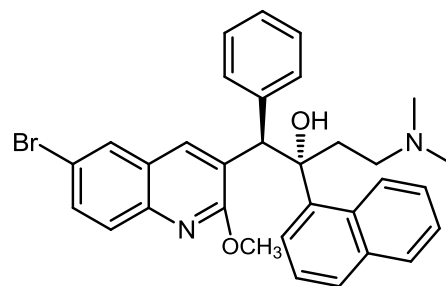


Figura 7. TMC207.

Hasta la fecha se han llevado a cabo los estudios clínicos de fase 2 con pacientes que padecen TB-MDR. El uso de bedaquilina no sólo fue capaz de reducir el tiempo de conversión del cultivo positivo a negativo sino que también aumentó considerablemente la proporción de pacientes cuyo esputo mostró un cultivo negativo¹⁶. Como característica negativa hay que destacar su potencial para inducir la arritmia cardíaca¹⁷. El uso compasivo de bedaquilina ya está disponible en varios países europeos y también en Sudáfrica¹⁸.

Nitroimidazoles: PA824 y OPC67683

Nitroimidazoles, como el clásico metronidazol (Fig. 8), se investigaron por primera vez como antituberculosos debido a su actividad conocida contra microorganismos anaerobios¹⁹.

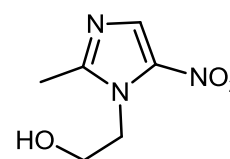


Figura 8. Metronidazol.

El metronidazol es capaz de matar a *M. tuberculosis in vitro* en condiciones de hipoxia, pero no en condiciones aeróbicas. Esta diferencia de actividad hace que presente resultados de eficacia dependientes del modelo animal que se utilice. Así metronidazol muestra una buena eficacia en el modelo de conejo, que posee granulomas caseosos, mientras que en el caso de los modelos de ratón y cobaya la eficacia es nula. En un estudio reciente en macacos cangrejeros (*cynomolgus*) que presentaron tuberculosis activa o latente, el tratamiento con metronidazol previno la reactivación de la infección latente²⁰. Cuando se administró junto con la isoniazida y la rifampicina, el metronidazol ayudó a acortar la duración de tratamiento requerido para curar la TB activa en monos²⁰.

En la actualidad dos compuestos pertenecientes al grupo de los nitroimidazoles PA824, desarrollado por la GATB (Global Alliance for TB) y OPC67683, desarrollado por la compañía farmacéutica Otsuka, se encuentran actualmente en la Fase II (PA-824)²¹ y la Fase III (OPC67683)²², respectivamente, para el tratamiento de la TB-MDR.

PA824 es activado intracelularmente por la nitroreductasa dependiente de la deazaflavina (Ddn). La forma activa se corresponde con el de-nitroimidazol correspondiente, capaz de generar especies reactivas de nitrógeno, incluyendo el óxido nítrico (NO), principales responsables

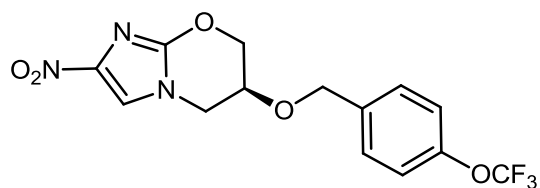


Figura 9. PA824.

de su actividad anaeróbica²³. La actividad de PA824 se restringe al complejo *M. tuberculosis*. Los estudios sobre el modo de acción de PA824 sugieren que la actividad de este compuesto se debe a un modo de acción “dual”²⁴. A diferencia de metronidazol PA824 si es activo frente a la forma aeróbica de la micobacteria y su mecanismo de acción se debe a la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos, mientras que el mecanismo frente a la anaeróbica es probablemente resultado del envenenamiento de la citocromo c oxidasa por óxido nitroso²⁴. PA824 ha progresado a ensayos clínicos de fase II y está siendo evaluado como un componente de nuevos regímenes^{25,26}.

OPC67683 (Delamanid) es un miembro de la familia nitroimidazo-oxazol, y aunque es una droga potencialmente eficaz para ambas TB resistente y TB sensible, en

la actualidad está siendo desarrollado inicialmente como tratamiento para dar en combinación frente a la tuberculosis resistente.

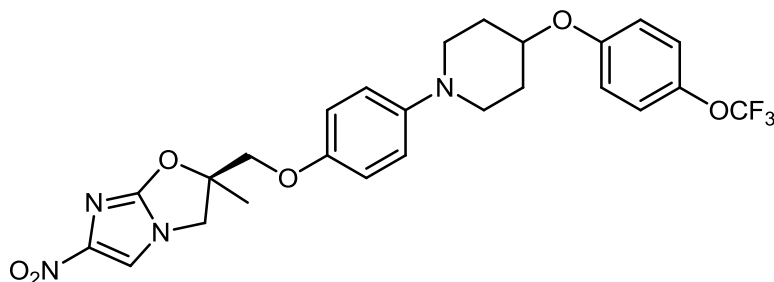


Figura 10. OPC67683 (Delamanid).

El modo de acción de OPC67683 se debe, muy probablemente, a la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos²⁷. Como PA-824, delamanid requiere de la reducción del grupo nitro por la Ddn para obtener la especie responsable de la actividad. Existen indicios para pensar que la forma activa actúa mediante la producción de NO o una especie radicalaria todavía no identificada que actúa aleatoriamente dentro de la micobacteria^{23,27-30}. Delamanid se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de la TB-MDR²².

Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son una clase de antibióticos de amplio espectro utilizados con frecuencia para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente como componentes de los regímenes de segunda línea. El mecanismo de acción de estos compuestos incluye la inhibición de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, que son esenciales en la replicación bacteriana.

El interés por su uso como posibles fármacos de primera línea se renovó cuando se demostró que las fluoroquinolonas tienen el potencial de reducir la duración de la terapia de tuberculosis en modelos de ratón³¹. Actualmente moxifloxacina y gatifloxacina (Fig. 11 y 12) se encuentran en ensayos clínicos de fase III para establecer si la tuberculosis sensible puede tratarse eficazmente en 4 meses mediante la sustitución de etambutol por gatifloxacina o etambutol o isoniazida por moxifloxacina³².

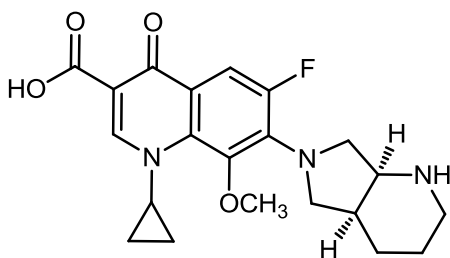


Figura 11. Moxifloxacin.

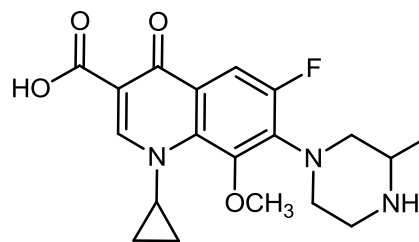


Figura 12. Gatifloxacin.

Dado que las fluoroquinolonas se utilizan ampliamente en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, ha surgido cierta preocupación en relación con el desarrollo de resistencias en aquellos pacientes con tuberculosis no diagnosticada que están siendo tratados con fluoroquinolonas. Para contrarrestar ésto, se están realizando esfuerzos para identificar nuevos inhibidores de la ADN girasa no basados en el farmacóforo de las fluoroquinolonas³³.

Rifamicinas

La rifampicina, perteneciente al grupo de las rifamicinas, ha sido la columna vertebral de la quimioterapia de la tuberculosis desde hace 40 años. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la ARN polimerasa bacteriana mediante su unión a la subunidad β de esta molécula, lo que impide la transcripción. La rifapentina (Fig. 13), otra rifamicina, actúa de la misma manera, pero tiene una vida media mucho más larga que la rifampicina, por lo que se consigue una mejor exposición y por lo tanto mayor potencial para acortar la duración del tratamiento³⁴.

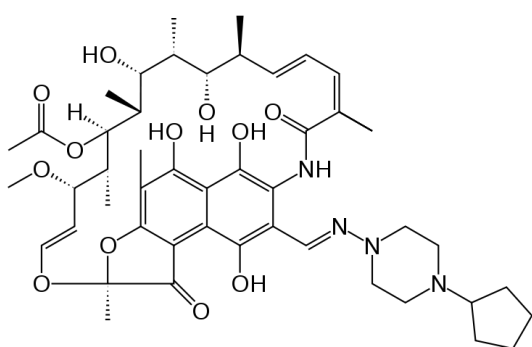


Figura 13. Rifapentina.

Actualmente en varios ensayos clínicos de fase II en curso, se sustituye la rifampicina por una alta dosis de rifapentina, para evaluar su capacidad de acortar la duración del tratamiento de la tuberculosis sensible. La administración diaria de rifapentina, o de dos o tres veces por semana en lugar de una vez a la

semana, conduce a mayores exposiciones y parece ser bien tolerado³⁵. Sin embargo, una desventaja importante del grupo de las rifamicinas es que inducen los citocromos P450, lo que puede desencadenar interacciones fármaco-fármaco con agentes antirretrovirales (especialmente los inhibidores de la proteasa) y otros candidatos a

fármacos para la tuberculosis como la bedaquilina¹³. Por tanto, existe un interés significativo en el desarrollo de regímenes terapéuticos libres de rifamicinas.

Combinaciones de fármacos TB

Como ya se ha comentado anteriormente el actual tratamiento de la TB sensible consiste en la administración de una combinación de cuatro fármacos (INH, RIF, PZA y EMB o SM) durante 6-9 meses pero la aparición de resistencias a estos fármacos junto con la necesidad de reducir la duración del tratamiento ha hecho que se inviertan esfuerzos en la investigación de nuevas terapias de combinación. En la actualidad existen tres regímenes de combinación en distintas fases de estudios clínicos. El régimen que se encuentra más avanzado en la clínica es el denominado REMox y ya ha completado la fase III de los ensayos clínicos. En estos ensayos se estudió una terapia de 4 meses de duración que constaba de diferentes combinaciones de fármacos con moxifloxacina. Como ya se ha comentado anteriormente este estudio aparte de identificar un posible tratamiento para lograr acortar el actual, ha contribuido a desarrollar la logística necesaria para poder llevar a cabo futuros estudios clínicos de combinación de fármacos³⁶. Otra terapia de combinación que se encuentra bastante avanzada en la clínica es la denominada PaMZ, que combina PA824, moxifloxacina y pirazinamida. El ensayo de fase IIb de una duración de 8 semanas se completó satisfactoriamente y actualmente se está planificando el comienzo de la fase III³⁶. Por último y la menos avanzada es la terapia de combinación JPaZ. Esta combinación va a comenzar la fase IIb de los ensayos clínicos. Fue identificada en el ensayo clínico de fase IIa, de dos semanas de duración, en el que se estudiaron varias combinaciones de PA-824 (Pa), bedaquilina (J), pirazinamida (Z), y clofazamina³⁶.

La principal ventaja de estas dos últimas combinaciones de fármacos es que no involucran a isoniazida ni a rifampicina y son por lo tanto adecuadas para su uso con pacientes que son resistentes a estos medicamentos. Otra ventaja es que un régimen sin rifampicina simplificaría en gran medida la terapia antirretroviral de VIH³⁷.

1.4.5. Necesidad de nuevos medicamentos contra la tuberculosis

Aunque el tratamiento de la tuberculosis sensible a los medicamentos en condiciones ideales puede ser exitoso en más del 95% de los casos, las tasas de curación en países en vías de desarrollo son a menudo mucho más bajas debido a los retos logísticos que se plantean tanto en la administración como en la supervisión de la

correcta ingesta de la quimioterapia de combinación durante 6-9 meses. Las tasas de éxito son mucho peores en los casos de tuberculosis multirresistente (MDR) y ampliamente resistente (XDR). Por ello nuevos fármacos antituberculosos son necesarios para reducir o simplificar el tratamiento de la tuberculosis sensible así como de la tuberculosis MDR y XDR, incluyendo la tuberculosis asociada a la infección del VIH³⁷. Los nuevos antituberculosos deben ser eficaces contra las cepas multiresistentes y reducir la duración del tratamiento. Esto podría conseguirse encontrando un nuevo mecanismo de acción que eliminase las bacterias en estado latente de no replicación. Los nuevos fármacos contra la tuberculosis también deben ser compatibles con medicamentos antirretrovirales utilizados para el tratamiento del VIH y con los agentes actuales antituberculosos de segunda línea. Al administrar los fármacos en combinación la toxicidad derivada de las interacciones fármaco-fármaco se presenta como uno de los problemas a solucionar por los nuevos fármacos en desarrollo.

Interacciones fármaco-fármaco

Las principales interacciones fármaco-fármaco son las derivadas de la inhibición y/o inducción de los citocromos CYP3A4, que constituye la subfamilia de P450 más abundante en el hígado humano, encontrándose también en la mucosa intestinal³⁸. Teniendo en cuenta este dato no sería extraño pensar que un elevado número de fármacos se metabolicen siguiendo esta ruta; si esos fármacos se administran conjuntamente, se pueden originar interacciones metabólicas que producirían variaciones farmacocinéticas provocando un mayor riesgo de efectos adversos o una disminución de su eficacia terapéutica. Es por ello que en los tratamientos de tuberculosis este tipo de interacciones requieren una atención especial.

Algunos medicamentos pueden aumentar la actividad del CYP3A³⁸ a través de la activación transcripcional. Se trata de fármacos inductores, ésta activación está mediada por los receptores nucleares PXR y /o CAR, ya que son capaces de regular la expresión de los genes CYP3A³⁹. Generalmente la inducción del CYP3A se considera clínicamente menos importante que su inhibición, ya que se consigue un efecto de disminución de las concentraciones plasmáticas de los fármacos sustrato del CYP3A sin implicar un aumento de la toxicidad⁴⁰. Sin embargo, la pérdida de eficacia también tiene un efecto devastador. Rifampicina uno de los fármacos más importantes en el tratamiento de la tuberculosis es un ejemplo de fármaco tanto inhibidor como inductor de los CYP3A4.

1.5. ENOYL-ACP REDUCTASA DE *M. TUBERCULOSIS* (InhA) COMO DIANA CONTRA LA TUBERCULOSIS

La capa exterior de la pared celular de la micobacteria, representada en la Figura 14, se compone predominantemente de ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena muy larga (C₆₀-C₉₀).

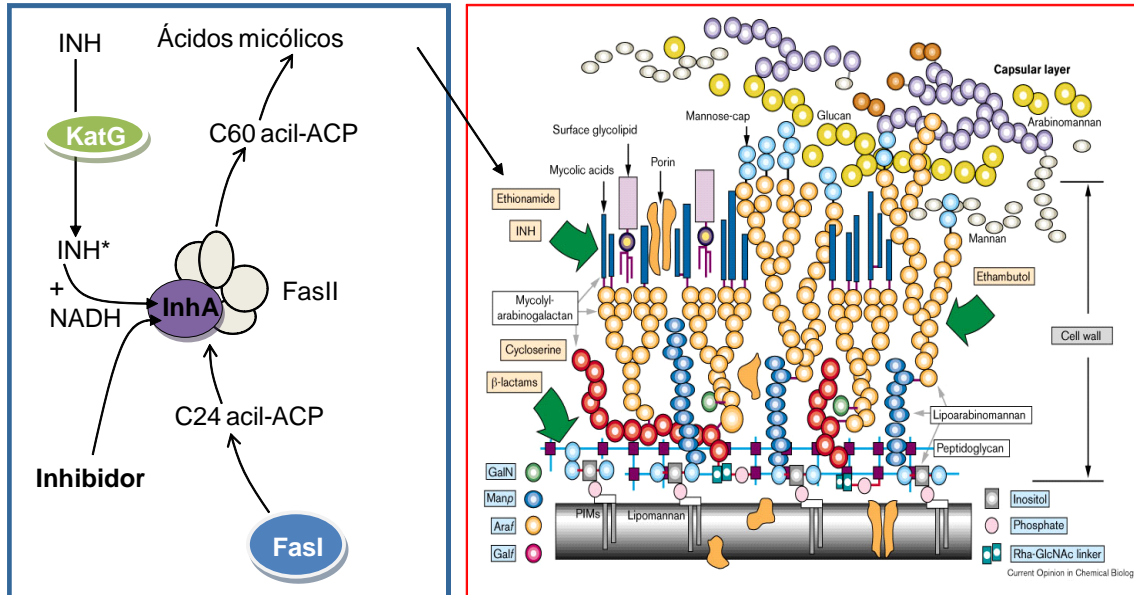


Figura 14. Esquema de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los ácidos micólicos dificultan el acceso al citosol de muchos de los antibióticos utilizados en la actualidad y resultan esenciales para la vida y replicación de la micobacteria dentro de los macrófagos^{41,42}. Por consiguiente, los compuestos que antagonizan la capacidad de las micobacterias de sintetizar ácidos micólicos son prometedores puntos de partida en el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos.

A diferencia de los organismos eucariotas, *M. tuberculosis* posee dos sistemas para la síntesis de ácidos grasos: FAS-I y FAS-II. FAS-I, presente en organismos eucariotas y procariotas, es el responsable de la síntesis de ácidos grasos *de novo* y su elongación para llegar a obtener cadenas carbonadas de 24-26 eslabones. Estos ácidos grasos son usados posteriormente para la producción de fosfolípidos y como iniciadores de lípidos complejos. El sistema FAS-II extiende esos ácidos grasos obtenidos hasta llegar a ácidos con 56 átomos de carbono precursores de los ácidos micólicos, que son constituyentes esenciales y específicos de la pared celular de *M. tuberculosis*. En el ciclo de síntesis de ácidos grasos existen cinco enzimas clave (Fig. 15): la β -cetoacil-ACP-sintasa (FabH) que cataliza el primer paso de elongación vía condensación al igual que las β -cetoacil-ACP-sintasas KasA y KasB involucradas en el proceso de elongación

vía condensación, la β -cetoacil-reductasa (MabA)⁴³ que reduce el grupo carbonilo a hidroxilo, la β -hidroxiacil-deshidratasa (DE) que cataliza la formación del doble enlace por deshidratación y la 2-*trans*-enoil-ACP (acyl carrier proteína) reductasa (InhA) que reduce dobles enlaces carbono/carbono.

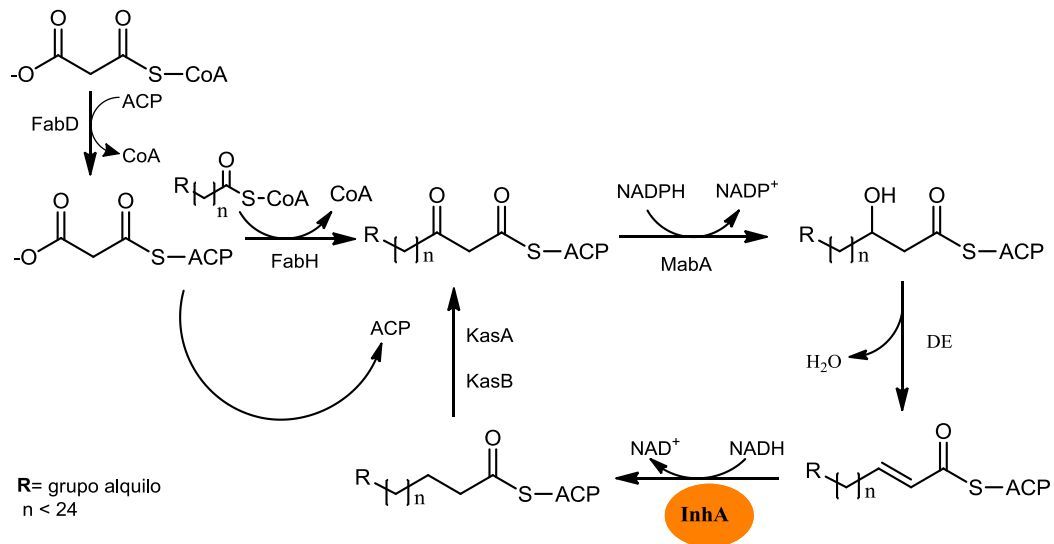


Figura 15. Síntesis de los ácidos grasos saturados por la micobacteria.

La enzima InhA, codificada en el gen *inhA* de *M. tuberculosis*, cataliza el último paso del ciclo metabólico de elongación de los ácidos grasos FAS-II. InhA es capaz de reducir el sistema 2-*trans*-enoil-DDCoA, con la consecuente oxidación del cofactor NADH a NAD⁺ (Figura 16). La identificación de InhA como una diana potente y efectiva contra *Mycobacterium* fue inicialmente desarrollada por Jacobs y su grupo de investigación^{44, 45}.

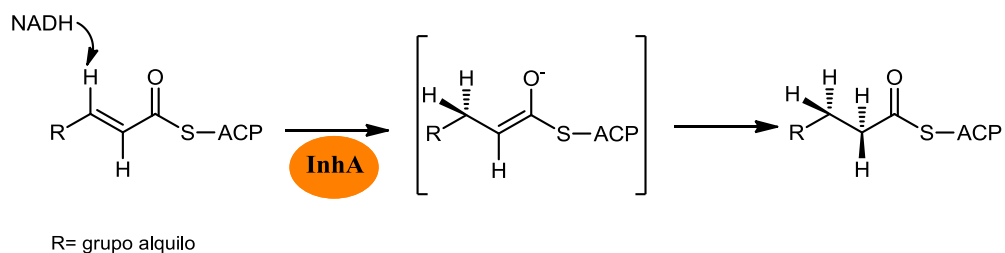


Figura 16. Mecanismo de la reducción llevada a cabo por InhA.

La inactivación de InhA conduce a la acumulación de ácidos grasos saturados, alteraciones en la morfología de la pared celular y como consecuencia a la muerte de la micobacteria⁴⁶.

La inhibición del proceso bioquímico de reducción puede deberse al bloqueo en la etapa de formación del complejo enzima-cofactor (InhA-NADH) o al bloqueo en la formación del complejo ternario enzima-cofactor-sustrato (InhA-NADH-DDCoA) (Fig. 17).

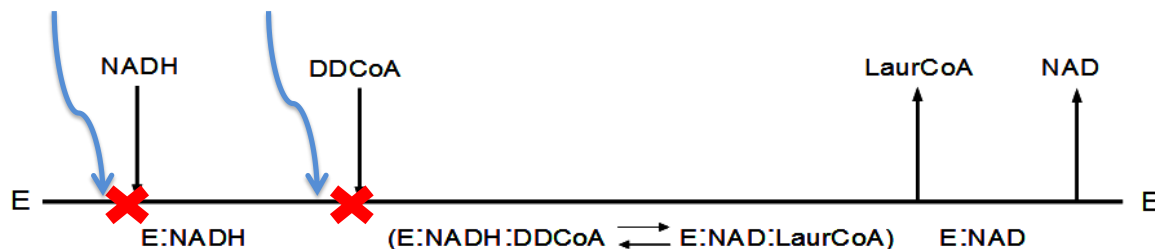


Figura 17. Distintas etapas donde se inhibe el proceso bioquímico de reducción.

Aunque en la literatura se encuentran numerosas referencias de inhibidores de InhA, en el presente capítulo se mencionan brevemente aquéllos de mayor relevancia como son los basados en isoniazida (INH), los derivados de triclosán y los basados en las diazaborinas, agentes antibacterianos que han demostrado inhibir InhA. También se revisarán otros inhibidores que han sido identificados en distintas campañas de cribado de alto rendimiento (HTS) como las pirrolidincarboxamidas, las piperazinindolformamidas, los pirazoles, las arilamidas y las prolinas. Estos inhibidores a excepción de INH y ETH se comportan como inhibidores no competitivos con el cofactor y competitivos con el sustrato.

1.5.1. Isoniazida y derivados

InhA se identificó como la diana de isoniazida (INH)^{45,47-49}, fármaco de primera línea en el tratamiento de TB. INH se ha usado en la terapia frente a tuberculosis desde su descubrimiento en 1952^{50,51}. Tanto *Mycobacterium bovis* BCG, como *M. tuberculosis* son extremadamente sensibles a este fármaco en el rango de concentraciones de 0.02-0.2 µg/mL⁵². Isoniazida presenta un efecto bactericida, siendo el antituberculoso sintético más antiguo y el más comúnmente empleado tanto para tratamiento como para profilaxis de la enfermedad. INH es un profármaco que requiere de la activación por KatG⁵³⁻⁵⁸, enzima de doble actividad catalasa-peroxidasa. KatG oxida INH a una forma de radical acilo, que se une a la posición 4 del dinucleótido adenina nicotinamida (NAD) formando un aducto activo INH-NAD^{59, 60} que actúa como inhibidor de InhA (Fig. 18). La adición del radical isonicotinoílo a la posición 4 del anillo de nicotinamida resulta en dos esteroisómeros, siendo únicamente el isómero 4(S)

del aducto INH-NAD el que posee actividad. Isoniazida es activa frente a bacterias en estado de replicación, prácticamente inactiva frente a las bacterias no replicantes y completamente inactiva frente a poblaciones resistentes a INH. Las mutaciones responsables de generar cepas resistentes a INH son principalmente de dos tipos: mutaciones en la región del promotor de *InhA* y mutaciones en el gen *katG* que codifica la catalasa KatG responsable de la activación de la INH. Estas últimas están presentes en un 50-60%⁶¹ de los aislados clínicos resistentes a INH. Por ello podemos concluir que los fármacos inhibidores directos de *InhA*, que no requieren previa activación por KatG podrían ser fármacos prometedores para combatir las resistencias (TB-MDR).

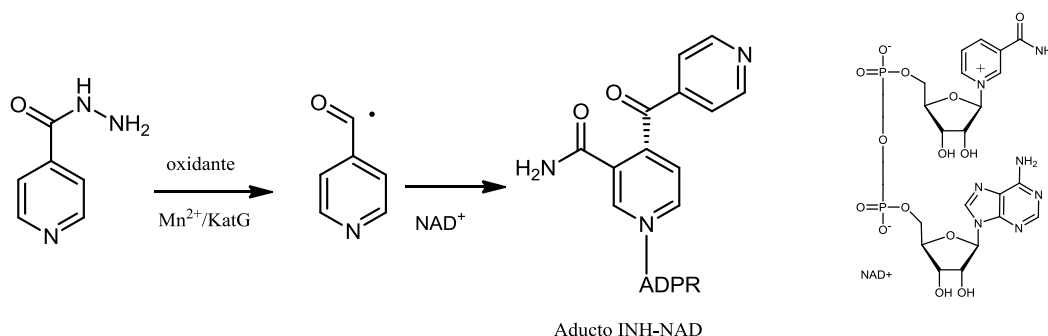


Figura 18. Esquema de la formación del aducto INH-NADH.

Con el fin de explorar la relación estructura-actividad relacionada con el aducto de INH-NAD, el aducto benzoilhidrazina-NAD (BH-NAD) fue sintetizado por el grupo de investigación de Tonge⁴⁹. Este aducto demostró ser capaz de inhibir competitivamente *InhA* con un valor de $K_i < 1 \text{ nM}$ ⁴⁹ indicando que la acil-piridina puede ser sustituida por un grupo benzoilo aunque, estudios preliminares también mostraron que la hidrazida del ácido benzoico se activa menos fácilmente que INH. Además, tras sintetizar una serie de análogos de BH-NAD en los que se modificaba la parte ADPR de la molécula, se encontró que ninguno de estos análogos afectaba significativamente la actividad de *InhA*, lo que indica la importancia del nucleótido para la inhibición de la reductasa.

Dentro de los análogos de INH cabe destacar a la etionamida (ETH) (Fig. 19). ETH es un análogo estructural de INH y se utiliza en el tratamiento de TB como antituberculoso de segunda línea. Ambos fármacos presentan efectos casi idénticos ya que los dos inhiben la síntesis de ácidos micólicos. ETH al igual que INH es un profármaco y requiere de una activación previa. ETH es activada por la monooxigenasa de Baeyer-Villiger (EthA), la especie activada forma un aducto

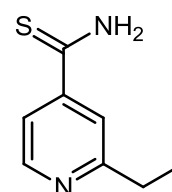


Figura 19. Estructura de la etionamida.

Figura 19. Estructura de la etionamida.

covalente con el NAD. Este aducto ETH-NAD es el responsable de la inhibición de InhA. Aunque ETH e INH presentan modos de acción similares la falta de resistencias cruzadas entre ambos dota de especial relevancia a éste fármaco. La mayoría de las cepas resistentes a ETH son sensibles a INH, mientras que algunas cepas resistentes a INH muestran un aumento de sensibilidad a ETH, de ahí que ETH sea empleado eficazmente como fármaco de segunda línea⁶².

1.5.2. Triclosán y derivados

El triclosán (Fig. 20) es una molécula biocida ampliamente utilizada en productos tales como pasta de dientes y desodorante, que a concentraciones altas puede inhibir el crecimiento bacteriano, actuando como un agente perturbador de la membrana de la bacteria. La actividad antibacteriana de este compuesto se debe a la inhibición de FabI⁶³⁻⁶⁶. Aunque la actividad de triclosán contra InhA y *M. tuberculosis* es relativamente modesta (Ki 0.2 μ M, MIC 12.5 μ g / ml)^{67,48}, el no requerir de la activación de KatG sugiere que derivados de triclosán con una mayor constante de afinidad para InhA serían excelentes puntos de partida para el desarrollo de fármacos activos contra la TB-MDR y TB-XDR.

La interacción de triclosán con las enzimas de tipo FabI, y, en particular, con InhA, se ha estudiado en detalle⁶⁸. El compuesto actúa como un inhibidor de InhA no competitivo, uniéndose preferentemente al complejo enzima-NAD⁺ con un valor de Ki de 0.2 μ M⁶⁹.

A fin de explorar el SAR de este tipo de estructuras el anillo aromático **A** se modificó sistemáticamente, por el contrario la modificación del anillo **B** ha sido menos explorada. El análisis del estudio de SAR reveló que el tamaño y la forma del

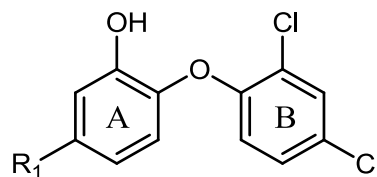


Figura 20. Estructura del triclosán, R₁: Cl.

sustituyente R₁ (Fig. 20) presentaban el mayor impacto en la afinidad por la unión al enzima. Los grupos alquilo de 5 a 8 átomos de C presentaron los valores más interesantes de inhibición *in vitro*⁷⁰. Hay que destacar que debido a las características físico-químicas de este tipo de compuestos, la serie química no presenta interés como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos.

1.5.3. Diazaborinas y derivados

Las diazaborinas son compuestos bicíclicos que contienen un átomo de boro y un grupo diazina, en posición 1,2- en un heterociclo (Fig. 21). Dependiendo del areno (X), las diazaborinas se pueden clasificar como tieno-, benzo-, furano- y pirrolo-diazaborina, según X sea tiofeno, benceno, furano y pirrol, respectivamente.

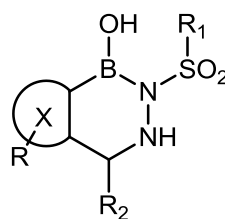


Figura 21. Estructura general de las diazaborinas.

La primera diazaborina se identificó en 1981 como un nuevo inhibidor de la biosíntesis de los lipopolisacáridos⁷¹, posteriormente, la enzima FabI en *E. coli* demostró ser la diana de esta clase de compuestos⁷².

El mecanismo de inhibición de la enzima FabI se ha estudiado exhaustivamente en *E. coli* utilizando cristalografía de rayos X y mutagénesis dirigida⁷³⁻⁷⁷. Según estos estudios, los compuestos forman un aducto con el cofactor a través de un enlace covalente entre el grupo 2'-hidroxilo del NAD⁺ de la 2'-ribosa y el átomo de boro diazaborina (Fig. 22). Por lo tanto, parecen imitar el mecanismo de acción de la isoniazida, aunque las diazaborinas no requieren de una activación previa.

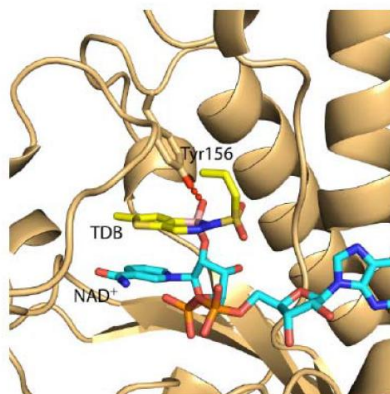


Figura 22. Estructura de rayos X de la unión de la diazaborina con ecFabI.

Se han realizado extensos estudios de SAR para dilucidar el mecanismo de la inhibición de FabI, junto con la actividad antibacteriana, poniendo de manifiesto que el grupo 1,2-diaza es esencial.

1.5.4. Inhibidores de InhA identificados en campañas de cribado de alto rendimiento (HTS)

A medida que el interés en el desarrollo de nuevos inhibidores de InhA ha ido creciendo, varios grupos de investigación han recurrido a campañas de cribado de alto rendimiento con el fin de identificar nuevas estructuras. He *et al.* identificaron 30 cabezas de serie inhibidores de InhA que no inhibían la actividad de las enzimas FabI de *E. coli* o de *Plasmodium falciparum*^{70,78}. A continuación se recogen las estructuras generales y actividades de las cabezas de serie más interesantes (Tabla 2). Se incluyen

también las estructuras representativas de dos series identificadas vía HTS por GlaxoSmithKline^{79,80}.

Tabla 2: Estructuras generales y actividades biológicas de los principales inhibidores de InhA identificados vía HTS.

Serie	Estructura General	InhA IC ₅₀ (μM)	Mtb H37Rv MIC (μM)
Pirrolidincarboxamidas ⁷⁸		0.062-73.6	62.5 - > 125
Piperazin-indolformamidas ⁷⁰		0.16->10	< 30
Pirazoles ⁷⁰		2.4	2.5
Arilamidas ⁷⁰		0.09	125 - > 125
Imidazopiperidinas ⁷⁹		0.2-10	16 - 63
Prolinas ⁸⁰		0.003 - >1	0.05 - 31

1.5.5. Modo de unión

La comparación de los datos estructurales de las moléculas consideradas en esta introducción, permite establecer un modo de unión común para los inhibidores. Como se comentó en el apartado anterior, a excepción de INH y ETH, los inhibidores descritos en los apartados anteriores, se unen en presencia del cofactor, por lo que estos compuestos son inhibidores no competitivos, se unen al complejo InhA:NAD⁺. La formación de una red de enlaces de puentes de hidrógeno entre el inhibidor y la Tyr158

y/o el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa de la nicotinamida ha resultado ser de importancia clave para lograr la unión del inhibidor a la enzima. Los inhibidores con funcionalidades que permiten establecer enlaces de hidrógeno (HB), como los grupos hidroxilo o carbonilo participan en esta red.^{64,66,76,81-82}. Además, ya que los sustratos naturales para InhA son significativamente más largos que para otras enzimas de tipo FabI (24-56 carbonos de longitud)⁸³, el bucle de unión al sustrato en InhA también es más grande, permitiendo de este modo inhibidores con grupos hidrófobos voluminosos tales como fluoreno que permite establecer interacciones hidrofóbicas con la enzima.

La región de la enzima que participa en estas interacciones (Fig. 23) está constituida por los siguientes aminoácidos: Met103, Gly104, Phe149, Ala157, Ala198, Met199, Ile202, Ile215 y Leu218^{67,82,84}. Por último, una tercera zona de unión se identifica cerca de la región de formación de enlaces de hidrógeno en el inhibidor. Esta zona es relativamente limitada en tamaño y está expuesta al disolvente.

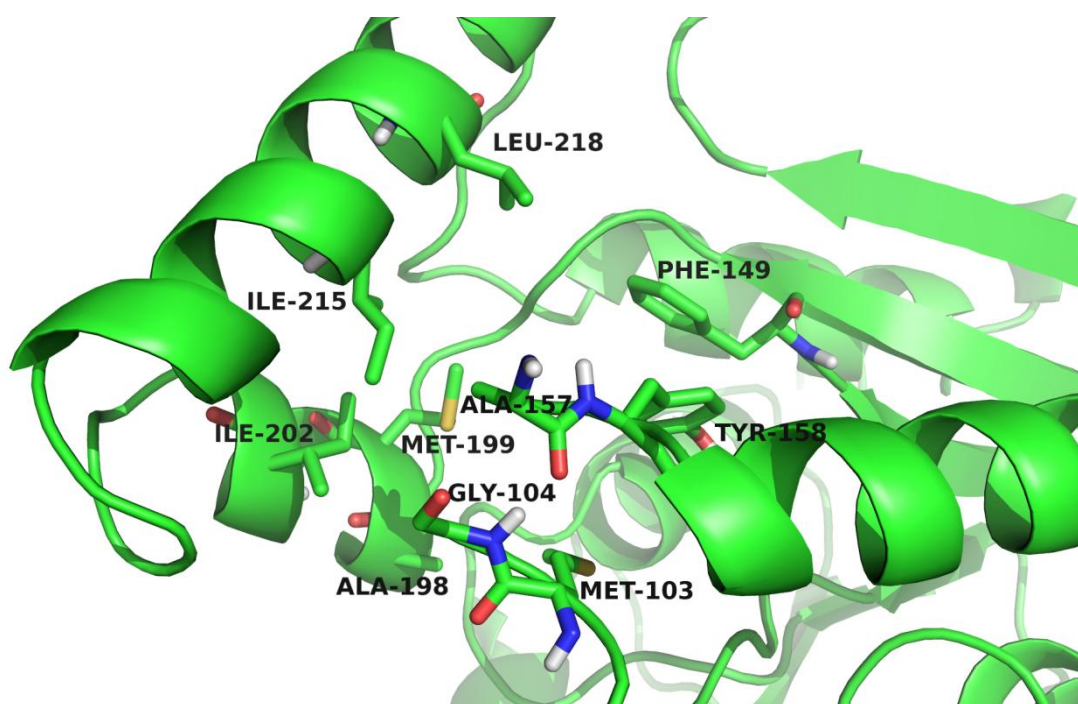


Figura 23. Región de InhA involucrada en interacciones hidrofóbicas con distintos inhibidores conocidos.

La información que se desprende de estos estudios puede ser utilizada en el futuro con el objetivo de optimizar la afinidad del inhibidor, perfeccionando así la actividad biológica, mientras que al mismo tiempo se debe pensar en diseñar los compuestos de manera que se mejoren las propiedades ADMET.

1.6. TIADIAZOLES: NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DIRECTOS DE InhA

Teniendo en cuenta que InhA representa una muy buena diana terapéutica para el tratamiento de tuberculosis, en nuestro grupo de investigación se realizaron distintas campañas de cribado de alto rendimiento (HTS) con el objetivo de identificar nuevas cabezas de serie en este campo. En estas campañas se identificaron diferentes estructuras químicas con actividades inferiores a 10 μM frente a InhA.

Dos tiadiazoles, **GSK1** y **GSK2** (Fig. 24), fueron con diferencia los mejores compuestos identificados en la campaña. Los dos presentaron un perfil de actividad nanomolar frente a InhA y valores de MIC de unidades bajas de micromolar frente *M. tuberculosis*. En relación a la toxicidad celular de los compuestos hay que destacar que frente a la línea celular utilizada como marcador de citotoxicidad (HepG2), no se observó muerte celular a las concentraciones ensayadas (50 μM y 12 μM) para **GSK1** y **GSK2** respectivamente. En el caso de **GSK2** el valor es menor debido al límite de solubilidad del compuesto en las condiciones del ensayo. La diferencia entre las concentraciones de MIC y las encontradas en el ensayo de citotoxicidad justifica el interés del estudio de esta serie química.

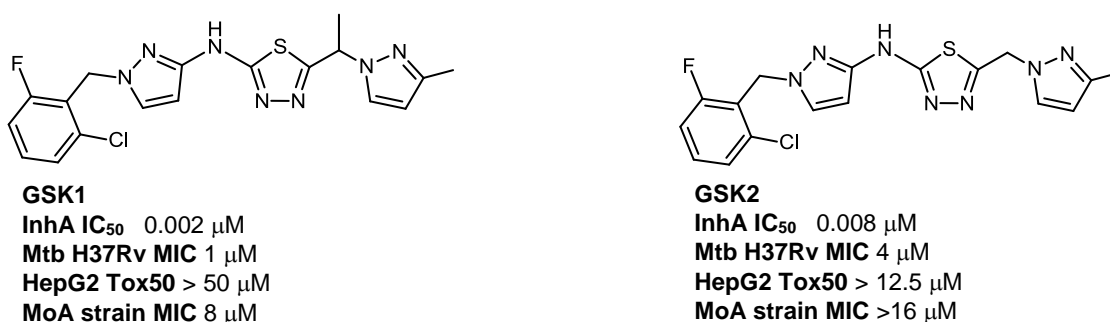


Figura 24. Estructuras y perfiles biológicos de **GSK1** y **GSK2**.

Para confirmar que la muerte celular de *M. tuberculosis* estaba relacionada con la inhibición de la enzima InhA, se valoró la inhibición del crecimiento bacteriano en la cepa que sobreexpresa InhA. Una variación en el valor de MIC mayor de 4 veces frente a la cepa silvestre indica que la actividad celular se debe principalmente a la inhibición de la enzima sobreexpresada. El ensayo de **GSK1** y **GSK2** en estas cepas mostró claramente una variación de 8 y 4 veces la MIC respectivamente confirmando que la muerte celular era debida principalmente a la inhibición de InhA.

1.6.1. Modo de unión

Paralelamente a los estudios descritos en el apartado anterior, en el grupo de biología se obtuvo la estructura cristalina del complejo ternario InhA-NAD⁺-GSK1⁸⁵ con una resolución de 2.9 Å. La densidad electrónica del cristal permitió identificar la disposición y la región del inhibidor GSK1 involucrada en la interacción con el centro activo del enzima (Fig. 25).

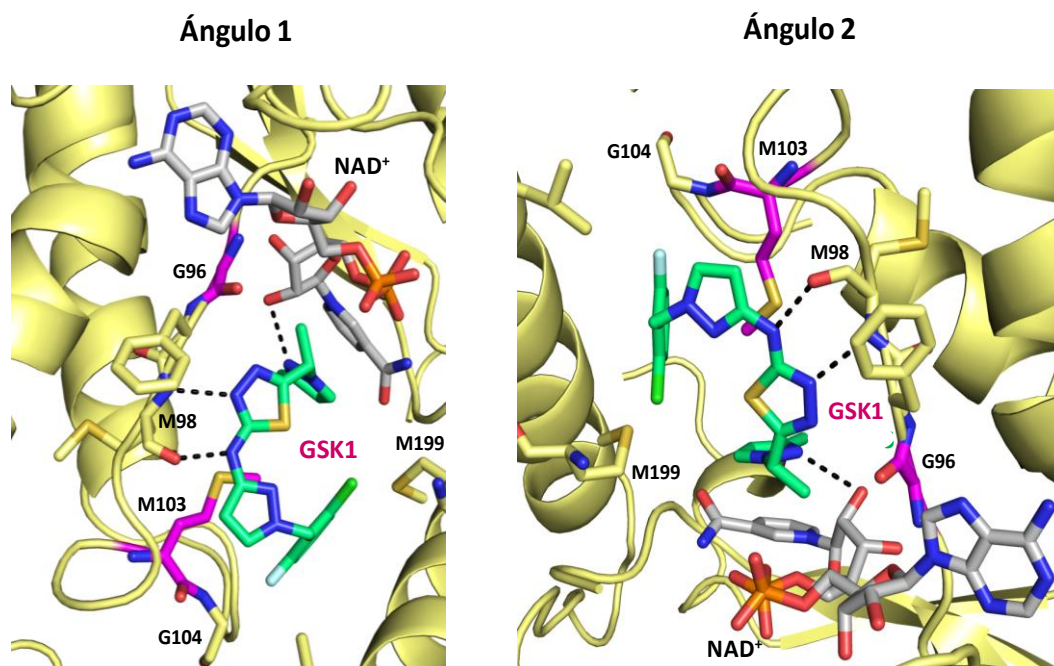


Figura 25. Modo de unión de GSK1 al centro activo de InhA. Los colores empleados en la Figura son: GSK1 (verde), NAD⁺(gris), Gly96 y Met103 (residuos involucrados en resistencias) (magenta) átomo de O (rojo), N (azul), S (amarillo), Cl (verde) y F (azul claro).

Como se aprecia en la representación del cristal (Fig. 25), GSK1 interacciona con el cofactor NAD⁺ y con la Met98 a través de enlaces de puente de hidrógeno (líneas negras punteadas) y a través de interacciones hidrofóbicas y de van der Waals con los residuos de Gly96, Phe97, Met98, Met103, Phe149, Met161, Ile202, Gly104, Met199 y Leu207. La unión del inhibidor al bolsillo lipófilo del InhA coincide con el lugar de unión del sustrato (DDCoA) estando delimitado este bolsillo lipófilo por los siguientes residuos, Met199, Leu207, Ile215, Met103, Phe149, Tyr158, Ala198 e Ile202.

Tras varios intentos sólo fue posible cristalizar el complejo InhA-GSK1 en presencia del cofactor NAD(H) en concordancia con el carácter incompetitivo del inhibidor respecto al cofactor mostrado en la Figura 25. Por comparación de las estructuras de InhA-NAD⁺-GSK1 y InhA-NAD⁺-ácido graso de 16C (análogo al

substrato natural DDCoA) (PDBID:1BVR), se observó que el anillo de pirazol ocupaba el mismo lugar que el tioéster y el doble enlace *trans* del análogo al substrato, lo que sugiere el comportamiento de inhibidor competitivo respecto al substrato. Se observa que el anillo de pirazol interactúa con el NAD^+ mediante interacción π - π stacking (4 Å) y también mediante un enlace de puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la ribosa (3.3 Å). Las otras interacciones clave identificadas fueron a través de enlaces de puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del tiadiazol y la amida (NH) de la Met98, y entre el átomo de nitrógeno puente, entre el pirazol y el ciclo de tiadiazol, con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la Met98 (2.9 & 2.5 Å) respectivamente. Las interacciones entre el inhibidor y los residuos de las cadenas laterales del centro activo son de tipo hidrofóbico y van der Waals. Los residuos que constituyen las cadenas laterales son los siguientes, Met161, Phe97, Leu207, Met199, Met103, Gly104, Met98, Ala198, Gly96, Phe149, Tyr158 e Ile202. En cuanto al anillo de benceno, interactúa con la Met199 y Gly104 a través de los sustituyentes haluros del anillo lo que aumenta notablemente la potencia en comparación a otros análogos sin grupo arilo.

1.6.2. La familia de los tiadiazoles

La búsqueda de análogos disponibles tanto en el banco de compuestos de la compañía como de diferentes fuentes comerciales permitió evaluar 79 derivados de tipo tiadiazol y realizar un estudio preliminar de relación estructura-actividad. De este análisis se estableció que el espacio de diversidad química en la zona del 3-metilpirazol era potencialmente restringido. En este grupo de compuestos no se valoró ninguna estructura con modificaciones en los anillos centrales de tiadiazol y aminopirazol. Lo que sí pareció claro es que la región del bencilo podía ofrecer más oportunidades para el diseño de nuevos derivados (Fig. 26).

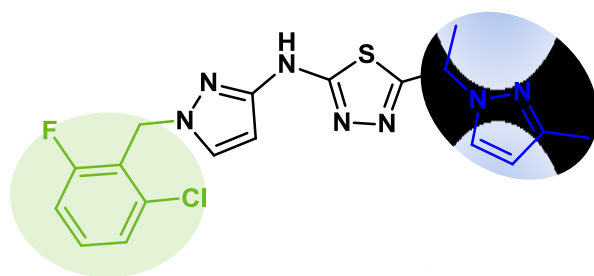


Fig. 26: GSK1.

Los dos compuestos fueron resintetizados con el fin de completar su perfil *in vitro* (MICs frente a aislados clínicos de INH, determinación del modo de acción cida/estático, de la frecuencia de mutantes resistentes, espectro antibacteriano, actividad intracelular, estabilidad en microsomas de ratón, actividad frente a P450) y realizar los estudios metabólicos y farmacocinéticas pertinentes.

Teniendo en cuenta los buenos perfiles biológicos obtenidos por ambos compuestos en los estudios realizados, se puso en marcha un nuevo programa de química médica, cuyo objetivo fue la optimización del prototipo **GSK1**, con el fin de mejorar su potencia como antituberculoso y sus propiedades metabólicas y farmacocinéticas. En el presente trabajo de investigación se presentará, como se detalla a continuación en los objetivos, el estudio y las modificaciones realizadas sobre esta molécula con el fin de incrementar su potencia sobre la diana terapéutica InhA y su capacidad como agente antituberculoso.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo global de la presente tesis doctoral consiste en la identificación de nuevos compuestos inhibidores de InhA dentro de la familia de los tiadiazoles, activos frente a tuberculosis incluyendo las cepas de tipo TB-MDR y TB-XDR. Estos nuevos compuestos deben tener el potencial de ser administrados en combinación, reemplazando a uno o más de los fármacos que se utilizan en los actuales regímenes de DOTS. Los compuestos identificados deberán poder ser administrados por vía oral, bien tolerados y presentar baja frecuencia de generación de resistencias.

Uno de los principales problemas del descubrimiento de nuevos fármacos es la falta de correlación entre los estudios *in vitro* e *in vivo* que conduce al término de un gran número de proyectos de investigación, por ello el objetivo específico de esta memoria consiste en **demostrar eficacia *in vivo* en un modelo animal** en la clase química de los 1,3,4-tiadiazoles.

Este objetivo se consigue mediante la optimización de la potencia y propiedades ADMET de los compuestos, para ello deben llevarse a cabo las siguientes acciones:

- Diseño de nuevas modificaciones en la estructura general de tipo tiadiazol, descrita en la Figura 27.

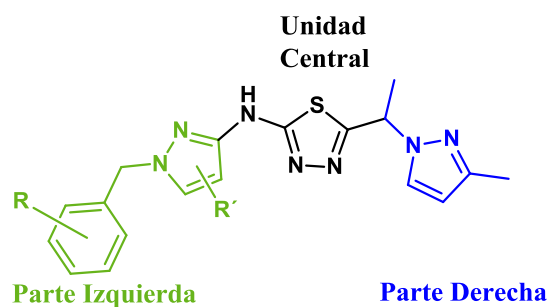


Figura 27. Estructura general de tipo tiadiazol.

- Síntesis y caracterización de los compuestos sintetizados.
- Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de InhA y de la inhibición de la actividad en cultivo celular de la cepa H37Rv (cepa referencia de *M. tuberculosis*).
- Estudio de la relación estructura-actividad (SAR) de los nuevos derivados en base a los datos críticos en cada serie a estudiar.

- Definición y relevancia de los mejores compuestos identificados como potenciales fármacos para el tratamiento de la infección por *M. tuberculosis*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. QUIRALIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PROTOTIPO GSK1

Como ya se mencionó en la Introducción, el programa puesto en marcha en nuestro equipo de investigación para el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos capaces de inhibir la proteína InhA, presenta como punto de partida, el compuesto **GSK1**, Figura 28.

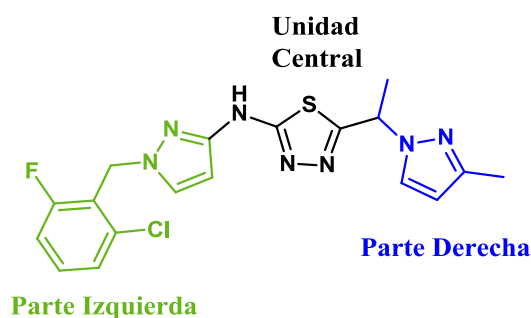


Figura 28. Estructura compuesto **GSK1**.

Teniendo en cuenta que el compuesto **GSK1** corresponde a una mezcla racémica y que los enantiómeros pueden presentar distintas propiedades biológicas, se decidió aislar y determinar la actividad de cada uno de los enantiómeros que conforman el racémico **GSK1**. La separación se llevó a cabo por HPLC en columna quiral⁸⁶ (véase sección experimental, aptdo:4.1.2.8). Ambos enantiómeros (**1** y **2**) fueron evaluados en los ensayos biológicos siendo claramente el isómero *S* (**1**) el más potente. Los datos de las actividades enzimáticas y en célula entera para ambos enantiómeros así como para el racemato se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividades biológicas de **GSK1** y enantiómeros correspondientes.

Estructura			
Comp.	GSK1	1	2
InhA IC ₅₀ (μM)	0.002	0.002	0.005
Mtb H37Rv MIC (μM)	1	1	4

La configuración absoluta fue determinada por la técnica de dicroísmo circular vibracional (VCD)⁸⁷⁻⁸⁹. El VCD es una técnica espectroscópica de absorción empleada para la asignación de la configuración absoluta de moléculas ópticamente activas. Está basada en el fenómeno que se produce cuando la luz polarizada circularmente pasa a través de un medio ópticamente activo, las interacciones del medio con la luz circularmente polarizada a la derecha y con la polarizada a la izquierda difieren y se produce una rotación del plano de la luz polarizada.

Para determinar la configuración absoluta de una sustancia enantioméricamente pura, deben determinarse los espectros experimentales y teóricos de VCD e IR de la sustancia. Los espectros teóricos se obtienen tras llevar a cabo un análisis conformacional de la molécula para determinar el número y población de las conformaciones de mínima energía a temperatura ambiente (la temperatura a la que se miden los espectros de IR y VCD experimental) y aplicar cálculos cuánticos empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT). La comparación de los espectros de VCD calculado y experimental permite asignar las configuraciones absolutas de las muestras ya que el espectro teórico de VCD del enantiómero de una determinada configuración absoluta debe estar en excelente acuerdo con el espectro de experimental de VCD, por el contrario el espectro de VCD del otro enantiómero debe ser completamente opuesto. Por último debe definirse el acuerdo entre los espectros calculado y experimental que se obtiene mediante un análisis de regresión lineal correlacionando las intensidades de las bandas del espectro de VCD experimental con las bandas del espectro calculado. La asignación de la configuración de los dos enantiómeros se recoge en la sección experimental (aptdo. 4.1.2.8).

3.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE LOS 1,3,4-TIADIAZOLES CON PIRAZOL EN LA PARTE DERECHA Y DISTINTOS N-BENCILPIRAZOLES EN LA PARTE IZQUIERDA

Del estudio de SAR preliminar, realizado por el grupo de investigación, se concluyó que tanto la parte derecha como la unidad central de la molécula eran dos regiones que admitían pocas variaciones en su estructura, mientras que la parte izquierda ofrecía más posibilidades de ser explorada. Por lo que el trabajo de esta memoria se centró en la exploración de la región izquierda.

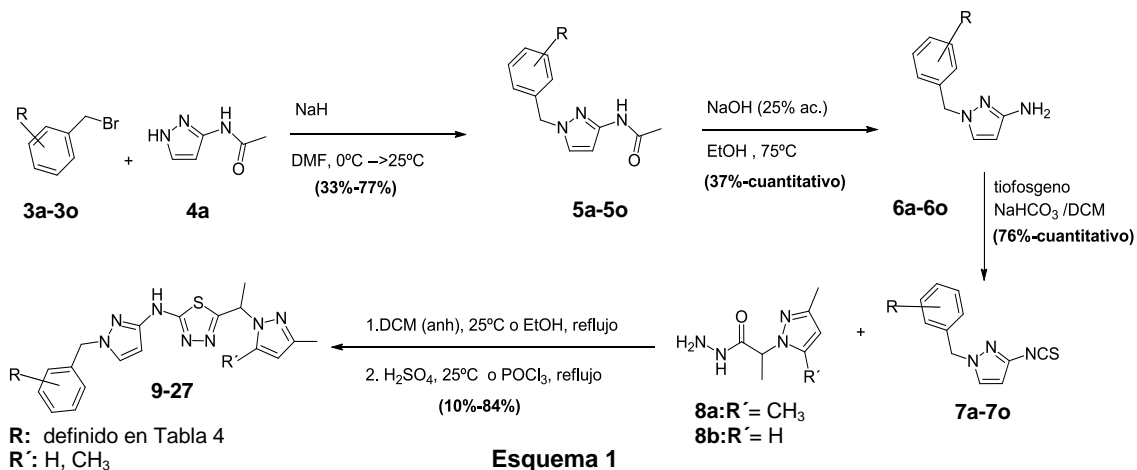
Teniendo en cuenta que todos los compuestos que resultaron activos en el estudio preliminar presentaban un sustituyente cloro en posición orto del benceno, perdiendo un orden de magnitud en el caso de no presentar ninguna sustitución, se seleccionaron como punto de partida de la exploración los monómeros descritos en la Tabla 4.

Tabla 4 . Monómeros seleccionados para el ejercicio de exploración.

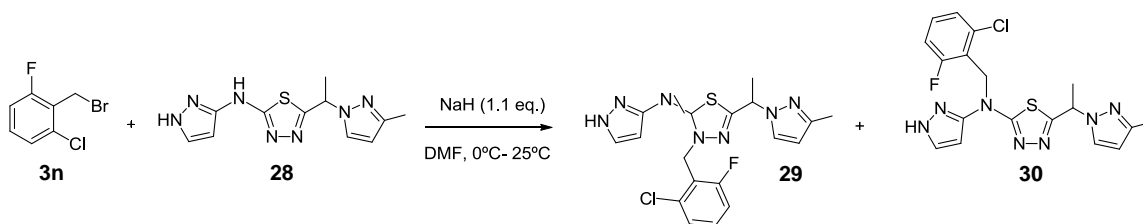
Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad
3a		Comercial LANCASTER	3g		Comercial ALDRICH	3m		Comercial FLUOROCHEM
3b		Comercial ALDRICH	3h		Comercial ALDRICH	3n		Comercial ALDRICH
3c		Comercial ACROSS	3i		Comercial ALDRICH	3ñ		Sintetizado
3d		Comercial ALFAAESAR	3j		Comercial ALDRICH	3o		Sintetizado
3e		Comercial JRD Chemicals	3k		Comercial ALFAAESAR	3p		Comercial ALDRICH
3f		Comercial ALDRICH	3l		Comercial FLUOROCHEM			

3.2.1 Síntesis general de los 1,3,4-tiadiazoles con 3,5-dimetilpirazol y 3-metilpirazol como parte derecha

Con el objeto de introducir diferentes variaciones en la región izquierda, los productos 9-27 se sintetizaron siguiendo la ruta sintética descrita en el Esquema 1.



En esta ruta lineal de 5 pasos de reacción, la variabilidad se introduce en el primer paso de síntesis lo cual no es deseable, por lo que se consideró una ruta alternativa para introducir la variabilidad estructural en el último paso de reacción, Esquema 2. La ruta consiste en la reacción del bromuro de bencilo con el N1 del pirazol, facilitando así la formación de nuevos compuestos para su posterior ensayo biológico. Sin embargo, la alquilación sobre el pirazol **28** condujo a la alquilación del N3 del tiadiazol y del -NH- puente⁹⁰, dando como resultado una mezcla (1:1) de regioisómeros **29** y **30** que resultaron inactivos en el ensayo bioquímico.



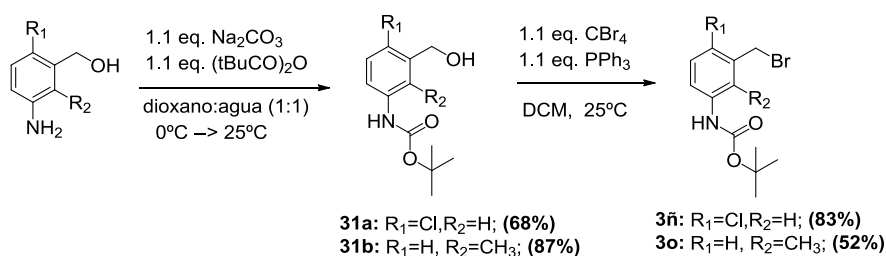
Esquema 2

Por esta razón, la ruta sintética inicialmente propuesta (Esquema 1) fue la empleada en la síntesis de la mayoría de los derivados de 1,3,4-tiadiazol recogidos en esta tesis. A continuación se detallan cada una de las etapas de síntesis de los 1,3,4-tiadiazoles.

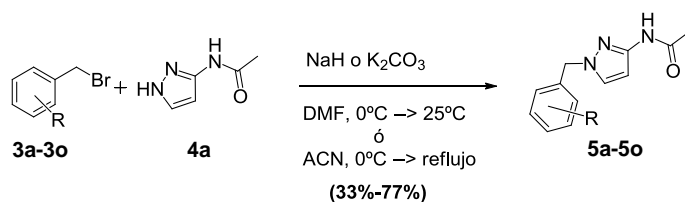
3.2.1.1. Reacción de bencilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (**4a**)

La reacción de bencilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (**4a**) se llevó a cabo empleando hidruro sódico (1.1 eq) como base y el correspondiente bromuro de bencilo (**3a-3o**) en dimetilformamida (anhidra) como disolvente⁹¹ dando lugar a los 3-acetamido-*N*-bencil-1*H*-pirazoles **5a-5o**. En todos los casos se emplearon bromuros de bencilo comerciales a excepción de **3ñ** y **3o** sintetizados a partir de los alcoholes comerciales correspondientes (Esquema 3).

a) Obtención de los bromuros de bencilo no comerciales a partir de alcoholes.

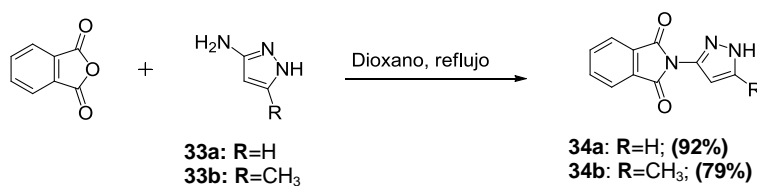


b) Reacción de bencilación del pirazol.



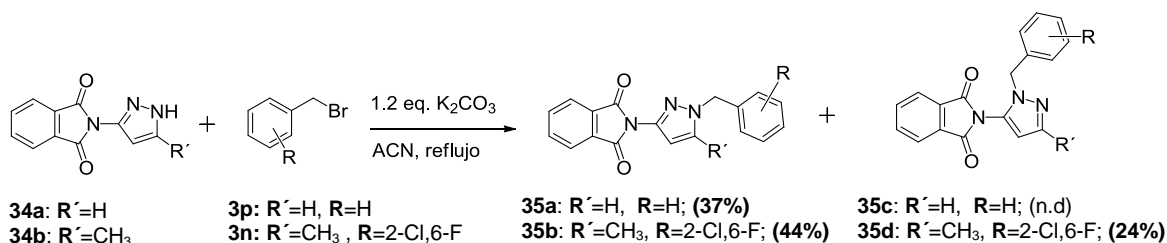
Esquema 3

Como alternativa al grupo acetilo se exploró en paralelo el ftalimido como grupo protector del aminopirazol⁹² (Esquema 4).



Esquema 4

El principal inconveniente que presentó el uso de la ftalimida como grupo protector fue la falta de regioselectividad obtenida en la posterior reacción de bencilación de los 3-ftalimidos (**34a** y **34b**), representada en el Esquema 5. En esta reacción los regioisómeros se obtuvieron en una proporción 2:1 a favor del regioisómero deseado (véase sección experimental aptdo: 4.1.2.3).



Esquema 5

Los *N*-bencilderivados sintetizados (**5a-5o**, **35a**, **35b** y **35d**) fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS). Las características espectroscópicas de ¹H-RMN más destacables de los intermedios **5a-5o** se ilustran en la Figura 29 para el compuesto **5e**, como ejemplo representativo de la serie.

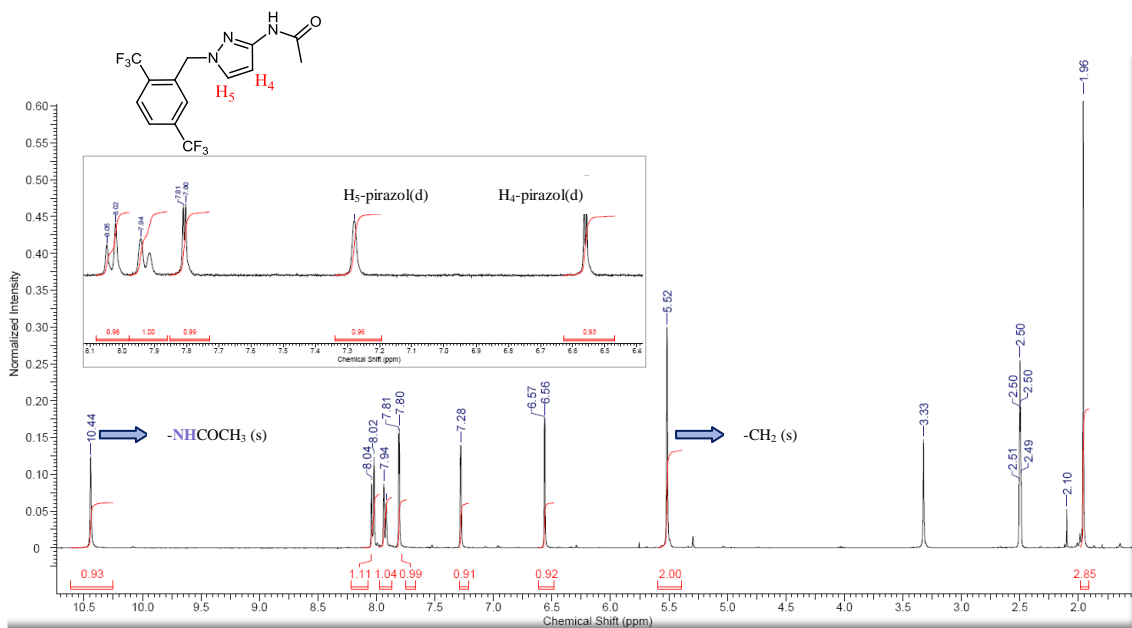


Figura 29

La caracterización del compuesto **5e** se completó con los datos de espectroscópicos de correlación heteronuclear de cuanto sencillo (HSQC) y correlación heteronuclear a múltiples enlaces (HMBC), Figuras 30 y 31.

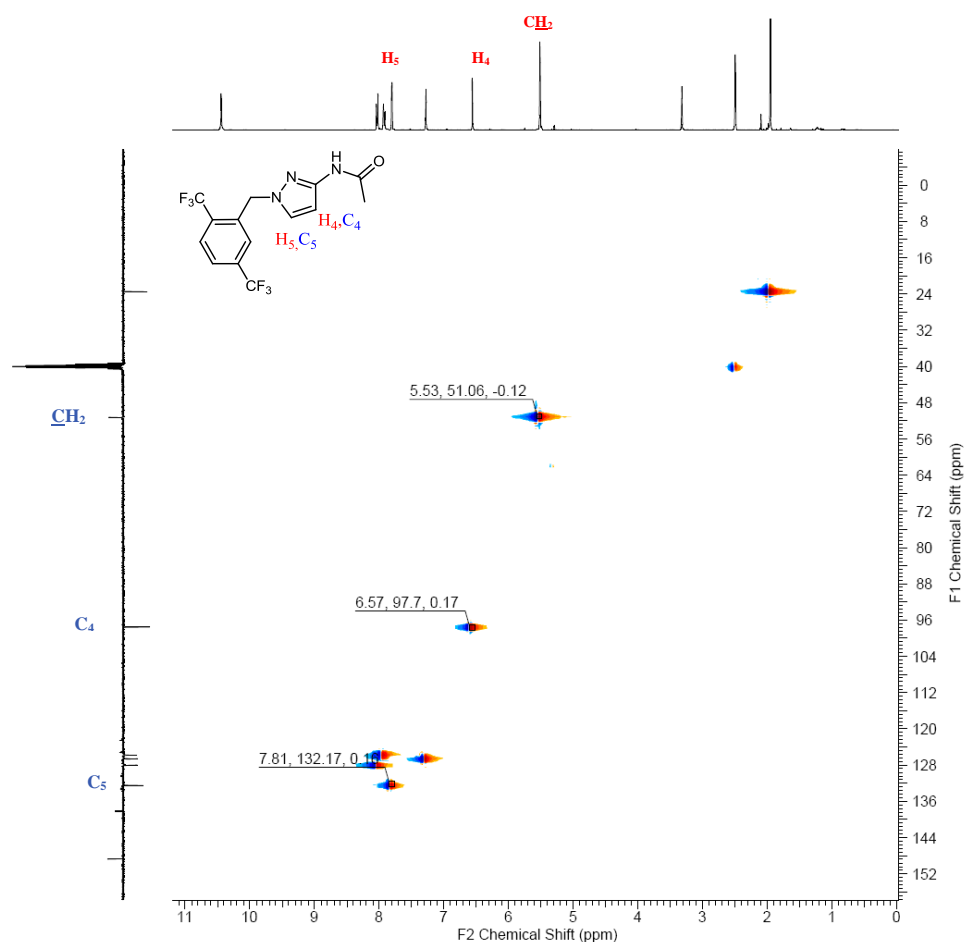


Figura 30. Espectro de correlación heteronuclear de cuanto sencillo (HSQC).

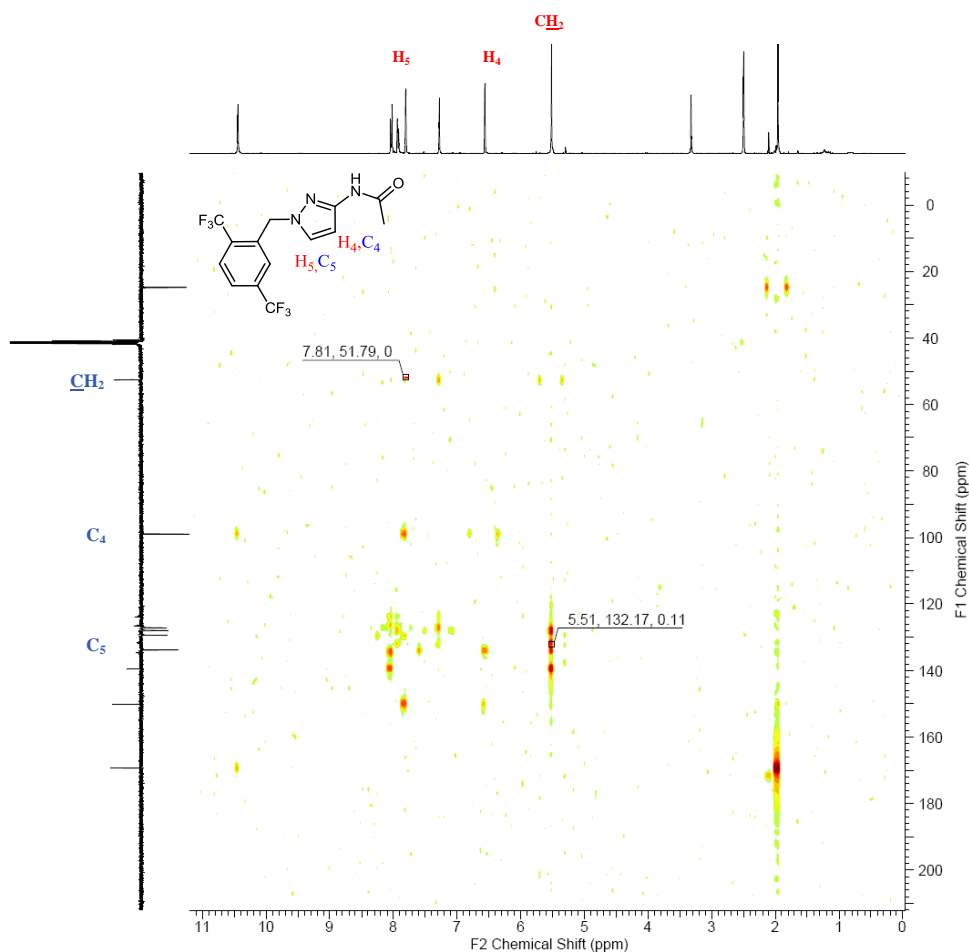


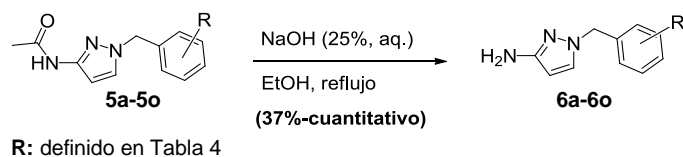
Figura 31. Espectro de correlación heteronuclear a múltiples enlaces (HMBC).

El estudio de los espectros de correlación permite determinar la relación entre los protones del pirazol (H_4 y H_5) con el átomo de C del grupo metileno, al igual que la relación entre los protones del grupo CH_2 con los átomos de C del pirazol, C_4 y C_5 . Como se observa en la Figura 31 existe una correlación clara entre los protones del grupo CH_2 con C_5 . Se observa también la correlación esperada, entre H_5 con el átomo de C del metileno. En cambio no se aprecia ningún tipo de correlación entre el grupo metileno con los átomos H_4 o C_4 . Este análisis confirma que en la reacción de bencilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (**4a**) se obtuvo el regioisómero deseado (**5e**) que presenta la sustitución en el N1 del pirazol.

3.2.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido-*N*-bencilpirazoles **5a-5o**

Las aminas **6a-6o** se sintetizaron a partir del 3-acetamido-*N*-bencilpirazol correspondiente por hidrólisis del grupo acetamido con hidróxido sódico acuoso (25%) en etanol, calentando a 75°C (Esquema 6). Las aminas resultantes fueron aisladas

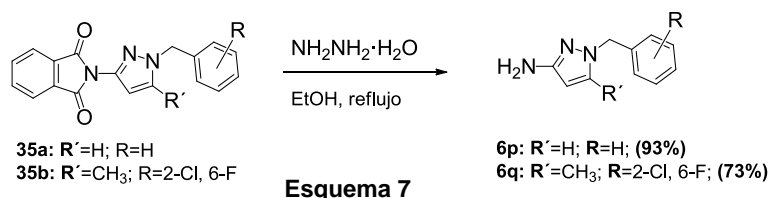
mediante extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico, diclorometano o acetato de etilo, tras eliminación del etanol en condiciones de presión reducida.



Esquema 6

En la mayoría de los casos trató de evitarse la purificación, de esta manera se minimizó el manejo y la exposición a los compuestos que contenían la fracción del 3-aminopirazol, conocido como potencial agente carcinogénico.

En los casos en los que se utilizó el grupo protector ftalimido (**35a** y **35b**). La desprotección se realizó utilizando hidracina monohidrato⁹² (Esquema 7).



Esquema 7

Esta etapa sintética alternativa fue empleada para la síntesis de los 3-aminobenzimidazoles **6p** y **6q**.

Los 3-aminobenzimidazoles sintetizados (**6a-6q**) fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS). Las características espectroscópicas de ¹H-RMN más destacables de los intermedios **6a-6q** se ilustran en la Figura 32 para el intermedio **6e**, como ejemplo representativo de la serie.

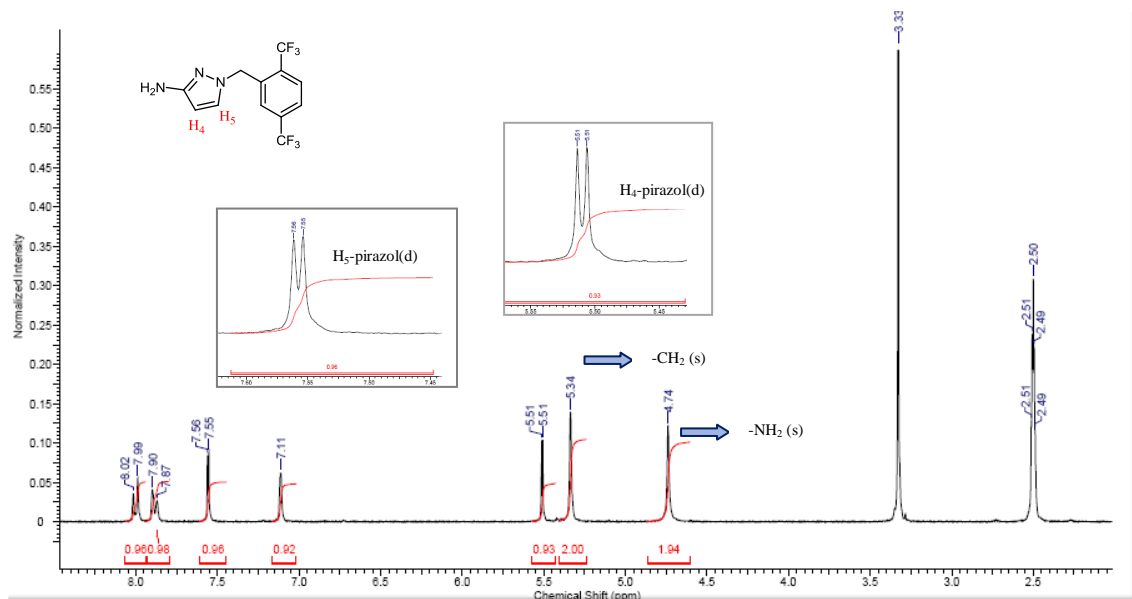
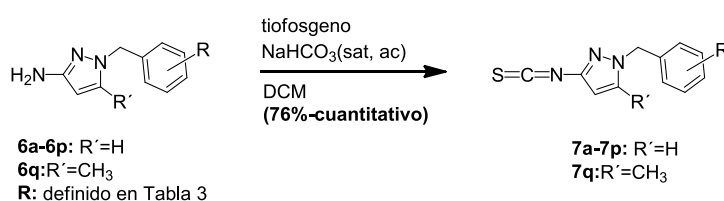


Figura 32

3.2.1.3. Síntesis de los isotiocianatos **7a-7q**

La preparación de los isotiocianatos **7a-7q** se realizó a partir de las correspondientes aminas por reacción con tiofosgeno en diclorometano y empleando bicarbonato acuoso saturado como base⁹³ (Esquema 8). A excepción del compuesto **7d**, que se purificó por cromatografía en gel de sílice, los isotiocianatos se aislaron por simple separación de fases y concentración del extracto orgánico, siendo empleados en el siguiente paso de la síntesis sin purificación adicional previa.



Esquema 8

Todos los isotiocianatos sintetizados (**7a-7q**) fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS). Las características espectroscópicas de ¹H-RMN más destacables de los intermedios, se ilustran en la Figura 33 para el intermedio **7e**, como ejemplo representativo de la serie.

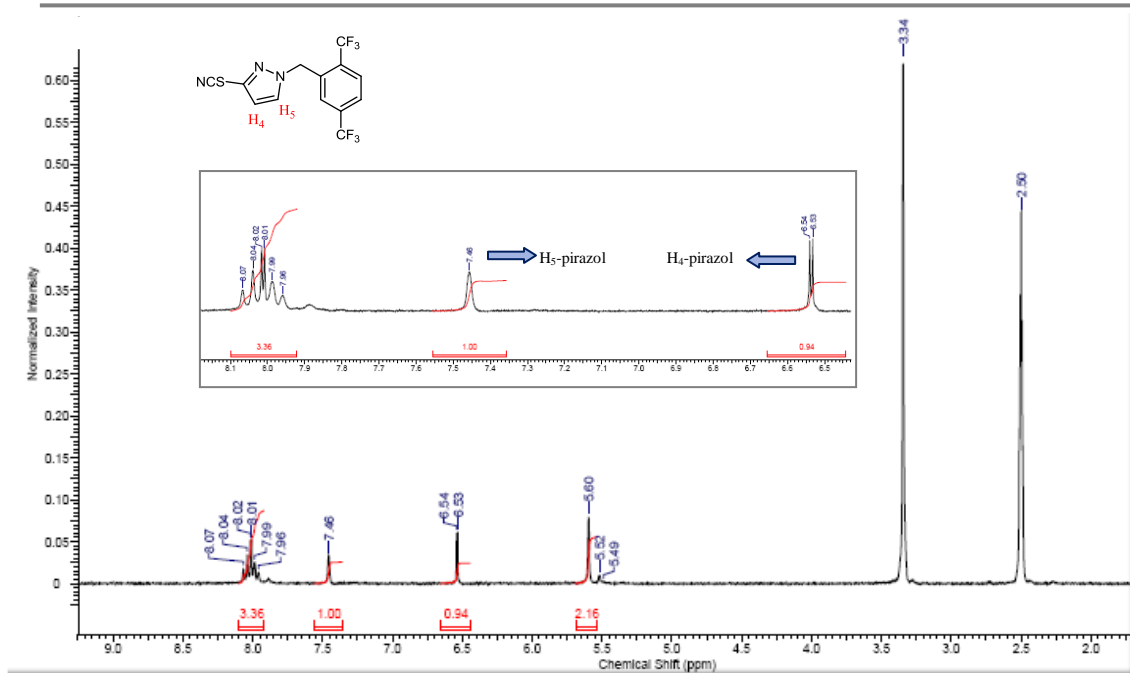
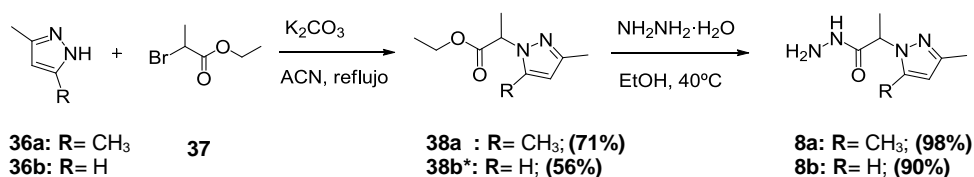


Figura 33

3.2.1.4. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol 9-27 y 39-40

En este capítulo de la memoria, la mayoría de los compuestos fueron sintetizados utilizando la hidrazida **8a**, ya que en aquel momento el equipo del proyecto consideraba que la sustitución 3,5-dimetilpirazol era la óptima para tener potencia frente a la enzima. También se prepararon algunos derivados correspondientes con la hidrazida del 3-metilpirazol (**8b**) como parte derecha. La síntesis de las dos hidrazidas se detalla a continuación en el Esquema 9.

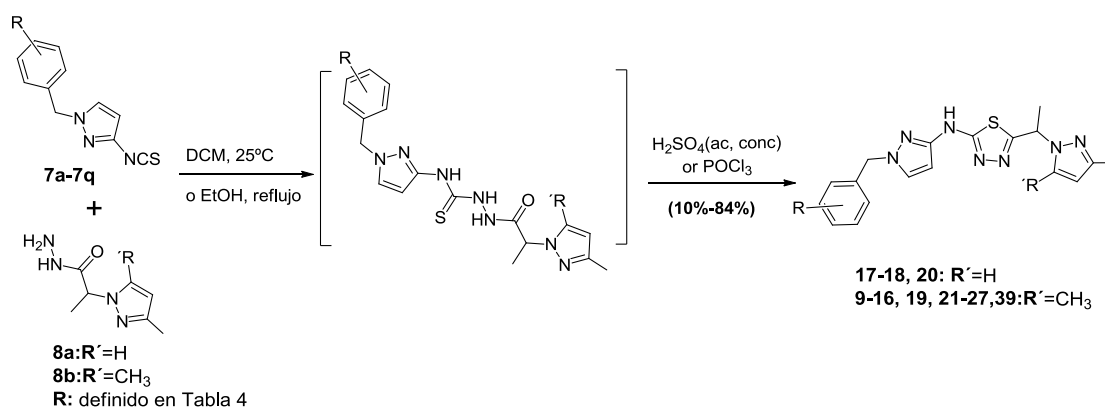


Esquema 9

* En la reacción de alquilación del pirazol también se obtuvo el regioisómero etil-2-(5-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanoato en una proporción 3:7 a favor del regioisómero deseado **38b**.

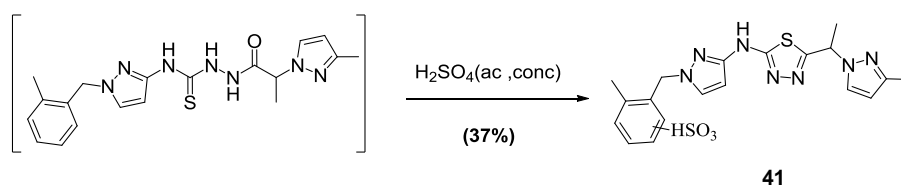
En la reacción de alquilación con el bromopropanoato **37**, el 3,5-dimetilpirazol **36a**, con dos N equivalentes en su estructura, condujo únicamente al derivado **38a** siendo más eficiente⁹⁴ que el 3-metilpirazol **38b** que dio lugar a los dos regioisómeros posibles.

Por reacción de los isotiocianatos **7a-7q** con las hidrazidas **8a** y/o **8b** se obtuvieron los nuevos 1,3,4-tiadiazoles⁹⁵. La obtención de los nuevos derivados de tiadiazol, **9-20**, **25** y **40**, se consiguió en dos pasos de reacción, descritos en el Esquema 10. El primer paso consiste en la obtención de los intermedios tiosemicarbazida por tratamiento de los isotiocianatos con la hidrazida correspondiente en diclorometano a temperatura ambiente o en etanol a reflujo y el segundo consiste en la ciclación regioselectiva de las tiosemicarbazidas, intermedios no aislados, en presencia de ácido sulfúrico concentrado acuoso. En la mayoría de los casos la neutralización posterior de las mezclas con amoníaco acuoso (32%), generó un precipitado que, una vez filtrado y lavado fue caracterizado, sin necesidad de purificación posterior. En el resto de los casos los compuestos necesitaron de una etapa de purificación. (véase sección experimental, aptdo: 4.1.2.7).



Esquema 10

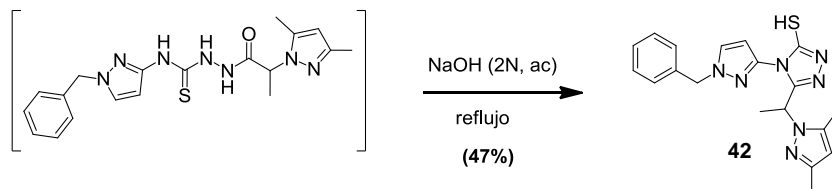
Una de las desventajas que presentó la utilización de ácido sulfúrico concentrado acuoso como medio ácido fue la sulfonación del bencilo⁹⁶ en el caso de que el anillo no presentase sustituyentes halógeno. Un ejemplo que ilustra esta reactividad se recoge en el Esquema 11. (véase sección experimental, aptdo: 4.1.3).



Esquema 11

Con el fin de solventar el problema se empleó el oxiclورو de fósforo (ácido de Lewis) en condiciones de reflujo⁹⁷. Tras la eliminación del oxiclورو de fósforo a presión reducida y purificación se obtuvieron los compuestos **21-24**, **26-27** y **39**.

La ciclación en condiciones básicas condujo al triazol **42** (Esquema 12), tal y como está descrito en la literatura en substratos similares⁹⁷. El producto obtenido se evaluó en el ensayo bioquímico resultando inactivo.



Esquema 12

Todos los compuestos sintetizados se obtuvieron como mezcla racémica y fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de masas y resonancia magnética nuclear. Las características espectroscópicas de ¹H-RMN más destacables de los compuestos **9-27**, **39-40**, **43-45** se ilustran en la Figura 34 para el compuesto **13** como ejemplo representativo de la serie.

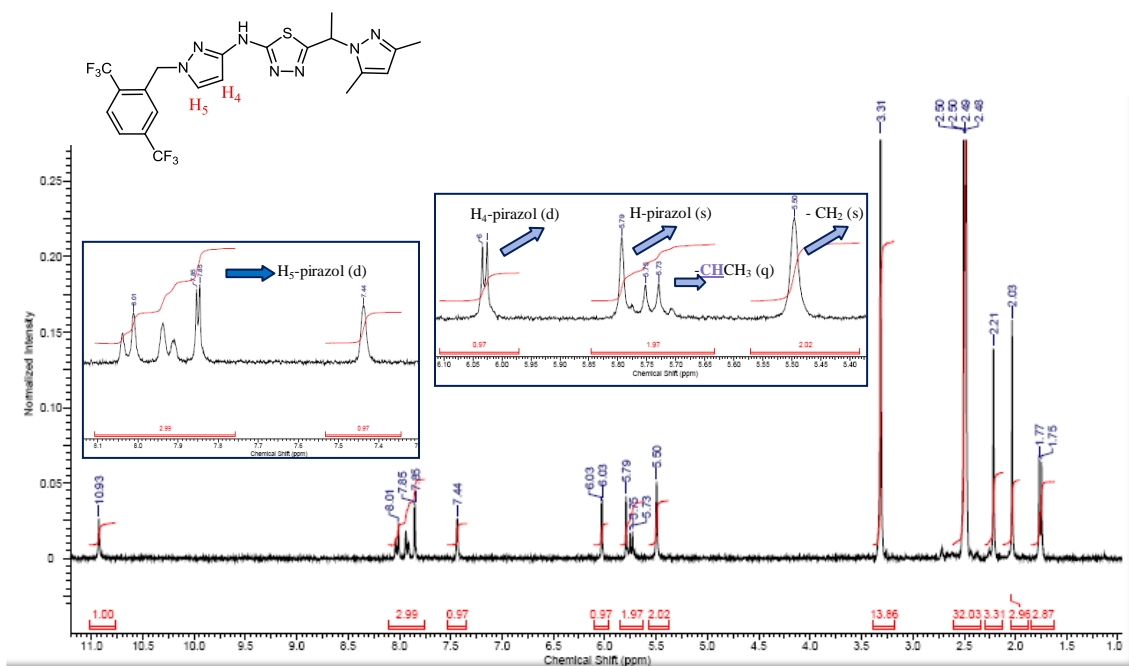


Figura 34

3.2.2. Actividad biológica y análisis de los resultados

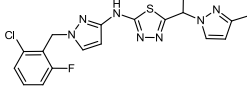
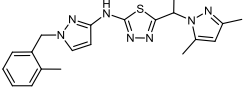
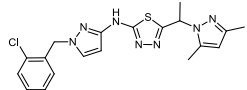
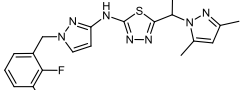
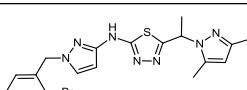
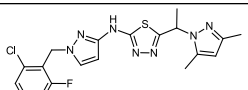
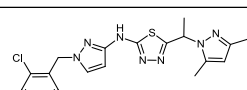
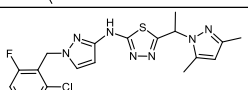
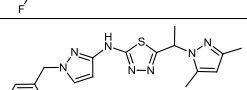
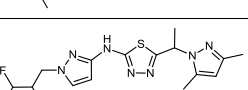
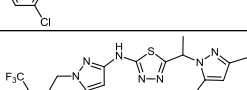
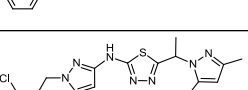
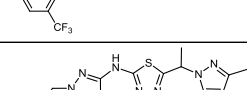
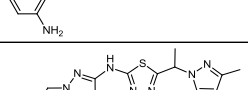
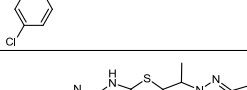
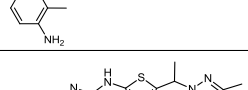
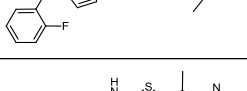
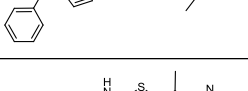
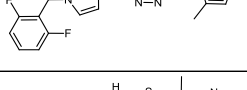
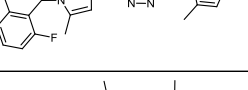
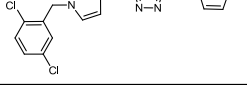
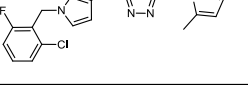
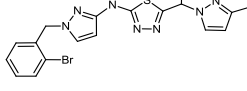
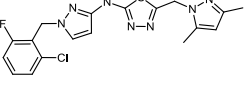
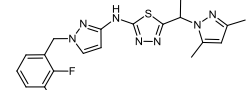
Los estudios biológicos de determinación del carácter antituberculoso de los tiadiazoles sintetizados se han realizado mediante el ensayo enzimático de inhibición del enzima InhA, midiendo la IC₅₀ de cada compuesto y ensayo de inhibición del

crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ensayo en cultivo celular). Las modificaciones estructurales llevadas a cabo en la parte izquierda de la molécula se han ido planteando en función de los resultados de inhibición enzimática y de crecimiento celular, obtenidos de forma paralela (Tabla 5).

La metodología de estos ensayos se describe en el apartado 4.2 de la sección experimental.

En la Tabla 5 se recogen los valores de IC_{50} y MIC, así como las constantes de inhibición, K_i , determinadas en aquellos casos en los que los valores de IC_{50} se encuentran en el límite de detección del ensayo que es de 2 nM.

Tabla 5. Actividades biológicas de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	InhA K _i (nM)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	InhA K _i (nM)	Mtb H37Rv MIC (μ M)
GSK1		0.002	0.5	1	21		0.021	n.d	4
9		0.006	2.8	>32	22		0.002	0.5	≤0.2
10		0.008	7.6	3	23		0.002	0.9	2
11		0.06	n.d	32	24		0.004	0.4	0.5
12		0.004	0.2	0.4	25		0.002	0.8	≤0.2
13		0.006	n.d	>31.2	26		0.041	n.d	31.2
14		0.06	n.d	8.1	27		0.044	n.d	8
15		0.006	n.d	2	39		0.01	6.2	8
16		0.003	3.3	0.4	40		0.002	1.5	1
17		0.014	n.d	8	43		1.44	n.d	>32.3
18		0.008	6	8	44		0.002	n.d	1
19		0.002	2.3	1	45		0.023	n.d	31.2
20		0.008	4.8	3					

n.d: no determinada

En primer lugar, comparando los resultados de las parejas de compuestos: **GSK1-25**, **9-17** y **10-18** y **19-20**, no se observa en ninguno de los casos que la sustitución del 3-metilpirazol por el 3,5-dimetilpirazol mejore la actividad enzimática. En cuanto a la actividad inhibitoria en cultivo celular, hay que resaltar que intervienen otros factores más allá de la interacción de la molécula con el enzima, tales como la lipofilia y/o la solubilidad; otra propiedad a tener en cuenta es la capacidad de unión a proteínas que posee la molécula. Estos factores juegan un papel importante a la hora de atravesar la pared celular de la micobacteria y por tanto de mostrar actividad inhibitoria del crecimiento en el cultivo celular. Si bien podemos comentar que la solubilidad de los 3,5-dimetil derivados es ligeramente menor que en el caso de los 3-metilpirazoles. Ésa podría ser una de las razones de que en algunos derivados no se pudiera valorar la actividad en el ensayo de inhibición de MtbH37Rv.

Con respecto a las sustituciones en el bencilo, se observa que es necesaria la presencia de un grupo halógeno en la posición *orto* para mantener la potencia presentada por la molécula de referencia **GSK1**. Los compuestos **10**, **15** y **18**, presentan interesantes valores de inhibición enzimática y de crecimiento celular, mientras que los compuestos **21** y **39**, muestran unos valores enzimáticos de un orden de magnitud mayor y unos valores de MIC menos interesantes. Observando los datos para los compuestos **11** y **14**, se puede concluir que la sustitución en *para* conlleva una considerable pérdida de actividad tanto a nivel enzimático como a nivel celular.

En referencia a la polisustitución en el anillo bencílico, y atendiendo a los datos de los compuestos **12**, **19**, **20** y **22**, se observa que el patrón de disustitución 2,3 es el que presentó mejor perfil biológico. Siendo el patrón de disustitución 2,6 una buena alternativa al anterior, como revelan los datos del compuesto **16**. Otros patrones probados como el 2,5 representado en los compuestos **9**, **13** y **17**, si bien presentan valores de inhibición enzimática del orden de nanomolar, éso no se tradujo a unos valores significativos de actividad en el ensayo celular ($MIC \geq 8$). En el caso de la trisustitución 2,3,6 representada en los compuestos **23** y **24** presentaron valores de actividad equipotentes al análogo disustituído **25**.

La introducción de grupos polares, (veáanse compuestos: **26** y **27**) no generó resultados interesantes. Ambas estructuras fueron diseñadas con la idea de rebajar la lipofilia de la molécula, introduciendo como sustituyente del anillo un grupo polar amino, pero resultó en una pérdida de un orden de magnitud en la inhibición del enzima.

Con respecto al grupo amino puente, se puede concluir atendiendo a los datos obtenidos para el compuesto **43**, que la metilación del nitrógeno trae consigo una dramática pérdida de la actividad frente a la enzima y por tanto una pérdida de inhibición del crecimiento a nivel celular. Sin embargo, se observa en el compuesto **40** que la presencia de un grupo metilo en la posición 5 del pirazol, mantiene la potencia, aunque no muestra ninguna otra ventaja respecto del compuesto de referencia **GSK1**.

Cabe destacar que en este primer ejercicio de exploración de la región izquierda, los compuestos **12**, **16**, **22**, **24** y **25**, presentaron mejores valores de potencia en célula entera que el compuesto **GSK1**, punto de partida del ejercicio.

3.3. NUEVOS DERIVADOS DE 1,3,4-TIADIAZOL CON 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETANOL COMO PARTE DERECHA

Como se menciona en el capítulo anterior la parte derecha de la molécula era una región que admitía pocas variaciones en su estructura, mientras que la parte izquierda ofrecía más posibilidades de ser explorada. Paralelamente al trabajo de esta memoria, en el grupo de investigación se trabajó en el reemplazo de la parte derecha de la molécula (3-metilpirazol) por otros sistemas aromáticos. De estas nuevas estructuras cabe destacar el 4-metiltiazol presente en el compuesto **46** (Tabla 6), este compuesto retiene la potencia presentada por el cabeza de serie **GSK1**. Otra de las modificaciones realizadas en el grupo fue la incorporación de un grupo hidroxilo sobre el carbono puente (compuesto **47**) consiguiendo mejorar considerablemente la actividad en célula entera, manteniendo la misma actividad enzimática con respecto al cabeza de serie **GSK1**.

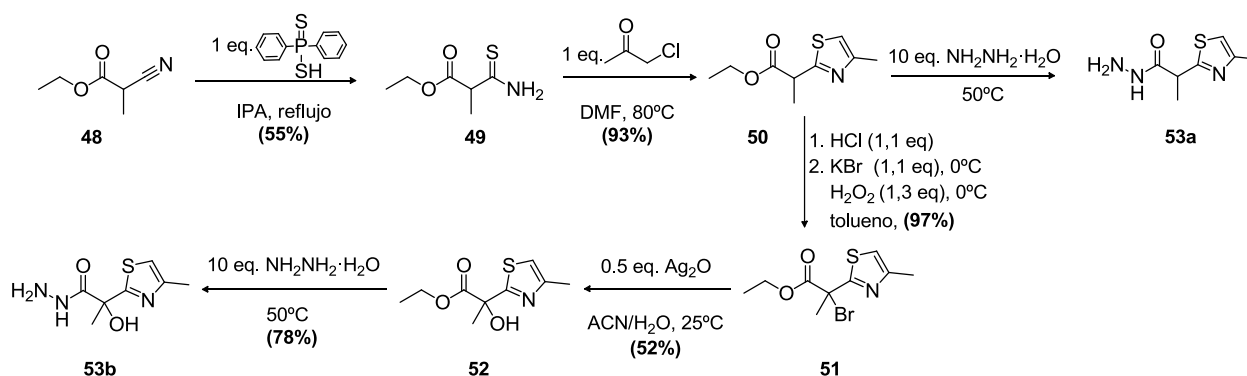
Parte de este trabajo de investigación consistió en incorporar esas modificaciones y valorar qué sustitución en la parte izquierda de la molécula daba como resultado el compuesto con mejor perfil biológico y físico-químico.

Tabla 6. Actividades biológicas del compuesto **GSK1** y derivados con nuevas regiones derechas.

Estructura			
Comp.	GSK1	46	47
InhA IC ₅₀ (μM)	0.002	0.002	0.002
Mtb H37Rv MIC (μM)	1	2	0.2

3.3.1 Síntesis de la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida (**53b**)

La ruta sintética que se utilizó en la síntesis del intermedio 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida **53b**, consiste en 5 pasos de reacción descritos en el Esquema 13.


Esquema 13

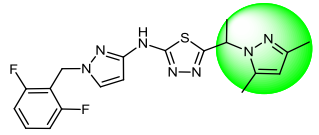
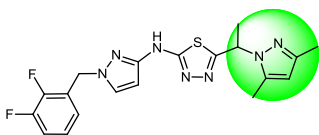
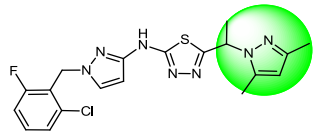
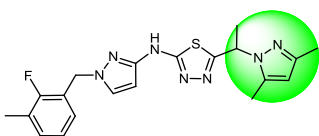
En la primera etapa de la síntesis, tiene lugar una reacción de conversión del grupo nitrilo a tioamida⁹⁹. Para ello se trató 2-cianopropionato de etilo (**48**) (1eq.) con ácido difenilfosfindioico (1 eq.) en isopropanol a reflujo. El ácido difenilfosfindioico es un reactivo utilizado en la hidrólisis de grupos nitrilo en condiciones suaves consiguiendo en este caso la tioamida correspondiente (**49**). El compuesto **49**, se empleó como reactivo de partida junto con la 2-cloroacetona (1 eq.) y dimetilformamida como disolvente en la reacción de ciclación de Hantzsch¹⁰⁰ obteniendo el heterociclo de tiazol **50**. El derivado bromado **51** se obtuvo a partir del éster **50** en tolueno¹⁰¹, tratándolo con ácido clorhídrico concentrado (1.1 eq.) y seguido de una adición a 0°C de bromuro potásico (1,1 eq.) y peróxido de hidrógeno (1.3 eq.). La introducción del grupo hidroxilo se llevó a cabo por oxidación¹⁰², utilizando óxido de plata (0.5 eq.) como agente

oxidante en una mezcla de acetonitrilo y agua, dando lugar al 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoato de etilo (**52**). Por último la obtención de las hidrazidas **53a** y **53b** se consiguió por desplazamiento del grupo etóxido de los ésteres **50** y **52** utilizando hidracina monohidrato (10 eq.) como disolvente a reflujo¹⁰³.

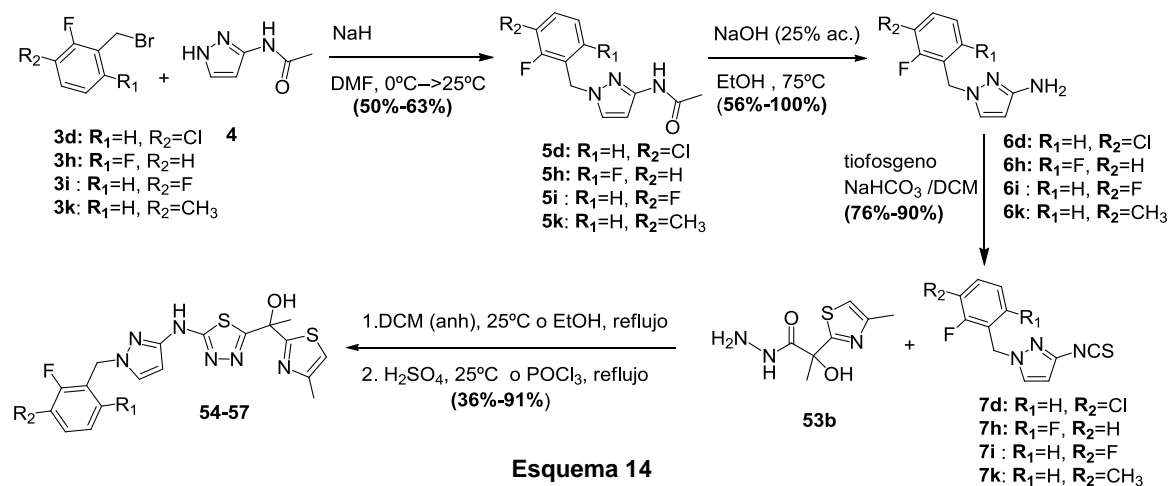
3.3.2. Síntesis de nuevos derivados de 1,3,4-tiadiazol con 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha

La obtención de la la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida (**53b**) mediante la ruta sintética descrita en el Esquema 13 permitió llevar a cabo la síntesis de *a priori* prometedores nuevos derivados. El diseño de estos derivados surgió como resultado de la combinación de la mejor parte derecha obtenida, 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol, con las mejores partes izquierdas discutidas en el capítulo anterior (Tabla 7).

Tabla 7. Actividades biológicas de los compuestos con mejores perfiles biológicos.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)
16		0.003	0.4	19		0.002	1
25		0.002	≤ 0.2	22		0.002	≤ 0.2

Así se prepararon los correspondientes bencilpirazoles con patrones de sustitución(2,6) o (2,3) con F, Cl o Me como sustituyentes (Esquema 14) descrito a continuación.



La secuencia de reacciones del Esquema 14 coincide con la empleada en la síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol pertenecientes a la serie del 3,5-dimetilpirazol, detallada en el apartado 3.2. La única variación que presenta es el reemplazo de la 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (**8a**) por la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propano hidrazida (**53b**).

Los intermedios **7d**, **7h**, **7i** y **7k** son comunes para las dos series y sus respectivas síntesis ya fueron descritas en los apartados 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.1.3. Los intermedios tiosemicarbazidas, se sintetizaron por tratamiento de los isotiocianatos con la hidrazida **53b** empleando como disolvente etanol a reflujo.

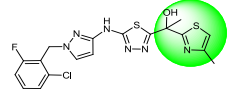
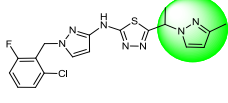
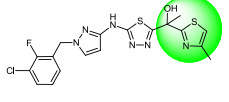
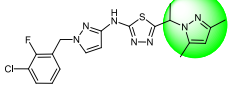
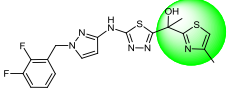
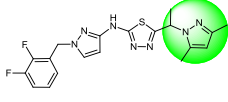
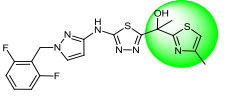
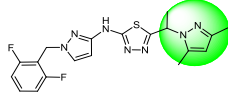
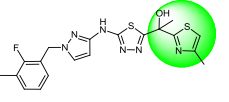
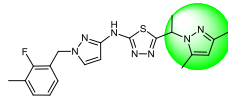
Todos los compuestos **54-57** se sintetizaron por ciclación de la tiosemicarbazida correspondiente en presencia de ácido sulfúrico concentrado acuoso. Los compuestos **54**, **55** y **56** necesitaron de una etapa de purificación tras la neutralización de los crudos con amoníaco (32%). (véase sección experimental, aptdo: 4.1.3.2).

Los compuestos sintetizados se enviaron a ensayo biológico para la determinación de su actividad biológica tanto enzimática como en célula entera.

3.3.3. Actividad biológica y análisis de los resultados

En la Tabla 8 se describen los valores de IC₅₀ en InhA y MIC en Mtb (H37Rv) de los nuevos derivados de 1,3,4-tiadiazol **54**, **55**, **56** y **57** así como de los correspondientes tiadiazoles pertenecientes a la serie del 3,5-dimetilpirazol **12**, **16**, **19** y **22**.

Tabla 8. Actividades biológicas de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)
47		0.002	0.2	GSK1		0.002	1
54		0.002	0.2	12		0.004	0.4
55		0.002	0.5	19		0.002	1
56		0.005	≤ 0.2	16		0.004	0.4
57		0.004	0.5	22		0.002	≤ 0.2

El análisis de los resultados recogidos en la Tabla 8, ha permitido constatar la relevancia de la región derecha de estas estructuras, en cuanto a actividad en célula entera se refiere, así como la elección de la molécula con el perfil más prometedor y mayores posibilidades de presentar un potencial carácter antituberculoso.

En primer lugar, por comparación de los resultados de los nuevos derivados de 1,3,4-tiadiazol **54**, **55**, **56**, **57** con los de los 1,3,4-tiadiazoles pertenecientes a las serie del 3,5-dimetilpirazol previamente sintetizados **12**, **16**, **19** y **22**, se puede concluir que como tendencia general el 1-(4-(metiltiazol-2-il)etanol como región derecha procuraba una mejora en la actividad en célula entera de la molécula. A esta conclusión se había llegado de manera preliminar comparando los resultados del par de compuestos **GSK1**, y **47**. Se investigaron las posibles razones de esta mejora pero no se pudo determinar qué papel desempeñaba el grupo hidroxilo para procurar esa mejora.

Comparando las actividades en célula entera de los compuestos **54**, **55**, **56** y **57**, se observa el compuesto **56** es el que mayor potencia presenta ($MIC \leq 0.2$). Este compuesto fue el seleccionado para continuar con los estudios de determinación del potencial carácter antituberculoso.

3.3.4. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros 58 y 59

Como se vio en el apartado 3.1, la pareja de enantiómeros **44** y **45** presentaron una clara diferencia en cuanto a actividad enzimática como inhibidores de la InhA. Este hecho puso de manifiesto la relevancia del centro quiral en este tipo de compuestos a la hora de mostrar actividad como antituberculosos. Con la idea de obtener información acerca de la importancia de la quiralidad en los nuevos derivados, que presentaban el 1-(4-metiliazol-2-il)etanol en la región derecha, se procedió a la separación de los enantiómeros que conformaban el compuesto **56**, sintetizado como racemato y se determinó la actividad de cada uno de los enantiómeros. La separación se llevó a cabo por HPLC en columna quiral (véase sección experimental, aptdo:4.1.3.3). Ambos enantiómeros **58** y **59** fueron evaluados en los ensayos biológicos y claramente el isómero *S* (**58**) resultó ser el más potente. Los datos de las actividades enzimáticas y en célula entera para ambos enantiómeros así como para el racemato (**56**) se recogen en la Tabla 9. La configuración absoluta fue determinada por la técnica de dicroísmo circular vibracional (VCD) (véase experimental aptdo:4.1.3.3).

Tabla 9. Actividades biológicas de **56** y de los enantiómeros correspondientes **58** y **59**.

Estructura			
Comp.	56	58	59
InhA IC ₅₀ (μM)	0.005	0.003	0.086
Mtb H37Rv MIC (μM)	≤0.2	≤0.2	7.8

Estos resultados revelan que el compuesto **58** presenta mayores posibilidades para llegar a ser un potencial agente antituberculoso. Dicho compuesto se seleccionó para continuar con los estudios biológicos *in vitro* con la idea de completar su perfil como potencial agente antituberculoso y validar su progresión a ensayos biológicos *in vivo*.

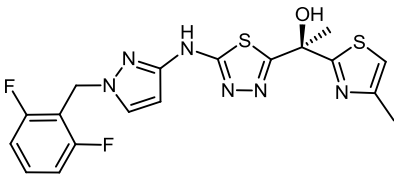
3.3.5. Perfil biológico *in vitro* del compuesto 58

Cuando un compuesto muestra un perfil de actividad interesante se hace necesario evaluarlo en otros ensayos *in vitro* para poder valorar el potencial del compuesto como un futuro fármaco ya que a parte de actividad biológica es importante tener en cuenta otras características del compuesto como son sus propiedades físicoquímicas y las

denominadas propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad).

Propiedades físicoquímicas de interés son: clogP, chromlogD (índice cromatográfico de hidrofobicidad), solubilidad (CLND) y unión a proteínas presentes en el suero plasmático (HSA). Para valorar las propiedades ADMET se emplea el ensayo de estabilidad en fracción microsomal en microsomas de ratón y humano. Se selecciona la especie de ratón por ser la empleada en el modelo de eficacia *in vivo* y humano por ser la especie objeto del tratamiento. Como ya se comentó en la Introducción, para evitar la aparición de resistencias, la infección de tuberculosis se trata con una combinación de fármacos. Con el fin de preveer potenciales interacciones droga-droga se valora la inhibición e inducción del citocromo CYP3A4, isoforma más representativa del complejo P450. La inducción se evalúa por la activación del hPXR (receptor nuclear X pregnano en humanos). La citotoxicidad se determina en una línea celular hepática de mamífero HepG2 y para valorar el posible efecto cardiovascular se mide la inhibición del canal de potasio hERG. Con toda esta información el compuesto más destacado en esta familia es **58**, su perfil biológico *in vitro* se describe en la Tabla 10.

Tabla 10. Perfil *in vitro* del compuesto 58.

Compuesto 58	
Eficacia <i>in vitro</i>	
MIC (μM)	≤0.2
Actividad enzimática InhA IC ₅₀ (μM)	0.003
Propiedades físico-químicas	
PM	434.08
Índice cromatográfico de hidrofobicidad (ChromlogD pH=7.4)	3.9
Porcentaje de unión a albúmina en suero (%HSA)	93.13
Solubility (CLND μM)	269
Propiedades ADME	
Inhibición de P450 3A4 Vivid Red IC ₅₀ (μM)	15.8
Inhibición de P450 3A4 Vivid Green IC ₅₀ (μM)	4.9
Aclarado intrínseco en ratón (mL/min/g)	14.2
Aclarado intrínseco en humano (mL/min/g)	2.2
Activación del receptor X pregnano en humanos	Sí
Toxicidad	
Citotoxicidad en líneas celulares HepG2 (μM)	>50
Inhibición del canal de K, hERG (μM)	>50

Además de la eficacia *in vitro* ya demostrada por el compuesto, éste muestra unas interesantes propiedades físico-químicas a excepción del índice cromatográfico de hidrofobicidad de valor moderado.

En relación a las propiedades ADMET, el compuesto no presenta ninguna alerta de cardiotoxicidad pero sí de baja estabilidad microsomal en ambas especies de ratón y humano, así como inhibición de los citocromos y activación del receptor X pregnano. Teniendo en cuenta que tanto la inducción de los citocromos, causada por la activación del receptor X pregnano, como la inhibición de los mismos se consideran causas directas del fenómeno de interacción fármaco-fármaco, el compuesto 58 presenta un riesgo considerable de producir interacciones fármaco-fármaco.

Se puede concluir por tanto que el compuesto 58 presenta claras desventajas en cuanto a estabilidad microsomal y potencial riesgo de provocar interacciones fármaco-fármaco, lo que dentro del grupo de investigación planteó la necesidad de valorar otras modificaciones estructurales que permitiesen minimizar o eliminar dicho riesgo.

3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA REGIÓN IZQUIERDA: COMPUESTOS HETEROAROMÁTICOS

Una vez identificadas las desventajas del compuesto **58**, baja estabilidad metabólica e interacción con los citocromos P450, se hizo patente la necesidad de seguir optimizando la estructura de las moléculas de la serie de los 1,3,4-tiadiazoles con el objeto de reducir los valores de aclaramiento hepático y de interacción de los citocromos P450, en especial la inhibición de los CYP3A4.

La introducción de polaridad en la estructura es una de las estrategias utilizadas en química médica para la obtención de moléculas con mejoradas propiedades metabólicas. Como ya se comentó anteriormente, la parte izquierda de la molécula ofrecía más posibilidades de ser explorada que la parte derecha por lo que se decidió que la introducción de polaridad en la estructura se llevaría a cabo en la región izquierda. Se consideraron dos estrategias para conseguir compuestos con una mayor polaridad: introducción de sustituyentes polares en el arilo (-NH₂, -OH, -OR etc) y reemplazo del grupo arilo por diferentes heterociclos. En relación a la estrategia de introducción de sustituyentes polares, observando la selección que se hizo de los primeros derivados bromados en la exploración preliminar de esa región (aptdo 3.2.1) así como las actividades biológicas y análisis de resultados descritos en el aptdo. 3.2.2, se consideró que las posibilidades de retener la actividad biológica en la primera estrategia eran menores que con la segunda. Por lo tanto, si bien se podrían seleccionar otros grupos polares para corroborar esta hipótesis, se decidió priorizar la segunda estrategia de reemplazo del grupo arilo por ciclos heteroaromáticos.

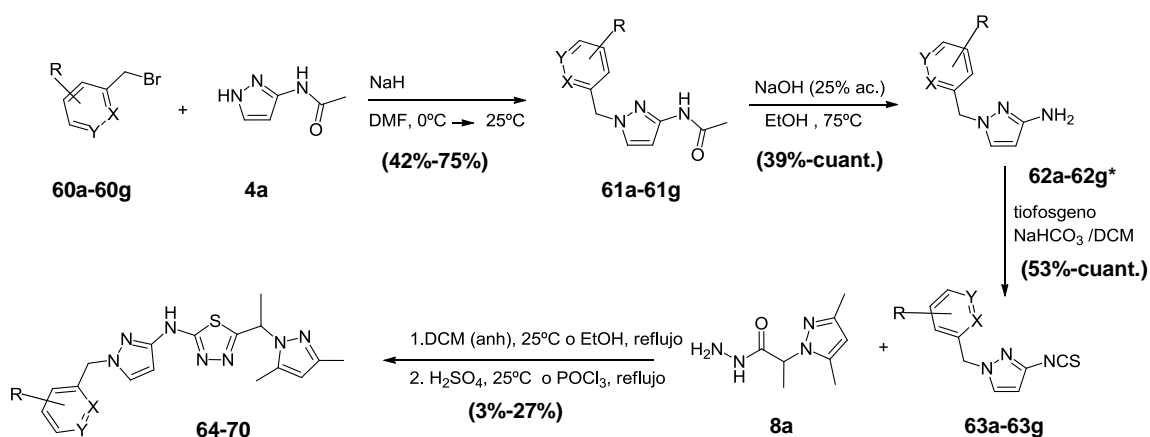
3.4.1. Síntesis de los 1,3,4-tiadiazoles con piridina como reemplazo del grupo arilo y 3,5-dimetilpirazol como región derecha

El anillo de piridina fue considerado como el primer reemplazo del benceno en la estructura. La selección de las primeras piridinas se realizó teniendo en cuenta el análisis de SAR establecido para los bencilpirazoles. Los monómeros de piridina empleados en este ejercicio se recogen en la Tabla 11, así como su disponibilidad. Las modificaciones estructurales llevadas a cabo posteriormente se fueron planteando en función de los resultados de inhibición enzimática y en célula entera, obtenidos de forma paralela.

Tabla 11. Selección de monómeros de piridina.

Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad
60a		Comercial ALDRICH	60d		Sintetizado	60f		Sintetizado
60b		Comercial ALDRICH	60e		Sintetizado	60g		Sintetizado
60c		Sintetizado						

La ruta sintética empleada en la obtención de estos nuevos derivados, fue la utilizada anteriormente. Esta propuesta sintética consiste en una ruta lineal de 5 pasos de reacción, en la cual se introduce el anillo de piridina en el primer paso de síntesis. (Esquema 15).



X= N, Y=C ó X=C, Y=N
 R= descrito en Tabla 11
 62d*: 1-((2-etoxipiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-3-amina

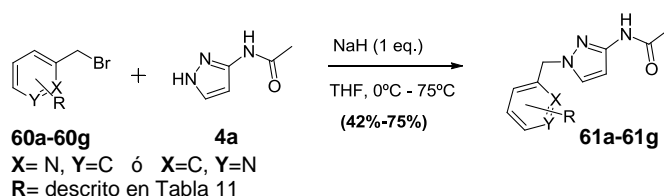
Esquema 15

Con idea de no perder información estructural se llevó a cabo un estudio inicial de relación estructura-actividad con el 3,5-dimetilpirazol como parte derecha de la molécula. Los compuestos fueron sintetizados y evaluados biológicamente, los datos actividad enzimática así como los de célula entera se recogen en la Tabla 12.

3.4.1.1. Reacción de alquilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (4a)

La reacción de alquilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (**4a**) se llevó a cabo empleando hidruro sódico (1.1 eq) como base, el correspondiente haluro tetrahidrofurano anhidro como disolvente (Esquema 16). Los 3-acetamido-*N*-metilpiridin-1*H*-pirazoles **61a** y **61b** se sintetizaron a partir de los haluros comerciales **60a** y **60b**, descritos en la Tabla 11. En los casos de los derivados **61c-61f** fue necesaria la síntesis de los haluros **60c-60f** a partir de los alcoholes comerciales correspondientes (Esquemas 17 y 18). En el caso concreto del derivado **61g** la síntesis se llevó a cabo a partir del aldehído comercial (Esquema 19).

a) Reacción de alquilación del 3-acetamido-1*H*-pirazol.



Esquema 16

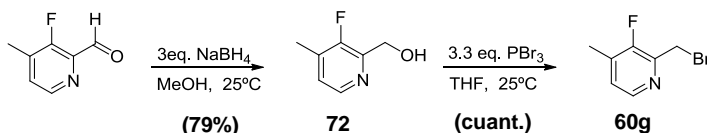
b) Obtención de los haluros no comerciales a partir de alcoholes.



Esquema 17

Esquema 18

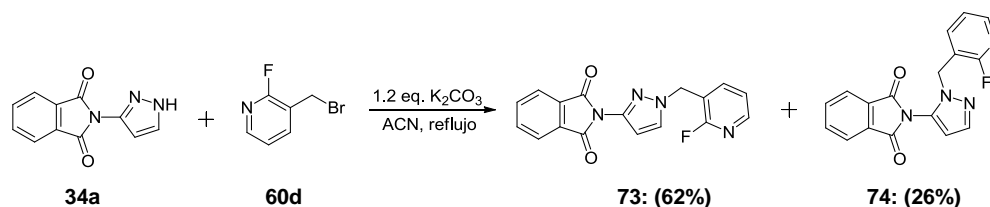
c) Obtención de la 2-(bromometil)-3-fluoro-4-metilpiridina (**60g**) a partir del aldehído comercial.



Esquema 19

Las condiciones drásticas de hidrólisis del grupo acetamido suponen un problema en la utilización de ciertos grupos funcionales, un ejemplo es el caso en el que el anillo de piridina presenta un sustituyente haluro en posición α al átomo de N del ciclo (**60d**).

En este caso tiene lugar la reacción de sustitución nucleófila del flúor por el grupo etoxilo dando lugar a la 1-((2-etoxipiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina (**62d**) (Esquema 21). Con el fin de evitar esta reactividad no deseada se optó por el empleo del grupo protector ftalimido que se había explorado como alternativa en el apartado 3.2.1.2. (Esquema 20).



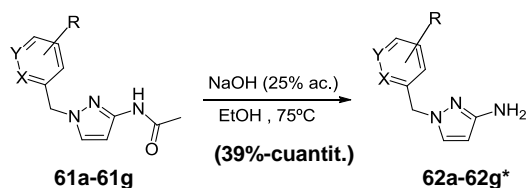
Esquema 20

Hay que recordar que el inconveniente que se plantea con el uso del grupo ftalimido como grupo protector es la falta de regioselectividad de la reacción de alquilación (Esquema 20). Los regioisómeros se obtuvieron en una proporción aproximada de (5:2) a favor del regioisómero deseado (**73**).

Todos los compuestos obtenidos en la reacción de alquilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol, **61a-61g** y del 3-ftalimido-*N*-1*H*-pirazol, **73-74**, así como los bromuros no comerciales **60c-60g** y el alcohol **72**, fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de masas (MS). (véase sección experimental).

3.4.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido-*N*-bencilpirazoles **61a-61g**

Las aminas **62a-62g** se sintetizaron a partir de los correspondientes acetamidopirazoles **61a-61g** por desprotección del grupo amino con hidróxido sódico acuoso (25%) en etanol, calentando a 75°C (Esquema 21). Las aminas resultantes fueron aisladas mediante extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico, diclorometano o acetato de etilo, tras eliminación del etanol en condiciones de presión reducida.



X= N, Y=C ó X=C, Y=N

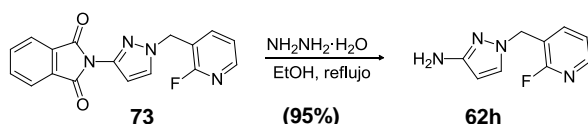
R= descrito en Tabla 11

62d*: 1-((2-etoxipiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina

Esquema 21

Como ya se describió en el apartado 3.2.1.2, en la mayoría de los casos trató de evitarse la purificación, minimizando el manejo y la exposición a los compuestos que contenían la fracción del 3-aminopirazol.

La obtención de la 1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina (**62h**), se obtuvo a partir del intermedio **73** por desprotección del grupo amino. La desprotección se llevó a cabo con hidracina monohidrato en etanol a reflujo⁹² (Esquema 22).

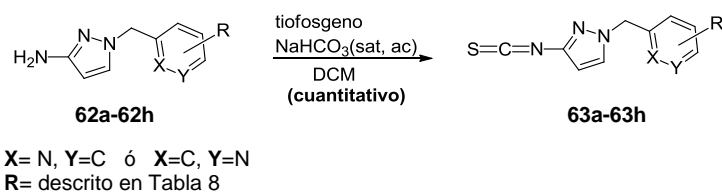


Esquema 22

En este caso fue necesaria la purificación del compuesto **62h**, que fue caracterizado por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS), descritos en la sección experimental.

3.4.1.3. Síntesis de los isotiocianatos 63a-63h

La preparación de los isotiocianatos **63a-63h** se realizó a partir de las correspondientes aminas **62a-62h** en presencia de tiofosgeno en diclorometano y empleando bicarbonato acuoso saturado como base⁹³ (Esquema 23). A excepción del isotiocianato **63b**, que se purificó por cromatografía en gel de sílice, los isotiocianatos intermedios se aislaron por simple separación de fases y concentración del extracto orgánico, siendo empleados en el siguiente paso de la síntesis sin purificación adicional previa.

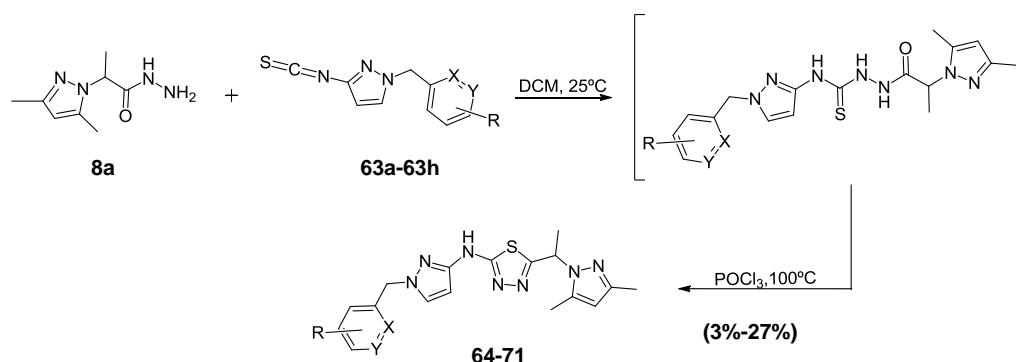


Esquema 23

Todos los isotiocianatos sintetizados fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS).

3.4.1.4. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol 64-71

La obtención de las nuevas estructuras de tiadiazol se consiguió en dos pasos de reacción (Esquema 24).



Esquema 24

La propuesta sintética es la misma que la empleada en la obtención de los derivados de 1,3,4-tiadiazol previamente sintetizados, descrita en el Esquema 10. Las tiosemicarbazidas intermedios, se sintetizaron por tratamiento de los isotiocyanatos **63a-63h** con la 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (**8a**) en diclorometano a temperatura ambiente⁹⁵.

Como se describió en el aptdo 3.2.1.4, el empleo de ácido sulfúrico concentrado acuoso como medio ácido dio lugar a la sulfonación del bencilo en aquellos casos en los que el anillo estaba activado frente a la sustitución electrófila aromática. Teniendo en cuenta esta experiencia previa se empleó el oxiclورو de fósforo (ácido de Lewis) en condiciones de reflujo⁹⁶. Tras la eliminación del oxiclورو de fósforo a presión reducida y purificación se obtuvieron los compuestos **64-71**. En todos los casos los compuestos necesitaron de una etapa de purificación descrita en la sección experimental 4.1.4.5.

Todos los derivados de tiadiazol sintetizados (**64-71**) fueron aislados, purificados y caracterizados por sus datos espectroscópicos de masas y de resonancia magnética nuclear de protón.

3.4.2. Actividad biológica, estabilidad microsomal *in vitro* y análisis de los resultados

Aparte de los ensayos enzimáticos de inhibición del enzima InhA e inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ensayo en célula entera) de los compuestos, los estudios biológicos se completaron con el ensayo de inhibición

enzimática de los CYP3A4 y con el ensayo de estabilidad microsomal *in vitro*, calculando el aclaramiento de los compuestos en las especies de ratón y humano. La metodología de estos ensayos ha sido descrita en el apartado 4.2. de la sección experimental.

En la Tabla 12 se recogen los valores de actividad enzimática frente a InhA (IC_{50}) así como los valores de actividad en célula entera, valores de inhibición de los CYP3A4 y valores de aclaramiento. La tabla se completó con los valores de $clogP$, parámetro utilizado como medida de la lipofilia.

Tabla 12. Resultados biológicos de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	clogP	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g ratón)	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g hombre)	IC ₅₀ CYP450 3A4VR (μ M)	IC ₅₀ CYP450 3A4VG (μ M)
GSK1		0.002	1.0	4.04	14.9	2.4	1	2.5
15		0.006	2.0	3.89	26.3	4.2	2.5	3.2
16		0.003	0.4	4.03	30.1	4.0	5	6.3
64		0.299	31.3	2.42	n.d	n.d	5.8	13.2
65		0.033	>31.3	2.30	n.d	n.d	6.2	8.0
66		0.041	15.6	2.47	10.4	1.9	7.2	10.3
67		0.015	4.0	3.26	n.d	n.d	24	10.1
68		0.017	2.0	2.75	10.3	n.d	29.1	16.6
69		0.048	16.0	3.82	n.d	n.d	15.1	3.2
70		0.954	>31.2	3.32	n.d	n.d	5.1	5.1
71		0.021	2.0	3.06	23.9	3.8	30.8	9.7

El análisis de los resultados reflejados en la Tabla 12, ha permitido evaluar el efecto del reemplazo del anillo de benceno por piridina en el potencial carácter

antituberculoso de los compuestos, para favorecer la comparativa entre ambas regiones izquierdas se incluyen en la tabla los compuestos **15** y **16** con los resultados biológicos correspondientes.

En primer lugar comparando los datos de inhibición enzimática de InhA de los compuestos **15**, **22**, y **39** (Tabla 5) con los compuestos **64**, **65**, **67**, **68** y **71**, es claro que el reemplazo del benceno por el heterociclo de piridina acarrea una disminución de la actividad enzimática. En cuanto al estudio de SAR, por comparación de los resultados de los compuestos **64** y **65** con los compuestos **68** y **71** respectivamente se hace patente que la presencia de un grupo halógeno en posición *orto* favorece la interacción enzimática. Esta apreciación se observó también en el caso en el que el benceno constituía la región izquierda de la estructura. Los compuestos con un sustituyente haluro en posición *orto* reportaron los mejores valores de IC₅₀ a excepción del compuesto **69**. Este compuesto presenta un átomo de cloro en posición *para*, al igual que en el caso de los arilos este tipo de sustitución conlleva una pérdida en la actividad tanto a nivel enzimático como en célula entera. En cuanto a la disustitución en el anillo de piridina con grupos flúor y metilo en posiciones 3 y 4, derivado **67**, también mostró un valor interesante en el ensayo de inhibición enzimática. Este derivado junto a los comentados anteriormente con sustitución 3-F (**68**) y 2-F (**71**) son los mejores compuestos de esta serie. En cuanto a la actividad en el ensayo de inhibición del crecimiento celular de la micobacteria cabe destacar los compuestos **67**, **68** y **71** que presentaron los mejores valores de MIC en esta serie, todos ellos con un sustituyente flúor en posición *orto*. A pesar de ser los derivados más activos de esta serie no consiguieron alcanzar las unidades de submicromolar en célula entera, que se habían alcanzado en la serie de los bencilpirazoles descrita en el capítulo anterior.

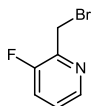
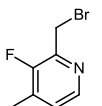
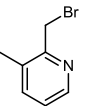
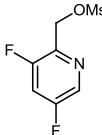
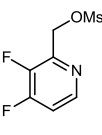
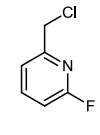
La estrategia del empleo de la piridina como región izquierda tenía como objetivo reducir la lipofilia aumentando la polaridad con idea de mejorar la estabilidad microsomal *in vitro* y reducir la inhibición de los CYP3A4. Por comparación de los valores de clogP de los compuestos **71** y **68** con los compuestos **15** y **16**, se concluye que la introducción del átomo de N de la piridina disminuye considerablemente la lipofilia de la molécula. Por otro lado los compuestos **66**, **68** y **71**, progresados al ensayo de estabilidad microsomal *in vitro* presentaron unos valores de aclaramiento en ratón mejorados con respecto al compuesto **15**. Con respecto a la inhibición de los CYP3A4, no se encontró un efecto claro al empleo de la piridina como región izquierda.

De este ejercicio de SAR preliminar se concluye que el uso de la piridina como región izquierda en la estructura reduce la lipofilia de la molécula consiguiendo una mejora en el aclaramiento de los compuestos, si bien, la interacción enzimática para lograr la inhibición de InhA se ve afectada negativamente. Con la idea de mejorar el perfil tanto biológico frente a TB como farmacocinético se consideró oportuno sintetizar nuevos derivados utilizando en este caso el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como región derecha.

3.4.3. Síntesis química de los 1,3,4-tiadiazoles con piridinas como reemplazo del grupo arilo y 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha

La síntesis de nuevos derivados se llevó a cabo siguiendo la propuesta sintética descrita en el aptdo 3.4.1. (Esquema 15). En el caso de los nuevos derivados se reemplazó la 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (**8a**) por la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida (**53b**). La selección de piridinas se realizó teniendo en cuenta el análisis de SAR llevado a cabo en la serie de los 3,5-dimetilpirazoles (aptdo 3.4.2). En la Tabla 13 se recogen todos los monómeros utilizados así como su disponibilidad.

Tabla 13. Monómeros seleccionados para el ejercicio de exploración.

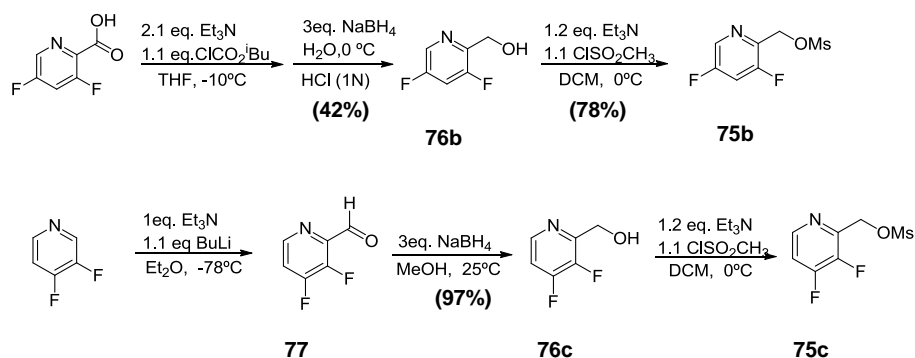
Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad
60e		Sintetizado	60g		Sintetizado	75a		Comercial CHEMBRIDGE
75b		Sintetizado	75c		Sintetizado	75d		Comercial ALDRICH

A continuación se revisan cada una de las etapas de la síntesis de los 1,3,4-tiadiazoles derivados así como la obtención de los mesilatos no comerciales empleados en el primer paso de la ruta sintética.

3.4.3.1. Síntesis de los mesilatos 75b-75c

La síntesis de estos compuestos se llevó a cabo siguiendo procedimientos generales descritos en la literatura. Todos los intermedios sintetizados descritos en el Esquema 25, fueron aislados, purificados y caracterizados por sus datos

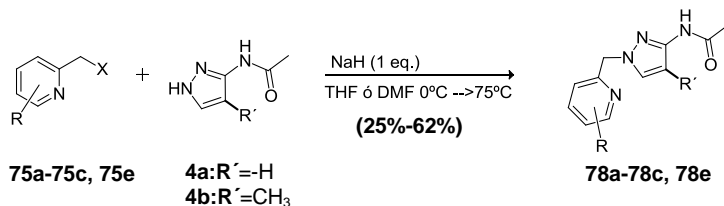
espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y de masas (MS).



Esquema 25

3.4.3.2. Reacción de alquilación de los 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazoles **4a-4b** y del 3-ftalimido-*N*-1*H*-pirazol (**34a**)

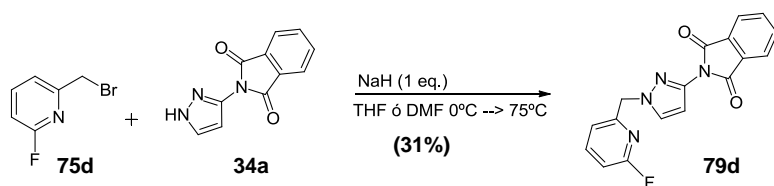
La reacción de alquilación de los 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazoles **4a** y **4b** se llevó a cabo empleando hidruro sódico (1 eq.) como base, el correspondiente haluro o mesilato (Tabla 13) y tetrahidrofurano (anhidro) o dimetilformamida (anhidra) como disolvente (Esquema 26).



R: definido en la tabla 13

Esquema 26

En el caso concreto de la 2-(clorometil)-6-fluoropiridina (**75d**), con el sustituyente F en posición α al N del ciclo (Tabla 13), se llevó a cabo la alquilación sobre el 3-ftalimido-*N*-1*H*-pirazol (**34a**) y así evitar la formación de productos secundarios derivados del desplazamiento del átomo de flúor. La reacción de alquilación se describe en el Esquema 27, dando lugar al compuesto **79d**.

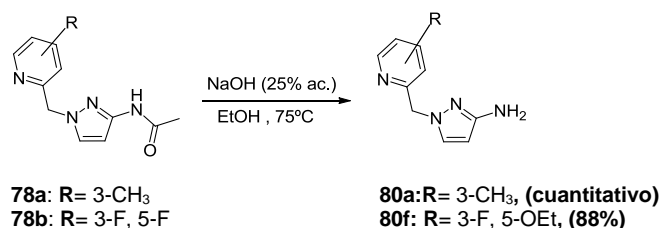


Esquema 27

La reacción de protección del pirazol con el grupo ftalimido presentaba como principales inconvenientes la falta de regioselectividad y la difícil separación de los regioisómeros formados, como consecuencia se aisló y caracterizó el regioisómero deseado (**79d**) con bajo rendimiento.

3.4.3.3. Reacción de desprotección de los 3-acetamido-*N*-(1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-pirazoles (**78a-78c**)

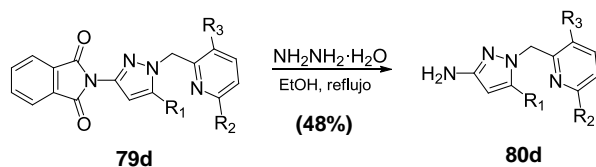
Las aminas **80a** y **80f** se sintetizaron a partir de los intermedios **78a** y **78b** por desprotección del grupo amino con hidróxido sódico acuoso (25%) en etanol, calentando a 75°C (Esquema 28). Las aminas resultantes fueron aisladas mediante extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico, diclorometano o acetato de etilo, tras eliminación del etanol en condiciones de presión reducida (véase aptdo experimental: 4.1.4.4).



Esquema 28

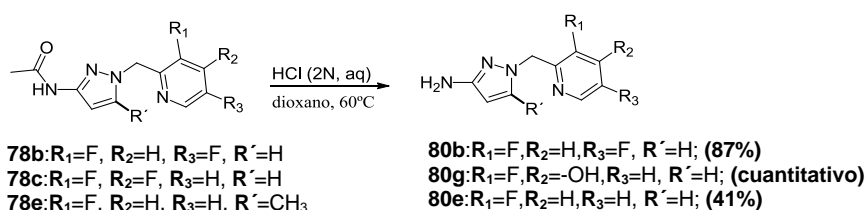
En la desprotección del intermedio **78b** se obtuvo como producto la 1-((5-etoxi-3-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina (**80f**), resultado de la sustitución del átomo de flúor en posición para por el grupo etoxilo.

El compuesto **80d** se obtuvo a partir del intermedio **79d**, por desprotección del grupo ftalimido. La desprotección se llevó a cabo con hidracina monohidrato en etanol a reflujo⁹² (Esquema 29).



Esquema 29

Para completar el SAR propuesto, fue necesario definir una alternativa a las condiciones básicas estándar empleadas en la desprotección del grupo amino. Se evaluó la posibilidad de desproteger el grupo amino en condiciones ácidas. El uso de HCl (aq, 2N) utilizando dioxano (anhidro) como disolvente a 60°C, se convirtió en una alternativa válida para la obtención del compuesto **80b**, sin embargo, en el caso en el que el sustituyente F estaba en posición *-para* al N no se obtuvo el producto deseado sino el intermedio, 2-((3-amino-1*H*-pirazol-1-il)metil)-3-fluoropiridin-4-ol (Esquema 30), resultado de la sustitución del átomo de flúor en posición 4 por el grupo hidroxilo, **80g**. El compuesto **80e** también se obtuvo empleando esta alternativa de desprotección.



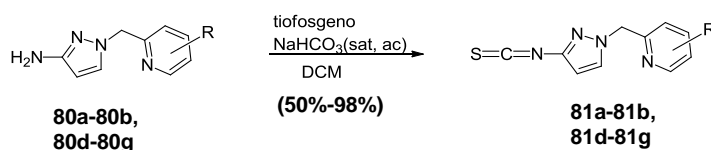
Esquema 30

A pesar de ser obtenidas de manera inesperada, las aminas **80f** y **80g** se utilizaron como materiales de partida de la siguiente etapa síntesis.

Todos los aminas descritas en esta sección (**80a-80b**, **80d-80g**) fueron caracterizadas por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS).

3.4.3.4. Síntesis de los isotiocianatos **81a-81b** y **81d-81h**

La preparación de los compuestos **81a-81b** y **81d-81g** se realizó a partir de las correspondientes aminas en presencia de tiofosgeno en diclorometano y empleando bicarbonato acuoso saturado como base⁹³ (Esquema 31). Los isotiocianatos se aislaron por simple separación de fases y concentración del extracto orgánico, siendo empleados en el siguiente paso de la síntesis sin purificación adicional previa.

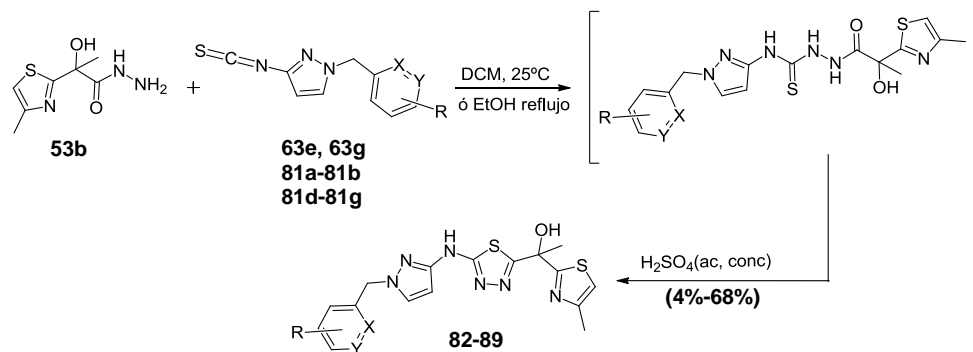


Esquema 31

Todos los isotiocianatos descritos (**81a-81b**, **81d-81g**) fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de masas (MS).

3.4.3.5. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol (**82-89**)

La obtención de las nuevas estructuras de tiadiazol se consiguió en dos pasos de reacción. (Esquema 32).



Esquema 32

En general, los intermedios tiosemicarbazida, se sintetizaron por tratamiento de los isotiocianatos **63e**, **63g**, **81a-81b** y **81d-81g** con la 2-hidroxi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida (**53b**) en diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 32), pudiendo ser también obtenidos empleando como disolvente etanol a reflujo. Los derivados de 1,3,4-tiadiazol (**82-89**) se sintetizaron por ciclación de la tiosemicarbazida correspondiente en presencia de ácido sulfúrico concentrado acuoso. Todos los compuestos necesitaron de una etapa de purificación tras la neutralización de los crudos con amoníaco (32%) seguida de una extracción en con disolvente orgánico (acetato de etilo o diclorometano) (véase aptdo:4.1.4.4 de la sección Experimental).

Todos los derivados de 1,3,4-tiadiazol sintetizados fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de masas y de resonancia magnética nuclear de protón.

3.4.4. Actividad biológica, estabilidad microsomal *in vitro* y análisis de los resultados

A continuación, al igual que en el apartado 3.4.2, se discuten los resultados biológicos de los nuevos derivados.

En la Tabla 14 se recogen los valores de actividad enzimática frente a InhA (IC_{50}) así como los valores de actividad en célula entera, valores de inhibición de los CYP3A4 y valores de aclaramiento. La tabla se completó con los valores de $clogP$.

Tabla 14. Resultados biológicos de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	clog P	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g ratón)	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g hombre)	IC ₅₀ CYP450 3A4VR (μ M)	IC ₅₀ CYP450 3A4VG (μ M)
56		0.005	≤ 0.2	2.15	7.0	1.7	10	6.3
67		0.015	4.0	3.26	n.d	n.d	24	10.1
68		0.017	2.0	2.75	10.3	n.d	29.1	16.6
82		0.022	1	2.33	1.9	0.2	42.7	16.3
83		0.007	3.9	2.72	2.6	0	>50.1	17.8
84		0.004	0.5	2.23	3.9	0.4	5.9	9
85		0.014	1	2.72	3.2	0.1	37	17.6
86		0.039	1.9	2.53	2.5	<0.5	37.1	11.7
87		0.054	3	2.47	n.d	n.d	>50.1	22.4
88		0.127	15.6	2.53	n.d	n.d	20.9	6.8
89		>1	>31.2	1.75	n.d	n.d	>50.1	>50.1

Por comparación de los datos enzimáticos de los compuestos **82** y **83**, con los datos de sus análogos pertenecientes a la serie del 3,5-dimetilpirazol, **68** y **67** respectivamente, no parece clara la influencia del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol en la interacción enzimática con InhA, ya que se obtuvieron valores enzimáticos similares para ambas parejas de compuestos. Observando las actividades en célula entera, se considera que los valores son del mismo orden. Para la pareja de compuestos **67** y **83** las actividades en célula entera resultaron idénticas. A priori la comparación de los resultados de potencia entre estos compuestos no permitía sacar ninguna conclusión.

Si bien, como se muestra en la Figura 35, la correlación entre IC_{50} y MIC es mucho mejor para los derivados pertenecientes a la serie que presentaba el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol en su parte derecha que para la serie que presentaba el 3,5-dimetilpirazol en esa región.

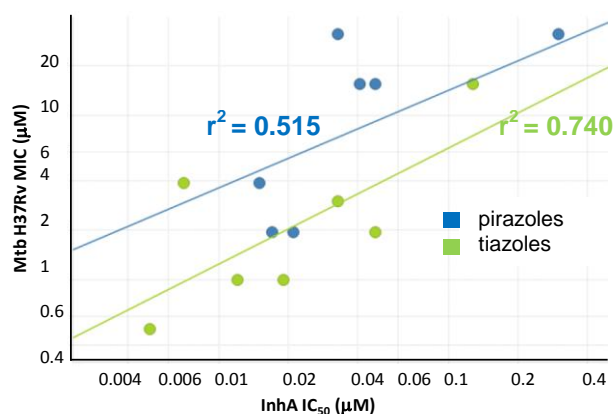


Figura 35

A pesar de que el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol no mejoraba la interacción enzimática, parece claro que procuraba una mejora a nivel de célula entera. Como tendencia general se observó que para actividades enzimáticas similares, las actividades en célula entera resultaron ser mejores en aquellos compuestos que presentaban el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha. Esta conclusión se apoya en el hecho de que aparte de la interacción con la enzima existen numerosos factores involucrados en la inhibición del crecimiento de la micobacteria tales como la lipofilia, la solubilidad, la capacidad de unión a proteínas, etc. Con el objetivo de analizar la influencia de estos factores en la inhibición del crecimiento de la micobacteria y entender las distintas correlaciones entre la actividad enzimática y la actividad en cultivo celular mostradas por las series, se estudió la relación entre el valor de la MIC frente a distintos parámetros. Los parámetros seleccionados fueron: el logP, como medida de la lipofilia, el área total de la superficie polar (TPSA) y la permeabilidad en membrana artificial (AMP) como medidas de la capacidad de los compuestos para permear las membranas celulares. El estudio se llevó a cabo analizando las gráficas descritas a continuación.

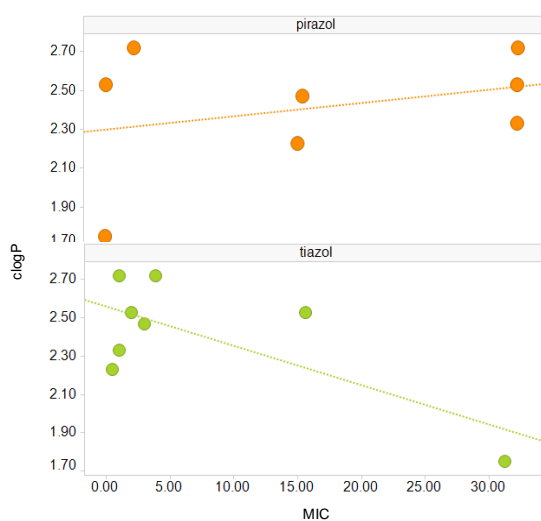


Figura 36. MIC vs clogP

En el caso de la lipofilia (Figura 36), no existe una correlación clara entre la potencia y los valores de clogP. Se puede observar en el gráfico que los compuestos más activos de la serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol muestran valores de clogP próximos a 2, un valor de clogP < 2 es considerado adecuado para evitar problemas de citotoxicidad a nivel de la membrana¹⁰². En cuanto a la serie del 3,5-dimetilpirazol, los derivados presentaron un rango de valores de clogP más amplio sin guardar ninguna relación con la potencia.

A pesar de no encontrar una dependencia directa entre la actividad y la lipofilia en ninguna de las dos series objeto de estudio, se puede concluir que el cambio estructural del 3,5-dimetilpirazol por el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol no sólo mantiene la potencia en célula entera sino que proporciona a las moléculas un perfil de lipofilia adecuado para poder llegar a ser fármacos.

Con respecto a la permeabilidad, no se disponía de valores experimentales necesarios para hacer el análisis completo. En su lugar se utilizaron valores teóricos de permeabilidad de membrana artificial (AMP) y del área total de la superficie polar (TPSA) obtenidos mediante cálculos *in silico* del modelo de permeabilidad desarrollado en GSK.

Las gráficas obtenidas se representan a continuación en las Figuras 37 y 38.

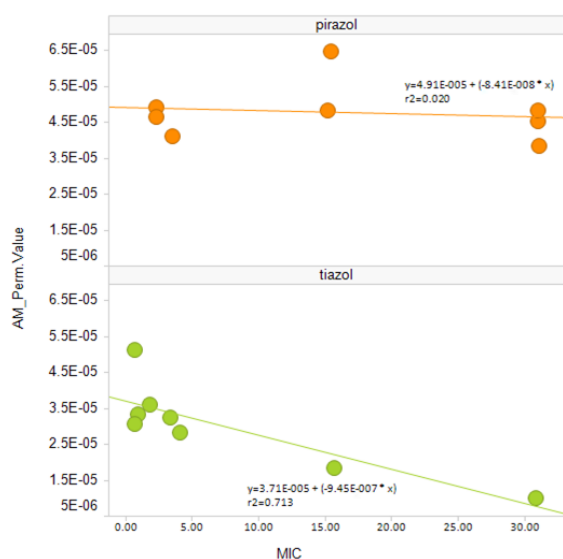


Figura 37. MIC vs AMP

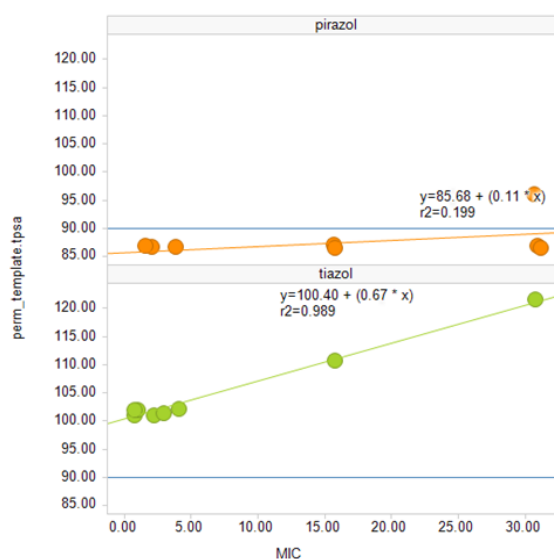


Figura 38. MIC vs tPSA

Como se muestra en las Figuras 37 y 38, al igual que ocurría con la lipofilia no fue posible encontrar una correlación entre los valores de MIC presentados por los derivados del 3,5-dimetilpirazol y los parámetros de permeabilidad estudiados. Sin embargo, en la serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol sí se encontró una correlación lineal clara en ambos casos.

En el caso de la AMP, la correlación con la MIC en la serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol sigue la tendencia esperada, a mayor capacidad del compuesto para atravesar la membrana de la micobacteria, menor concentración total de compuesto se requiere para lograr el mismo efecto de inhibición, presentando menor valor de MIC.

En cuanto al área total de la superficie polar se encuentra descrito en la literatura el rango de valores óptimo para esta propiedad. Como tendencia general, las moléculas con una superficie polar de más de 140 (\AA)^2 suelen presentar una pobre permeabilidad de las membranas celulares mientras que las moléculas capaces de penetrar la barrera hematoencefálica, suelen requerir una superficie polar menor de 90 (\AA)^2 ¹⁰². Observando la visualización de la TPSA para las dos series, a medida que la superficie polar aumenta, disminuye la potencia en célula entera como consecuencia de la pérdida de permeabilidad a través de la membrana de la micobacteria. En el caso de los derivados del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol, de nuevo se encuentran en el espacio físico-químico deseado.

Analizando las gráficas del estudio, se observa que los derivados del 3,5-dimetilpirazol presentaban un amplio rango de valores de solubilidad y lipofilia. Se trata de una selección heterogénea en cuanto a estas propiedades se refiere; mientras que la serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol estaba constituida por un grupo más homogéneo de compuestos, con valores similares de propiedades-físicoquímicas. Este hecho podría explicar la falta de correlación entre los valores de potencia enzimática y potencia en célula entera que presentaba la serie del 3,5-dimetilpirazol (Fig.35).

Por otro lado la serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol además de presentar interesantes valores de actividad en célula entera, presentó un perfil más balanceado. Se trataba de compuestos potentes, solubles y con valores de lipofilia y permeabilidad en el rango considerado óptimo para el desarrollo de un fármaco. Por ello se decidió continuar con la síntesis y el estudio de los derivados de esta serie.

Una vez identificados los mejores compuestos en cuanto a potencia y propiedades físico-químicas, el siguiente paso fue el análisis de los parámetros de estabilidad metabólica e interacción con los CYP3A4, que habían sido identificados como claras desventajas del compuesto **58**, derivado más avanzado del proyecto.

En relación a los resultados de estabilidad microsomal, a diferencia de los compuestos **66**, **68**, **71**, **15** y **16**, los nuevos derivados **82**, **83**, **84**, **85** y **86**, mostraron unos mejores valores de aclaramiento, inferiores a 1 mL/min·g en humano e inferiores a 4 mL/min·g en ratón. El compuesto **82** presentó el mejor valor de aclaramiento en ratón.

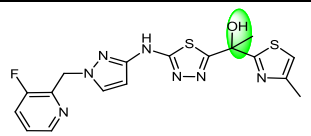
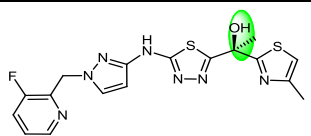
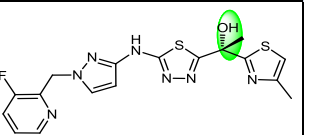
En cuanto a los datos de inhibición de los citocromos 3A4, no se puede establecer un SAR claro con los compuestos evaluados al igual que ocurría en el caso de los 3,5-dimetilpirazoles. De los compuestos recogidos en la tabla, cabe destacar los compuestos **82**, **85** y **86** que mostraron una inhibición moderada frente a los dos subtipos CYP3A4 (vivid red y vivid green) a la vez que presentaron valores interesantes de potencia.

Comparando los valores de actividad de célula entera, estabilidad microsomal e inhibición de los CYP3A4, se identificó el compuesto **82** como el derivado más prometedor de la serie.

3.4.5. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros **90** y **91**

La separación de los enantiómeros que conformaban el compuesto **82**, sintetizado como racemato, se llevó a cabo por HPLC en columna quiral (véase aptdo:4.1.2h de la sección Experimental). Ambos enantiómeros **90** y **91** fueron evaluados en los correspondientes ensayos biológicos para determinar su actividad tanto enzimática como en célula entera. El isómero *S* correspondiente al derivado **90** resultó ser claramente el más potente. Los datos de las actividades enzimáticas y en célula entera para ambos enantiómeros así como para el racemato (**82**) se recogen en la Tabla 14. La configuración absoluta fue determinada por la técnica de dicroísmo circular vibracional (VCD) (véase sección experimental aptdo: 4.1.2.8).

Tabla 14. Actividades biológicas del racemato **82** y los enantiómeros correspondientes **90** y **91**.

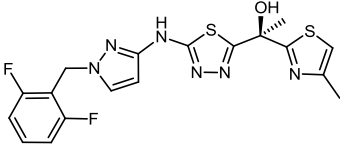
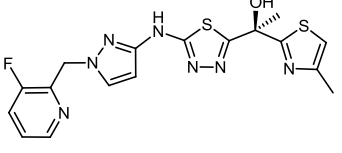
Estructura			
Comp.	82	90	91
IC₅₀(μM)	0.022	0.005	0.399
Mtb H37Rv MIC (μM)	1	≤0.5	31.2

Comparando los perfiles biológicos de los distintos pares de enantiómeros descritos en esta memoria, se observa que según se incorporan nuevas modificaciones en la región izquierda del 1,3,4-tiadiazol los perfiles de los isómeros *S* y *R* son claramente más diferenciados.

Observando los datos recogidos en la Tabla 14 se decidió seleccionar al compuesto **90** para completar su perfil biológico *in vitro* y evaluar sus posibilidades como potencial agente tuberculoso.

3.4.5.1. Perfil biológico *in vitro* del compuesto 90

Tabla 15. Comparación de los perfiles biológicos de los compuestos 90 y 58.

Estructura		
Compuesto	58	90
Eficacia <i>in vitro</i>		
MIC (μM)	≤0.2	0.5
Actividad enzimática InhA IC ₅₀ (μM)	0.003	0.005
Propiedades físico-químicas		
PM	434.08	417.08
Índice cromatográfico de hidrofobicidad (ChromlogD pH=7.4)	3.9	2.63
Porcentaje de unión a albúmina en suero (%HSA)	93.13	n.d
Solubility (CLND μM)	269	≥ 396
Propiedades ADME		
Inhibición de P450 3A4 Vivid Red IC ₅₀ (μM)	15.8	>50.11
Inhibición de P450 3A4 Vivid Green IC ₅₀ (μM)	4.9	31.6
Aclarado intrínseco en ratón (mL/min/g)	14.2	2.4
Aclarado intrínseco en humano (mL/min/g)	2.2	0.3
Activación del receptor X pregnano en humanos	Sí	Sí
Toxicidad		
Citotoxicidad en líneas celulares HepG2 (μM)	>50	>50
Inhibición del canal de K, hERG (μM)	>50	>50

n.d: no determinada

Comparando el derivado **90**, enantiómero *S* del compuesto **82**, con el mejor derivado de la serie de los bencilpirazoles, derivado **58**, se observa una mejora clara en los parámetros de propiedades ADMET. Los aclaramientos intrínsecos valorados por la estabilidad en fracción microsomal fueron significativamente menores, al igual que los valores de inhibición de los citocromos 3A4 que se redujeron en un orden de magnitud. En cuanto a cardiotoxicidad no se encontró ninguna alerta y las propiedades físico-químicas mejoraron ligeramente con respecto al compuesto **58**. Al igual que el compuesto **58**, el compuesto **90** resultó ser un activador del hPXR. A pesar de esto se puede extraer por comparación de ambos perfiles que el compuesto **90**, era de los dos el compuesto más balanceado y candidato a seguir avanzando en la cascada de progresión de la serie.

Este derivado se progresó a estudios *in vivo* para valorar los niveles de exposición, pero debido a problemas en la formulación del producto, las diferentes evaluaciones del perfil farmacocinético en la especie de ratón no presentaron los niveles de exposición esperados teniendo en cuenta los parámetros obtenidos *in vitro*.

Continuando con la estrategia de reemplazo del arilo por el anillo de piridina se siguió trabajando en la optimización de la estructura mediante la estrategia de introducción de anillos heteroaromáticos de 5 miembros como reemplazo del grupo arilo en la molécula de referencia **GSK1**. Este ejercicio de optimización se describe en el siguiente capítulo.

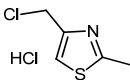
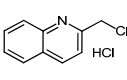
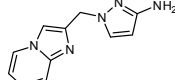
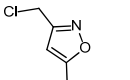
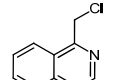
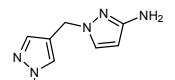
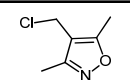
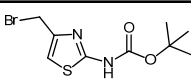
3.5. OPTIMIZACIÓN DE LA REGIÓN IZQUIERDA: OTROS HETEROCICLOS

3.5.1. Síntesis química de otros heterociclos como reemplazo del grupo arilo

A la vista de los resultados de los compuestos descritos en la Tabla 13 se puede concluir que el reemplazo del benceno por el heterociclo de piridina es un reemplazo admitido y capaz de generar compuestos competitivos en términos de potencia y también de estabilidad. Es por ello, que se decidió continuar la estrategia de introducción de polaridad mediante el reemplazo del benceno por diferentes heterociclos.

La selección se llevó a cabo teniendo en cuenta el estudio de SAR realizado en las series anteriores, la accesibilidad sintética de los monómeros de partida fue también un factor que condicionó este ejercicio de exploración. Atendiendo a estos criterios se seleccionaron diferentes heterociclos comerciales. Se consideraron también sistemas benzocondensados, **92d**, **92e** y **96h**, no explorados en las series anteriores. Los reactivos de partida se recogen en la Tabla 16.

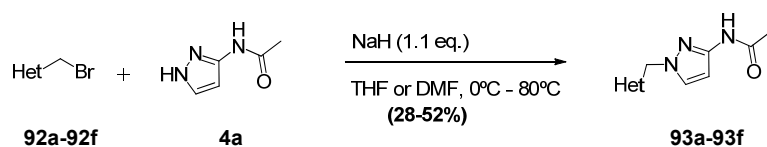
Tabla 16. Selección de heterociclos.

Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad	Comp.	Estructura	Disponibilidad
92a	 HCl	Comercial MAYBRIDGE	92d	 HCl	Comercial ALDRICH	96h		Comercial UKRORGANICS
92b		Comercial ACROSS	92e		Comercial APOLLO	96g		Comercial UKRORGANICS
92c		Comercial ALDRICH	92f		Sintetizado			

A continuación se detallan todas las etapas de la síntesis para la obtención de los productos finales obtenidos a partir de los monómeros recogidos en la Tabla 16.

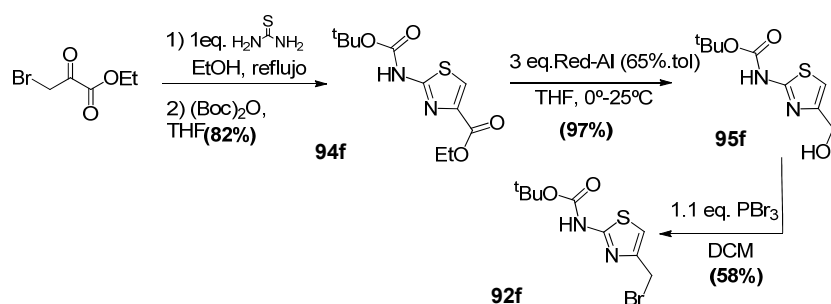
3.5.1.1. Reacción de alquilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (4a)

La reacción de alquilación del pirazol se llevó a cabo empleando hidruro sódico (1.1 eq) como base, el correspondiente haluro y tetrahidrofurano (anhidro) o dimetilformamida (anhidra) como disolvente (Esquema 33).



Esquema 33

Los derivados del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol **93a-93e**, se sintetizaron a partir de los haluros comerciales correspondientes. El derivado **93f**, se sintetizó a partir del bromuro **92f**. En el Esquema 34 se describen los tres pasos de reacción necesarios en la obtención de **92f**. El primer paso de la síntesis consiste en la condensación de la tiourea con el α -halo-oxoéster correspondiente en etanol, seguido de la protección del grupo amino para dar el ciclo de tiazol¹⁰³. El alcohol **95f**, se obtuvo por reducción del grupo éster empleando 3 equivalentes de la amalgama Red-Al y tetrahidrofurano (anhidro) como disolvente. El tercer paso consiste en la bromación del alcohol (**95f**) con 1.1 equivalentes de tribromuro de fósforo, empleando diclorometano (anhidro) como disolvente dio lugar a **92f**.



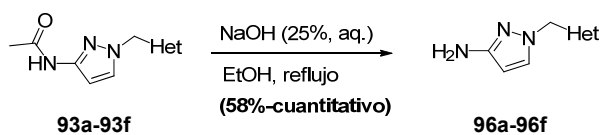
Esquema 34

Todos los compuestos sintetizados con la ruta anteriormente descrita fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de masas (MS), (véase sección experimental aptdo:4.1.5.2).

3.5.1.2. Reacción de desprotección de los 3-acetamido-*N*-bencilpirazoles **93a-93f**

Todas las aminas (**96a-96f**) se sintetizaron a partir de los 3-acetamidopirazoles **93a-93f**, por desprotección del grupo amino con hidróxido sódico acuoso (25%) en etanol, calentando a 75°C (Esquema 35). Las aminas resultantes fueron aisladas mediante extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico, diclorometano o acetato de etilo, tras eliminación del etanol en condiciones de presión reducida. En la

mayoría de los casos no fue necesaria la purificación posterior (véase sección experimental, aptdo 4.1.5.3).

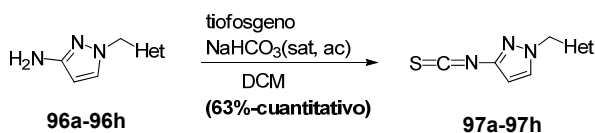


Esquema 35

Todos los compuestos sintetizados con la ruta anteriormente descrita fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de masas (MS).

3.5.1.3. Síntesis de los isotiocianatos 97a-97h

Los isotiocianatos **97a-97h** se prepararon a partir de las correspondientes aminas en presencia de tiofosgeno en diclorometano y empleando bicarbonato acuoso saturado como base⁹³ (Esquema 36). Los isotiocianatos **97g** y **97h** se obtuvieron a partir de aminas comerciales (**96g** y **96h**, Tabla 16), en el resto de los casos se emplearon los intermedios amina correspondientes sintetizados en el apartado anterior. Los isotiocianatos se aislaron por simple separación de fases y concentración del extracto orgánico, siendo empleados en el siguiente paso de la síntesis sin purificación adicional previa.



Esquema 36

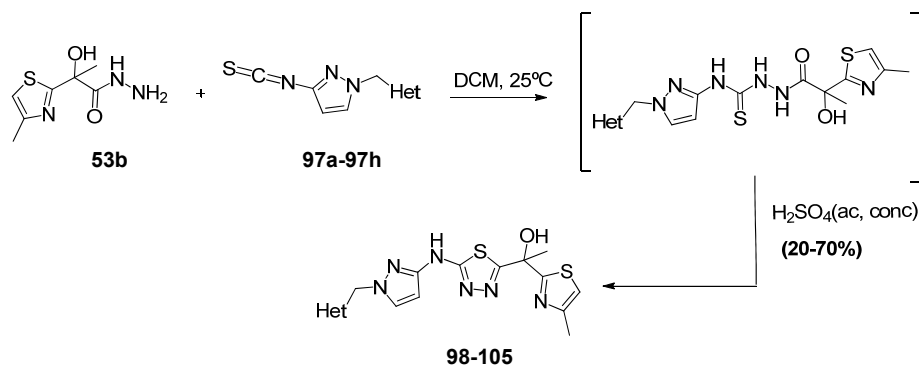
Todos los compuestos sintetizados con la ruta anteriormente descrita fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de masas (MS), (véase sección experimental aptdo 4.1.5.4).

3.5.1.4. Síntesis de los derivados del 1,3,4-tiadiazol 98-105

Como se vio en los derivados que presentan el ciclo de piridina en la región izquierda, el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol era la región derecha con la que los compuestos mostraban mejores propiedades ADMET y presentaban una mejor correlación entre los valores de IC_{50} y MIC. Por ello derivados que presentan un heterociclo como reemplazo

del benceno se sintetizaron utilizando el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como región derecha sin sintetizar los análogos correspondientes en la serie del 3,5-dimetilpirazol.

La obtención de las nuevas estructuras de tiadiazol se consiguió en dos pasos de reacción (Esquema 37).



Las tiosemicarbazidas intermedios, se sintetizaron por tratamiento de los isotiocyanatos con la hidrazida correspondiente en diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 37).

Los derivados de 1,3,4-tiadiazol obtenidos se sintetizaron por ciclación de la tiosemicarbazida correspondiente en presencia de ácido sulfúrico concentrado acuoso. En todos los casos se necesitó de una etapa de purificación tras la neutralización de los crudos con amoníaco (32%) seguida de una extracción con disolvente orgánico (acetato de etilo o diclorometano). (véase sección experimental aptdo:4.1.5.5).

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y de masas (MS).

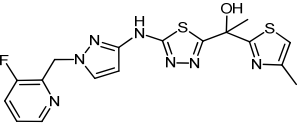
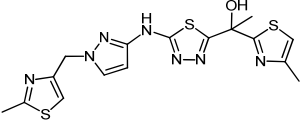
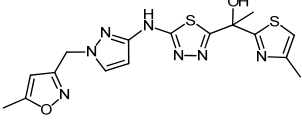
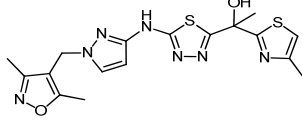
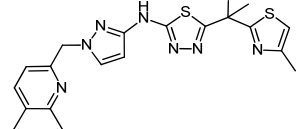
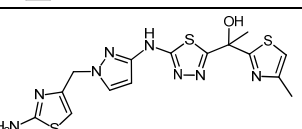
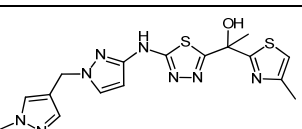
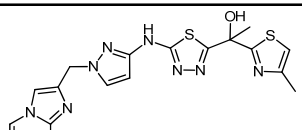
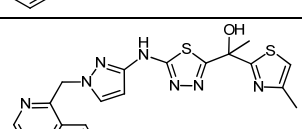
3.5.2. Actividad biológica, estabilidad microsomal *in vitro* y análisis de los resultados

A continuación, se discuten los resultados de los nuevos derivados en los ensayos enzimáticos de inhibición del enzima InhA e inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ensayo en célula entera), inhibición enzimática de los CYP3A4 y ensayos de estabilidad microsomal *in vitro*, en las especies de ratón y

humano. La metodología de estos ensayos ha sido descrita en el apartado 4.2 de la sección experimental.

En la Tabla 17 se recogen los valores de actividad enzimática frente a InhA (IC_{50}) así como los valores de actividad en célula entera y los valores de inhibición de los CYP3A4, los valores de aclaramiento sólo se describen en los casos en los que su evaluación ayudaba a la toma de decisiones en la cascada de progresión de ensayos biológicos definida para este proyecto. La tabla se completó con los valores de $clogP$.

Tabla 17. Resultados biológicos de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Comp.	Estructura	InhA IC ₅₀ (μ M)	Mtb H37Rv MIC (μ M)	clogP	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g ratón)	aclareamiento <i>in vitro</i> (ml/min· g humano)	IC ₅₀ CYP450 3A4VR (μ M)	IC ₅₀ CYP450 3A4VG (μ M)
82		0.022	1	2.33	1.9	0.2	42.7	16.3
98		0.02	0.5	2.19	2	1.2	10.4	5.3
99		0.097	8	1.97	2.2	1.2	>50.1	37.8
100		0.797	>31.3	2.02	n.d	n.d	12.2	12.5
101		0.014	2	3.41	n.d	n.d	16.6	4.2
102		0.111	16	1.72	n.d	n.d	26.9	13.8
103		0.272	31.3	1.75	n.d	n.d	>50.1	43.7
104		0.088	7.8	1.38	n.d	n.d	>50.1	26.3
105		0.015	8	2.81	n.d	n.d	>50.1	3.9

n.d: no determinada

Por comparación de los datos de actividad de los compuestos **98** y **102**, queda claro que la introducción de un sustituyente polar, el grupo amino, afecta negativamente a la interacción con la enzima y conlleva una pérdida significativa de la potencia en

célula entera. Comparando los resultados de los compuestos **98** y **99** con los valores presentados por el compuesto **103**, se podría deducir que la posición preferida para el átomo de nitrógeno es la posición 2 del heterociclo, pudiendo intervenir en algún tipo de interacción con el enzima. En cualquier caso hay que considerar en el compuesto **103** la diferencia de polaridad, dada por el valor de clogP, entre el anillo de pirazol (1.75) y los anillos de tiazol (2.19) y oxazol (1.97). Este factor puede también contribuir a la pérdida de actividad en célula entera.

El compuesto **100**, presenta los peores valores de actividad ($IC_{50}=0.797 \mu M$, $MIC>31.3$) de las estructuras recogidas en la tabla. El oxazol no presenta el átomo de nitrógeno en posición 2 pero presenta una disustitución en posiciones 2,5, no estudiada para este tipo de ciclos y que podría estar perjudicando la interacción con la enzima.

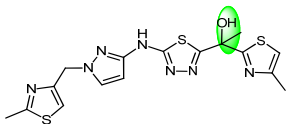
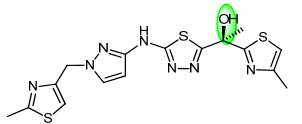
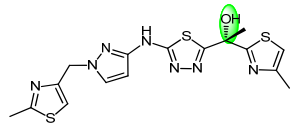
En cuanto a los compuestos **101** y **105**, que presentan un heterociclo benzocondensado en la región izquierda, muestran actividades enzimáticas del orden de las decenas de nanomolar interesantes como punto de partida de un ejercicio de exploración de nuevos sustituyentes del sistema benzocondensado si bien, un mayor aumento del peso molecular y de la lipofilia no sería recomendable.

En resumen, los valores de potencia tanto enzimática como en célula entera así como de aclaramiento reportados por el compuesto **98**, hacen de éste el compuesto más destacado de la serie.

3.6.3. Quiralidad y actividad biológica de los enantiómeros **106** y **107**

La separación de los enantiómeros que conformaban el compuesto **98**, sintetizado como racemato, se llevó a cabo por HPLC en columna quiral (véase sección experimental). Ambos enantiómeros **106** y **107** fueron evaluados en los correspondientes ensayos biológicos para determinar su actividad tanto enzimática como en célula entera. El isómero *S* **106** resultó ser claramente el más potente. Los datos de las actividades enzimáticas y en célula entera para ambos enantiómeros así como para el racemato (**98**) se recogen en la Tabla 18. La configuración absoluta fue determinada por la técnica de dicroísmo circular vibracional (VCD) (véase sección experimental).

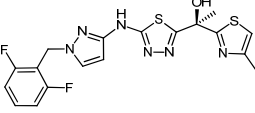
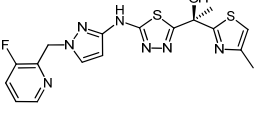
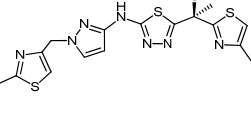
Tabla 18. Actividades biológicas del compuesto **98** y de los enantiómeros correspondientes **106** y **107**.

Estructura			
Comp.	98	106	107
InhA IC ₅₀ (μ M)	0.015	0.011	0.311
Mtb H37Rv MIC (μ M)	0.5	0.5	15.6

Los resultados de potencia observados demostraban que el compuesto **106** era el más prometedor para continuar con los estudios biológicos *in vitro* completando su perfil como potencial agente antituberculoso y validar su progresión a ensayos biológicos *in vivo*.

3.6.4. Perfil biológico *in vitro* del compuesto 106

Tabla 19. Comparación de los perfiles biológicos de los compuestos 106, 90 y 58.

Estructura			
Compuesto	58	90	106
Eficacia <i>in vitro</i>			
MIC (µM)	<0.2	0.5	0.5
Actividad enzimática InhA IC ₅₀ (µM)	0.003	0.005	0.011
Propiedades fisico-químicas			
PM	434.08	417.08	419.07
Índice cromatográfico de hidrofobicidad (ChromlogD pH=7.4)	3.9	2.63	2.7
Porcentaje de unión a albúmina en suero (%HSA)	93.13	n.d	86.5
Solubility (CLND µM)	269	≥ 396	413
Propiedades ADME			
Inhibición de P450 3A4 Vivid Red IC ₅₀ (µM)	15.8	>50.11	20.9
Inhibición de P450 3A4 Vivid Green IC ₅₀ (µM)	4.9	31.6	>25.1
Aclarado intrínseco en ratón (mL/min/g)	14.2	2.4	2.1
Aclarado intrínseco en humano (mL/min/g)	2.2	0.3	0.2
Activación del receptor X pregnano en humanos	Si	Si	Si
Toxicidad			
Citotoxicidad en líneas celulares HepG2 (µM)	>50	>50	>50
Inhibición del canal de K _v hERG (µM)	>50	>50	>50

3.6.5. Modo de unión del compuesto 106

Con el objeto de confirmar el modo de unión del compuesto 106, el grupo de cristalografía obtuvo la estructura cristalina del complejo ternario InhA-NAD⁺-106 con una resolución de 2.00 Å (Figura 39).

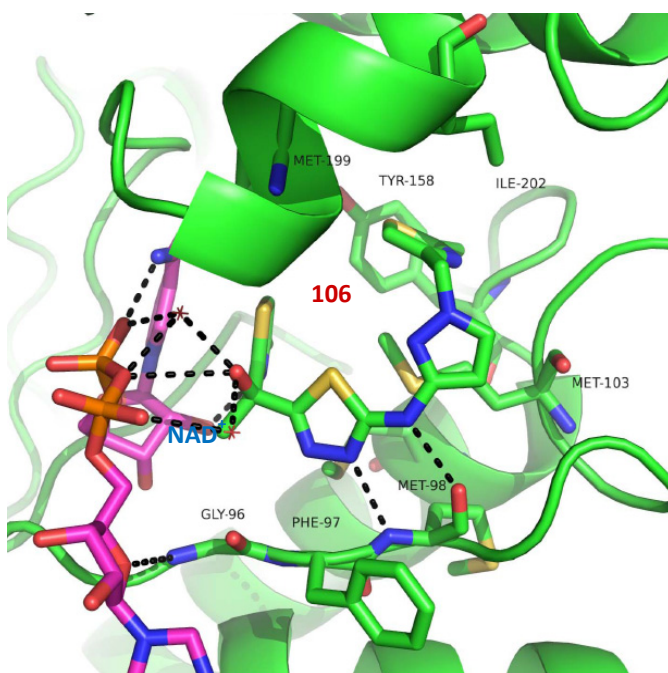


Figura 39. Modo de unión de 106 al centro activo de InhA. Los colores empleados en la Figura son: GSK1 (verde), NAD⁺(rosa), H₂O (asterisco rojo), átomo de O (rojo), N (azul), S (amarillo). Enlaces por puente de hidrógeno (punteado negro). Ile202, Met199, Met103, Phe97, Gly96 y Met161, residuos involucrados en enlaces de tipo van der Waals.

Como se observa en la representación del cristal, el compuesto **106** presenta las mismas interacciones que presentaba **GSK1** con la Met98 a través de enlaces de puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno N-3 del tiadiazol y la amida (NH) de la Met98, y entre el átomo de nitrógeno puente, entre el pirazol y el ciclo de tiadiazol, con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la Met98. También se identifican en el cristal interacciones de tipo enlace de hidrógeno con el cofactor NAD⁺. En cuanto a las interacciones de tipo van der Waals, **106** interacciona con los siguientes residuos: Ile202, Met199, Met103, Phe97, Gly96 y Met161, residuos comunes a las interacciones de tipo van der Waals presentadas por **GSK1**.

La estructura cristalina del complejo ternario permite concluir que la unión de este inhibidor tiene lugar en el bolsillo lipófilo de InhA que coincide con lugar de unión del sustrato (DDCoA), mostrando el mismo modo de unión que el cabeza de serie original **GSK1**.

3.6.6. Perfil biológico *in vivo* del compuesto 106

Para establecer el perfil farmacológico del compuesto se llevó a cabo, en primer lugar, una farmacocinética intravenosa (vía de administración intravenosa) utilizando ratones hembra de la cepa C57BL/6J. El compuesto se administró a una única dosis de 4 mg/Kg en solución, utilizando como vehículo una disolución de encapsina al 20%. La concentración de compuesto en sangre se midió a diferentes tiempos: 10, 20 y 30 minutos, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 8 horas, tomando cuatro medidas para cada uno de los tiempos, Tabla 20.

Tabla 20. Farmacocinética intravenosa del compuesto **106**.

Dosis iv (mg/Kg)	t1/2 (h)	AUC _{final} (µg.h/mL)	AUC (0-∞) (µg.h/mL)	Vd (L/Kg)	Cl (mL/min/Kg)
4 (solución)	0.15	0.64 ⁽¹⁾	0.64	1.52	113.75

⁽¹⁾ T_{final}=1h

El análisis de los resultados revela un volumen de distribución moderado (Vd) y un alto valor de aclaramiento, a pesar de presentar un aclaramiento *in vitro* bajo. En consonancia con el alto valor del aclaramiento en sangre, la vida media del compuesto presentó un valor bajo así como el área bajo la curva.

Para completar el estudio farmacocinético del compuesto, se llevó a cabo una farmacocinética oral (vía de administración oral) utilizando ratones hembra de la cepa C57BL/6J, al igual que en la farmacocinética intravenosa. El compuesto se administró a una única dosis de 50 mg/Kg como sólido micronizado en suspensión y se utilizó como vehículo una disolución de metilcelulosa al 1%. En este caso la concentración de compuesto en plasma se midió en los siguientes tiempos: 15, 30 and 45 minutos, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 8 horas, tomando cuatro medidas para cada uno de los tiempos, Tabla 21.

Tabla 21. Farmacocinética oral del compuesto **106**.

Dosis (mg/Kg)	T _{max} (h)	C _{max} (µg/ml)	AUC (0-8h) (µg·h/ml)	AUC (0-∞) (µg·h/ml)	DNAUC (0-8h) (µg·h/ml por mg/kg)	DNAUC (0-∞) (µg·h/ml por mg/kg)	%F ⁽¹⁾
50 (suspension)	0.50	8.31	6.85	6.88	0.15	0.16	107.4

⁽¹⁾ Biodisponibilidad oral (%F) calculada en relación con el dato intravenoso de 4 mg/Kg teniendo en cuenta la AUC_(0-∞)

La concentración máxima de compuesto fue de 8.31 (µg/ml) y se alcanzó a las 0.50 horas. Hay que destacar de estos resultados que a pesar del alto valor de aclaramiento mostrado en el ensayo intravenoso el compuesto presentó una alta biodisponibilidad.

Con idea de determinar la eficacia terapéutica del compuesto **106** como antituberculoso se progresó a un estudio dosis-respuesta de eficacia en el modelo de infección aguda en ratón desarrollado por el grupo de eficacia terapéutica en nuestras instalaciones¹⁰⁴.

El ensayo se llevó a cabo con ratones de la cepa C57 BL/6J que fueron infectados por vía intratraqueal con una carga bacteriana de 10⁵ CFUs de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv Pasteur*. Tras 24 horas de la infección, se comenzó a tratar a los animales. El tratamiento consistió en una administración oral del compuesto **106**, a distintas dosis (30,100 y 300 mg/Kg), una vez al día durante ocho días. En el experimento se utilizó como control moxifloxacina a una dosis de 30 mg/Kg que redujo en 3.04 unidades logarítmicas las unidades formadoras de colonias respecto a los

animales no tratados. La gráfica correspondiente a la curva dosis respuesta del ensayo se describe en la Figura 40.

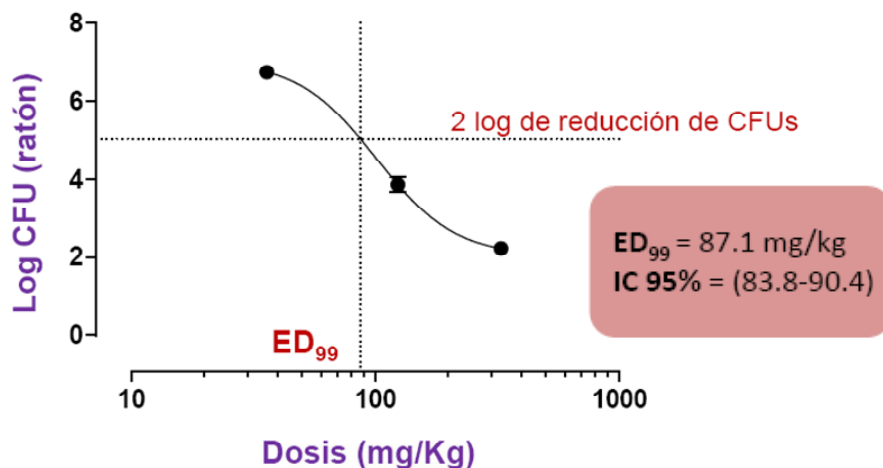


Figura 40. Curva dosis-respuesta del compuesto 106.

Analizando la curva dosis-respuesta se puede concluir que:

El compuesto **106** ha resultado ser el inhibidor directo de InhA con mejor perfil antituberculostático desarrollado hasta la fecha. Si bien, comparando este compuesto con fármacos como moxifloxacina, actualmente en ensayos clínicos y que presenta una ED₉₉ = 28 mg/Kg y con isoniazida con una ED₉₉ = 0.9 mg/Kg, referencia clara para los inhibidores de InhA¹⁰⁴; la dosis de **106** necesaria para mostrar un efecto antituberculostático competitivo es alta al presentar una ED₉₉ = 87 mg/kg⁸⁵. Este hecho complica la administración del fármaco en humanos, que sería posiblemente mayor de 1g al día. Ahora bien, teniendo en cuenta su potencial como agente antituberculoso se ha decidido progresar a estudios de eficacia en el modelo de infección crónica y a estudios de terapia de combinación. Es posible que no se requiera la misma dosis cuando el compuesto es administrado en combinación. Actualmente el compuesto **106** sigue activo en la cartera de proyectos del departamento del DDW.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE TIPO TIADIAZOL

4.1.1. Materiales y métodos

Procedimientos cromatográficos.

El seguimiento de las reacciones se ha realizado por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de gel de sílice de tipo **60 F₂₅₄ de 2 mm de espesor (Merck)**. El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de UV de 254 nm y por revelado con KMnO₄ y yodo. También se han seguido por espectrometría de masas y cromatografía en fase reversa de alta resolución utilizando un espectrómetro Waters **Micromass ZMD 2000** y un cromatógrafo analítico **Agilent 1100** respectivamente.

La separación y purificación de los productos obtenidos se ha llevado a cabo mediante cromatografía en columna, utilizando columnas compactadas de gel de sílice con un tamaño de partícula de **30-45 μ (Isolute)**. Las purificaciones se realizaron de forma automatizada en un equipo Flash Master-II de Biotage. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen-volumen.

Poderes rotatorios ópticos.

Los poderes rotatorios ópticos $[\alpha]_D$ han sido medidos por el Departamento de Análisis Estructural de GlaxoSmithKline en el Research Triangle Park (Carolina del Norte) y se han determinado en un polarímetro **Rudolph AUTOPOL V**, en células de cuarzo de 0.5 dm, utilizando luz amarilla de sodio, a la temperatura de 25°C y en los disolventes y concentraciones (g/100 ml) indicados en cada caso.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han sido realizados por el Departamento de Análisis Estructural del Tres Cantos Medicines Development Campus de GlaxoSmithkline, empleando un Varian UNITY 300. Las frecuencias empleadas fueron de 300 MHz y 75 MHz para el caso de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN respectivamente. En algunas de las determinaciones de ¹³C-NMR se empleó un Varian UNITY 400 a 100 MHz de frecuencia. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y en el disolvente deuterado que se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos vienen expresados en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en hertzios (Hz). En la

descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (simplete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), qt (quintuplete), m (multiplete) y a (ancho).

Espectroscopía de Masas

Han sido realizadas por el Departamento de Análisis Estructural del Tres Cantos Medicines Development Campus de GlaxoSmithkline. Empleando un espectrómetro de masas, **Waters Micromass ZMD 2000**.

Espectroscopia Vibracional de Dicroísmo Circular

Los cálculos teóricos *ab initio* y las medidas experimentales para la determinación de la configuración absoluta de los compuestos se han realizado en el Departamento de Análisis Estructural de GlaxoSmithKline en el Research Triangle Park (Carolina del Norte). Se ha empleado un espectrómetro **Bio Tools ChiralIR VCD** operando en un rango de frecuencia 2000-800 cm^{-1} . Los disolventes y las concentraciones utilizadas se especifican en cada caso.

Disolventes.

Los disolventes utilizados se han adquirido con alto grado de pureza a la casa comercial Panreac y han sido secados con tamiz (3Å ó 4Å).

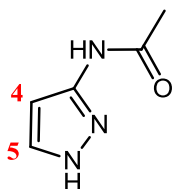
Reactivos.

En cada caso se ha especificado la casa comercial de los reactivos de partida adquiridos comercialmente.

4.1.2. Síntesis general de los 1,3,4-tiadiazoles con 3,5-dimetilpirazol y 3-aminopirazol como parte derecha

4.1.2.1. Síntesis de los 3-aminopirazoles protegidos

Compuesto 4a: 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol.



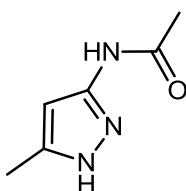
A una disolución de 3-amino-*N*-1*H*-pirazol (Aldrich, 11.32 g, 0.136 mol) en 100 mL de agua destilada se adicionó lentamente bicarbonato sódico (34 g, 0.408 mol). A continuación se añadió gota a gota anhídrido acético (27.55 g, 0.272 mol) y la

disolución resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado blanco formado se filtró a vacío obteniéndose el intermedio 1: 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (8.4 g, 0.067 mol). El filtrado se concentró parcialmente apareciendo un segundo precipitado que se filtró para obtener 2.7 g de 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (Rto. 65%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 12.23 (s a, 1H, -NH-), 10.30 (s a, 1H, -NHCOCH₃), 7.55 (s a, 1H, H₅), 6.45 (s a, 1H, H₄), 1.97 (s, 3H, -CH₃).

[ES+MS] m/z 126 (MH⁺).

Compuesto 4b: 3-acetamino-5-metil-*N*-1*H*-pirazol.

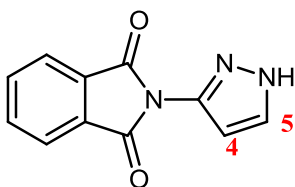


El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del compuesto 4a. Se utilizaron como materiales de partida: 3-acetamino-5-metil-*N*-1*H*-pirazol (Aldrich, 1 g, 10.30 mmol) y anhídrido acético (Aldrich, 2.02 g, 20.59 mmol) obteniéndose 1 g de 3-acetamino-5-metil-*N*-1*H*-pirazol como un sólido blanco (Rto. 70.4%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 11.86 (s a, 1H, -NH-), 10.16 (s a, 1H, -NHCOCH₃), 6.22 (s a, 1H), 2.16 (s a, 3H, -COCH₃), 1.97 (s, 3H, -CH₃).

[ES+MS] m/z 140 (MH⁺).

Compuesto 34a: 2-(1*H*-pirazol-3-il)-isoindolina-1,3-diona.

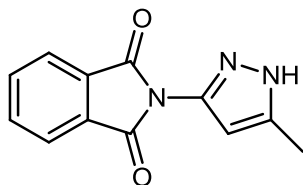


A una disolución de 3-aminopirazol (Aldrich, 10 g, 120 mmol) en 150 mL de 1,4-dioxano se añadió en porciones anhídrido ftálico (Aldrich, 24.96 g, 168 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 17 horas. Una vez que la disolución alcanzó temperatura ambiente se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se trituró con etanol y posteriormente se filtró el sólido obteniéndose 23.6 g de 2-(1*H*-pirazol-3-il)-isoindolina-1,3-diona (Rto. 92%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 13.09 (s a, 1H, -NH-), 7.86-7.98 (m, 5H, 4H-Ar, H₅), 6.36 (m, 1H, H₄).

[ES+MS] m/z 214 (MH^+).

Compuesto 34b: 2-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-isoindolina-1,3-diona.



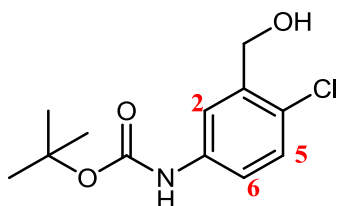
Una disolución de 3-amino-5-metil-1H-pirazol (Aldrich, 500 mg, 5.15 mmol) y anhídrido ftálico (Aldrich, 1.07 g, 7.21 mmol) en 1,4-dioxano (30 mL) se calentó a reflujo durante 25 horas. Se dejó alcanzar temperatura ambiente apareciendo un precipitado. Se filtró el precipitado y se lavó con etanol obteniéndose 589 mg de 2-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-isoindolina-1,3-diona como un sólido amarillento. El filtrado se concentró a sequedad y tras lavar el residuo con etanol obteniéndose 331 mg de un segundo lote de 2-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-isoindolina-1,3-diona (Rto. 79%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 12.77 (s a, 1H, -NH-), 7.87-7.98 (m, 4H, 4H-Ar), 6.09 (s, 1H, H-pirazol), 2.28 (s, 3H, -CH₃).

[ES+MS] m/z 228 (MH^+).

4.1.2.2 Síntesis de los bromuros de bencilo no comerciales

Compuesto 31a: [4-cloro-3-(hidroximetil)fenil]carbamato de *tert*-butilo.

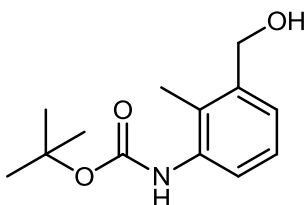


A una disolución de 5-amino-2-clorofenilmetanol (Aldrich, 500 mg, 3.17 mmol) en dioxano (7.5 mL) y agua (7.5 mL) se añadió carbonato sódico (336 mg, 3.17 mmol) previamente disuelto en 4 mL de agua. La disolución se enfrió a 0°C en un baño de agua hielo. A continuación se añadió a la mezcla, anhídrido de *tert*-butilcarbonato (Aldrich, 692 mg, 3.17 mmol) y se agitó durante 3 horas. Se eliminó el dioxano en condiciones de vacío. La fase acuosa se acidificó hasta pH=4 con hidrógeno sulfato potásico (10%, ac.) y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla

de hexano:acetato (100:0 a 50:50) obteniéndose 560 mg de 4-cloro-3-(hidroximetil)fenilcarbamato de etilo (Rto. 68%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 9.46 (s a, 1H, -NH-), 7.72 (s, 1H, H₅), 7.21-7.32 (m, 2H, H₂, H₆), 5.35 (t, $J = 5.57$ Hz, 1H, OH), 4.48 (d, $J = 5.57$ Hz, 2H, CH₂), 1.47 (s, 9H, ^tBu).

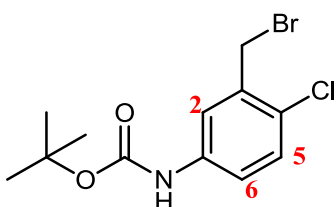
Compuesto 31b: [3-(hidroximetil)2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo.



El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del compuesto 31a. Se utilizaron como materiales de partida: (3-amino-2-metilfenil)metanol (Aldrich, 300 mg, 2.18 mmol) y anhídrido de *tert*-butilcarbonato (Aldrich, 716 mg, 3.28 mmol) obteniéndose 452 mg de [3-(hidroximetil)2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo como un sólido blanco (Rto. 87%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 8.53b (s a, 1H, -NH-), 7.06-7.17 (m, 3H, 3H-Ar), 5.06 (t, $J = 5.42$ Hz, 1H, -OH), 4.46 (d, $J = 5.42$ Hz, 2H, -CH₂-), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu).

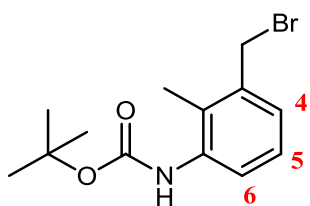
Compuesto 3ñ: [3-(bromometil)-4-clorofenil]carbamato de *tert*-butilo.



A una disolución del intermedio 31a (200 mg, 0.776 mmol) en diclorometano (5 mL) se añadió trifenilfosfina (Aldrich, 244 mg, 0.931 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 386 mg, 1.164 mmol) en un baño de agua-hielo. Después de 15 minutos, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice. Se utilizó como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 0:100) obteniéndose 206 mg de [3-(bromometil)-4-clorofenil]carbamato de *tert*-butilo como un sólido amarillento (Rto. 83%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 9.58 (s a, 1H, -NH-), 7.77 (s a, 1H, H₅), 7.35 (m, 2H, H₂, H₆), 4.67 (s, 2H, -CH₂-), 1.48 (s, 9H, ^tBu).

Compuesto 3o: [3-(bromometil)-2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo.

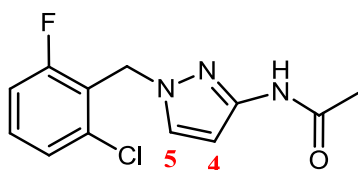


El producto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 3ñ. Se utilizaron como reactivos de partida, el compuesto 31b (443 mg, 1.86 mmol), trifetilfosfina (Aldrich, 588 mg, 2.24 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 929 mg, 2.80 mmol) obteniéndose 293 mg de [3-(bromometil)-2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo como un sólido blanco (Rto. 52%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 8.64 (s a, 1H), 7.20-7.27 (m, 2H, H₅, H₆), 7.09-7.15 (m, 1H, H₄), 4.73-4.79 (m, 2H, -CH₂-), 2.19-2.21 (m, 3H, -CH₃), 1.45 (s, 9H, ^tBu).

4.1.2.3 Método general de bencilación del 3-acetamido-*N*-1*H*-pirazol (4).

Compuesto 5n: *N*-[1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



A una disolución del compuesto 4 (3 g, 24 mmol) en 40 mL de dimetilformamida anhidra a 0°C, se adicionó lentamente hidruro sódico (Aldrich, 0.63 g, 26.4 mmol). La disolución se mantuvo bajo agitación, en un baño de agua-hielo, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió gota a gota el 2-(bromometil)-1-cloro-2-fluorobenceno (Aldrich, 5.36 g, 24 mmol) durante un período de 30 minutos. La mezcla permaneció bajo agitación en baño de agua-hielo durante 30 minutos más. A continuación se paró la reacción adicionando 1 mL de agua. A la disolución resultante se añadió acetato de etilo (150 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de cloruro amónico (3 x 60 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato de etilo (100:0 a 0:100) obteniéndose 4.12 g de *N*-[1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida. (Rto: 64.2%).

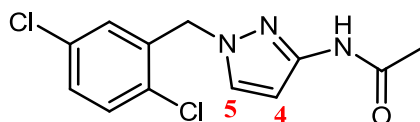
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.71 (s, 1H, -NH-), 7.35 (d, J = 2.34 Hz, 1H, H₅),

7.05-7.32 (m, 3H, 3H-Ar), 6.65 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H₄), 5.34 (d, $J = 1.76$ Hz, 2H, -CH₂-), 2.10 (s, 3H, -CH₃).

[ES+MS] m/z: 268 (MH⁺).

Los siguientes derivados se prepararon utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención de *N*-[1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida. En cada caso se reemplazó el 2-(bromometil)-1-cloro-2-fluorobenceno por el bromuro de bencilo correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 5a: *N*-[1-(2,5-diclorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.00 mmol de bromuro de 2,5-diclorobencilo (Lancaster).

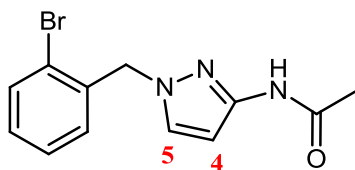
Rto.: 0.58 mmol, 53b%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.43 (s a, 1H, -NH-), 7.75 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.51-7.54 (m, 1H, H-Ar), 7.41-7.45 (m, 1H, H-Ar), 7.08 (m, 1H, H-Ar), 6.51 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H₄), 5.31 (s, 2H, -CH₂-), 1.96 (s, 3H, -CH₃).

[ES+MS] m/z 285 (MH⁺).

Compuesto 5b: *N*-[1-(2-bromobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.00 mmol de bromuro de 2-bromobencilo (Aldrich).

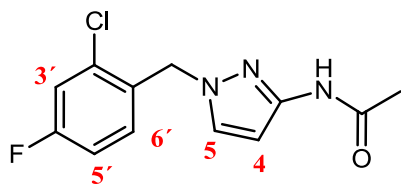
Rto.: 0.70 mmol, 70%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.42 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.62-7.65 (m, 1H, H-Ar), 7.33-7.38 (m, 1H, H-Ar), 7.22-7.28 (m, 1H, H-Ar), 6.93-6.96 (m, 1H, H-Ar), 6.50 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 5.29 (s, 2H, -CH₂-), 1.96 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 295 (MH⁺).

Compuesto 5c: *N*-[1-(2-cloro-4-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.00 mmol de bromuro de 2-cloro-4-fluorobencilo (Acros).

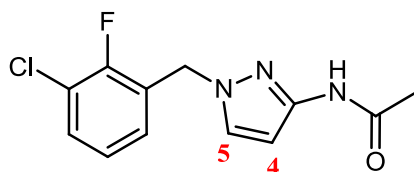
Rto.: 0.75 mmol, 75%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.41 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.46-7.50 (m, 1H, H_{6'}), 7.19-7.26 (m, 1H, H_{5'}), 7.10-7.15 (m, 1H, H_{3'}), 6.49 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H_{4'}), 5.29 (s, 2H, -CH₂-), 1.96 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 253b (MH⁺).

Compuesto 5d: *N*-[1-(3-cloro-2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 2.00 mmol de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (Alfaesar).

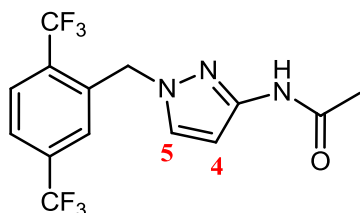
Rto.: 1.09 mmol, 55%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato de etilo (100:0 a 30:70).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.70 (s a, 1H, -NH-), 7.32-7.39 (m, 2H, H-Ar, H₅), 7.00-7.08 (m, 2H, 2H-Ar), 6.72 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.24 (s, 2H, -CH₂-), 2.14 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 268 (MH⁺).

Compuesto 5e: *N*-[1-(2,5-bis(trifluorometil)bencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.60 mmol de bromuro de 2,5-bis-trifluorometilbencilo (JRD Chemicals).

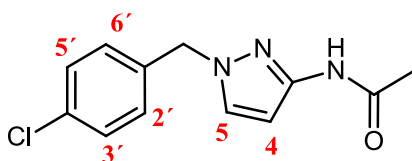
Rto.: 0.98 mmol, 62%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.44 (s a, 1H, -NH-), 7.91-8.05 (m, 2H, 2H-Ar), 7.80 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.28 (s a, 1H, H-Ar), 6.56 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.52 (s, 2H, -CH₂-), 1.96 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 352 (MH⁺).

Compuesto 5f: *N*-[1-(4-clorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 2.00 mmol de bromuro de 4-clorobencilo (Aldrich).

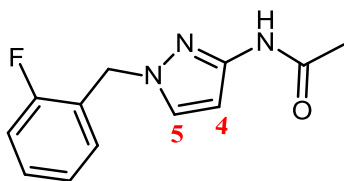
Rto.: 1.316 mmol, 65%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 10.37 (s, 1H, -NH-), 7.69 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.38 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.19 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.46 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 1.93 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 250 (MH⁺).

Compuesto 5g: *N*-[1-(2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



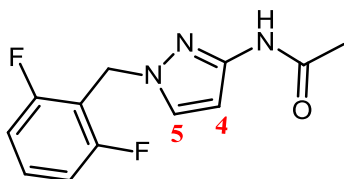
A una disolución del intermedio 1 (200 mg, 1.60 mmol) en 10 mL de acetonitrilo, se adicionó carbonato potásico (Aldrich, 331 mg, 2.40 mmol) y bromuro de 2-fluorobencilo (Aldrich, 302 mg, 1.60 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante una hora y posteriormente se concentró a sequedad. El residuo obtenido se diluyó en acetato de etilo y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando una mezcla de hexano:acetato de etilo como eluyente obteniéndose 123 mg de *N*-[1-(2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida. (Rto. 33%).

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.72 (s a, 1H, -NH-), 7.33-7.37 (m, 2H, H-Ar, H₅), 7.17-7.20 (m, 3H, 3H-Ar), 6.70 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.18 (s, 2H, -CH₂-), 2.13 (s, 3H, -CONHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 234 (MH⁺).

Compuesto 5h: *N*-[1-(2,6-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 2.40 mmol de bromuro de 2,6-difluorobencilo (Aldrich).

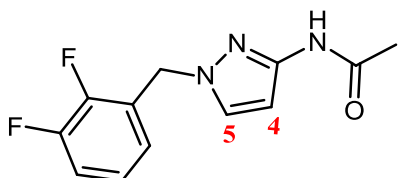
Rto.: 1.50 mmol, 63%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.39 (s a, 1H, -NH), 7.66 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.39-7.49 (m, 1H, H-Ar), 7.07-7.15 (m, 2H, 2H-Ar), 6.43 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 5.25 (s, 2H, -CH₂-), 1.91 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 252 (MH⁺).

Compuesto 5i: *N*-[1-(2,3-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 2.40 mmol de bromuro de 2,3-difluorobencilo (Aldrich).

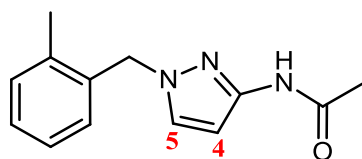
Rto.: 1.20 mmol, 50%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.41 (s a, 1H, -NH), 7.73 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.34-7.43 (m, 1H, H-Ar), 7.15-7.22 (m, 1H, H-Ar), 6.98-7.03 (m, 1H, H-Ar), 6.47 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.32 (s, 2H, -CH₂-), 1.94 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 252 (MH⁺).

Compuesto 5j: *N*-[1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.00 mmol de bromuro de 2-metilbencilo (Aldrich).

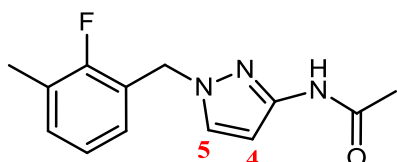
Rto.: 0.61 mmol, 61%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.37 (s a, 1H, -NH-), 7.61 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.14-7.20 (m, 3H, 3H-Ar), 6.94-7.13 (m, 1H, H-Ar), 6.46 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.21 (s, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃), 1.95 (s, 3H, -CONHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 230 (MH⁺).

Compuesto 5k: *N*-[1-(2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.60 mmol de bromuro de 2-fluoro-3-metilbencilo (Alfaesar).

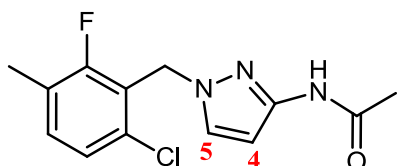
Rto.: 1.01 mmol, 63%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.39 (s a, 1H, -NH-), 7.68 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.20-7.25 (m, 1H, H-Ar), 6.97-7.07 (m, 2H, 2H-Ar), 6.45 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.23 (s a, 2H, -CH₂-), 2.22 (d, *J* = 2.05 Hz, 3H, -CH₃), 1.94 (s, 3H, -CONHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 248 (MH⁺).

Compuesto 5l: *N*-[1-(6-cloro-2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.60 mmol de bromuro de 6-cloro-2-fluoro-3-metilbencilo (Fluorochem).

Rto.: 1.1 mmol, 69%.

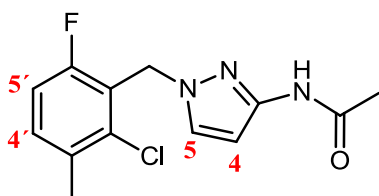
Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de

hexano:acetato de etilo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.38 (s a, 1H, -NH-), 7.66 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.23-7.34 (m, 2H, 2H-Ar), 6.43 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.31 (d, $J = 1.61$ Hz, 2H, CH_2), 2.22 (m, 3H, - CH_3), 1.92 (s, 3H, -CONH CH_3).

[ES^+MS] m/z 282 (MH^+).

Compuesto 5m: *N*-[1-(6-cloro-2-fluoro-5-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il]acetamida.



Reactivo de partida: 1.60 mmol de bromuro de 2-cloro-6-fluoro-3-metilbencilo (Fluorochem).

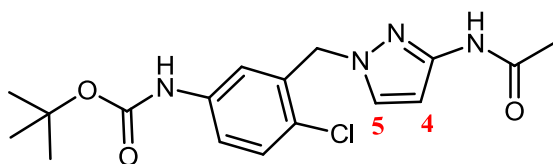
Rto.: 0.89 mmol, 55%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.37 (s a, 1H, -NH-), 7.67 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.38-7.43 (m, 1H, H_4 -Ar), 7.16-7.22 (m, 1H, H_5 -Ar), 6.43 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.34 (d, $J = 1.61$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.31 (s, 3H, - CH_3), 1.92 (s, 3H, -NHCO CH_3).

[ES^+MS] m/z 282 (MH^+).

Compuesto 5ñ: [3-((3-acetamido-1*H*-pirazol-1-il)metil)-4-clorofenil]carbamato de *tert*-butilo.



Reactivo de partida: 0.62 mmol del compuesto 3ñ.

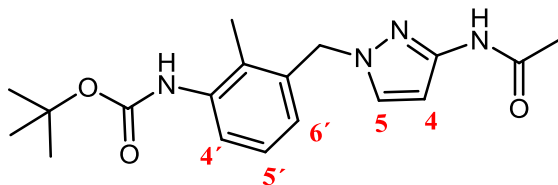
Rto.: 0.37 mmol, 58%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.42 (s a, 1H, - CH_3CONH), 9.51 (s a, 1H, $^t\text{BuOCONH}$), 7.68 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.26-7.50 (m, 3H, 3H-Ar), 6.47 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.23 (s a, 2H, - CH_2 -), 1.95 (s, 3H, - CH_3), 1.45 (s, 9H, ^tBu).

[ES^+MS] m/z 365 (MH^+).

Compuesto 5o: [3-((3-acetamido-1H-pirazol-1-il)metil)-2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo.



Reactivo de partida: 0.97 mmol del compuesto 3o.

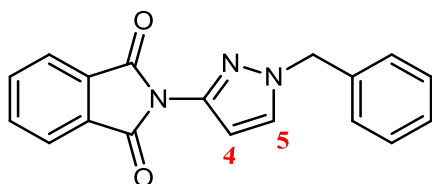
Rto.: 0.55 mmol, 57%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 94:6).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.37 (s a, 1H, -NHCOCH₃), 8.60 (s a, 1H, -NHCOO^tBu), 7.60 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.17-7.20 (m, 1H, H_{4'}), 7.06-7.11 (m, 1H, H_{5'}), 6.77-6.80 (m, 1H, H_{6'}), 6.46 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.21 (s a, 2H, -CH₂-), 2.10 (s, 3H, -CH₃), 1.95 (s, 3H, -CONHCH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu).

[ES⁺MS] m/z 345 (MH⁺).

Compuesto 35a: 2-(1-bencil-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona.



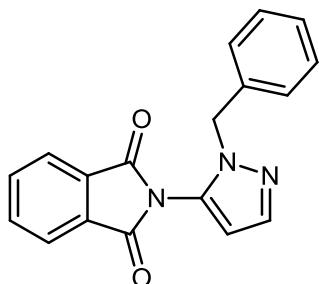
A una disolución del compuesto 34a (500 mg, 2.35 mmol) en 15 mL de dimetilformamida anhidra a 0°C se adicionó bajo atmósfera inerte de N₂ (g) el hidruro sódico (Aldrich, 188 mg, 2.34 mmol) y se mantuvo a 0°C durante 30 minutos. A continuación se añadió el bromuro de bencilo (Aldrich, 401 mg, 2.34 mmol), en porciones durante 2 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 equivalente más de bromuro de bencilo y se calentó la mezcla a 80°C. 0.2 equivalentes de hidruro sódico fueron añadidos a la mezcla cada 2 horas, tras enfriar previamente dicha mezcla. Se añadió un total de 0.8 equivalentes. Tras 44 horas la mezcla de reacción se disolvió en acetato de etilo y se lavó con cloruro amónico acuoso saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de hexano:acetato para dar 262 mg de 2-(1-bencil-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona como un sólido blanco (Rto. 37%). En el proceso de purificación se detectó el otro regioisómero 2-(1-bencil-1H-

pirazol-5-il)isoindolina-1,3-diona (**35c**).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.88-7.97 (m, 5H, 4H-ftalimida, H_5), 7.28-7.39 (m, 5H, 5H-Ar), 6.38 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.37 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

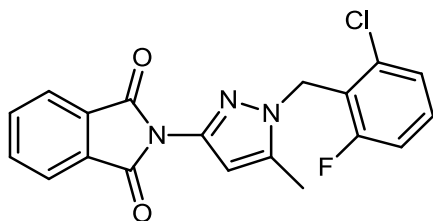
$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 304 (MH^+).

Compuesto 35c: 2-(1-bencil-1*H*-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona.



$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 304 (MH^+).

Compuesto 35b: 2-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona.

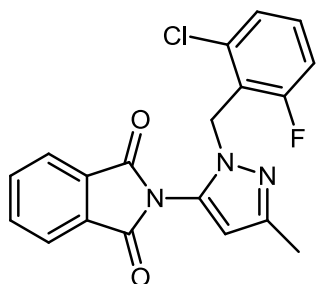


A una disolución del compuesto 34b (882 mg, 3.88 mmol) en acetonitrilo (40 mL) se añadieron carbonato potásico (Aldrich, 1041 mg, 4.66 mmol) y 2-(bromometil)-1-cloro-3-fluorobenceno (Aldrich, 0.639 mL, 4.66 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 20 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se filtró el carbonato potásico y se lavó con diclorometano. El filtrado se concentró a sequedad obteniendo 1.42 g de un crudo que se purificó por cromatografía en gel de sílice. Se utilizó como eluyente un gradiente de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 0:100) obteniéndose el producto deseado con un 44% de rendimiento. En la separación se consiguió aislar el regioisómero no deseado 2-[1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-metil-1*H*-pirazol-5-il]isoindolina-1,3-diona (**35d**).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.85-7.93 (m, 4H, 4H-ftalimida), 7.25-7.48 (m, 3H, 3H-Ar), 6.15 (s, 1H, H-pirazol), 5.36 (d, $J = 1.32$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.43 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 370 (MH^+).

Compuesto 35d: 2-[1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-metil-1*H*-pirazol-5-il]isoindolina-1,3-diona.



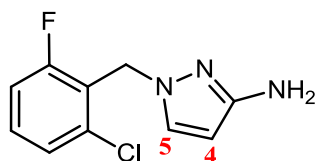
Rto.:24%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.93-8.01 (m, 4H, 4H-ftalimida), 7.13-7.38 (m, 3H, 3H-Ar), 6.20 (s, 1H, H-pirazol), 5.24 (d, $J = 1.17$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 370 (MH^+).

4.1.2.4 Método general de desprotección de los 3-acetamido-*N*-bencilpirazoles 5a-5o

Compuesto 6n: 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



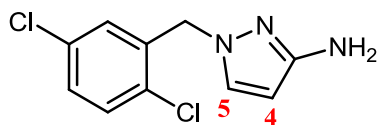
El compuesto 5n (4 g, 15 mmol) se disolvió en una mezcla de etanol (30 mL) e hidróxido sódico (25%, ac) (37.5 mL). La disolución se calentó a reflujo durante 12 horas. Se evaporó el etanol a sequedad y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo 50 mL y se trató con salmuera (50 mL). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a sequedad obteniéndose 3.28 g de 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina como sólido amarillo (Rto. 97%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.17-7.30 (m, 3H, H_5 , 2H-Ar), 7.04 (m, 1H, H-Ar), 5.56 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.27 (d, $J = 1.76$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.61 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 226 (MH^+).

Las siguientes aminas se prepararon de utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención de la 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina. En cada caso se reemplazó el compuesto 5n por el correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 6a: 1-(2,5-diclorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



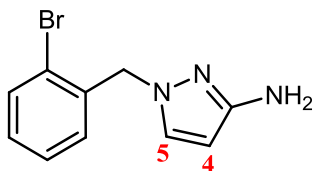
Reactivo de partida: 0.53b mmol del compuesto 5a.

Rto.: 0.50 mol, 95%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.48-7.51 (m, 2H, 2H-Ar), 7.36-7.41 (m, 1H, H-Ar), 6.89 (d, *J* = 2.64 Hz, 1H, H₅), 5.46 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.13 (s, 2H, -CH₂-), 4.69 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 243 (MH⁺).

Compuesto 6b: 1-(2-bromobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



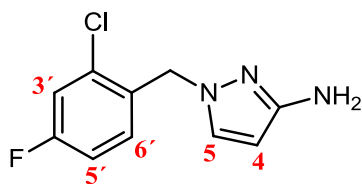
Reactivo de partida: 0.70 mmol del compuesto 5b.

Rto.: 0.67 mmol, 95%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.60-7.63 (m, 1H, H-Ar), 7.45 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.30-7.36 (m, 1H, H-Ar), 7.19-7.25 (m, 1H, H-Ar), 6.85-6.88 (m, 1H, H-Ar), 5.45 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.10 (s, 2H, -CH₂-), 4.62 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 253b (MH⁺).

Compuesto 6c: 1-(2-cloro-4-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



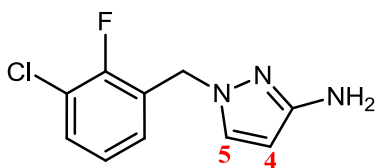
Reactivo de partida: 0.75 mmol compuesto 5c.

Rto.: 0.70 mmol, 94%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.43-7.47 (m, 2H, H_{6'}, H₅), 7.14-7.22 (m, 1H, H₅), 6.99-7.18 (m, 1H, H_{3'}), 5.43 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.1 (s, 2H, -CH₂-), 4.63 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 226 (MH⁺).

Compuesto 6d: 1-(3-cloro-2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



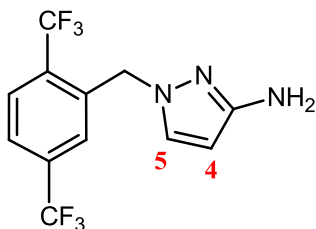
Reactivo de partida: 0.966 mmol del compuesto 5d.

Rto.: 0.96 mmol, 88%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.49-7.54 (m, 1H, H-Ar), 7.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.16-7.21 (m, 1H, H-Ar), 7.06-7.11 (m, 1H, H-Ar), 5.41 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 5.12 (s a, 2H, -CH₂-), 4.62 (s a, 2H, -NH₂).

[ESMS] m/z 226 (MH⁺).

Compuesto 6e: 1-(2,5-bistrifluorometilbencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



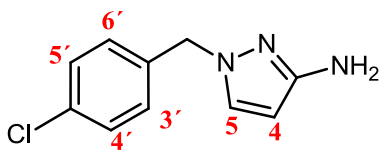
Reactivo de partida: 0.98 mmol del compuesto 5e.

Rto.: 0.89 mmol, 90%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.87-8.02 (m, 2H, 2H-Ar), 7.55 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.11 (s a, 1H, H-Ar), 5.51 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 5.34 (s a, 2H, -CH₂-), 4.74 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 310 (MH⁺).

Compuesto 6f: 1-(4-clorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina.

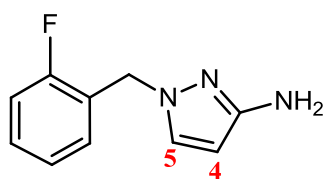


Reactivo de partida: 0.35 mmol del compuesto 5f.

Rto.: (0.32 mmol, 90%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.26-7.32 (m, 2H, H_{4'}, H_{5'}), 7.15 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.12 (m, 2H, H_{3'}, H_{6'}), 5.63 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.07 (s, 2H, -CH₂-), 3.65 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 208 (MH⁺).

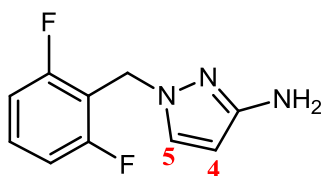
Compuesto 6g: 1-(2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina

Reactivo de partida: 0.51 mmol del compuesto 5g.

Rto.: 0.44 mmol, 85%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.41 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.29-7.37 (m, 1H, H-Ar), 7.08-7.21 (m, 3H, 3H-Ar), 5.40 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.08 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 4.58 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 192 (MH^+).

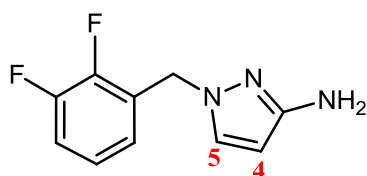
Compuesto 6h: 1-(2,6-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina

Reactivo de partida: 1.47 mmol del compuesto 5h.

Rto.: 0.83 mmol, 56%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.35-7.46 (m, 2H, H-Ar, H_5), 7.05-7.14 (m, 2H, 2H-Ar), 5.36 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.07 (s, 2H), 4.67 (s a, 2H).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 210 (MH^+).

Compuesto 6i: 1-(2,3-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-amina

Reactivo de partida: 1.15 mmol del compuesto 5i.

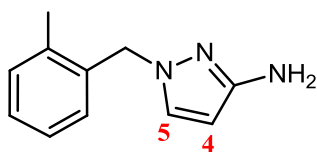
Rto.: cuantitativo.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.45 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.29-7.39 (m, 1H, H-Ar), 7.12-7.20 (m, 1H, H-Ar), 6.92-6.96 (m, 1H, H-Ar), 5.41 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.13 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 4.61 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 210 (MH^+).

Compuesto 6j: 1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



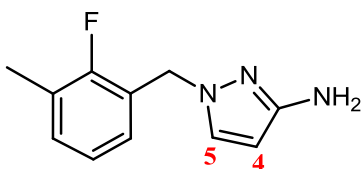
Reactivo de partida: 0.49 mmol del compuesto 5j.

Rto.: 0.47 mmol, 95%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.32 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.09-7.17 (m, 3H, 3H-Ar), 6.89-6.91 (m, 1H, H-Ar), 5.41 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.02 (s, 2H, -CH₂), 4.5 (s a, 2H, -NH₂), 2.27 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 188 (MH⁺).

Compuesto 6k: 1-(2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



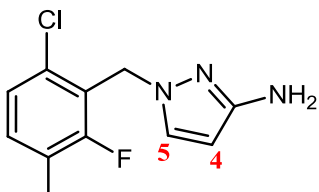
Reactivo de partida: 0.59 mmol del compuesto 5k.

Rto.: Cuantitativo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.40 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.17-7.22 (m, 1H, H-Ar), 7.05-7.00 (m, 1H, 1H-Ar), 6.95-6.90 (m, 1H, 1H-Ar), 5.40 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.05 (s a, 2H, -CH₂-), 4.57 (s a, 2H, -NH₂), 2.22 (d, *J* = 2.05 Hz, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 206 (MH⁺).

Compuesto 6l: 1-(6-cloro-2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



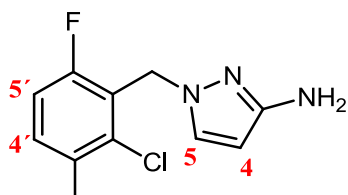
Reactivo de partida: 1.07 mmol del compuesto 5l.

Rto.: 0.86 mmol, 80%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.34 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.21-7.32 (m, 2H, 2H-Ar), 5.35 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.13 (d, *J* = 1.76 Hz, 2H, -CH₂-), 4.57 (s a, 2H, -NH₂), 2.21 (d, *J* = 1.76 Hz, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 240 (MH⁺).

Compuesto 6m: 1-(2-cloro-6-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-amina.



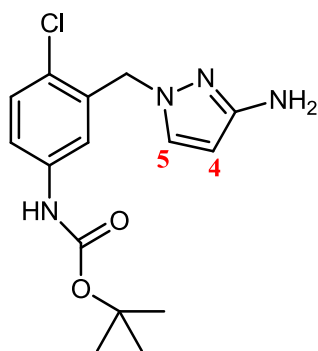
Reactivo de partida: 0.87 mmol del compuesto 5m.

Rto.: 0.65 mmol, 76%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.35-7.41 (m, 2H, H_{4'}, H₅), 7.13-7.19 (m, 1H, H_{5'}), 5.35 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.15 (d, *J* = 1.70 Hz, 2H, -CH₂-), 4.56 (s a, 2H, -NH₂), 2.30 (s, 3H, -CH₃).

[ESMS] m/z 240 (MH⁺).

Compuesto 6ñ: [3-((3-amino-1*H*-pirazol-1-il)metil)-4-clorofenil]carbamato de *tert*-butilo.



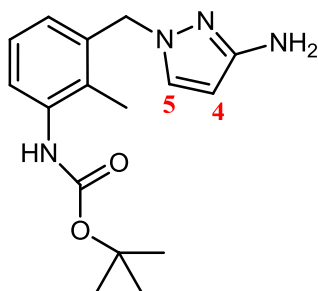
Reactivo de partida: 0.35 mmol del compuesto 5ñ.

Rto.: 0.26 mmol, 73%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 9.49 (s a, 1H, -NH-), 7.25-7.39 (m, 4H, 3H-Ar, H₅), 5.42 (d, 1H, H₄), 5.04 (d, 2H, -CH₂-), 4.58 (s, 2H, -NH₂), 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

[ES⁺MS] m/z 323 (MH⁺).

Compuesto 6o: [3-((3-amino-1*H*-pirazol-1-il)metil)-2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo.

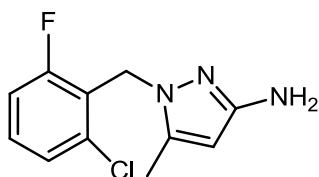


Reactivo de partida: 0.54 mmol del compuesto 5o.

Rto.: 0.20 mmol, 37%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.58 (s a, 1H, -NH-), 7.30 (d, 1H, H_5), 7.15-7.17 (m, 1H, 1H-Ar), 7.04-7.09 (m, 1H, 1H-Ar), 6.71-6.74 (m, 1H, 1H-Ar), 5.40 (d, 1H, H_4), 5.03 (s a, 2H, - CH_2 -), 4.54 (s, 2H, - NH_2), 2.10 (s, 3H, - CH_3), 1.44 (s, 9H, *t*Bu).
[ES^+MS] m/z 303 (MH^+).

Compuesto 6q: 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-amina.



A una disolución del compuesto 35b (314 mg, 0.85 mmol) en etanol (40 mL) se añadió hidrazina monohidrato (Aldrich, 0.095 mL, 1.95 mmol). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 50 horas apareciendo un sólido blanco precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con etanol. El filtrado obtenido se concentró a sequedad obteniendo 330 mg de un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de diclorometano:metanol (100:0 a 80:20). Se obtuvieron 148 mg de 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-amina (Rto.73%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.18-7.42 (m, 3H, 3H-Ar), 5.18 (s, 1H, H-pirazol), 5.01-5.02 (m, 2H, - CH_2 -), 4.41 (s a, 2H, - NH_2), 2.23 (s, 3H, - CH_3).

[ES^+MS] m/z 240 (MH^+).

El siguiente derivado se preparó utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención del compuesto 6q. En este caso se reemplazó el compuesto 35b por el correspondiente.

Compuesto 6p: 1-bencil-1*H*-pirazol-3-amina.



Reactivo de partida: 0.86 mmol del compuesto 35a.

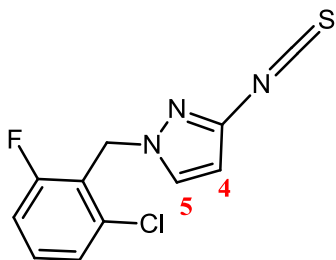
Rto.: 0.81 mmol, 93%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.42 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.16-7.33 (m, 5H, 5H-Ar), 5.40 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.02 (s, 2H, - CH_2 -), 4.55 (s a, 2H, - NH_2).

[ES^+MS] m/z 174 (MH^+).

4.1.2.5 Método general de síntesis de los isotiocianatos 7a-7q

Compuesto 7n: 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



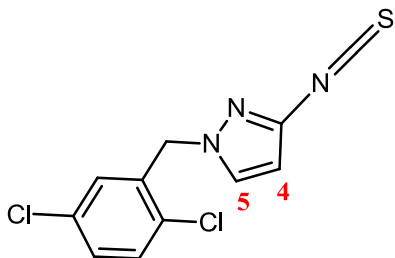
A una disolución del compuesto 6n (1g, 4.4 mmol) en cloroformo (60 mL), se añadió bicarbonato sódico acuoso (60 mL). A continuación se añadió tiofosgeno (Aldrich, 0.76 g, 6.6 mmol). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras separar las fases, la fase orgánica se concentró a sequedad obteniéndose 1.1 g de 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol como un sólido amarillo (Rto. 93%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.24-7.36 (m, 3H, 2H-Ar, H₅), 7.07 (m, 1H, H-Ar), 6.16 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H₄), 5.39 (d, $J = 1.76$ Hz, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 268 (MH⁺).

Los siguientes isotiocianatos se prepararon utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención del 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol, utilizando diclorometano como disolvente en lugar de cloroformo. En cada caso se reemplazó el compuesto 6n por el correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 7a: 1-(2,5-diclorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



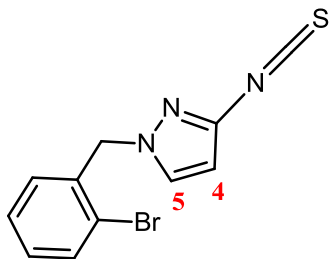
Reactivo de partida: 0.50 mmol del compuesto 6a.

Rto.: 0.43 mmol, 85%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.96 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H₅), 7.53b-7.56 (m, 1H, H-Ar), 7.45-7.48 (m, 1H, H-Ar), 7.21-7.22 (m, 1H, H-Ar), 6.49 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H₄), 5.40 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 285 (MH⁺).

Compuesto 7b: 1-(2-bromobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



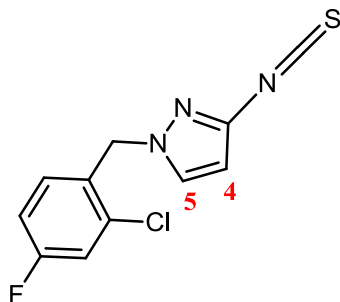
Reactivo de partida: 0.67 mmol del compuesto 6b.

Rto.: 0.57 mmol, 86%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.93 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₅), 7.65-7.68 (m, 1H, H-Ar), 7.36-7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.26-7.32 (m, 1H, H-Ar), 7.02-7.05 (m, 1H, H-Ar), 6.48 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.38 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 295 (MH⁺).

Compuesto 7c: 1-(2-cloro-4-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



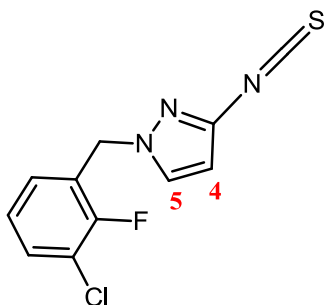
Reactivo de partida: 0.70 mmol del compuesto 6c.

Rto.: 0.62 mmol, 87%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.90 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₅), 7.49-7.53b (m, 1H, H-Ar), 7.23-7.26 (m, 2H, 2H-Ar), 6.47 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.38 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 295 (MH⁺).

Compuesto 7d: 1-(3-cloro-2-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



Reactivo de partida: 0.71 mmol del compuesto 6d.

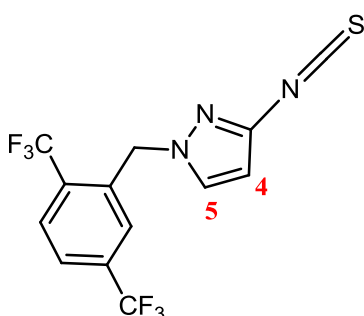
Purificación: El extracto orgánico se lavó con agua destilada, se secó sobre sulfato magnésico y se concentró. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en sílice utilizando como eluyente un gradiente de hexano:acetato (100:0 a 90:10).

Rto.: 0.56 mmol, 79%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ, ppm: 7.96 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.55-7.61 (m, 1H, H-Ar), 7.19-7.27 (m, 2H, 2H-Ar), 6.46 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.40 (d, 2H, -CH₂).

[ES⁺MS] m/z 268 (MH⁺).

Compuesto 7e: 2,5-bis(trifluorometilbencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.

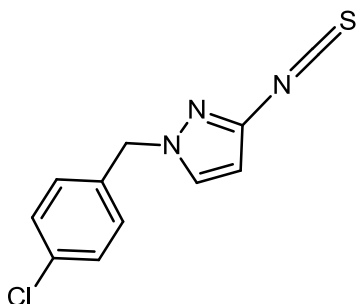


Reactivo de partida: 0.86 mmol del compuesto 6e.

Rto.: Cuantitativo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 7.96-8.01 (m, 3H, 2H-Ar, H₅), 7.46 (s a, 1H, H-Ar), 6.53b (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.60 (s, 2H, -CH₂-).

Compuesto 7f: 1-(4-clorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.

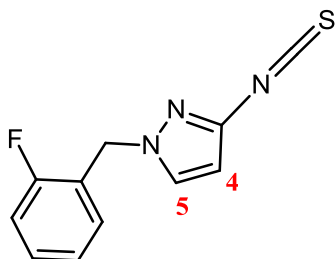


Reactivo de partida: 0.30 mmol del compuesto 6f.

Rto.: 0.26 mmol, 87%.

[ES⁺MS] m/z 250 (MH⁺).

Compuesto 7g: 1-(2-fluorobencil)3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



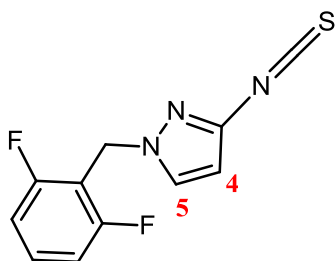
Reactivo de partida: 0.41 mmol del compuesto 6g.

Rto.: 0.386 mmol, 93%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.92 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.35-7.43 (m, 1H, H-Ar), 7.17-7.27 (m, 3H, 3H-Ar), 6.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.35 (s, 2H, $-\text{CH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 234 (MH^+).

Compuesto 7h: 1-(2,6-fluorobencil)3-isotiocianato-1H-pirazol.



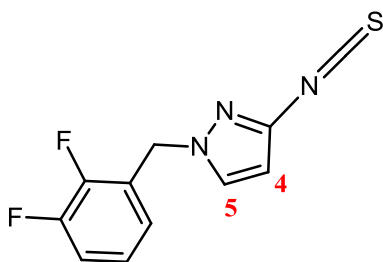
Reactivo de partida: 0.774mmol del compuesto 6h.

Rto.: 0.61 mmol, 79%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.91 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.43-7.53b (m, 1H, H-Ar), 7.10-7.18 (m, 2H, 2H-Ar), 6.42 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.35 (s, 2H).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 252 (MH^+).

Compuesto 7i: 1-(2,3-difluorobencil)3-isotiocianato-1H-pirazol



Reactivo de partida: 0.5 mmol del compuesto 6i.

Rto.: 90%.

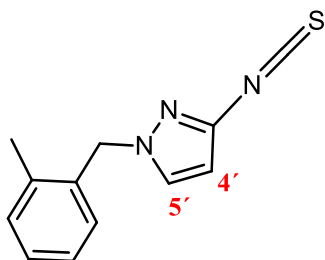
Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.95 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.37-7.46 (m, 1H, H-Ar), 7.17-7.24 (m, 1H, H-Ar), 7.03-7.08 (m, 1H, H-Ar), 6.45 (d, $J = 2.34$ Hz,

1H, H₄), 5.40 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 252 (MH⁺).

Compuesto 7j: 3-isotiocianato-1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol.



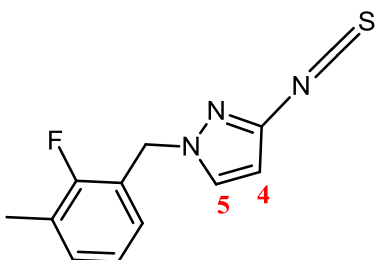
Reactivo de partida: 0.45 mmol del compuesto 6j.

Rto.: 0.37 mmol, 82%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.86 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.17-7.23 (m, 3H, 3H-Ar), 6.97-6.99 (m, 1H, H-Ar), 6.46 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.30 (s, 2H, -CH₂-), 2.28 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 230 (MH⁺).

Compuesto 7k: 1-(2-fluoro-3-metilbencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



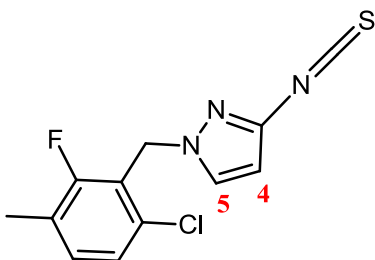
Reactivo de partida: 0.67 mmol del compuesto 6k.

Rto.: 0.51 mmol, 76%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.90 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.22-7.28 (m, 1H, H-Ar), 7.02-7.10 (m, 2H, 2H-Ar), 6.44 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.32 (s, 2H, -CH₂-), 2.22 (d, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 248 (MH⁺).

Compuesto 7l: 1-(6-cloro-2-fluoro-3-metilbencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



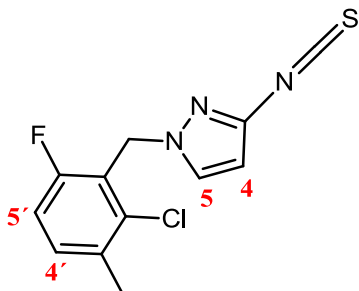
Reactivo de partida: 0.96 mmol del compuesto 6l.

Rto.: 0.84 mmol, 87%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.91 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 7.21-7.39 (m, 2H, 2H-Ar), 6.43 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.39 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.22 (d, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 282 (MH^+).

Compuesto 7m: 1-[(2-cloro-6-fluoro-3-metilfenil)metil]-3-isotiocianato-1*H*-pirazol.



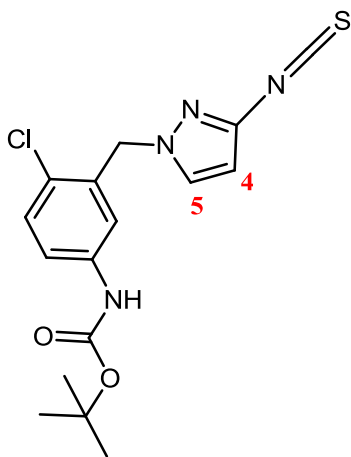
Reactivo de partida: 0.69 mmol del compuesto 6m.

Rto.: 0.61 mmol, 88%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.91 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.42-7.47 (m, 1H, H_4), 7.19-7.25 (m, 1H, H_5), 6.41 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.42 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.31 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 282 (MH^+).

Compuesto 7ñ: [4-cloro-3-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)fenil]carbamato de *tert*-butilo.



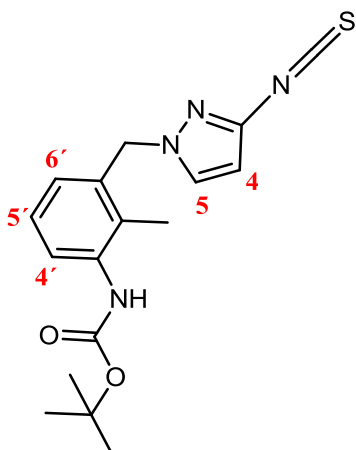
Reactivo de partida: 0.24 mmol del compuesto 6ñ.

Rto.: Cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 9.51 (s a, 1H, $-\text{NH-}$), 7.91 (d, 1H, H_5), 7.44-7.48 (m, 1H, H-Ar), 7.33-7.37 (m, 1H, H-Ar), 7.17-7.21 (m, 1H, H-Ar), 6.48 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.33 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.45 (s, 9H, ^tBut).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 365 (MH^+).

Compuesto 7o: [3-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-2-metilfenil]carbamato de *tert*-butilo.



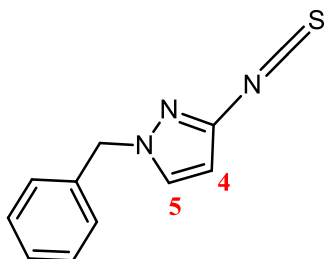
Reactivo de partida: 0.20 mmol del compuesto 6o.

Rto.: Cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.62 (s a, 1H, -NH-), 7.83 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 7.21-7.23 (m, 1H, H_4), 7.09-7.14 (m, 1H, H_5), 6.81-6.83 (m, 1H, H_6), 6.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.31 (s, 2H, - CH_2 -), 2.11 (s, 3H, - CH_3), 1.44 (s, 9H, ^tBut).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 345 (MH^+).

Compuesto 7p: 3-isotiocianato-1-(fenilmetil)-1*H*-pirazol.



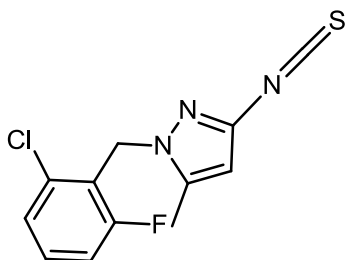
Reactivo de partida: 0.81 mmol del compuesto 6p.

Rto.: Cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.21-7.40 (m, 6H, 5H-Ar, H_5), 6.19 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.22 (s, 2H, - CH_2 -).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 216 (MH^+).

Compuesto 7q: 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-isotiocianato-5-metil-1*H*-pirazol.



Reactivo de partida: 1.09 mmol del compuesto 6q.

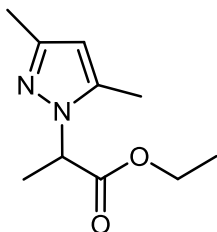
Rto.: 0.99 mmol, 91%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.25-7.49 (m, 3H, 3H-Ar), 6.23 (s, 1H, pirazol), 5.28 (s a, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.37 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 282 (MH^+).

4.1.2.6 Síntesis de la 2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)propanohidrazida (8a)

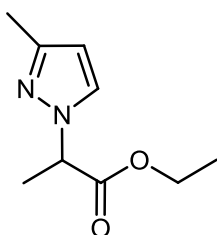
Compuesto 38a: 2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)propanoato de etilo.



A una disolución de 3,5-dimetil-1H-pirazol (Aldrich, 8g, 0.083 mol) y carbonato potásico anhidro (11.5 g, 0.083 mol) en 50 mL de acetonitrilo anhidro se añadió etil-2-bromopropanoato (Aldrich, 15 g, 0.083 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 horas. Se adicionaron 0.2 equivalentes de carbonato potásico a la mezcla y se mantuvo bajo reflujo durante 24 horas más. Tras enfriar a temperatura ambiente, se filtró la reacción y se eliminó el disolvente bajo presión reducida. El residuo obtenido se diluyó en 50 mL de diclorometano y se lavó con agua destilada. Tras separar la fase acuosa, se extrajo con diclorometano (3 x 70 mL). Los extractos orgánicos se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El aceite aislado se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla de hexano:acetato (100:0 a 20:80) obteniéndose 11.6 g de 2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)propanoato de etilo como un aceite incoloro (Rto. 71%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.83 (s, 1H, H-pirazol), 4.85 (q, $J = 7.18$ Hz, 1H, $-\text{CHCH}_3$), 4.08-4.25 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.22-2.23 (m, 6H, 2 CH_3), 1.79 (d, $J = 7.32$ Hz, 3H, $-\text{CHCH}_3$), 1.23 (t, $J = 7.18$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

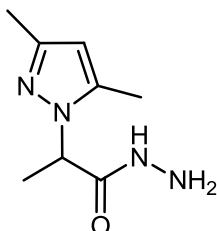
Compuesto 38b: 2-(3-metil-1H-pirazol-1-il)propanoato de etilo.



El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la

preparación del compuesto 38a. Se utilizaron como materiales de partida: 3-metil-1*H*-pirazol (Aldrich, 80 g, 0.97 mol), carbonato potásico anhidro (138 g, 1 mol) y etil-2-bromopropanoato (Aldrich, 181 g, 0.97 mol) en 500 mL de acetonitrilo anhidro obteniéndose 105 g de 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanoato de etilo como un líquido amarillo (Rto. 87%). En la reacción de alquilación también se obtuvo el regioisómero etil-2-(5-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanoato en una proporción 3:7 frente al regioisómero deseado.

Compuesto 8a: 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida.

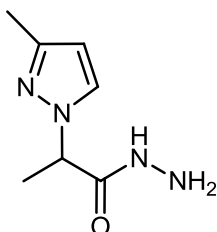


A una disolución de hidrazina monohidrato (Fluka, 0.360 mol, 17.47 mL) en 100 mL de etanol (95%) se añadió gota a gota el intermedio 62 (11.76 g, 0.059 mol), previamente disuelto en 60 mL de etanol. La mezcla de reacción se calentó a 50°C y se siguió por c.c.f. revelando con yodo. Tras 16 horas se eliminó el disolvente bajo presión reducida obteniéndose 10.7 g de 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida como un sólido blanco (Rto. 98%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.90 (s a, 1H, -NH-), 5.85 (s, 1H, H-pirazol), 4.80 (q, *J* = 7.18 Hz, 1H, -CHCH₃), 3.82 (s a, 2H, -NH₂), 2.21-2.24 (m, 6H, 2CH₃), 1.75 (d, *J* = 7.18 Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 183 (MH⁺).

Compuesto 8b: 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida.



El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del compuesto 8a. Se utilizaron como materiales de partida: 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanoato de etilo (105 g, 0.76 mol), hidracina monohidrato (120 ml, 2.3 mol) en 400 mL de etanol obteniéndose 149 g de 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida como sólido blanco (Rto. 90%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ ppm: 9.28 (s a, 1H, -NH-), 7.62 (d, 1H, *J*=2.20 Hz,

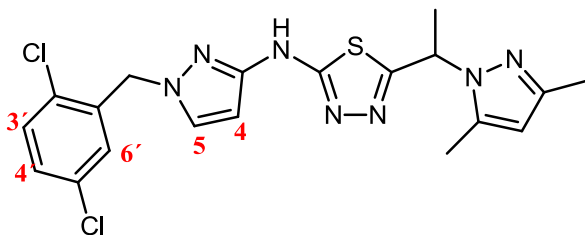
H-pirazol), 6.01 (d, 1H, $J=2.05$ Hz, H-pirazol), 4.80 (q, $J = 7.18$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CH}}\text{CH}_3$), 4.29 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.11 (sa, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.51 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, $-\text{CH}\underline{\text{CH}}_3$).

[ES⁺MS] m/z 169 (MH⁺).

4.1.2.7 Métodos generales de síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol.

Metodo A:

Compuesto 9: *N*-(1-(2,5-diclorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



A una disolución del compuesto 7a (80 mg, 0.23 mmol) en 5 mL de diclorometano anhidro se añadió el compuesto 8a (42 mg, 0.23 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentró a sequedad obteniendo 4-(1-(2,5-diclorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-1-(2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanoil)tiosemicarbazida. [ES⁺MS] m/z 467 (MH⁺). El sólido se disolvió en 4 mL de ácido sulfúrico acuoso concentrado y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 3h. La mezcla resultante se neutralizó con amoníaco acuoso (32%) en baño de agua-hielo apareciendo un precipitado en la mezcla. El precipitado se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30mm x 150mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (40:100 a 100:0) en condiciones neutras obteniéndose 0.13 mmol del compuesto 9, como un sólido blanco (Rto. 54%)

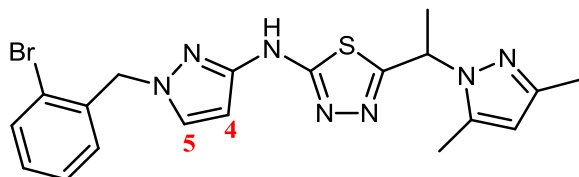
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.79 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.51-7.54 (m, 1H, H_{6'}), 7.41-7.45 (m, 1H, H_{4'}), 7.15-7.16 (m, 1H, H_{3'}), 6.01 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.83 (s, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, $J = 6.74$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CH}}\text{CH}_3$), 5.32 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.79 (d, $J = 6.74$ Hz, 3H, $-\text{CH}\underline{\text{CH}}_3$).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.98, 14.02, 20.93 (3CH₃), 52.30 ($\underline{\text{CH}}\text{CH}_3$), 52.88 (CH₂), 94.50 (C₄), 105.72 (CH-pirazol), 129.85, 130.14, 131.54 (3CH-Ar), 132.32 (C-Ar), 133.12(C₅), 137.31 (2C-Cl), 139.25, 147.27 (2CCH₃), 149.12 (CNH), 161.77, 164.39, (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 448 (MH⁺).

Los siguientes tiadiazoles se prepararon utilizando el método A, descrito anteriormente en la obtención del compuesto 9. En cada caso se reemplazaron los compuestos 7a y 8a por los correspondientes. Las cantidades utilizadas, rendimientos se especifican en cada caso. En el caso del método de purificación se especifica si es distinto al utilizado en el caso del compuesto 9.

Compuesto 10: *N*-(1-(2-bromobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.255 mmol del compuesto 7b y 0.26 mmol del compuesto 8a.

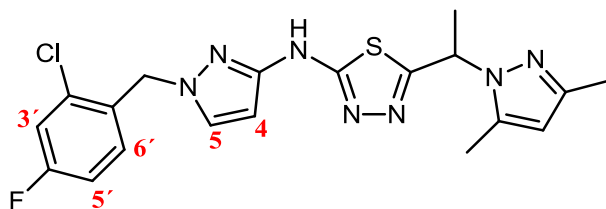
Rto.: 0.15 mmol, 59%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.76 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.63-7.66 (m, 1H, H-Ar), 7.23-7.37 (m, 2H, 2H-Ar), 7.02-7.05 (m, 1H, H-Ar), 5.99 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.84 (s a, 1H, H-pirazol), 5.76 (q, *J* = 6.88 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.29 (s, 2H, -CH₂-), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.53b, 13.59, 20.52 (3CH₃), 52.45 (CH₂), 54.62(CHCH₃), 93.81 (C₄), 105.28 (CH-pirazol), 122.51 (CH-Ar), 122.89 (C-Ar), 127.94, 129.80, 130.02, 132.60 (3CH-Ar, C₅), 136.34 (CBr), 138.82 (CCH₃), 146.80, 148.46 (CCH₃, CNH), 161.31, 163.91 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 458 (MH⁺).

Compuesto 11: *N*-(1-(2-cloro-4-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.35 mmol del compuesto 7c y 0.35 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua destilada. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose el producto descrito.

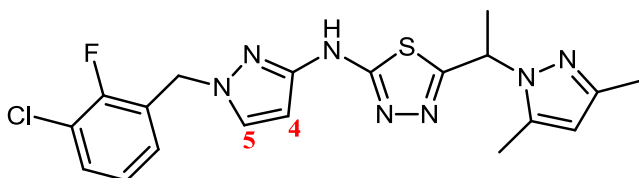
Rto.: 0.19 mmol, 53b%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.75 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.46-7.49 (m, 1H, H_3), 7.18-7.21 (m, 2H, H_5 , H_6), 5.97 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.85 (s, 1H, H-pirazol), 5.76 (q, $J = 6.74$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CHCH}}_3$), 5.29 (s a, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.79 (d, $J = 6.74$ Hz, 3H, $-\text{CHCH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.96, 14.00, 20.92 (3CH_3), 52.06 ($\underline{\text{CHCH}}_3$), 52.91 (CH_2), 94.22 (C_4), 105.70 (CH-pirazol), 115, 117 (2CH-Ar), 131.61 (C-Ar), 132.2, 132.82 (CH-Ar , C_5), 132.32 (CAr), 139.28 (C-Cl), 147.27, 148.94 (2CCH_3), 160.66, 161.81, 163.12, 163.38 ($\underline{\text{CNH}}$ (2C-tiadiazol , CF).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 432 (MH^+).

Compuesto 12: *N*-(1-(3-cloro-2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.35 mmol del compuesto 8a y 0.35 mmol del compuesto 7d.

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua destilada. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose el producto descrito.

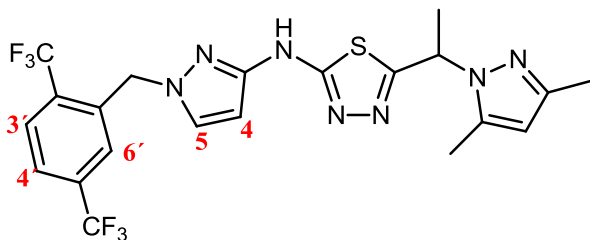
Rto.: 0.232 mmol, 67%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.89 (s a, 1H, $-\text{NH-}$), 7.77 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.52-7.58 (m, 1H, H-Ar), 7.17-7.23 (m, 2H, 2H-Ar), 5.99 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.84 (s, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, $J = 6.74$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CHCH}}_3$), 5.32 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.79 (d, 3H, $J = 6.74$ Hz, $-\text{CHCH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.96, 14.01, 20.96 (3CH_3), 48.89 ($\underline{\text{CHCH}}_3$), 52.91 (CH_2), 94.42 (C_4), 105.72 (CH-pirazol), 125.80 (CH-Ar), 126.62, 126.76 (C-Cl , C(Ar)), 129.61, 129.65, 130.66, 132.73, (3CH-Ar , C_5), 139.28, 147.28 ($\underline{\text{CCH}}_3$, $\underline{\text{CNH}}$), 148.01 ($\underline{\text{CCH}}_3$), 154.40, 156.86, 163.75 (2C-tiadiazol , CF).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 432 (MH^+).

Compuesto 13: *N*-(1-(2,5-bis(trifluorometil)encil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.68 mmol del compuesto 7e y 0.68 mmol del compuesto 8a.

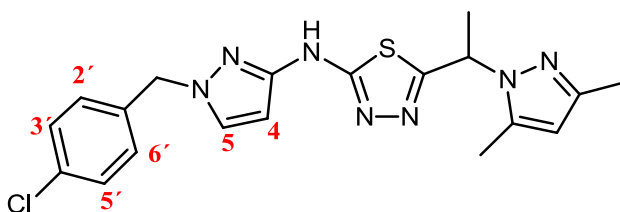
Rto.: 0.068 mmol, 10%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.94 (s a, 1H, -NH-), 7.92-8.05 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$), 7.86 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.45 (s, 1H, $\text{H}_{6'}$), 6.04 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.72-5.80 (m, 2H, - CHCH_3 , H-pirazol), 5.51 (s a, 2H, - CH_2 -), 2.22 (s, 3H, - CH_3), 2.04 (s, 3H, - CH_3), 1.77 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, - CHCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.97, 13.97, 20.98 (3 CH_3), 51.34 (CH_2), 52.90 (CHCH_3), 94.31 (C_4), 105.72 (CH-pirazol), 125.88, 127.18, 128.00 (3CH-Ar), 133.64 (CH-pirazol), 137.88 (C-Ar), 138.05 (CF_3), 139.27, 142.95, 147.29 (2C- CH_3 , CF_3), 149.60 (C-NH), 160.81, 164.09 (2C-tiadiazol).

[ES^+MS] m/z 516 (MH^+).

Compuesto 14: *N*-(1-(4-clorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.29 mmol del compuesto 7f y 0.29 mmol de compuesto 8a.

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua destilada. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose el producto descrito.

Rto.: 0.08 mmol, 29%.

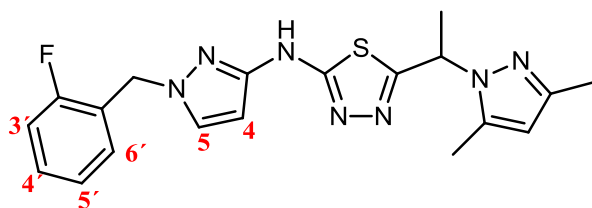
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.87 (s, 1H, -NH-), 7.74 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.37-7.40 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.24-7.27 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 5.95 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.84 (s, 1H, H-pirazol), 5.76 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, - CHCH_3), 5.20 (s, 2H, - CH_2 -),

2.24 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 2H, -CH₂), 1.78 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.96, 14.00, 21.91 (3CH₃), 52.97 (CH₂), 54.27 (CHCH₃), 94.28 (C₄), 105.71 (CH-pirazol), 128.83, 129.93 (4CH-Ar), 132.46 (C₅), 132.67(C-Cl), 136.91 (C-Ar), 139.33, 147.27 (2C-CH₃), 148.98, (CNH), 161.84, 164.16 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] *m/z* 414 (M⁺).

Compuesto 15: *N*-(1-(2-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.34 mmol del compuesto 7g y 0.34 mmol del compuesto 8a.

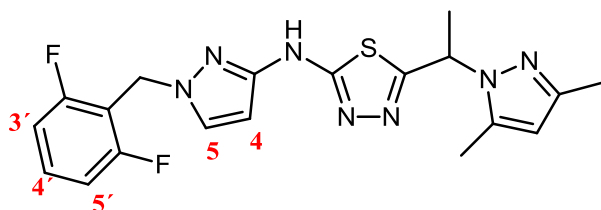
Rto.: 0.18 mmol, 42%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, -NH-), 7.73 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₅), 7.32-7.40 (m, 1H, H_{3'}), 7.13-7.25 (m, 3H, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}), 5.97 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.85 (s, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, *J* = 6.88 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.26 (s a, 2H, -CH₂-), 2.25 (s, 3H, -CH₃), 2.10 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 11.05, 14.11, 21.07 (3CH₃), 48.94 (CHCH₃), 52.97 (CH₂), 94.29 (C₄), 105.80 (CH-pirazol), 115.98, 125.02 (2CH-Ar), 130.50 (C-Ar), 130.60, 130.99 (2CH-Ar), 132.59 (C₅), 139.37, 147.37 (2C-CH₃), 149.85 (CNH), 159.29, 161.73, 164.48 (2C-tiadiazol, C-F).

[ES⁺MS] *m/z* 448 (MH⁺).

Compuesto 16: *N*-(1-(2,6-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.30 mmol del compuesto 7h y 0.36 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El precipitado se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (40:100 a 100:0) en

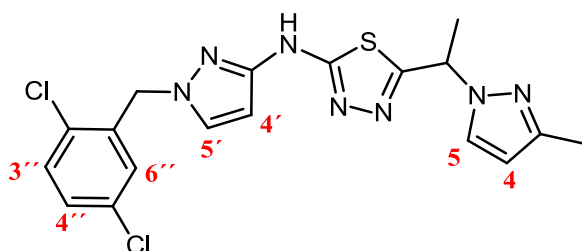
condiciones neutras. Posteriormente se disolvió en diclorometano (pureza de HPLC) y se precipitó con hexano (pureza HPLC).

Rto.: (0.154 mmol, 51%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.84 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.39-7.50 (m, 1H, H_4), 7.07-7.12 (m, 2H, H_3 , H_5), 5.92 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.86 (s, 1H, H-pirazol), 5.75 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH $_3$), 5.24 (s, 2H, -CH $_2$ -), 2.24 (s, 3H, -CH $_3$), 2.11 (s, 3H, -CH $_3$). 1.78 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH $_3$).

[ES $^+$ MS] m/z 416 (MH $^+$).

Compuesto 17: *N*-(1-(2,5-diclorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.20 mmol del compuesto 7a y 0.20 mmol de 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (Artchem).

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua destilada. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose el producto descrito.

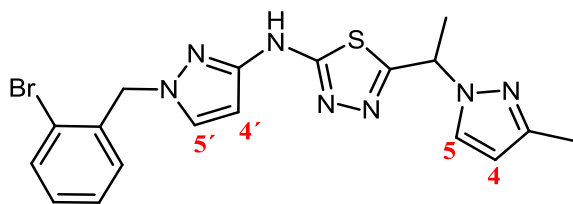
Rto.: 0.06 mmol, 32%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.93 (s a, 1H, -NH-), 7.79 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.73 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.51-7.54 (m, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.41-7.45 (m, 1H, $\text{H}_{4''}$), 7.13-7.14 (m, 1H, $\text{H}_{3''}$), 6.01-6.06 (m, 2H, H_4 , H_4), 5.83 (q, $J = 7.03$ Hz, 1H, -CHCH $_3$), 5.32 (s, 2H, -CH $_2$ -), 2.15 (s, 3H, -CH $_3$), 1.82 (d, 3H, $J = 7.03$ Hz, -CHCH $_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 14.04, 20.75 (2CH $_3$), 52.39 (CH $_2$), 56.31 (CHCH $_3$), 94.59 (C $_4$), 105.74 (CH-pirazol), 122.92, 130.13, 130.24 (3CH-Ar), 131.56, 132.40 (2C-Cl), 133.24, 134.88 (C $_5$, C $_5$), 137.41 (C-CH $_3$), 140.19 (C-Ar), 148.35 (C-NH), 162.01, 164.04 (2C-tiadiazol).

[ES $^+$ MS] m/z 434 (MH $^+$).

Compuesto 18: *N*-(1-(2-bromobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.26 mmol del compuesto 7b y 0.26 mmol de 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (ArtChem).

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua destilada. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose el producto descrito.

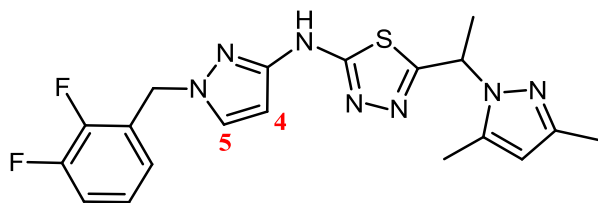
Rto.: 0.11 mmol, 41%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.91 (s a, 1H, -NH-), 7.75-7.76 (m, 2H, H₅, H₅), 7.63-7.66 (m, 1H, H-Ar), 7.23-7.37 (m, 2H, 2H-Ar), 6.99-7.02 (m, 1H, H-Ar), 6.06 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.99 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.83 (q, *J* = 7.03 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.29 (s a, 2H, -CH₂-), 2.15 (s, 3H), 1.82 (d, 3H, *J* = 7.03 Hz, -CHCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 14.04, 20.75 (2CH₃), 52.39 (CH₂), 56.31 (CHCH₃), 94.59 (C₄), 105.74 (CH-pirazol), 122.92 (CBr), 128.49, 130.28, 130.31, 130.41, 133.07, 133.12, (4CH-Ar, C₅, C₅'), 136.92, 140.15 (C-CH₃, C_(Ar)), 148.33 (C-NH), 161.34, 164.38 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 445 (MH⁺).

Compuesto 19: *N*-(1-(2,3-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.82 mmol del compuesto 7i y 0.82 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), se secó a vacío obteniéndose el producto descrito.

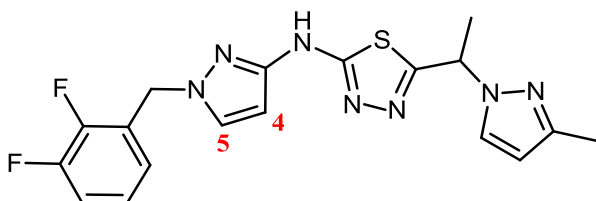
Rto.: 0.61 mmol, 76%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.90 (s a, 1H, -NH-), 7.77 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.01-7.44 (m, 3H, 3H-Ar), 5.98 (d, $J = 1.90$ Hz, 1H, H_4), 5.84 (s, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH $_3$), 5.32 (br s, 2H, -CH $_2$ -), 2.24 (s, 3H, -CH $_3$), 2.09 (s, 3H, -CH $_3$), 1.79 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH $_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.94, 13.97, 20.95 (3CH $_3$), 48.50 (CHCH $_3$), 52.91 (CH $_2$), 94.40 (C_4), 105.71 (CH-pirazol), 117.37, 125.24, 125.93, (3CH-Ar), 127.25 C(Ar), 132.70 (C_5), 139,30, 147.30 (2C-CH $_3$), 149.00 (C-pirazol-N), 151.20, 161.76 (2C-tiadiazol), 164.37, 169.53 (2C-F).

[ES $^+$ MS] m/z 416 (MH $^+$).

Compuesto 20: *N*-(1-(2,3-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.19 mmol del compuesto 7i y 0.19 mmol del 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (ArtChem).

Purificación : El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C), posteriormente se disolvió en diclorometano y se co-evaporó con tolueno obteniendo el producto descrito.

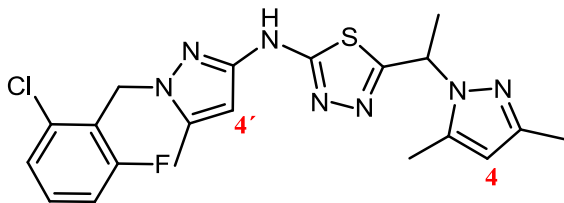
Rto.: 0.15 mmol, 77%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.88 (s a, 1H-NH-), 7.77 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.74 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.33-7.43 (m, 1H, H-Ar), 7.12-7.20 (m, 1H, H-Ar), 6.99-7.03 (m, 1H, H-Ar), 6.06 (d, $J = 2.05$ Hz, 1H, H_4), 5.98 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.83 (q, $J = 7.03$ Hz, 1H, -CHCH $_3$), 5.31 (s, 2H -CH $_2$ -), 2.15 (s, 3H, -CH $_3$), 1.81 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CHCH $_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 14.00, 20.75 (2CH $_3$), 48.58 (CHCH $_3$), 56.32 (CH $_2$), 94.46 (C_4), 105.73 (CH-pirazol), 117.46, 125.43, 125.94 (3CH-Ar), 127.24 (C-Ar), 130.27, 132.81 (C_5' , C_5), 139.83 (C-CH $_3$), 148.37 (C-NH), 161.51, 164.39, 166.89, 167.92 (2C-tiadiazol, 2C-F).

[ES $^+$ MS] m/z 402 (MH $^+$).

Compuesto 40: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivos de partida: 0.59 mmol del compuesto 7p y 0.59 mmol del compuesto 8a.

Rto.: 0.16 mmol, 27%.

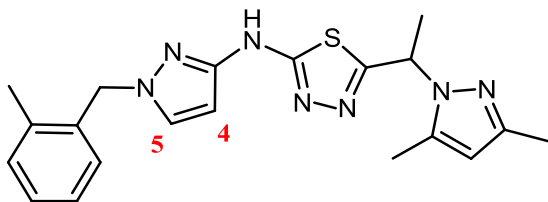
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.45 (s a, 1H, -NH-), 7.15-7.44 (m, 3H, 3H-Ar), 5.85 (s, 1H, H_{4'}), 5.69-5.76 (m, 2H, -CHCH₃, H₄), 5.20 (m, 2H, -CH₂-), 2.35 (s, 3H, H₄-C-C-CH₃), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 2.13 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, *J* = 6.74 Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 11.10, 14.19, 20.66 (3CH₃), 43.19 (CH₂), 52.86 (CHCH₃), 93.52 (C_{4'}), 105.78 (C₄), 115.11 (CH-Ar), 122.73 (C-Ar), 125.98, 131.25 (2CH-Ar), 135.52 (CCl), 139.22, 140.94, 147.30 (3C-pirazol-CH₃), 160.79, 163.27 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 446 (MH⁺).

Método B:

Compuesto 21: *N*-(1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



A una disolución de 3-isotiocianato-1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol (Compuesto 7j, 127 mg, 0.55 mmol) en 5 mL en diclorometano anhidro se añadió 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (Compuesto 8a, 101 mg, 0.55 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se concentró a sequedad bajo presión reducida obteniéndose 223 mg de 2-[2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanoil]-*N*-[1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il]hidrazinacarbotoamida como un sólido amarillo (Rto. 98%). [ES⁺MS] m/z 412 (MH⁺). El sólido se disolvió en oxiclورو de fósforo (Aldrich, 3 mL) y se mantuvo bajo agitación a reflujo durante 2 horas y 30 minutos. Se eliminó el disolvente a vacío. El residuo obtenido se disolvió en

diclorometano y se lavó con agua destilada. El extracto orgánico se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y concentró para dar un sólido que se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (50:100, 100:0) en condiciones neutras obteniéndose 96 mg de *N*-(1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (Rto. 46%).

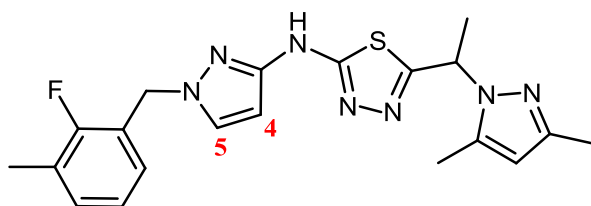
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, -NH-), 7.68 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.10-7.18 (m, 3H, 3H-Ar), 7.01-7.04 (m, 1H, 1H-Ar), 5.93 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H_4), 5.85 (s a, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, $J = 6.68$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.20 (s a, 2H, -CH₂-), 2.35 (s, 3H, -ArCH₃), 2.25 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, 3H, $J = 6.88$ Hz, -CHCH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.96, 14.04, 19.21, 20.97 (4CH₃), 52.94 (CH₂), 53b.02 (CHCH₃), 93.94 (C₄), (CHCH₃), 105.74 (CH-pirazol), 126.40, 128.19, 129.04, 130.57, 132.40 (4CH-Ar, C₅), 135.98 (C-benceno-CH₃), 136.59, 139.27, 147.27 (2C-CH₃, C-Ar), 148.53b (CNH), 161.71, 164.34, (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 394 (MH⁺).

Los siguientes tiadiazoles se prepararon siguiendo el método B descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 21. En cada caso se reemplazaron los compuestos 7j y 8a por los intermedios correspondientes. Las cantidades utilizadas, rendimientos y método de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 22: *N*-(1-(2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.51 mmol del compuesto 7k y 0.51 mmol del compuesto 8a.

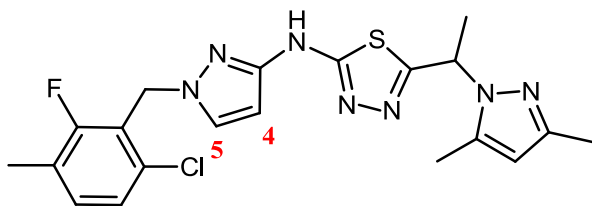
Rto.: 0.42 mmol, 84%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, -NH-), 7.72 (d, $J = 2.05$ Hz, 1H, H_5), 7.19-7.25 (m, 1H, H-Ar), 6.97-7.06 (m, 2H, 2H-Ar), 5.96 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H_4), 5.74-5.84 (m, 2H, H-pirazol, -CHCH₃), 5.23 (s, 2H, -CH₂-), 2.25 (s a, 3H, -CH₃), 2.10 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.96, 14.00, 14.56, 21.00 (4CH₃), 49.10 (CHCH₃), 52.94 (CH₂), 94.22 (C₄), 105.72 (CH-pirazol), 124.38, 124.33, 128.31, 131.72 (3CH-Ar, C-Ar), 132.44 (C₅), 137.88 (C-Ar), 139.28, 147.27 (2C-CH₃), 148.84 (C-pirazol-N), 157.62, 160.15 (2C-tiadiazol), 164.47 (C-F).

[ES⁺MS] m/z 398 (MH⁺).

Compuesto 23: *N*-(1-(6-cloro-2-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.84 mmol del compuesto 71 y 0.84 mmol del compuesto 8a.

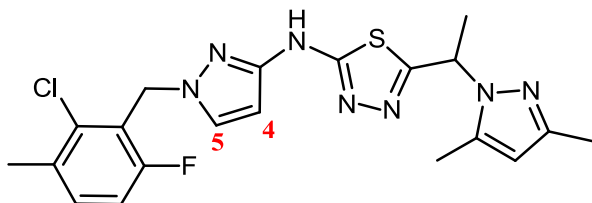
Rto.: (0.26 mmol, 31%).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.22-7.34 (m, 2H, 2H-Ar), 5.90 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.85 (s a, 1H, H-pirazol), 5.76 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.31 (m, 2H, -CH₂-), 2.24-2.26 (m, 3H, -Ar-CH₃), 2.07-2.11 (m, 6H, -2CH₃), 1.79 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.99, 14.06, 14.42, 20.81 (4CH₃), 46.51 (CHCH₃), 52.86 (CH₂), 93.51 (C₄), 105.70 (CH-pirazol), 122.04, 124.37 (C-Ar, C-Ar-CH₃), 125.34, 132.49, 132.64 (2CH-Ar, C₅), 132.70 (C-Cl), 139.13, 147.23 (2C-CH₃), 148.61 (C-pirazol-N), 159.00, 161.48 (2C-tiadiazol), 164.29 (C-F).

[ES⁺MS] m/z 446 (MH⁺).

Compuesto 24: *N*-(1-(2-cloro-6-fluoro-3-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.61 mmol del compuesto 7m y 0.61 mmol del compuesto 8a.

Rto.: 0.24 mmol, 40%.

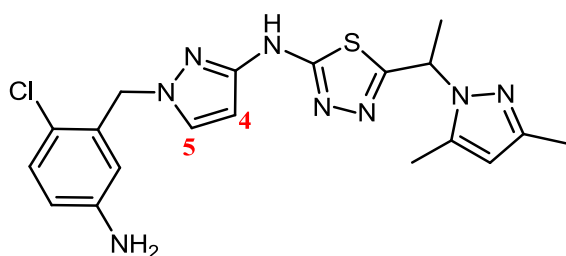
^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.85 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.38-7.43 (m, 1H, H-Ar), 7.13-7.19 (m, 1H, H-Ar), 5.90 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.87 (s a, 1H, H-pirazol), 5.75 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.33 (m, 2H, -CH₂-), 2.32

(s a, 3H, Ar-CH₃), 2.26 (s a, 3H, -CH₃), 2.12 (s a, 3H, -CH₃), 1.80 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.98, 14.06, 20.16, 20.74 (4CH₃), 46.78 (CHCH₃), 52.86 (CH₂), 93.67 (C₄), 105.69 (CH-pirazol), 114.26 (CH-Ar), 122.19 (C-Ar), 132.11 (CH-Ar), 132.76, 135.51 (C-Ar-CH₃, C-Cl), 139.19, 147.25 (2C-CH₃), 148.48 (C-pirazol-N), 158.85, 161.30, 164.3 ((2C-tiadiazol), C-F).

[ES⁺MS] m/z 446 (MH⁺).

Compuesto 26: *N*-(1-(5-amino-2-clorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



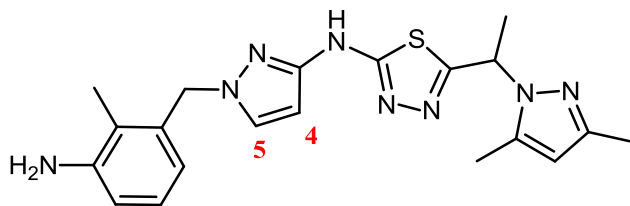
Reactivo de partida: 0.24 mmol del compuesto 7ñ y 0.24 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (30:100, 100:0) en condiciones ácidas (0.1% de ácido trifluoroacético en ambos disolventes). La sal obtenida se basificó con amoníaco acuoso (32%) y se realizó una partición con acetato de etilo/agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.88 (s a, 1H, -NH-), 7.67 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.05-7.07 (m, 1H, H-Ar), 6.47-6.50 (m, 1H, H-Ar), 6.02 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 6.19-6.20 (m, 1H, H-Ar), 5.83 (s a, 1H, H-pirazol), 5.77 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.26 (s a, 2H, -CH₂-), 5.15 (s a, 2H, -NH₂), 2.25 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 429 (MH⁺).

Compuesto 27: *N*-(1-(3-amino-2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.19 mmol del compuesto 70 y 0.19 mmol del compuesto 8a.

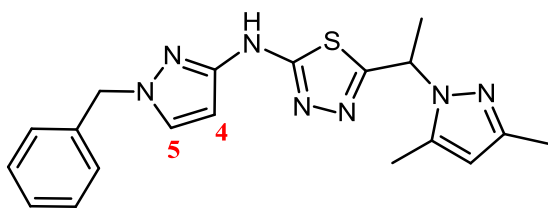
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (20:100, 100:0) en condiciones neutras.

Rto.: 0.09 mmol, 46%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.84 (s a, 1H, -NH-), 7.54 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 6.80-6.85 (m, 1H, H-Ar), 6.57-6.60 (m, 1H, H-Ar), 6.30-6.32 (m, 1H, H-Ar), 5.91 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.85 (s a, 1H, H-pirazol), 5.78 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.12 (s a, 2H, -CH₂), 4.83 (s a, 2H, -NH₂), 2.26 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 2.03 (s, 3H, -CH₃), 1.80 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 409 (MH⁺).

Compuesto 39: *N*-(1-bencil-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.81 mmol del compuesto 7q y 0.81 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (40:100, 100:0) en condiciones neutras.

Rto.: 0.30 mmol, 37%.

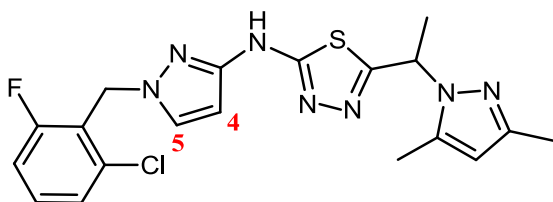
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.85 (s a, 1H, -NH-), 7.74 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.24-7.33 (m, 5H, 5H-Ar) 5.96 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.85 (s a, 1H, H-pirazol), 5.78 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.20 (s a, 2H, -CH₂-), 2.25 (s, 3H, -CH₃), 2.10 (s,

3H, -CH₃), 1.80 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.98, 14.02, 21.06 (3CH₃), 52.97 (CH₂), 55.12 (CHCH₃), 94.16 (C₄), 105.74 (CH-pirazol), 128.04, 128.14, 128.86 (5CH-Ar), 132.27 (C₅), 137.89 (C-Ar), 139.32, 147.28 (2C-CH₃), 148.76 (CNH), 161.31, 164.29 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 380 (MH⁺).

Compuesto 25: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



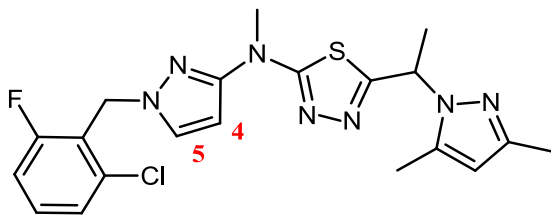
Una suspensión de 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (Compuesto 8a, 0.75 g, 4.1 mmol) y 1-(2-cloro-6-fluorobencil)-3-isotiocianato-1*H*-pirazol (Compuesto 7n, 1.1 g, 4.1 mmol) en 30 mL de etanol se calentó a reflujo durante 2 horas apareciendo un precipitado blanco. El precipitado se filtró y se lavó con etanol para dar 1.65g de 1-(2-(3-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanoil)-4-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)tiosemicarbazida (3.7 mmol, 92 %). [ES⁺MS] m/z 450 (MH⁺). El sólido (1.65 g, 3.7 mmol) se disolvió en 4 mL de ácido sulfúrico acuoso concentrado y se agitó a temperatura ambiente durante 2h. La mezcla resultante se neutralizó con amoníaco acuoso (32%) en baño de hielo. El precipitado se filtró y secó obteniéndose 1.26 g de *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (2.9 mmol, 78%) como sólido blanco.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.21-7.34 (m, 3H, 2H-Ar, H₅), 7.05-7.06 (m, 1H, H-Ar), 5.99 (d, $J = 2.49$ Hz 1H, H₄), 5.83 (s a, 1H, H-pirazol), 5.69 (q, $J = 7.18$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.36-5.37 (m, 2H, -CH₂-), 2.30 (s, 3H, -CH₃), 2.26 (s, 3H, -CH₃), 1.99 (d, $J = 7.18$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 11.08, 14.18, 20.79 (3CH₃), 46.38 (CH₂), 52.92 (CHCH₃), 93.76 (C₄), 105.81 (CH-pirazol), 115.28 (CH-Ar), 122.53b (C-Ar), 126.15, 131.76, 132.78 (2CH-Ar, C₅), 135.65 (CCI), 139.30 (CCH₃), 147.38, 148.73 (CCH₃, CNH), 160.75, 162.15 (2C-tiadiazol), 164.34 (CF).

[ES⁺MS] m/z 432 (MH⁺).

Compuesto 43: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-metil-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



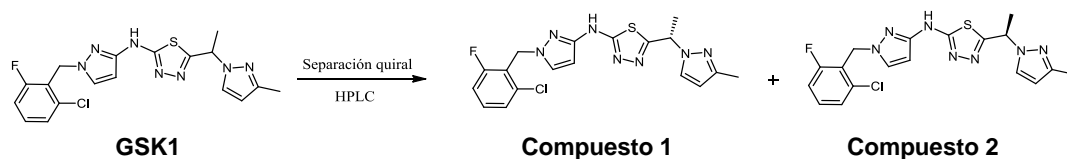
A una disolución de *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (Compuesto 25, 50 mg, 0.12 mmol) en 2 mL de dimetilformamida anhidra, se adicionó carbonato potásico (Aldrich, 16 mg, 0.12 mmol) y yoduro de metilo (Aldrich, 16 mg, 0.12 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo. La reacción se siguió por HPLC y c.c.f. Transcurrida 1 h y 30 minutos se adicionó otro equivalente de yoduro de metilo y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 3 horas 30 minutos más. Se realizó una partición de la mezcla entre diclorometano y cloruro amónico (aq, sat). El extracto orgánico se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y concentró a vacío obteniéndose un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0 a 70:30) obteniéndose 25 mg del compuesto *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-metil-1,3,4-tiadiazol-2-amina (Rto. 46%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.86 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.40-7.47 (m, 1H, H-Ar), 7.33-7.35 (m, 1H, H-Ar), 7.21-7.27 (m, 1H, H-Ar), 6.14 (d, 1H, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₄), 5.87 (s a, 1H, H-pirazol), 5.74 (q, *J* = 6.88 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.36 (s, 2H, -CH₂-), 3.50 (s, 3H, -NCH₃), 2.25 (s, 3H, -CH₃), 2.12 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 11.11, 14.20, 20.79 (3CH₃), 36.93 (NCH₃), 46.58 (CH₂), 52.89 (CHCH₃), 93.40 (C₄), 105.80 (CH-pirazol), 115.06 (CH-Ar), 122.50 (C-Ar), 126.15, 131.74, 133.30 (2CH-Ar, C₅), 135.58 (CCl), 139.27 (CCH₃), 147.34, 151.60 (CCH₃, CNH), 160.74, 163.35 (2C-tiadiazol), 165.18 (CF).

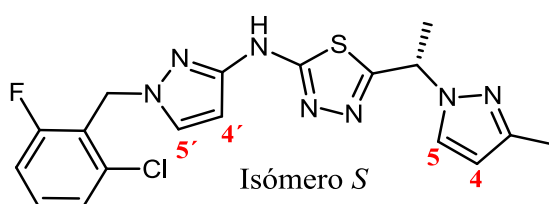
[ES⁺MS] m/z 446 (MH⁺).

4.1.2.8 Separación de los enantiómeros del compuesto de referencia GSK1



El racemato GSK1 (38 mg, 0.091 mmol) se separó en sus dos enantiómeros correspondientes, compuesto **1** y compuesto **2**, por cromatografía líquida de alta resolución de tipo semipreparativo utilizando una columna de fase estacionaria quiral, CHIRALPAK-AD 20x250mm y un gradiente isocrático de hexano:etanol (40:60) como eluyente a un flujo de 17 mL/min. La longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. El compuesto GSK1 se disolvió en 3 mL de etanol/isopropanol/metanol, debido a la baja solubilidad del compuesto se calentó la mezcla para la total disolución. Se necesitaron 4 inyecciones para separar la totalidad de la muestra, antes de cada inyección se calentó la disolución del compuesto ya que éste precipitaba al descender la temperatura. Tras coleccionar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros correspondientes que fueron purificados por separado por cromatografía en columna de gel de sílice (1g) empleando una mezcla de disolventes de grado de HPLC, diclorometano:metanol (25:1) como eluyente.

Compuesto 1: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((1*S*)-1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



El compuesto **1** eluyó en segundo lugar, se obtuvieron (10.5 mg, 0.025 mmol, 83%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):metanol (0.1% isopropilamina) (85:15) con un de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 6.70 min.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.41 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H_{5'}), 7.36 (d, *J* = 2.20

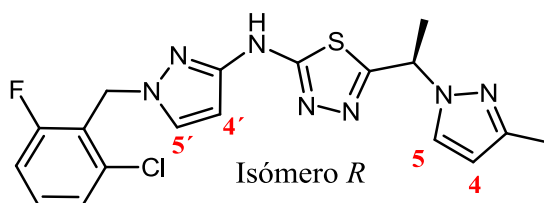
Hz, 1H, H₅), 7.22-7.32 (m, 2H, 2H-Ar), 7.02-7.09 (m, 1H, 1H-Ar), 6.09 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₄), 6.01-6.02 (m, 1H, H₄), 5.76 (q, $J = 7.03$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.38 (d, 2H, -CH₂-), 2.35 (s, 3H, -CH₃), 2.02 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

$[\alpha]_D^{20} = +0.88^\circ$ ($c = 2$, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

La configuración absoluta (*S*) se determinó por dicroísmo circular vibracional y se estimó con un 91% como límite de confianza. La concentración de la muestra fue de 10mg/125µl empleando CDCl₃ como disolvente.

Compuesto 2: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((1*R*)-1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



El compuesto 2 eluyó en primer lugar, se obtuvieron (10.5 mg, 0.025 mmol, 83%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):metanol (0.1% isopropilamina) (85:15) con un flujo de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 4.43 min.

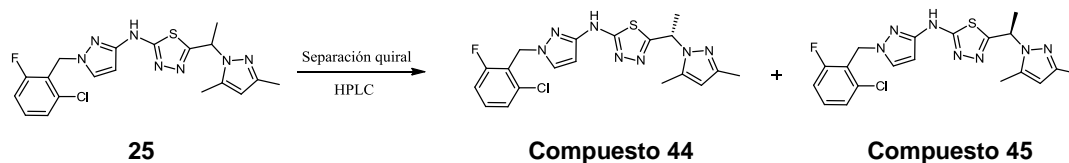
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.41 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.36 (d, $J = 1.90$ Hz, 1H, H₅), 7.22-7.32 (m, 2H, 2H-Ar), 7.02-7.09 (m, 1H, 1H-Ar), 6.09 (d, $J = 2.05$ Hz, 1H, H₄), 6.01-6.02 (m, 1H, H₄), 5.76 (q, $J = 7.18$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.38 (d, 2H, -CH₂-), 2.35 (s, 3H, -CH₃), 2.02 (d, $J = 7.18$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

$[\alpha]_D^{20} = -1.47^\circ$ ($c = 2$, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

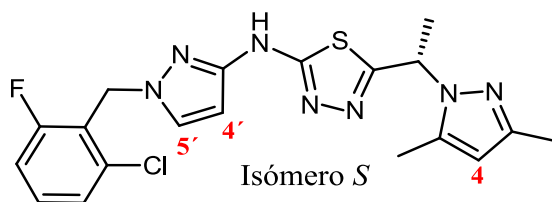
La configuración absoluta (*R*) se determinó por dicroísmo circular vibracional y se estimó con un 91% como límite de confianza. La concentración de la muestra fue de 10mg/125µl empleando CDCl₃ como disolvente.

4.1.2.9. Separación de los enantiómeros del compuesto 25



El compuesto racémico **25** (20 mg, 0.046 mmol) se separó en sus dos enantiómeros correspondientes, compuesto **44** y compuesto **45**, por cromatografía líquida de alta resolución de tipo semipreparativo utilizando una columna de fase estacionaria quiral, CHIRALPAK-AD 20x250mm y un gradiente isocrático de hexano:etanol (50:50) como eluyente a un flujo de 17 mL/min. La longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. El compuesto **25** se disolvió en 12 mL de isopropanol/metanol/acetonitrilo, debido a la baja solubilidad del compuesto se calentó la mezcla para la total disolución. Se necesitaron 6 inyecciones para separar la totalidad de la muestra, antes de cada inyección se calentó la disolución del compuesto ya que éste precipitaba al descender la temperatura. Tras coleccionar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros correspondientes que fueron purificados por separado por cromatografía en columna de gel de sílice (500 mg) empleando una mezcla de disolventes de grado de HPLC, diclorometano:metanol (25:1) como eluyente. Debido a la poca cantidad de productos obtenida se recuperaron las primeras fracciones de la purificación llevada a cabo por HPLC, se concentraron y el residuo se repurificó utilizando las mismas condiciones (CHIRALPAK-AD 20x250mm, gradiente isocrático de hexano-etanol 50:50, F = 17 ml/min, 254 nm). En este caso la muestra se disolvió empleando únicamente metanol (20 mL). Tras coleccionar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros deseados pero no con la pureza necesaria para progresar a los ensayos de actividad biológica por ello se procedió a una repurificación de cada uno de ellos por cromatografía preparativa en fase reversa. En ambos casos se empleó una columna de fase reversa, SUNFIRE 19x150 mm y un gradiente lineal de agua:acetonitrilo (3min 60:40; 15min 0:100; 20min 0:100) como eluyente a un flujo de 17 mL/min. La longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. Tras juntar las fracciones apropiadas y evaporar disolventes se obtuvieron los enantiómeros deseados.

Compuesto 44: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((1*S*)-1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



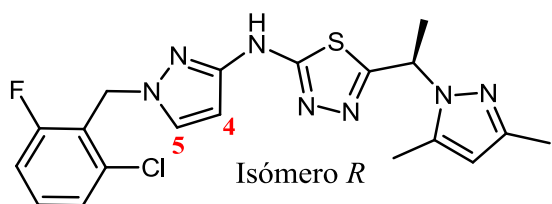
El compuesto **44** eluyó en segundo lugar, se obtuvieron (1.7 mg, 0.004 mol, 8%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):metanol (0.1% isopropilamina) (85:15) con un de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 3.39 min.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.34 (d, *J* = 2.94 Hz, 1H, H₅), 7.22-7.32 (m, 2H, 2H-Ar), 7.02-7.09 (m, 1H, 1H-Ar), 5.96 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H₄), 5.82 (s, 1H, H_{pirazol}), 5.76 (q, *J* = 6.88 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.36-5.37 (m, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃), 2.35 (s, 3H, -CH₃), 1.98 (d, *J* = 7.03 Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 432 (MH⁺).

Compuesto 45: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((1*R*)-1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



El compuesto **45** eluyó en primer lugar, se obtuvieron (3.5 mg, 0.008 mmol, 16%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):metanol (0.1% isopropilamina) (85:15) con un de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 2.67 min.

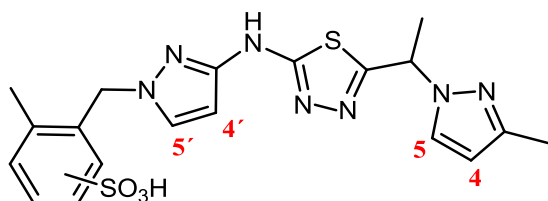
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.34 (d, *J* = 2.94 Hz, 1H, H₅), 7.22-7.32 (m, 2H,

2H-Ar), 7.02-7.09 (m, 1H, 1H-Ar), 5.96 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.82 (s, 1H, H_{pirazol}), 5.76 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CHCH₃), 5.36-5.37 (m, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃), 2.35 (s, 3H, -CH₃), 1.98 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 432 (MH⁺).

4.1.3. Otros compuestos

Compuesto 41: ácido X-((3-(5-(1-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-ilamino)-1*H*-pirazol-1-il)metil)-4-metilbencenosulfónico.



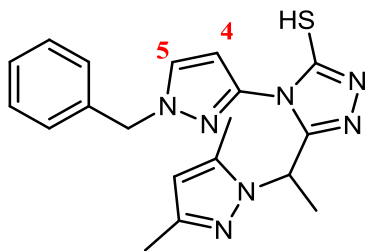
A una disolución del compuesto 7j (39 mg, 0.170 mmol) en 5 mL de diclorometano anhidro se añadió (31 mg, 0.170 mmol) de 2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanohidrazida (ArtChem). (31 mg, 0.170 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentró a sequedad obteniéndose 70 mg de la 1-(2-(3-metil-1*H*-pirazol-1-il)propanoil)-4-(1-(2-metilbencil)-1*H*-pirazol-3-il)tiosemicarbazida. [ES⁺MS] m/z 412 (MH⁺). El sólido obtenido (70 mg, 0.170 mmol) en 4 mL de ácido sulfúrico concentrado (aq.) se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se guardó en el frigorífico durante un día. Transcurrido ese tiempo y tras alcanzar temperatura ambiente, la disolución se neutralizó con NH₃ (32%, aq.) apareciendo un sólido amarillento precipitado. El precipitado se filtró y lavó con agua a 0°C y hexano, obteniéndose el compuesto **41** (30 mg, 0.063 mmol, 37%) como un sólido amarillo pálido.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.81 (d, $J = 2.05$ Hz, 1H, H_{5'}), 7.70 (d, $J = 2.05$ Hz, 1H, H₅), 7.41-7.42 (m, 1H, H-Ar), 7.00-7.14 (m, 2H, 2H-Ar), 6.06 (d, $J = 1.90$ Hz, H₄), 5.96 (d, $J = 2.05$ Hz, H₄), 5.83 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CH-CH₃), 5.20 (s, 2H, -CH₂), 2.36 (s, 3H, -CH₃), 2.17 (s, 3H, -CH₃), 1.83 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CH-CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 13.50, 18.64, 20.10 (3CH₃), 52.42 (CH₂), 55.76 (CHCH₃), 93.44, 105.20 (C₄, C₄'), 124.97, 126.18, 129.76, 131.62 (-2CH-Ar, C₅;C₅), 134.58, 136.57 (C-Ar-CH₃, C-Ar), 146.31, 147.71, 148.07 (CNH, 2C-pirazol-CH₃), 152.7, 163.83 (2C-tiadiazol).

[ES⁺MS] m/z 460 (MH⁺).

Compuesto 42: 4-(1-bencil-1*H*-pirazol-3-il)-3-metil-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-4*H*-1,2,4-triazol.



A una disolución del compuesto 7p (24 mg, 0.11 mmol) en 5 mL de diclorometano anhidro se añadió el compuesto 8a (20 mg, 0.11 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentró a sequedad obteniéndose 44 mg de 1-(2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propanoil)-4-(1-bencil-1*H*-pirazol-3-il)tiosemicarbazida como sólido, [ES⁺MS] *m/z* 398 (MH⁺). El sólido obtenido (44 mg, 0.11 mmol) se disolvió en 5 mL de hidróxido sódico (2N, ac) se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se calentó a reflujo durante 15 horas. Tras alcanzar temperatura ambiente, la disolución se acidificó con ácido clorhídrico (2N, aq.) hasta alcanzar pH = 7, apareciendo un precipitado blanco. El precipitado se filtró y lavó con agua a 0°C. El sólido obtenido se disolvió en amoníaco acuoso (32%) y se neutralizó con ácido clorhídrico (2N, ac.) hasta la aparición de un precipitado blanco en la disolución. La mezcla se guardó en el frigorífico durante dos días, transcurrido ese tiempo y tras alcanzar temperatura ambiente se filtró el sólido blanco precipitado y se lavó con agua a 0°C, obteniéndose el compuesto **42** (20 mg, 0.053b mmol, 47%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.82 (d, *J* = 2.42 Hz, 1H, H₅), 7.28-7.40 (m, 5H, 5H-Ar), 5.90 (d, *J* = 2.42 Hz, 1H, H₄), 5.55 (s, 1H, H-pirazol), 5.38 (q, *J* = 6.85 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.29 (s, 2H, -CH₂), 1.98 (s, 3H, -CH₃), 1.61 (s, 3H, -CH₃), 1.56 (d, *J* = 6.65 Hz, 3H, -CH₃).

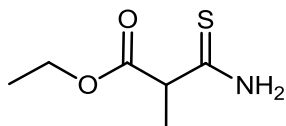
¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 9.43, 13.35, 18.01 (3CH₃), 48.08 (CHCH₃), 55.25 (CH₂), 103.44, 104.47 (C₄, CH-pirazol), 127.93, 128.54, 132.02 (5CH-Ar), 136.46, 138.29 (C₅, C-pirazol), 140.53, 146.63 (2C-pirazol-CH₃), 151.08 (C-triazol), 168.86 (CSH).

[ES⁺MS] *m/z* 380 (MH⁺).

4.1.3. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol: Serie del 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.

4.1.3.1. Síntesis de la 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)propanohidrazida.

Compuesto 49: 3-amino-2-metil-3-thioxopropanoato de etilo.

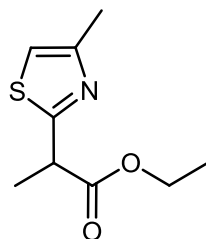


Una disolución de ácido difenilfosfinoditioico (Alfaesar, 37.4 g, 149 mmol) y cianopropionato de etilo (ABCR, 9.9 mL, 74.7 mmol) en isopropanol (350 mL) se calentó a reflujo durante 5h. Transcurrido ese tiempo la reacción se completó. El seguimiento de la reacción se realizó por c.c.f utilizando como una mezcla hexano:acetato (7:3) como eluyente. El crudo se guardó en la nevera hasta el día siguiente. La mezcla se filtró a vacío, y se lavó con isopropanol. Tras disolver el crudo en acetato de etilo (250 mL) se lavó con una disolución acuosa de sosa (1N, 250 mL), agua (300 mL), brine (300 mL) y se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. La purificación del residuo se llevó a cabo mediante cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente de hexano:acetato de etilo obteniéndose 6.6 g de 3-amino-2-metil-3-thioxopropanoato de etilo en forma de sólido blanco (Rto. 55%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 9.60 (s a, 1H, -NH-), 9.40 (s a, 1H, -NH-), 4.06 (q, $J = 7.03$ Hz, 2H, -CH₂-), 3.74 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CH-CH₃), 1.29 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CH-CH₃), 1.15 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CH₂-CH₃).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 162 (MH^+).

Compuesto 50: 2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo.



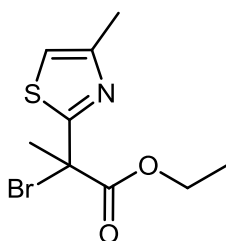
Una disolución del compuesto 49 (6.6 g, 40.9 mmol) y cloroacetona (Fluka , 3.27 mL, 40.9 mmol) en dimetilformamida (50 mL) se agitó a 80°C durante 5h. Transcurrido ese tiempo se paró la calefacción. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añadió una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico acuoso (150 mL) y se extrajo con

dietil éter (2 x 200 mL). La fase orgánica se lavó con brine, se secó sobre sulfato sódico y se concentró obteniéndose 7.57 g de 2-bromo-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo en forma de aceite amarillo (Rto. 93%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.19 (m, 1H, H-tiazol), 4.06-4.23 (m, 3H, 2H- CH_2 y $-\text{CH}-\text{CH}_3$), 2.31 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -tiazol), 1.48 (d, $J = 7.18$ Hz 3H, $-\text{CH}-\text{CH}_3$), 1.16 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 200 (MH^+).

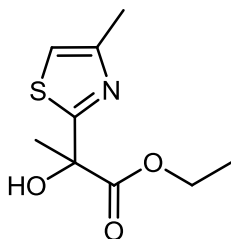
Compuesto 51: 2-bromo-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo.



A una disolución del compuesto 50 (7.57 g, 38 mmol) en tolueno (100 mL) y agua (28 mL) se añadió ácido clorhídrico concentrado (3.43 mL, 41.8 mmol). La mezcla agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se enfrió a 0°C en un baño de agua-hielo y se adicionó bromuro potásico (Panreac, 4.97, 41.8 mmol) y peróxido de hidrógeno 33% (Panreac, 4.59 mL. 49.4 mmol). La disolución se agitó a 0°C durante 3 horas. Transcurridas las 3 horas se añadieron 150 mL de una disolución acuosa (1N) de tiosulfato sódico y 150 mL de disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Se separar ambas fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lavó con brine, se secó sobre sulfato sódico y se concentró obteniéndose 10.22 g de 2-bromo-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo en forma de aceite (Rto. 97%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.43 (m, 1H, H-tiazol), 4.24 (q, $J = 7.03$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.30-2.35 (m, 6H, 3H-tiazol- CH_3 , 3H- CH_3 -Br), 1.19-1.24 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

Compuesto 52: 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo.



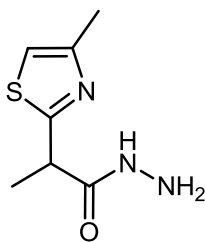
A una disolución del compuesto 51 (10.2 g, 36.7 mmol) en acetonitrilo (112 mL) y agua

(28 mL) se añadió óxido de plata (Aldrich, 4.25 g, 18.33 mmol). La mezcla agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La disolución se filtró a través de celita eliminando los sólidos no deseados y ésta se lavó con una mezcla de diclorometano: metanol (95:5). El filtrado se concentró a sequedad obteniendo 8 g de un residuo marrón. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla de hexano:acetato de etilo (100:0 a 70:30) obteniéndose 4.14 g de 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il) propanoato de etilo como un aceite amarillo (Rto. 52%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.19 (m, 1H, H-tiazol), 6.72 (s, 1H, -OH), 4.09 (q, $J = 7.03$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.31-2.32 (s, 3H, tiazol- $\underline{\text{CH}_3}$), 1.67 (m, 3H, $-\text{CH}_3-$), 1.14 (t, $J = 7.18$ Hz, 3H, tiazol- $\underline{\text{CH}_3}$ - CH_2-).

[ES^+MS] m/z 216 (MH^+).

Compuesto 53a: 2-(4-metiltiazol-2-il)propanohidrazida.

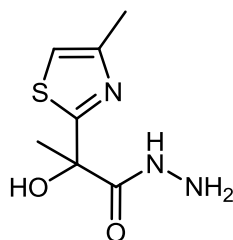


A una disolución del compuesto 50 (315 mg, 1.58 mmol) en 5 mL de etanol se añadió hidrazina monohidrato (Fluka, 7.90 mmol, 0.384 mL). La mezcla de reacción se calentó a 50°C y se siguió por c.c.f. Tras 3 horas se adicionó hidrazina monohidrato (Fluka, 7.90 mmol, 0.384 mL) y se agitó a 50°C durante cuatro horas. Transcurrido ese tiempo eliminó el disolvente bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5) obteniéndose 3 g de 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)propanohidrazida como un sólido blanco (Rto.78%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.36 (s a, 1H, $-\text{NH}-$), 7.12 (s, 1H, H-tiazol), 4.27 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3.92 (q, $J = 7.18$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3$), 2.30 (s, 3H, tiazol- $\underline{\text{CH}_3}$), 1.40 (s, 3H, $J = 7.18$ Hz, $-\text{CH}-\underline{\text{CH}_3}$).

[ES^+MS] m/z 186 (MH^+).

Compuesto 53bb: 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)propanohidrazida.



A una disolución de hidrazina monohidrato (Fluka, 192 mmol, 9.35 mL) se añadió gota a gota el compuesto 52 (4.14 g, 19.23 mmol), previamente disuelto en 60 mL de etanol. La mezcla de reacción se calentó a 50°C y se siguió por c.c.f. Tras 3 horas se eliminó el disolvente bajo presión reducida. El residuo obtenido se trituró con una mezcla de diclorometano/hexano y finalmente dietil éter. Tras la trituración con éter se filtró el sólido obtenido y se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5) obteniéndose 3 g de 2-hidroxi-2-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)propanohidrazida como un sólido blanco (Rto. 78%).

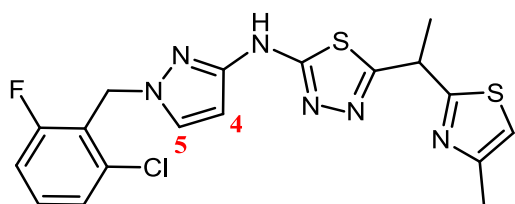
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.05 (s a, 1H, -NH-), 7.16 (s, 1H, H-tiazol), 6.59 (s, 1H, -OH), 4.23-4.25 (m, 2H, -NH₂), 2.32 (s, 3H, tiazol-CH₃), 1.67 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 202 (MH⁺).

4.1.3.2. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol con 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol como parte derecha.

Los siguientes tiadiazoles se prepararon siguiendo el método descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 25. En cada caso se reemplazaron los compuestos 7n y 8a por los intermedios correspondientes. Las cantidades utilizadas, rendimientos y método de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 46: *N*-(1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(4-metiltiazol-2-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.702 mmol del compuesto 7n y 0.702 mmol del compuesto 53a.

Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal

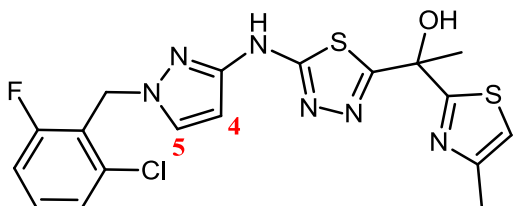
de diclorometano:metanol (100:0) a (95:5).

Rto.: 21 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.5 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.21-7.46 (m, 4H, 3H-Ar, 1H-tiazol), 5.92 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.32 (s, 2H, - CH_2 -), 4.86 (q, $J = 6.88$ Hz, 1H, -CH-), 2.35 (s, 3H, - CH_3), 1.71 (d, $J = 7.03$ Hz, 3H, -CH- CH_3).

[ES^+MS] m/z 435 (MH^+).

Compuesto 47: 1-(5-((1-(2-cloro-6-fluorobencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.328 mmol del compuesto 7n y 0.328 mmol del compuesto 53b.

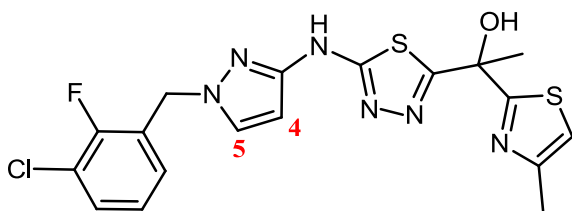
Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0) a (90:10).

Rto.: 44 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.84 (s a, 1H, -NH-), 7.69 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 7.21-7.46 (m, 5H, 3H-Ar, 1H-tiazol, -OH), 5.90 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.32 (s a, 2H, - CH_2 -), 2.29 (s, 3H, - CH_3), 1.97 (s, 3H, -C- CH_3).

[ES^+MS] m/z 451 (MH^+)

Compuesto 54: 1-(5-((1-(3-cloro-2-fluorobencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol



Reactivo de partida: 0.73 mmol del compuesto 7d y 0.73 mmol del compuesto 53b.

Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

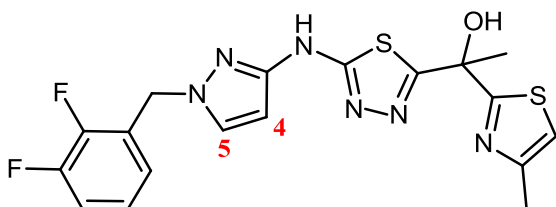
Rto.: 67 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.90 (s a, 1H, -NH-), 7.76 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_5), 7.52-7.56 (m, 3H, 3H-Ar), 7.29 (s, 1H, tiazol), 7.13-7.21 (m, 3H, 2H-Ar, 1H-OH), 5.99 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_4), 5.33 (br s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.30 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 17.36, 28.70 (2 CH_3), 46.91 (CH_2), 74.64 (C-OH), 94.45 (C_4), 115.30 ($\text{CH}_{(\text{tiazol})}$), 120.23 (C-Cl) 125.89 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 126.72 ($\text{C}_{(\text{Ar})}$), 129.44, 130.62, 132.73 (C_5 , 2 $\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 149.04 (C-NH), 152.41 ($\text{C-CH}_3(\text{tiazol})$), 154.34, 156.81, 164.64, 175.80 (2 $\text{C}_{(\text{tiadiazol})}$, $\text{C}_{(\text{tiazol})}$, C-F).

[ES^+MS] m/z 451 (MH^+).

Compuesto 55: 1-(5-((1-(2,3-difluorobencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)ethanol



Reactivo de partida: 0.92 mmol del compuesto 7i y 0.92 mmol del compuesto 53b.

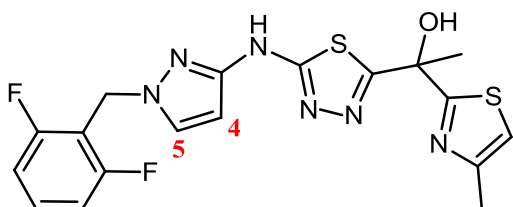
Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

Rto.: 58 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.90 (s a, 1H, -NH-), 7.76 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_5), 7.52-7.56 (m, 3H, 3H-Ar), 7.29 (s, 1H, tiazol), 7.13-7.21 (m, 1H, -OH), 5.99 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_4), 5.33 (br s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.30 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 435 (MH^+).

Compuesto 56: 1-(5-((1-(2,6-difluorobencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)ethanol.



Reactivo de partida: 0.83 mmol del compuesto 7h y 0.83 mmol del compuesto 53b.

Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato.

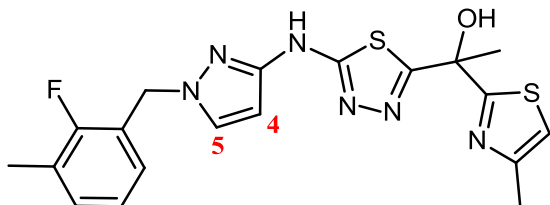
Rto.: 36 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.90 (s a, 1H, -NH-), 7.69 (d, $J = 2.02$ Hz, 1H, H_5), 7.42-7.46 (m, 1H, H-Ar), 7.22-7.25 (m, 2H, H-tiazol, -OH), 7.08-7.12 (m, 1H, H-Ar), 5.92 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_4), 5.25 (s, 2H, - CH_2 -), 2.24 (s, 3H, - CH_3), 2.29 (s, 3H, - CH_3), 1.97 (s, 3H, - CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 17.36, 28.59 (2 CH_3), 42.87 (CH_2), 74.59 (C-OH), 94.08 (C_4), 111.98, 112.23 (2 $\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 112.79 ($\text{C}_{(\text{Ar})}$), 115.29 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 131.43, 132.28 (C_5 , $\text{CH}_{(\text{tiazol})}$), 148.82 (C-NH), 152.42 ($\text{C-CH}_3(\text{tiazol})$), 160.18, 162.65 (2C-F), 164.71, 166.35, 175.88 (2 $\text{C}_{(\text{tiadiazol})}$, $\text{C}_{(\text{tiazol})}$).

[ES^+MS] m/z 435 (MH^+).

Compuesto 57: 1-(5-((1-(2-fluoro-3-metilbencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol



Reactivo de partida: 0.19 mmol del compuesto 7k y 0.19 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El precipitado se filtró y lavó con agua (0°C) posteriormente se secó bajo condiciones de presión reducida obteniéndose el compuesto descrito.

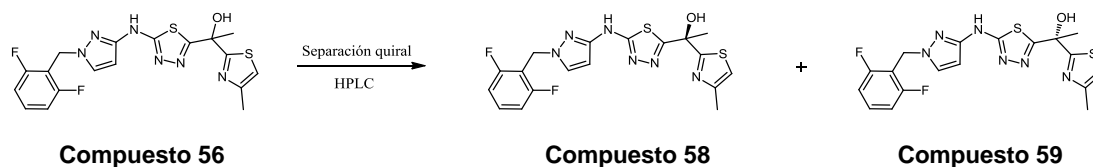
Rto.: 91 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.69 (s a, 1H, -NH-), 7.71 (d, $J = 2.02$ Hz, 1H, H_5), 6.99-7.29 (m, 5H, 3H-Ar, -OH, H-tiazol), 5.96 (d, $J = 2.02$ Hz, 1H, H_4), 5.25 (s, 2H, - CH_2 -), 2.23 (s, 3H, - $\text{CH}_3(\text{Ar})$), 2.30 (s, 3H, - CH_3), 1.96 (s, 3H, - CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 14.53b, 17.35, 28.71 (3 CH_3), 49.10 (CH_2), 74.67 (C-OH), 94.21 (C_4), 115.27 ($\text{CH}_{(\text{tiazol})}$), 124.37, 128.08, 131.63, 132.43 (3 $\text{CH}_{(\text{Ar})}$, C_5), 148.82, 152.42 (C-NH , $\text{C-CH}_3(\text{tiazol})$), 157.67, 160.11, 164.68 ($\text{C}_{(\text{Ar})-\text{CH}_3}$, $\text{C}_{(\text{tiadiazol})-\text{NH}}$, $\text{C}_{(\text{Ar})}$), 166.11, 166.34 175.81 ($\text{C}_{(\text{tiazol})-\text{S}}$, $\text{C}_{(\text{tiadiazol})-\text{C}(\text{CH}_3)}$, C-F).

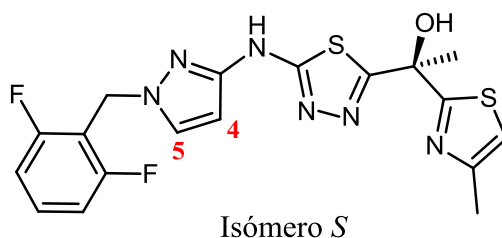
[ES^+MS] m/z 431 (MH^+).

4.1.3.3. Separación de los enantiómeros del compuesto 56



El compuesto racémico **56** (78 mg, 0.178 mmol) se separó en sus dos enantiómeros correspondientes, compuesto **58** y compuesto **59**, por cromatografía líquida de alta resolución de tipo semipreparativo utilizando una columna de fase estacionaria quiral, CHIRALPAK-AD 20x250mm y un gradiente isocrático de acetonitrilo:(metanol:isopropanol), (90:10) como eluyente a un flujo de 17 mL/min. A ambos disolventes se les adicionó un 0.1% de isopropilamina como aditivo básico. La longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. El compuesto 30 se disolvió en 3.5 mL de metanol/acetonitrilo. Se necesitaron 2 inyecciones para separar la totalidad de la muestra. Tras colectar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros.

Compuesto 58: (1*S*)-1-(5-((1-(2,6-difluorobencil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



El compuesto 58 eluyó en primer lugar, se obtuvieron (28 mg, 0.064 mmol, 72%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):[(metanol:isopropanol)(60:40)](0.1% isopropilamina) (90:10) con un flujo de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 3.90 min.

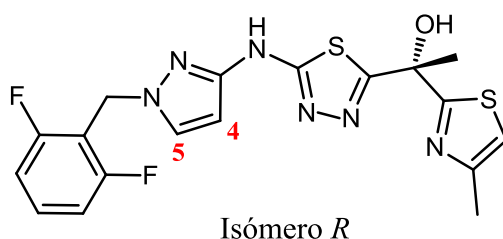
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.82 (s a, 1H, -NH-), 7.69 (d, $J = 2.02$ Hz, 1H, H_5), 7.42-7.46 (m, 1H, H-Ar), 7.22-7.25 (m, 2H, H-tiazol, -OH), 7.08-7.12 (m, 1H, H-Ar), 5.92 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_4), 5.25 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.24 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.29 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.97 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES⁺MS] m/z 434 (MH⁺).

$[\alpha]_D^{20} = +101.55^\circ$ (c = 2, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

La configuración absoluta (S) se determinó por dicroísmo circular vibracional y se estimó con un 91% como límite de confianza. La concentración de la muestra fue de 10mg/125 μ l empleando CDCl₃ como disolvente.

Compuesto 59: (1R)-1-(5-((1-(2,6-difluorobencil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



El compuesto 59 eluyó en segundo lugar, se obtuvieron (41 mg, 0.101 mmol, cuantitativo) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática de acetonitrilo(0.1% isopropilamina):[(metanol:isopropanol)(60:40)](0.1% isopropilamina) (90:10) con un flujo de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 5.93 min.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.82 (s a, 1H, -NH-), 7.69 (d, *J* = 2.02 Hz, 1H, H₅), 7.42-7.46 (m, 1H, H-Ar), 7.22-7.25 (m, 2H, H-tiazol, -OH), 7.08-7.12 (m, 1H, H-Ar), 5.92 (d, *J* = 2.27 Hz, 1H, H₄), 5.25 (s, 2H, -CH₂-), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 2.29 (s, 3H, -CH₃), 1.97 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 435 (MH⁺).

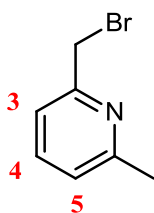
$[\alpha]_D^{20} = -96.08^\circ$ (c = 2, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

La configuración absoluta (R) se determinó por dicroísmo circular vibracional y se estimó con un 91% como límite de confianza. La concentración de la muestra fue de 10mg/125 μ l empleando CDCl₃ como disolvente.

4.1.4. Síntesis de los 1,3,4-tiadiazoles con piridina como reemplazo del bencilpirazol

4.1.4.1. Síntesis de los bromuros y mesilatos de bencilo no comerciales

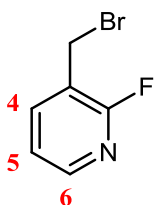
Compuesto 60c: 2-(bromometil)-6-metilpiridina.



A una disolución de (6-metil-2-piridinil)metanol (Aldrich, 300 mg, 2.44 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL) se añadió tribromuro de fósforo (Aldrich, 725 mg, 2.68 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice. Se utilizó como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 0:100), obteniéndose un sólido blanco. El sólido se disolvió en acetato de etilo y la disolución resultante se lavó con una disolución acuosa basificada hasta pH=14 con amoníaco (32%, ac.). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose 152 mg de 2-(bromometil)-6-metilpiridina como sólido blanco (Rto. 34%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.68 (t, $J =$ Hz, 1H, H_4), 7.33 (d, 1H, H_5), 7.17 (d, $J =$ Hz, 1H, H_3), 4.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.44 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

Compuesto 60d: 3-(bromometil)-2-fluoropiridina.

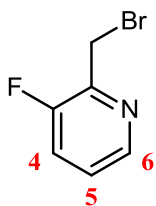


El producto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 3ñ. Se utilizaron como reactivos de partida, el (2-fluoro-3-piridinil)metanol (Asynchem, 505 mg, 3.97 mmol), trifenilfosfina (Aldrich, 1.042 g, 3.97 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 1.318 mg, 3.97 mmol). En este caso tras 16 horas de reacción se añadieron trifenilfosfina (Aldrich, 323 mg, 1.19 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 409 mg, 1.32 mmol). Transcurridos 45 minutos la mezcla se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 50:50) obteniéndose 812 mg de 3-(bromometil)-2-fluoropiridina en forma de aceite (Rto. cuantitativo).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.20-8.21 (m, 1H, H_6), 8.06-8.12 (m, 1H, H_4), 7.35-7.39 (m, 1H, H_5), 4.69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES⁺MS] m/z 190 (MH⁺).

Compuesto 60e: 2-(bromometil)-3-fluoropiridina.

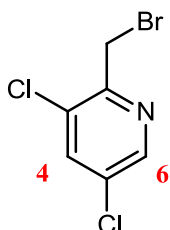


El producto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 3ñ. Se utilizaron como reactivos de partida, (3-fluoro-2-piridinil)metanol (Maybridge, 250 mg, 1.97 mmol), trifenilfosfina (Aldrich, 619 mg, 2.36 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 783 mg, 2.36 mmol). En este caso la mezcla se agitó durante 3h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se concentró la mezcla a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 35:65) obteniéndose 224 mg de 3-(bromometil)-2-fluoropiridina en forma de aceite anaranjado (Rto. 60%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.39-8.41 (m, 1H, H₆), 7.74-7.80 (m, 1H, H₄), 7.46-7.51 (m, 1H, H₅), 4.70 (s, 2H, -CH₂).

[ES⁺MS] m/z 190 (MH⁺).

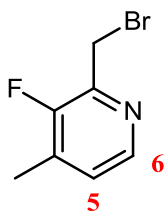
Compuesto 60f: 2-(bromometil)-3,5-dicloropiridina.



El producto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 3ñ. Se utilizaron como reactivos de partida, (3,5-dicloropiridin-2-il)metanol (Activate, 500 mg, 2.81 mmol), trifenilfosfina (Aldrich, 737 mg, 2.81 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 931 mg, 2.81 mmol). En este caso tras 5 horas de reacción se añadieron trifenilfosfina (Aldrich, 294 mg, 1.12 mmol) y tetrabromuro de carbono (Aldrich, 374 mg, 1.12 mmol). Transcurridos 16 horas la mezcla se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano:acetato de etilo (100:0, 70:30) obteniéndose 540 mg de 5-(bromometil)-3-cloro-2-metilpiridina como sólido rosado (Rto. 80%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.60-8.61 (m, 1H, H_6), 8.30-8.31 (m, 1H, H_4), 4.72 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

Compuesto 60g: 2-(bromometil)-3-fluoro-4-metilpiridina.

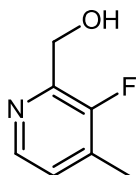


A una disolución del compuesto 72 (246 mg, 1.74 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL) se añadió tribromuro de fósforo (Aldrich, 519 mg, 1.92 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en éter dietílico y la disolución resultante se lavó con una disolución de bicarbonato sódico acuoso. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniéndose 372 mg de 2-(bromometil)-3-fluoro-4-metilpiridina como sólido blanco (Rto.cuantitativo).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.23-8.25 (m, 1H, H_6), 7.34-7.37 (m, 1H, H_5), 4.66 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 206 (MH^{2+}).

Compuesto 72: (3-fluoro-4-metilpiridin-2-il)metanol.

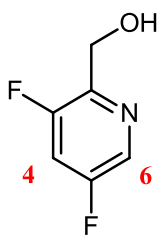


A una disolución de 3-fluoro-4-metilpiridincarbaldéhid (Asymchem, 250 mg, 1.797 mmol) en metanol (5 mL) se añadió borohidruro sódico (Aldrich, 187 mg, 4.94 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos hora. Tras concentrar el disolvente el residuo se disolvió en acetato de etilo (15 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (2 x15 mL). La fase orgánica se se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y concentró obteniendo 200 mg de (3-fluoro-4-metilpiridin-2-il)metanol (Rto. 79%).

$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.21-8.22 (m, 1H, H-piridina), 7.27-7.31 (m, 1H, H-piridina), 5.23 (t, 1H, $-\text{OH}$), 4.55-4.57 (m, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.27-2.28 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 142 (MH^+).

Compuesto 76b: (3,5-difluoropiridin-2-il)metanol.

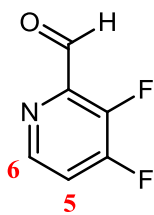


A una disolución de ácido 3,5-difluoro-2-piridina (Alfaesar, 300 mg, 1.886 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL) se añadió trietilamina (Fluka, 0.549 mL, 3.96 mmol) y la disolución se enfrió a -10°C (hielo-acetona). Se añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (Fluka, 0.269 mL, 2.074 mmol). La reacción se agitó a -10°C durante 20 min. La mezcla se adicionó lentamente sobre una disolución de borohidruro sódico (Aldrich, 214 mg, 5.66 mmol) previamente disuelto en 2 mL de agua a 0°C . La reacción se agitó a 0°C durante 45 min. Posteriormente se añadió lentamente ácido clorhídrico acuoso (1N) hasta alcanzar pH neutro. La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (3x15ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico (anh), se filtró y se concentró. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de gel de sílice usando un gradiente lineal de diclorometano/metanol obteniéndose 116 mg de (3,5-difluoro-2-piridinil)metanol (Rto. 42%).

$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.44-8.45 (s, 1H, H_6), 7.88-7.93 (m, 1H, H_4), 5.35 (t, 1H, -OH), 4.56-4.58 (m, 2H, $-\text{CH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 146 (MH^+).

Compuesto 77: 3,4-difluoropicolinaldehído.



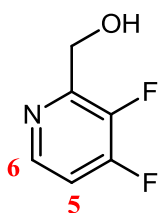
Una disolución de N,N,N',N' -tetrametiletilendiamina (Aldrich , 0.521 mL, 3.48 mmol) en dietil éter anhidro (15 mL) se enfrió a -20°C en baño de tetracloruro de carbono-acetona. Alcanzada la temperatura se añadió gota a gota una disolución de butil litio (Aldrich , 1.529 mL, 3.82 mmol) en dietil éter. La mezcla se agitó a -20°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo la mezcla de reacción se enfrió a -78°C en un baño de acetona-nieve carbónica. Posteriormente se añadió gota a gota una disolución de 3,4-difluoropiridina (Chemcollect, 400 mg, 3.48 mmol) en dietil éter (1 mL) a -78°C . La reacción se agitó a -78°C durante 1h. Transcurrido este tiempo se añadió a la mezcla N,N -dimetilformamida (300 μl), previamente disuelta en dietil éter (1ml), la reacción se

agitó durante 2 horas a la misma temperatura (-78°C), la reacción se siguió por cromatografía de capa fina revelando con 2,4-dinitrofenilhidrazina utilizando hexano:acetato de etilo (1:3) como eluyente. La reacción se completó a las dos horas, se añadió sobre una mezcla de agua-hielo y se agitó durante 20 min. Transcurrido este tiempo se diluyó con acetato de etilo (15 mL). Tras separar ambas fases, se extrajo la fase acuosa con diclorometano (4x15 mL). Tras juntar las fases orgánicas, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro y se concentraron a sequedad obteniendo 337 mg de un líquido amarillo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de la mezcla hexano-acetato (100:0 a 25:75) obteniéndose 148 mg de 3,4-difluoro-2-piridincarbaldhído en forma de líquido (Rto. 30%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.03-10.04 (m, 1H, -COH), 8.65-8.68 (m, 1H, H_6), 7.88-7.94 (m, 1H, H_5).

[ES^+MS] m/z 144 (MH^+).

Compuesto 76c: (3,4-difluoropiridin-2-il)metanol.

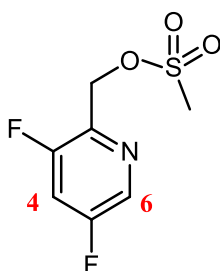


A una disolución del compuesto 77 (142 mg, 0.992 mmol) en etanol (5 mL) se añadió borohidruro sódico (Aldrich, 113 mg, 2.98 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se diluyó con agua destilada (15 mL) y se extrajo con diclorometano (2 x15 mL). Las fases orgánicas se unieron, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y concentraron para obtener 140 mg de (3,4-difluoropiridin-2-il)metanol (Rto. 97 %).

$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.38-8.39 (m, 1H, H_6), 7.48-7.54 (m, 1H, H_5), 5.43 (t, $J = 5.81$ Hz 1H, -OH), 4.60-4.62 (m, 2H, $-\text{CH}_2$).

[ES^+MS] m/z 146 (MH^+).

Compuesto 75b: (3,5-difluoro-2-piridinil)metil sulfonato de metilo.

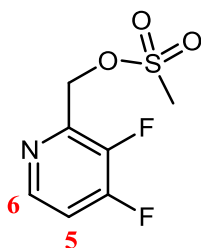


A una disolución del compuesto 76b (3,5-difluoro-2-piridinil)metanol (114 mg, 0.786 mmol) en diclorometano anhidro (6 mL) a 0°C, se añadieron trietilamina (Aldrich, 0.131 mL, 0.943 mmol) y cloruro de metilsulfonilo (Aldrich, 0.067 mL, 0.864 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1h 30 min. A continuación se añadió agua destilada (15 mL) al crudo de reacción y se extrajo en diclorometano (2x10 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad obteniendo 137 mg de (3,5-difluoro-2-piridinil)metil sulfonato de metilo (Rto. 78%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.58 (d, 1H, H_6), 8.06-8.11 (m, 1H, H_5), 5.36 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 224 (MH^+).

Compuesto 75c: (3,4-difluoropiridin-2-il)metilsulfonato de metilo.



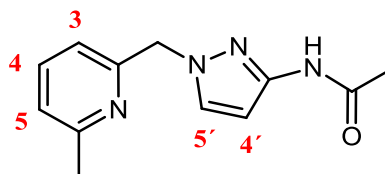
El producto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 75b. En este caso se utilizaron como reactivos de partida, el compuesto 76c (108 mg, 0.74 mmol) y cloruro de metilsulfonilo (Aldrich, 0.09 mL, 1.32 mmol) y el tiempo total de reacción fue de 5 horas (Rto. Cuantitativo)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.46-8.50 (m, 1H, H_6), 7.66-7.71 (m, 1H, H_5), 5.40 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 224 (MH^+)

4.1.4.2. Síntesis de los derivados de alquilación del 3-acetamidopirazol

Compuesto 61c: *N*-{1-[(6-metil-2-piridinil)metil]-1*H*-pirazol-3-il}acetamida.



A una disolución del compuesto 4 (97 mg, 0.77 mmol) en 10 mL de tetrahidrofurano anhidro a 0°C, se adicionó lentamente hidruro sódico (Aldrich, 31 mg, 0.77 mmol). La disolución se mantuvo bajo agitación, en un baño de agua-hielo, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió gota a gota el compuesto 60c (144 mg, 0.77 mmol) durante un período de 30 minutos. La mezcla permaneció bajo agitación en baño de agua-hielo durante 30 minutos más. La mezcla de reacción se agitó a 75°C durante 16 horas. A la disolución se añadió agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 92:8) obteniéndose 133 mg de *N*-{1-[(6-metil-2-piridinil)metil]-1*H*-pirazol-3-il}acetamida (Rto. 75%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.39 (s a, 1H, -NH-), 7.72 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H₅), 7.59-7.64 (m, 1H, H₄), 7.13-7.15 (m, 1H, H₅), 7.73-7.76 (m, 1H, H₃), 6.49 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄'), 5.23 (s, 2H, -CH₂-), 1.94 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 231 (MH⁺).

Los siguientes derivados acetilados se prepararon utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención de *N*-{1-[(6-metil-2-piridinil)metil]-1*H*-pirazol-3-il}acetamida. En cada caso se reemplazó la 2-(bromometil)-6-metilpiridina por el bromuro correspondiente. Las cantidades utilizadas, temperatura, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 61a: *N*-(1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 3.05 mmol de clorhidrato de 2-(clorometil)piridina (Aldrich).

Temperatura: 75°C.

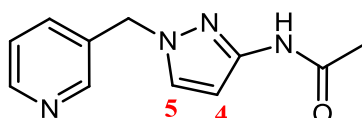
Rto.: 1.35 mmol, 44%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 93:7).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.39 (s a, 1H, -NH-), 8.49-8.52 (m, 1H, H-piridina), 7.72-7.77 (m, 2H, H_5 , H-piridina), 7.28-7.30 (m, 1H, H-piridina), 6.98-7.00 (m, 1H, H-piridina), 6.48 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_4), 5.29 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.94 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 217 (MH^+).

Compuesto 61b: *N*-(1-(piridin-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 3.04 mmol de hidrobromuro de 3-(bromometil)piridina (Aldrich).

Temperatura: 25°C.

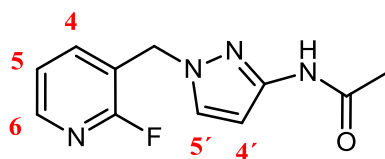
Rto.: 1.29 mmol, 42%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 93:7).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.38 (s a, 1H, -NH-), 8.47-8.49 (m, 2H, H-piridina), 7.74 (d, 1H, $J = 2.20$ Hz, H_5), 7.58-7.61 (m, 1H, H-piridina), 7.33-7.37 (m, 1H, H-piridina), 6.46 (d, 1H, $J = 2.20$ Hz, H_4), 5.24 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.94 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 217 (MH^+).

Compuesto 61d: *N*-(1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 2.69 mmol de 3-(bromometil)-2-fluoropiridina (Compuesto 60d).

Temperatura: 25°C.

Rto.: 1.823 mmol, 68%.

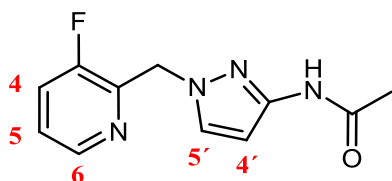
Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 88:12).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.40 (s a, 1H, -NH-), 8.16-8.18 (m, 1H, H_6), 7.65-7.74 (m, 2H, H_4 , H_5), 7.32-7.36 (m, 1H, H_5), 6.48 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_4), 5.27

(s, 2H, -CH₂-), 1.93 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 235 (MH⁺).

Compuesto 61e: *N*-(1-((3-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.16 mmol de 2-(bromometil)-3-fluoropiridina (Compuesto 60e).

Temperatura: 25°C.

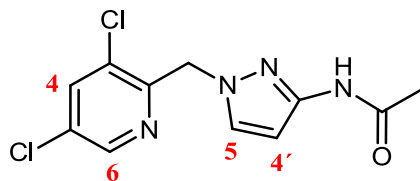
Rto.: 0.811 mmol, 70%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.35 (s a, 1H, -NH-), 8.35-8.37 (m, 1H, H₆), 7.68-7.75 (m, 2H, H₄, H₅), 7.41-7.46 (m, 1H, H₅), 6.43 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄'), 5.34 (s, 2H, -CH₂-), 1.91 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 235 (MH⁺).

Compuesto 61f: *N*-(1-((3,5-dicloropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 0.64 mmol de 2-(bromometil)-3,5-dicloropiridina (Compuesto 60f).

Temperatura: 25°C.

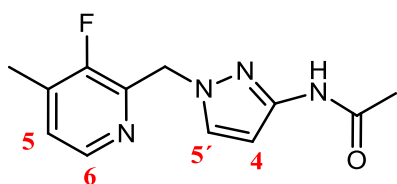
Rto.: 0.34 mmol, 54%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato de etilo (100:0 a 70:30).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.35 (s a, 1H, -NH-), 8.55 (s, 1H, H₆), 8.26 (s, 1H, H₄), 7.68 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₅), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄'), 5.41 (s, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃CO-), 1.92 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 285 (MH⁺).

Compuesto 61g: *N*-(1-((3-fluoro-4-metilpiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.823 mmol de 2-(bromometil)-3-fluoro-4-metilpiridina (Compuesto 60g).

Temperatura: 25°C.

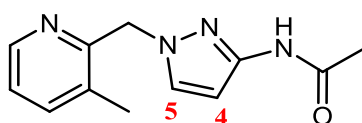
Rto.: 0.995 mmol, 55%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 91:9).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.35 (s, 1H, -NH-), 8.19-8.21 (m, 1H, H₆), 7.66 (m, 1H, H_{5'}), 7.30-7.33 (m, 1H, H₅), 6.42 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄), 5.31 (s, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃CO-), 1.91 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 249 (MH⁺).

Compuesto 78a: *N*-(1-((3-metilpiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.2 mmol de 2-(clorometil)-3-metilpiridina (Chembridge)

Temperatura: 150°C.

Tiempo de reacción: 3h.

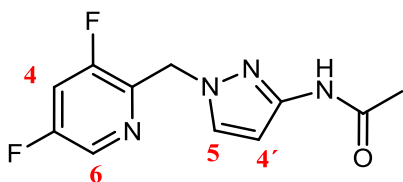
Rto.: 0.40 mmol, 34 %.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.33 (s, 1H, -NH-), 8.32-8.34 (m, H, H₆ piridina), 7.61 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₅), 7.22-7.26 (m, 2H, 2H_{5'} piridina), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄), 5.319 (s, 2H, -CH₂-), 2.26 (s, 3H, -CH₃-piridina), 1.92 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 231 (MH⁺).

Compuesto 78b: *N*-(1-((3,5-difluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 0.60 mmol del compuesto 75b.

Temperatura: 25°C.

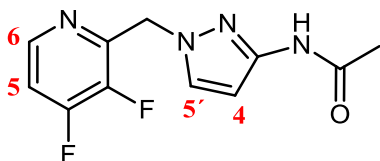
Rto.: 0.38 mmol, 62%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometanol (100:0 a 95:5).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.35 (s a, 1H, -NH-), 8.46 (s, 1H, H₆), 7.96-7.98 (s, 1H, H₄), 7.69 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₅), 6.44 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H_{4'}), 5.34 (s, 2H, -CH₂-), 1.91 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 253b (MH⁺).

Compuesto 78c: *N*-(1-((3,4-difluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 0.77 mmol del compuesto 75c.

Temperatura: 25°C.

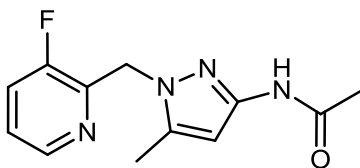
Rto.: 0.19 mmol, 25 %.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.36 (s a, 1H, -NH-), 8.36-8.39 (m, H, H₆), 7.72 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H_{5'}), 7.55-7.59 (m, H, H₅), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄), 5.39 (s, 2H, -CH₂-), 1.92 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 253b (MH⁺).

Compuesto 78e: *N*-(1-((3-fluoropiridin-2-il)metil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 2.06 mmol del compuesto 60e y 2 mmol del compuesto 4b.

Temperatura: 25°C.

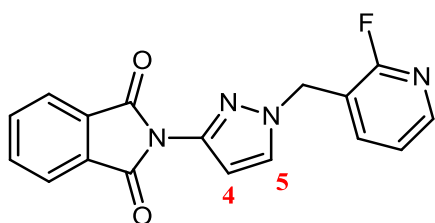
Rto.: 0.85 mmol, 41 %.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.23 (s, 1H, -NH-), 8.34-8.36 (m, H, H-piridina), 7.69-7.63 (m, 1H, H-piridina), 7.40-7.43 (m, 1H, H-piridina), 6.28 (s, 1H, H-pirazol), 5.28 (s, 2H, -CH₂-), 2.30 (s, 3H, -CH₃-piridina), 1.90 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 249 (MH⁺).

Compuesto 73: 2-(1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona.

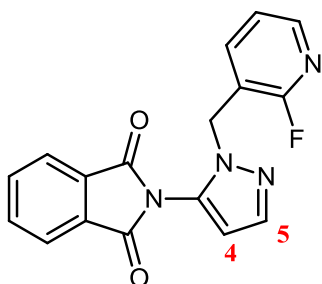


El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del compuesto 35b. Se utilizaron como materiales de partida los compuestos 34a y 60d: 2-(1H-pirazol-3-il)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (224 mg, 1.05 mmol) y 3-(bromometil)-2-fluoropiridina (300 mg, 1.6 mmol). Obteniéndose 211 mg de 2-(1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona como un sólido blanco (Rto. 62 %). En el proceso de purificación se consiguió aislar el otro regioisómero 2-(1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-5-il)isoindolina-1,3-diona (74) (Rto. 26%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.20-8.22 (m, 1H, H-piridina), 8.01 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.88-7.98 (m, 4H, 4H-ftalimida), 7.77-7.79 (m, 1H, H-piridina), 7.36-7.40 (m, 1H, H-piridina), 6.41 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₄), 5.46 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 323 (MH⁺).

Compuesto 74: 2-(1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-5-il)isoindolina-1,3-diona.

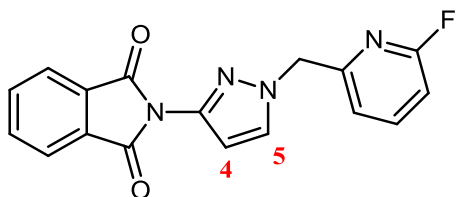


Rto.: 26%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.11-8.13 (m, 1H, H-piridina), 7.92-7.98 (m, 4H, 4H-ftalimida), 7.67 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.53b-7.57 (m, 1H, H-piridina), 7.29-7.31 (m, 1H, H-piridina), 6.47 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.33 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 323 (MH^+).

Compuesto 79d: 2-(1-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona.



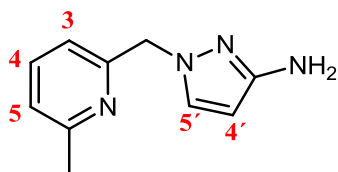
El producto se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del compuesto 35b. Se utilizaron como materiales de partida el compuesto 34a: 2-(1H-pirazol-3-il)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (200 mg, 1.05 mmol) y la 2-(clorometil)-6-fluoropiridina (Allichem, 137 mg, 0.938 mmol). Obteniéndose 94 mg de 2-(1-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona como un sólido blanco (Rto. 31%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.02-7.88 (m, 6H, 4H-ftalimida, H_5 , H-piridina) 7.11-7.15 (m, 2H, H-piridina), 6.43 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.45 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 323 (MH^+).

4.1.4.3. Síntesis de los 3-amino-N-bencilpirazoles.

Compuesto 62c: 1-((6-metilpiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina.



El compuesto 61c (123 mg, 0.53b mmol) se disolvió en una mezcla de etanol (10 mL) e hidróxido sódico (25%, ac) (10 mL). La disolución se calentó a reflujo durante 12 horas. Se evaporó el etanol a sequedad y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo 10 mL y se trató con salmuera (10 mL). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a sequedad obteniéndose 93 mg de 1-((6-metilpiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina (Rto. 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.58-7.63 (m, 1H, H_4), 7.45 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_5), 7.11-7.13 (m, 1H, H_5), 6.68-6.71 (m, 1H, H_3), 6.44 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_4), 5.06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.59 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.44 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 189 (MH^+).

Las siguientes aminas se prepararon de utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención de la 1-((6-metilpiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina. En cada caso se reemplazó el compuesto 61c por el intermedio correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 62a: 1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-amina.



Reactivo de partida: 1.34 mmol del compuesto 61a.

Rto.: 1.28 mol, 95%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.47-8.49 (m, 1H, 1H-piridina), 7.69-7.74 (m, 1H, 1H-piridina), 7.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.23-7.27 (m, 1H, 1H-piridina), 6.90-6.92 (m, 1H, 1H-piridina), 5.2 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.10 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.57 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

Compuesto 62b: 1-(piridin-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-amina.

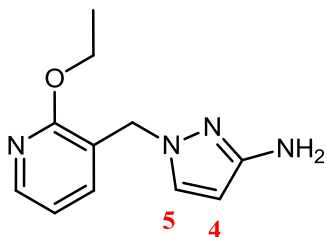


Reactivo de partida: 1.27 mmol del compuesto 61b.

Rto.: 1.12 mol, 88%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.41-8.45 (m, 2H, 2H-piridina), 7.54-7.57 (m, 1H, 1H-piridina), 7.46 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.30-7.35 (m, 1H, 1H-piridina), 5.40 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.05 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.61 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

Compuesto 62d: 1-((2-etoxipiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



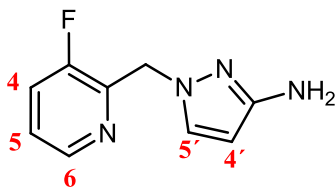
Reactivo de partida: 0.317 mmol del compuesto 61d.

Rto.: 0.279 mmol, 88%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.06-8.10 (m, 1H, H-piridina), 7.39-7.49 (m, 2H, 2 H-piridina), 7.30-7.36 (m, 1H, H₅), 5.36 (d, 1H, H₄), 5.06-5.07 (m, 2H, -NH₂), 4.44-4.52 (m, 2H, -OCH₂-), 1.30-1.37 (m, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 237 (MH⁺).

Compuesto 62e: 1-((3-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



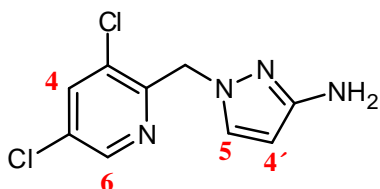
Reactivo de partida: 0.58 mmol del compuesto 61e.

Rto.: 0.52 mol, 90%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.42-8.44 (m, 1H, H₆), 7.76-7.80 (m, 1H, H₄), 7.47-7.51 (m, 2H, H₅, H_{5'}), 5.44 (d, *J* = 2.34 Hz, 1H, H_{4'}), **5.23** (s, **2H**, -CH₂-), 4.60 (s a, 2H, -NH₂).

[ES⁺MS] m/z 193 (MH⁺).

Compuesto 62f: 1-((3,5-dicloropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



Reactivo de partida: 0.34 mmol del compuesto 61f.

Rto.: 0.14 mmol, 39%.

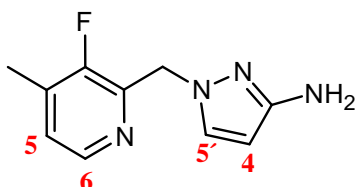
Cromatografía: Cromatografía en fase reversa utilizando una columna XTerra (19 x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de bicarbonato amónico acuoso (10

mM):acetonitrilo (90:10) (0:100). 3min 90:10; 15min 0:100; 20min 0:100.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.54-8.55 (m, 1H, H_6), 8.22-8.23 (m, 1H, H_4), 7.39 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 5.37 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4'), 5.22 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.53b (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 243 (MH^+).

Compuesto 62g: 1-((3-fluoro-4-metilpiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina.



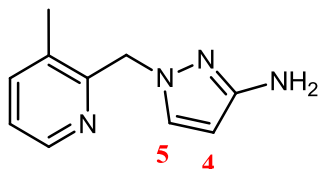
Reactivo de partida: 1.03 mmol del compuesto 61g.

Rto.: 1.03 mmol, cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.18-8.19 (m, 1H, H_6), 7.38 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.25-7.30 (m, 1H, H_5), 5.35 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.12 (s a, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.51 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 207 (MH^+).

Compuesto 80a: 1-((3-metilpiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina.



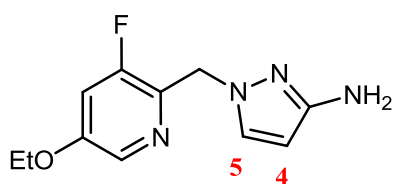
Reactivo de partida: 0.40 mmol del compuesto 78a.

Rto.: 0.40 mmol, cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.31-8.32 (m, 1H, H-piridina), 7.54-7.57 (m, 1H, H-piridina), 7.30 (d, 1H, H_5), 7.19-7.23 (m, 1H, H-piridina), 5.36 (d, 1H, H_4), 5.11 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.49 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 189 (MH^+).

Compuesto 80f: 1-((5-etoxi-3-fluoro-2-piridinil)metil)-1H-pirazol-3-amina.



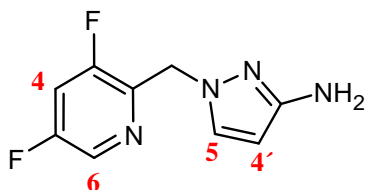
Reactivo de partida: 0.317 mmol del compuesto 78b.

Rto.: 0.279 mmol, 88%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.06-8.10 (m, 1H, H-piridina), 7.39-7.49 (m, 1H, H-piridina), 7.30-7.36 (m, 1H, H_5), 5.36 (m, 1H, H_4), 5.06-5.07 (m, 2H, $-\text{NH}_2$), 4.44-4.52 (m, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 1.30-1.37 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 237 (MH^+).

Compuesto 80b: 1-((3,5-difluoro-2-piridinil)metil)-1H-pirazol-3-amina.

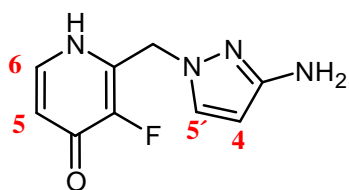


A una disolución del compuesto 78b (94 mg, 0.373 mmol) en dioxano (2 mL) se añadió ácido clorhídrico acuoso (2 M) (0.932 mL). La disolución se agitó a 60°C durante 7 h 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se basificó con una disolución acuosa saturada de carbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo (3x15 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad obteniendo 68 mg de 1-((3,5-difluoro-2-piridinil)metil)-1H-pirazol-3-amina (Rto: 87 %).

$^1\text{H NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.44-8.45 (m, 1H, H_6), 7.92-7.97 (m, 1H, H_4), 7.41 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 5.36 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.15 (s, 1H, $-\text{CH}_2$), 4.55 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 211 (MH^+).

Compuesto 80g : 2-((3-amino-1H-pirazol-1-il)metil)-3-fluoropiridin-4(1H)-ona.



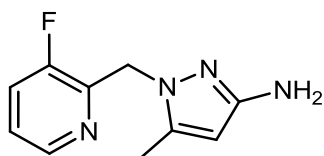
A una disolución del compuesto 78c (47 mg, 0.19 mmol) en dioxano (1.54 mL) se añadió ácido clorhídrico acuoso (2 M) (466 μL). La disolución se agitó a 60°C durante 9h 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se basificó con una disolución acuosa saturada de carbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo (3x15 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad no obteniéndose el producto descrito. La fase acuosa se rotó a sequedad y el residuo obtenido se agitó con 20 mL de una mezcla de diclorometano:metanol (10:1) durante 2h. Tras este tiempo la disolución se filtró y se concentró a sequedad

obteniéndose 2-((3-amino-1*H*-pirazol-1-il)metil)-3-fluoropiridin-4(1*H*)-ona con un rendimiento cuantitativo.

$^1\text{H NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.32-7.34 (m, 1H, H_6), 7.15 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 5.94-5.97 (m, 1H, H_3), 5.31 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 4.77 (s, 1H, $-\text{CH}_2$), 4.41 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 209 (MH^+).

Compuesto 80e: *N*-(1-((3-fluoropiridin-2-il)metil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-amina.

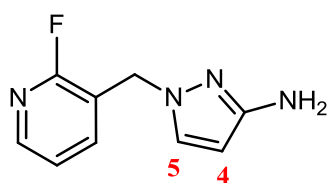


A una disolución del compuesto 77e (222 mg, 0.89 mmol) en dioxano (5 mL) se añadió ácido clorhídrico acuoso (2 M) (2.24 mL). La disolución se agitó a 60°C durante 5h 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se basificó con una disolución acuosa saturada de carbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo (3x15 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad obteniéndose 143 mg de *N*-(1-((3-fluoropiridin-2-il)metil)-5-metil-1*H*-pirazol-3-amina (Rto. 78%).

$^1\text{H NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.33-8.34 (m, 1H, H-piridina), 7.66-7.71 (m, 1H, H-piridina), 7.37-7.41 (m, 1H, H-piridina) 5.21 (s, 1H, H-pirazol), 5.10-5.11 (m, 2H, $-\text{CH}_2$), 4.38 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 207 (MH^+).

Compuesto 62h: 1-((2-fluoropiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.

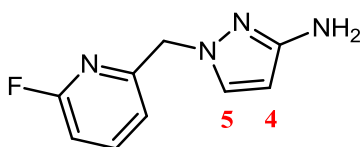


El producto se preparó siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 6q. Se utilizaron como reactivos de partida, el compuesto 73 (180 mg, 0.56 mmol) y hidracina monohidrato (Aldrich, 0.035 mL, 1.18 mmol). En este caso el filtrado obtenido se concentró a sequedad obteniendo 125 mg de un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de diclorometano:metanol. Se obtuvieron 102 mg de 1-[(2-fluoro-3-piridinil)metil]-1*H*-pirazol-3-amina (Rto. 95%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.13-8.15 (m, 1H, H-piridina), 7.57-7.62 (m, 1H, H-piridina), 7.46 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.28-7.36 (m, 1H, H-piridina), 5.42 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.08 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.62 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 193 (MH^+).

Compuesto 80d: 1-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



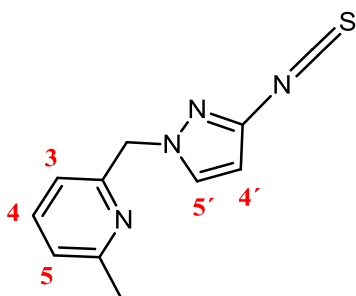
Este intermedio se preparó siguiendo un método análogo al descrito anteriormente para el compuesto 62h. En este caso se reemplazó el compuesto 73 por el compuesto 79d (90 mg, 0.279 mmol). Se obtuvieron 48 mg del compuesto deseado 1-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina (Rto. 48%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.69-7.74 (m, 1H, H-piridina), 7.30 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 6.82-6.90 (m, 2H, H-piridina), 5.67 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.16 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.87 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 193 (MH^+).

4.1.4.4. Síntesis de los isotiocianatos

Compuesto 63c: 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-6-metilpiridina.



A una disolución del compuesto 62c (88 mg, 0.47 mmol) en diclorometano (2 mL), se añadió bicarbonato sódico acuoso (2 mL). A continuación se añadió tiofosgeno (Aldrich, 53b.8 g, 0.47 mmol). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Tras separar las fases, la fase orgánica se concentró a sequedad obteniéndose 105 mg de 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-6-metilpiridina como un aceite marrón (Rto.: 98%).

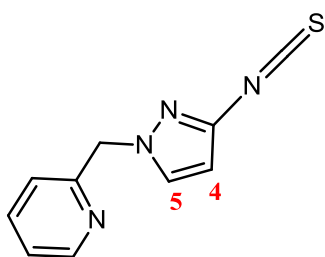
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.94 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.66 (m, 1H, H_4), 7.18 (m, 1H, H_5), 6.88 (m, 1H, H_3), 6.45 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 5.33 (d, $J = 1.76$

Hz, 2H, -CH₂-), 2.43 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 231 (MH⁺).

Los siguientes isotiocianatos se prepararon utilizando un método análogo al descrito anteriormente en la obtención del 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-6-metilpiridina. En cada caso se reemplazó el compuesto 62c por el correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y métodos de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 63a: 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)piridina.



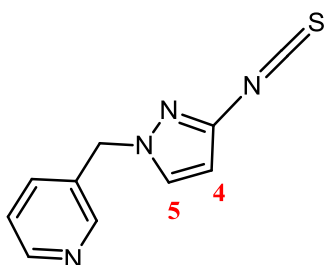
Reactivo de partida: 1.25 mmol del compuesto 62a.

Rto.: 1.04 mmol, 84%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.52-8.53b (m, 1H, H-piridina), 7.96 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₅), 7.77-7.82 (m, 1H, H-piridina), 7.33-7.35 (m, 1H, H-piridina), 7.14-7.16 (m, 1H, H-piridina), 6.47 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.40 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 217 (MH⁺).

Compuesto 63b: 3-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)piridina.



Reactivo de partida: 1.01 mmol del compuesto 62b.

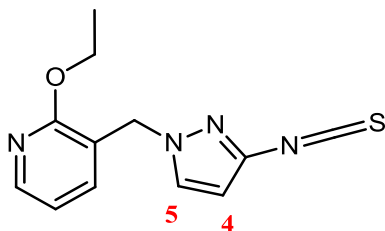
Purificación: El extracto orgánico se lavó con agua destilada, se secó sobre sulfato magnésico y se concentró. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en sílice utilizando como eluyente un gradiente de hexano:acetato (100:0 a 0:100)

Rto.: 0.58 mmol, 53b%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.52-8.53b (m, 2H, 2H-piridina), 7.98 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₅), 7.64-7.68 (m, 1H, H-piridina), 7.37-7.41 (m, 1H, H-piridina), 6.46 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.35 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 217 (MH⁺).

Compuesto 63d: 2-etoxi-3-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.



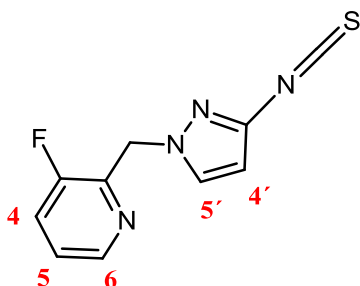
Reactivo de partida: 0.82 mmol del compuesto 62d.

Rto.: 0.73 mmol, 89%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.09 (m, 1H, H-piridina), 7.85 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₅), 7.36-7.39 (m, 1H, H-piridina), 6.92-6.96 (m, 1H, H-piridina), 6.46 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.21 (s, 2H, -CH₂-), 4.31 (q, 2H, -CH₂-), 1.27 (t, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 261 (MH⁺).

Compuesto 63e: 3-fluoro-2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.



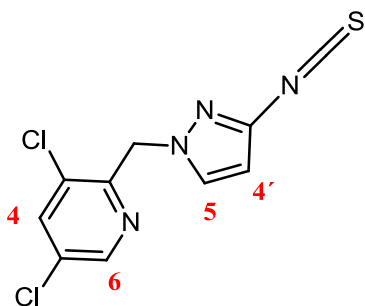
Reactivo de partida: 0.51 mmol del compuesto 62e.

Rto.: 0.51 mmol, cuantitativo.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.36-8.37 (m, 1H, H₆), 7.98 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H_{5'}), 7.73-7.79 (m, 1H, H_{4'}), 7.43-7.50 (m, 1H, H₅), 6.44 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H, H₄), 5.47 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 236 (MH⁺).

Compuesto 63f: 3,5-dicloro-2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.



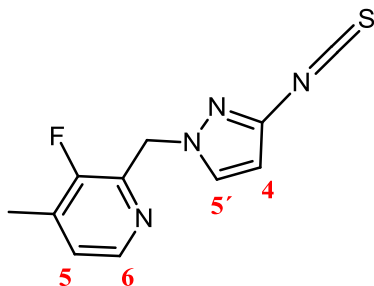
Reactivo de partida: 0.123 mmol del compuesto 62f.

Rto.: 0.08 mmol, 62%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.55-8.56 (m, 1H, H_6), 8.28-8.29 (m, 1H, H_4), 7.91 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 6.44 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4'), 5.52 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 285 (MH^+).

Compuesto 63g: 3-fluoro-2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-4-metilpiridina.



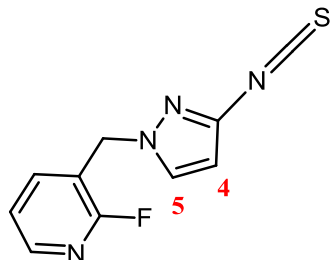
Reactivo de partida: 1.077 mmol del compuesto 62g.

Rto.: 0.96 mmol, 89%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.20-8.22 (m, 1H, H_6), 7.91 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 7.33-7.36 (m, 1H, H_5), 6.42 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 249 (MH^+).

Compuesto 63h: 2-fluoro-3-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)piridina.



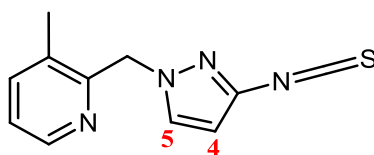
Reactivo de partida: 0.51 mmol del compuesto 62h.

Rto.: 0.39 mmol, 75%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.20-8.22 (m, 1H, H-piridina), 7.98 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 7.75-7.81 (m, 1H, H-piridina), 7.35-7.40 (m, 1H, H-piridina), 6.47 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4'), 5.38 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 236 (MH^+).

Compuesto 81a: 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-3-metilpiridina.



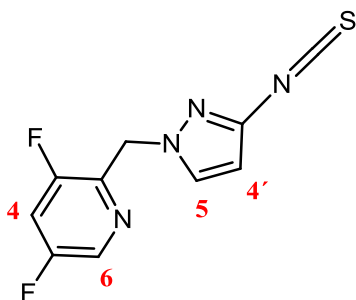
Reactivo de partida: 0.40 mmol del compuesto 80a.

Rto.: 0.20 mmol, 51%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.43-8.45 (m, 1H, H-piridina), 7.92 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.83-7.85 (m, 1H, H-piridina), 7.42-7.46 (m, 1H, H-piridina), 6.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.49 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.34 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 231 (MH^+).

Compuesto 81b: 3,5-difluoro-2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.



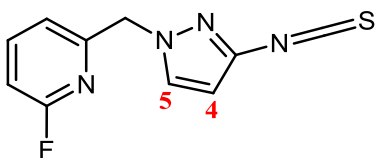
Reactivo de partida: 0.32 mmol del compuesto 80b.

Rto.: 0.31 mmol, 98%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.47 (s, 1H, H_6), 7.97-8.02 (m, 1H, H_4), 7.93 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 6.43 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4'), 5.45 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES^+MS] m/z 253b (MH^+).

Compuesto 81d: 2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3-metilpiridina.



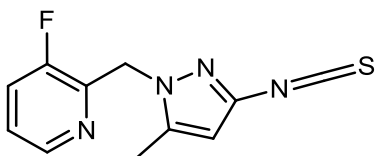
Reactivo de partida: 0.250 mmol del compuesto 80d.

Rto.: 0.250 mmol, 77%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.74-7.82 (m, 1H, H-piridina), 7.49 (d, 1H, H_5), 6.87-7.00 (m, 2H, 2H-piridina), 6.23 (d, 1H, H_4), 5.49 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES^+MS] m/z 235 (MH^+).

Compuesto 81e: 3-fluoro-2-((3-isotiocianato-5-metil-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.

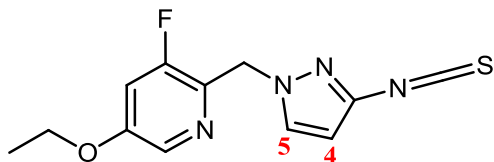


Reactivo de partida: 0.28 mmol del compuesto 80e.

Rto.: 0.14 mmol, 50%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.32-8.46 (m, 1H, H-piridina), 7.73-7.78 (m, 1H, H-piridina), 7.43-7.47 (m, 1H, H-piridina), 6.23 (s, 1 H, H-pirazol), 5.42 (d, $J=1.52$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.29 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

Compuesto 81f: 5-etoxi-3-fluoro-2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridina.



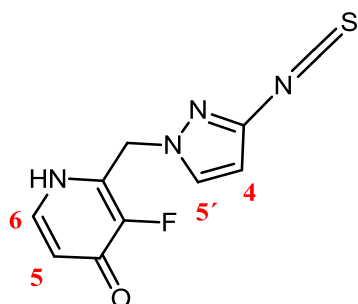
Reactivo de partida: 0.27 mmol del compuesto 80f.

Rto.: 0.24 mmol, 90%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.09-8.13 (m, 1H, H-piridina), 7.83-7.90 (m, 1H, H-piridina), 7.45-7.56 (m, 1H, H_5), 6.42-6.43 (m, 1H, H_4), 5.34-3.35 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.11-4.15 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{O-}$), 1.31-1.35 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES⁺MS] m/z 279 (MH^+).

Compuesto 81g: 3-fluoro-2-((3-isotiocianato-1H-pirazol-1-il)metil)piridin-4(1H)-ona.



Reactivo de partida: 0.28 mmol del compuesto 80g.

Rto.: 0.14 mmol, 50%.

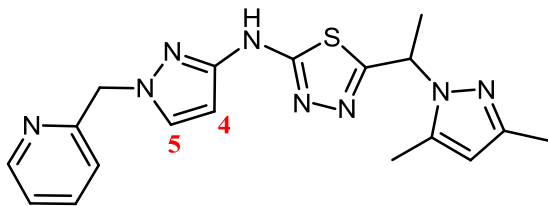
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.53b-8.54 (s, 1H, H_6), 7.96 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.71-7.73 (m, 1H, H_5), 6.44 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.58 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES⁺MS] m/z 251 (MH^+).

4.1.4.5. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol

Los siguientes tiadiazoles se prepararon siguiendo el método B descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 21. En cada caso se reemplazó el compuesto 7j por el intermedio correspondiente. Las cantidades utilizadas, rendimientos y método de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 64: 5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-(1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 1.01 mmol del compuesto 63a y 1.01 mmol del compuesto 8a.

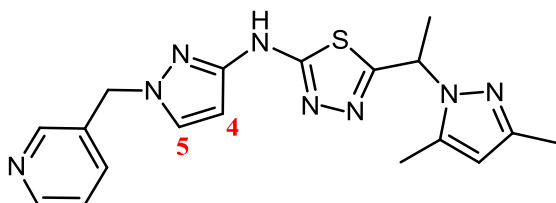
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:100, 100:0) en condiciones neutras.

Rto.: 0.03 mmol, 3%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, -NH-), 7.71-7.77 (m, 2H, H₅, H-Ar), 7.27-7.32 (m, 1H, H-Ar), 7.01-7.04 (m, 1H, H-Ar), 6.01 (d, *J* = 2.34 Hz 1H, H₄), 5.72-5.82 (m, 2H, H-pirazol, -CHCH₃), 5.30 (s, 2H, -CH₂-), 2.22 (s a, 3H, -CH₃), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 1.78 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 381 (MH⁺).

Compuesto 65: 5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-(1-(piridin-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.56 mmol del compuesto 63b y 0.56 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (20:100, 100:0) en condiciones neutras.

Rto.: 0.12 mmol, 22%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.88 (s a, 1H, -NH-), 8.50-8.51 (m, 2H, 2H-Ar), 7.78 (d, *J* = 2.05 Hz 1H, H₅), 7.64-7.66 (m, 1H, H-Ar), 7.33-7.38 (m, 1H, H-Ar), 5.97 (d, *J* = 2.05 Hz 1H, H₄), 5.74-5.85 (m, 2H, H-pirazol, -CHCH₃), 5.26 (s, 2H, -CH₂-), 2.25 (s a, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 1.78 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, -CHCH₃).

Reactivo de partida: 0.32 mmol del compuesto 63g y 0.35 mmol del compuesto 8a.

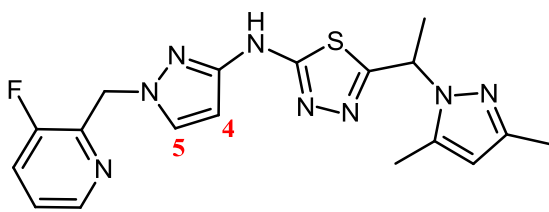
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:100, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en el disolvente acuoso).

Rto.: 0.06 mmol, 16%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.81 (s a, 1H, -NH-), 8.19-8.21 (m, 1H, H-Ar), 7.71 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_5), 7.31-7.34 (m, 1H, H-Ar), 5.95 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_4), 5.73-5.82 (m, 2H, H-pirazol, - CHCH_3), 5.32 (d, $J = 1.612.34$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.23-2.30 (m, 6H, - 2CH_3), 2.09 (s, 3H, - CH_3), 1.78 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, - CHCH_3).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 413 (MH^+).

Compuesto 68: 5-(1-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)-N-(1-((3-fluoropiridin-2-il)methyl)-1H-pirazol-3-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.69 mmol del compuesto 63e y 0.69 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (10:100, 100:0) en condiciones neutras.

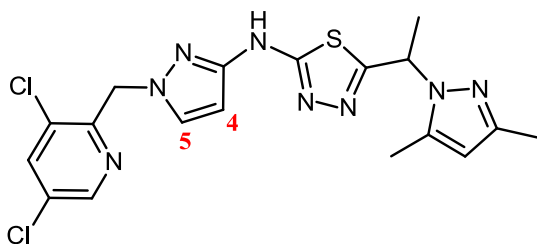
Rto.: 0.18 mmol, 27%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.82 (s a, 1H, -NH-), 8.36-8.37 (m, 1H, H-Ar), 7.73-7.76 (m, 2H, H_5 , H-Ar), 7.43-7.49 (m, 1H, H-Ar), 5.97 (d, $J = 2.34$ Hz 1H, H_4), 5.85 (s a, 1H, H-pirazol), 5.75 (c, $J = 6.88$ Hz, 1H, H_4 - CHCH_3), 5.36 (d, $J = 1.612.34$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.24 (s a, 3H, - CH_3), 2.10 (s, 3H, - CH_3), 1.78 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, - CHCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.96, 14.03, 20.94 (3CH_3), 51.46 (CHCH_3), 52.90 (CH_2), 94.21 (C_4), 105.72 ($\text{CH}_{\text{pirazol}}$), 124.03, 124.22 (2CH_{Ar}), 125.77 (C_5), 139.26, 144.03, (C-CH_3 , C_{Ar}), 145.71 (CH_{Ar}), 147.28 (C-CH_3), 156.48, 159.03, 161.45, 164.45 ($\text{C}_{\text{pirazol-NH}}$, C-F , $2\text{C}_{\text{tiadiazol}}$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 399 (MH^+).

Compuesto 69: *N*-(1-((3,5-dicloropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.08 mmol del compuesto 63f y 0.08 mmol del compuesto 8a.

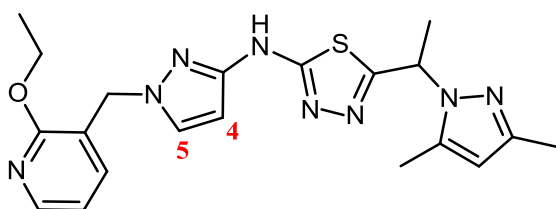
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:100, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en el disolvente acuoso).

Rto.: 0.01 mmol, 17%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.5 (s a, 1H, -NH-), 8.19-8.21 (m, 1H, H-Ar), 7.71 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_5), 7.31-7.34 (m, 1H, H-Ar), 5.95 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_4), 5.73-5.82 (m, 2H, H-pirazol, - CHCH_3), 5.32 (d, $J = 1.612.34$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.23-2.30 (m, 6H, - 2CH_3), 2.09 (s, 3H, - CH_3), 1.78 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, - CHCH_3).

[ES⁺MS] m/z 449 (MH⁺).

Compuesto 70: 5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-(1-((2-etoxipiridin-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.27 mmol del compuesto 63d y 0.27 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:100, 100:0) en condiciones neutras.

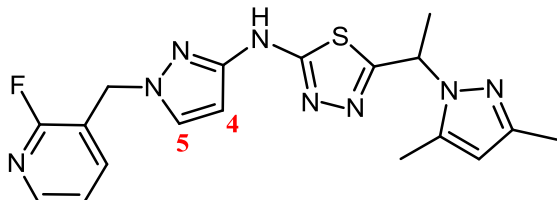
Rto.: 0.02 mmol, 12%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.88 (s a, 1H, -NH-), 8.08-8.09 (m, 1H, H-Ar), 7.71 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_5), 7.29-7.31 (m, 1H, H-Ar), 6.90-6.94 (m, 1H, H-Ar), 5.97 (d, $J = 2.05$ Hz 1H, H_4), 5.73-5.83 (m, 2H, H-pirazol, - CHCH_3), 5.15 (s, 2H, - CH_2 -), 4.34 (c, $J = 7.03$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.24 (s, 3H, - CH_3), 2.9 (s, 3H, - CH_3), 1.78 (d, $J = 6.88$

Hz, 3H, $-\text{CHCH}_3$), 1.31 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES⁺MS] m/z 425 (MH⁺).

Compuesto 71: 5-(1-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-*N*-(1-((2-fluoropiridin-3-il)methyl)-1*H*-pirazol-3-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina.



Reactivo de partida: 0.19 mmol del compuesto 63h y 0.19 mmol del compuesto 8a.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:100, 100:0) en condiciones neutras.

Rto.: 0.05 mmol, 20%.

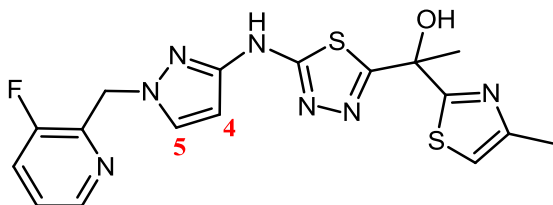
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.87 (s a, 1H, $-\text{NH}-$), 8.17-8.18 (m, 1H, H-Ar), 7.76 (d, $J = 2.34$ Hz 1H, H₅), 7.67-7.75 (m, 1H, H-Ar), 7.31-7.33 (m, 1H, H-Ar), 5.98 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H₄), 5.72-5.83 (m, 2H, H-pirazol, $-\text{CHCH}_3$), 5.27 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.23 (s a, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.78 (d, $J = 6.74$ Hz, 3H, $-\text{CHCH}_3$).

[ES⁺MS] m/z 399 (MH⁺).

4.1.4.6. Síntesis de los derivados de 1,3,4-tiadiazol derivados del hidroximetiltiazol

Los siguientes tiadiazoles se prepararon siguiendo el método B descrito anteriormente en la síntesis del compuesto 9. En cada caso se reemplazaron los intermedios 7a y 8a por los intermedios correspondientes. Las cantidades utilizadas, rendimientos y método de purificación se especifican en cada caso.

Compuesto 82: 1-(5-(((1-((3-fluoropiridin-2-il)methyl)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 8.54 mmol del compuesto 63e y 8.54 mmol del compuesto 53b.

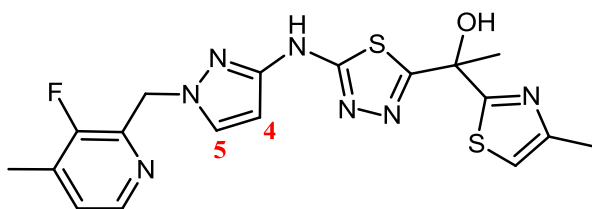
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

Rto.: 5.2 mmol, 61%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.81 (s a, 1H, -NH-), 8.35-8.37 (m, 1H, H-piridina), 7.68-7.74 (m, 2H, H₅, H-piridina), 7.43-7.47 (m, 1H, H-piridina), 7.26 (s a, 1H, H-tiazol), 7.20 (s a, 1H, -OH), 5.95 (d, *J* = 2.27 Hz 1H, H₄), 5.36-5.37 (m, 2H, -CH₂-), 2.30 (s, 3H, -CH₃), 1.96 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

Compuesto 83: 1-(5-((1-((3-fluoro-4-metilpiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.41 mmol del compuesto 60g y 0.34 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

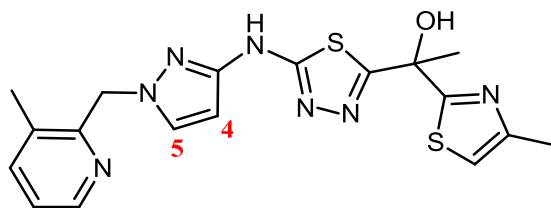
Rto.: 0.22mmol, 68%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.82 (s a, 1H, -NH-), 8.19-8.21 (m, 1H, H-piridina), 7.70-7.71 (m, 1H, H₅), 7.28-7.34 (m, 2H, H-piridina, H-tiazol), 7.20 (s a, 1H, -OH), 5.93-5.94 (m, 1H, H₄), 5.34 (m, 2H, -CH₂-), 2.30 (s a, 6H, 2(-CH₃)), 1.97 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 14.21, 17.44, 28.75 (3CH₃), 51.60 (CH₂), 74.72 (C-OH), 94.13 (C₄), 115.35 (CH_(tiazol)), 127.24, 133.21 (CH_(Ar), C₅), 134.70 (C_(Ar)-CH₃), 143.47 (C_(Ar)), 145.13 (CH_(Ar)), 152.50 (C-NH), 158.22 (C-CH₃(tiazol)), 164.65, 173.15, 175.89 (2C_(tiadiazol), C-F).

[ES⁺MS] m/z 432 (MH⁺).

Compuesto 84: 1-(5-((1-((3-metilpiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.20 mmol del compuesto 81a y 0.20 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando como

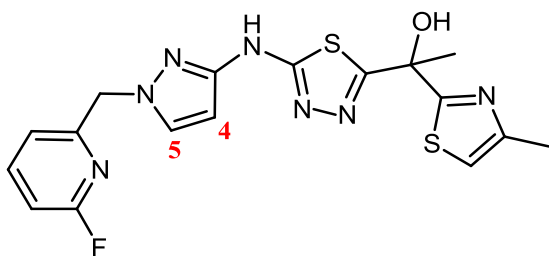
como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

Rto.: 0.04 mmol, 19 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.83 (s a, 1H, -NH-), 8.31-8.33 (m, 1H, H-piridina), 7.58-7.65 (m, 2H, H_5 , H-piridina), 7.21-7.26 (m, 3H, H-piridina, H-tiazol, -OH), 5.95 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H_4), 5.30 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.38 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ (piridina)), 2.30 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 414 (MH^+).

Compuesto 85: 1-(5-((1-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.19 mmol del compuesto 81d y 0.19 mmol del compuesto 53b.

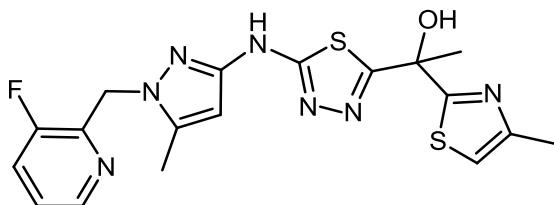
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

Rto.: 0.12 mmol, 63%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.70-7.75 (m, 1H, H_5), 7.20-7.35 (m, 2H, H-piridina, -OH), 6.96-7.02 (m, 2H, 2H-piridina), 5.92-5.94 (m, 1H, H_4), 5.23 (s a, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.83-4.91 (m, 1H, 2($-\text{CH}_3$)), 1.97 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 418 (MH^+).

Compuesto 86: 1-(5-((1-((3-fluoropiridin-2-il)methyl)-5-metil-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-yl)etanol.



Reactivo de partida: 0.34 mmol del compuesto 81e y 0.34 mmol del compuesto 53b.

Purificación: Tras evaporar disolventes el residuo se suspendió en una mezcla de agua y éter dietílico. El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó a vacío obteniendo un sólido blanco.

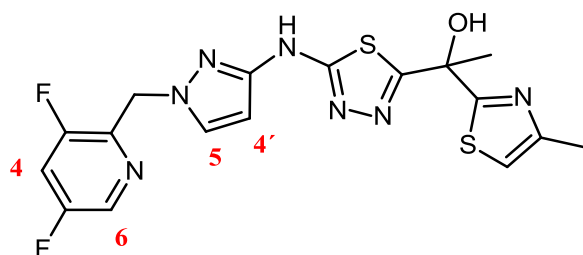
Rto.: 0.13 mmol, 38 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.80 (s a, 1H, -NH-), 8.06-8.11 (m, 1H, H-piridina), 7.63-7.68 (m, 1H, H-piridina), 7.40-7 (m, 1H, H_5), 7.27-7.28 (m, 1H, H-tiazol), 7.20-7.21 (m, 1H, -OH), 5.20-5.27 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.09-4.15 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.29-2.30 (m, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.97 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.32-1.36 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 11.40, 17.36, 28.69 (3CH_3), 48.47 (CH_2), 74.65 (C-OH), 94.29 (C_4), 115.26 ($\text{CH}_{(\text{tiazol})}$), 124.13, 125.42 ($2\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 141.34 ($\text{C}_{(\text{pirazol})-\text{CH}_3}$), 144.67 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 145.69 ($\text{C}_{(\text{Ar})}$), 147.56, 152.40 (C-NH , $\text{C}_{(\text{tiazol})-\text{CH}_3}$), 158.79, 164.54, 166.25 175.86 ($2\text{C}_{(\text{tiadiazol})}$, $\text{C}_{(\text{tiazol})-\text{S}}$, C-F).

[ES^+MS] m/z 462 (MH^+).

Compuesto 87: 1-(5-((1-((3,5-difluoropiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.31 mmol del compuesto 81b y 0.31 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna SunFire de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (30:70, 100:0) en condiciones ácidas (0.1% de ácido fórmico en ambos disolventes).

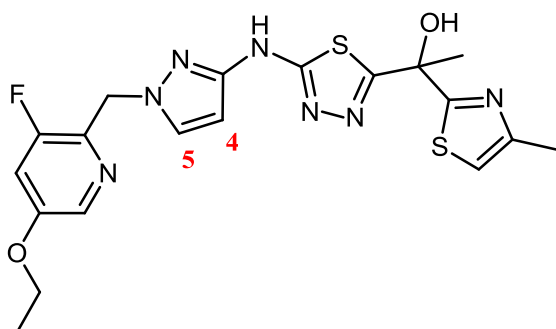
Rto.: 0.11 mmol, 30 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.82 (s a, 1H, -NH-), 8.45-8.46 (m, 1H, H_6), 7.58-7.91-7.91 (m, 1H, H_4), 7.73 (d, $J = 2.53\text{b Hz}$ 1H, H_5), 7.26 (s, 1H, H-tiazol), 7.19-7.20 (s, 1H, -OH), 5.95 (d, $J = 2.52\text{ Hz}$ 1H, H_4'), 5.35-5.36 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.28-2.29 (m, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 17.34, 28.62 (2CH_3), 51.14 (CH_2), 74.61 (C-OH), 94.29 (C_4), 112.86 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 115.26 ($\text{CH}_{(\text{tiazol})}$), 132.93 (C_5), 134.15 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 140.85 ($\text{C}_{(\text{Ar})}$), 148.90, 152.45 ($\text{C}_{(\text{pirazol})-\text{NH}}$, $\text{C}_{(\text{tiazol})-\text{CH}_3}$), 157.70, 158.42, 160.23, 164.66, 175.84 ($2\text{C}_{(\text{tiadiazol})}$, $\text{C}_{(\text{tiazol})-\text{S}}$, 2CF).

[ES^+MS] m/z 436 (MH^+).

Compuesto 88: 1-(5-((1-((5-etoxi-3-fluoropiridin-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metilthiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.27 mmol del compuesto 81f y 0.27 mmol del compuesto 53b.

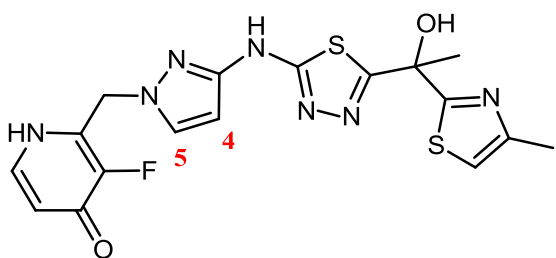
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Bridge de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (25:75, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en ambos disolventes).

Rto.: 0.13 mmol, 43 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.80 (s a, 1H, -NH-), 8.06-8.11 (m, 1H, H-piridina), 7.63-7.68 (m, 1H, H-piridina), 7.40-7 (m, 1H, H_5), 7.27-7.28 (m, 1H, H-tiazol), 7.20-7.21 (m, 1H, -OH), 5.20-5.27 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.09-4.15 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.29-2.30 (m, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.97 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.32-1.36 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 462 (MH^+).

Compuesto 89: 3-fluoro-2-((3-((5-(1-hidroxi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino)-1H-pirazol-1-il)metil)piridin-4(1H)-ona.



Reactivo de partida: 0.14 mmol del compuesto 81g y 0.14 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Bridge de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (10:90, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en ambos disolventes).

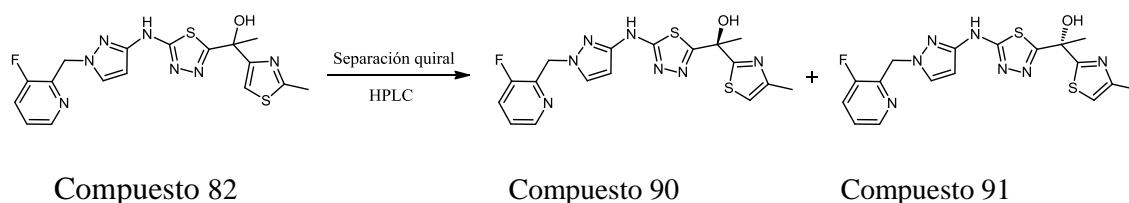
Rto.: 0.032 mmol, 4 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 11.29-11.78 (m, 1H, -NHAr), 10.80 (s a, 1H, -NH-), 7.60-8.02 (m, 2H, H-Ar), 6.28-6.92 (m, 1H, H_5), 7.28 (s, 1H, H-tiazol), 7.20 (s, 1H, -OH), 5.98-6.04 (m, 1H, H_4), 5.20-5.27 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.30 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.97 (s,

3H, -CH₃).

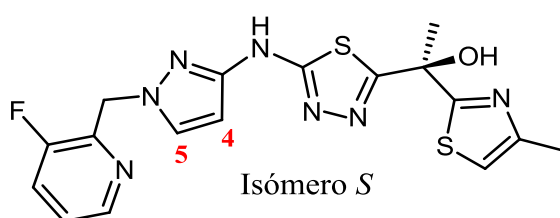
[ES⁺MS] m/z 434 (MH⁺).

4.1.2.6. Separación de los enantiómeros del compuesto 82



El compuesto **82** (162 mg, 0.388 mmol) se separó en sus dos enantiómeros correspondientes, compuesto **90** y compuesto **91**, por cromatografía líquida de alta resolución de tipo semipreparativo utilizando una columna de fase estacionaria quiral, CHIRALPAK-AD 20x250mm y un gradiente isocrático de ACN/MeOH-iPrOH (60:40) en una proporción 98:2, utilizando un 0.1% isopropilamina como aditivo. La mezcla de disolventes eluyó a un flujo de 17 mL/min y la longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. El compuesto 82 se disolvió en 8 mL de una mezcla de metanol/acetonitrilo de grado de HPLC. Se necesitaron 5 inyecciones para separar la totalidad de la muestra. Tras colectar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros.

Compuesto 90: (1*S*)-1-[5-({1-[(3-fluoro-2-piridil)metil]-1*H*-pirazol-3-il}amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-1-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)etanol.



El compuesto **90** eluyó en primer lugar, se obtuvieron (70.5 mg, 0.169 mmol, 87%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática (90:10) de acetonitrilo (metanol:isopropanol)(60:40). Se utilizó como aditivo básico un 0.1% de isopropilamina en todos los disolventes. La mezcla eluyó a un flujo de 1mL/min. El

tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 4.82 min.

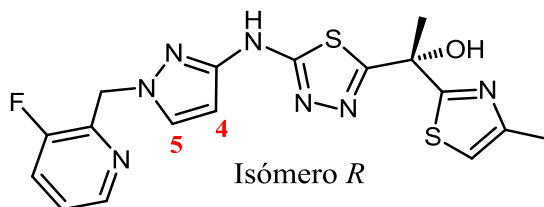
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 10.91 (sa, 1H, -NH), 8.43-8.45 (m, 1H, H-piridina), 7.77-7.82 (m, 2H, H₅, H-piridina), 7.50-7.55 (m, 1H, H-piridina), 7.35 (s, 1H, -OH), 7.29 (d, $J = 1.01$ Hz, 1H, H-tiazol), 6.04 (m, 1H, H₄), 5.45 (s, 2H, -CH₂), 5.38 (d, 2H, -CH₂-), 2.37 (s, 3H, -CH₃-tiazol), 2.04 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

$[\alpha]_D^{20} = +86.3^\circ$ ($c = 2$, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

La configuración absoluta (*S*) se determinó por dicroísmo circular vibracional. La concentración de la muestra fue de 10.1mg/70 μ l empleando DMSO- d_6 como disolvente.

Compuesto 91: (1*S*)-1-[5-({1-[(3-fluoro-2-piridil)metil]-1*H*-pirazol-3-il}amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-1-(4-metil-1,3-tiazol-2-il)etanol.



El compuesto **92** eluyó en primer segundo, se obtuvieron (71 mg, 0.170 mmol, 88%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática (90:10) de acetonitrilo (metanol:isopropanol)(60:40). Se utilizó como aditivo básico un 0.1% de isopropilamina en todos los disolventes. La mezcla eluyó a un flujo de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 8.08 min.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 10.91 (sa, 1H, -NH), 8.43-8.45 (m, 1H, H-piridina), 7.77-7.82 (m, 2H, H₅, H-piridina), 7.50-7.55 (m, 1H, H-piridina), 7.35 (s, 1H, -OH), 7.29 (d, $J = 1.01$ Hz, 1H, H-tiazol), 6.04 (m, 1H, H₄), 5.45 (s, 2H, -CH₂), 5.38 (d, 2H, -CH₂-), 2.37 (s, 3H, -CH₃-tiazol), 2.04 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

$[\alpha]_D^{20} = -60.9^\circ$ ($c = 2$, $\lambda = 589$ nm, CDCl₃).

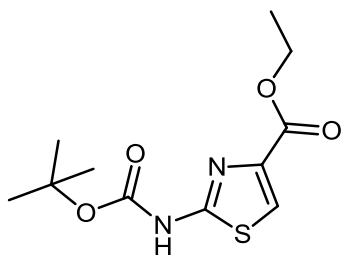
La configuración absoluta (*R*) se determinó por dicroísmo circular vibracional. La concentración de la muestra fue de 10.5mg/70 μ l empleando DMSO- d_6 como disolvente.

4.1.5 Síntesis de los derivados del 1,3,4-tiadiazol: Heterociclos en la región izquierda.

4.1.5.1. Síntesis del derivado bromado: 4-(bromometil)tiazol-2-il)carbamato de *tert*-

butilo.

Compuesto 94f: 2-([(1,1-dimetiletil)oxi]carbonil)amino)-1,3-tiazol-4-carboxilato de etilo.

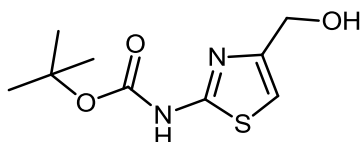


A una disolución de 2-amino-1,3-tiazol-4-carboxilato de etilo (Acros, 1g, 5.81 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL) se añadió anhídrido de di-*tert*-butilo (1,39 g, 6.39 mmol, Aldrich). A continuación se añadió trietilamina (Aldrich, 1.619 mL, 11.61 mmol) y *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (70.9 mg, 0.58 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo se añadió a la disolución acetato de etilo (150 mL) y se lavó con ácido clorhídrico (1N). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Obteniéndose 1.3 g de 2-([(1,1-dimetiletil)oxi]carbonil)amino)-1,3-tiazol-4-carboxilato de etilo en forma de sólido amarillo (Rto. 82%).

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.20 (br s, 1H, -NH), 7.56 (s, 1H, H-tiazol), 4.35 (q, 2H, $-\text{CH}_2$), 1.50 (m, 9H, ^tBu), 1.40 (t, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 273 (MH^+).

Compuesto 95f: 4-(hidroximetil)tiazol-2-il-carbamato de *tert*-butilo.

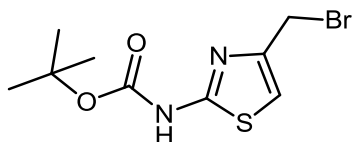


A una disolución del compuesto 94f, 2-([(1,1-dimetiletil)oxi]carbonil)amino)-1,3-tiazol-4-carboxilato de etilo, (500 mg, 1.836 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (40 mL) se añadió una solución de bis(metoxietoxi) hidruro de sodio y aluminio (Red-Al) 65% solution en tolueno (Aldrich, 1.654 mL, 5.51 mmol) a 0°C y bajo atmósfera de $\text{N}_2(\text{g})$. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación se añadió tetrahidrofurano a la disolución. La mezcla resultante se añadió sobre agua destilada (20 mL), se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con brine, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se concentró a sequedad obteniéndose 410 mg de 4-(hidroximetil)tiazol-2-il-carbamato de *tert*-butilo (Rto.: 97%)

^1H NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 11.33 (br s, 1H, -NH), 6.84 (s, 1H, H-tiazol), 5.17 (t, 1H, -OH), 4.40 (d, 2H, -CH $_2$), 1.48 (s, 9H, ^tBu).

[ES $^+$ MS] m/z 231 (MH $^+$).

Compuesto 92f: 4-(bromometil)tiazol-2-il)carbamato de *tert*-butilo.



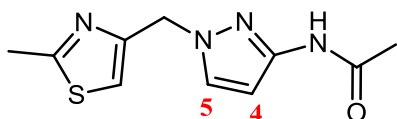
A una disolución de 4-(hidroximetil)tiazol-2-il-carbamato de *tert*-butilo (Compuesto 95f, 410 mg, 1.78 mmol) en diclorometano anhidro (5 mL) se añadió tribromuro de fósforo (5360 mg, 1.958 mmol, Aldrich) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12h. Transcurrido este tiempo la mezcla se diluyó con agua destilada (5 mL) y se extrajo con diclorometano (3x5 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose el 4-(bromometil)tiazol-2-il)carbamato de *tert*-butilo (300 mg, 1.02 mmol). Rto. 58%.

^1H NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 11.56 (br s, 1H, -NH), 7.23 (s, 1H, H-tiazol), 4.60 (s, 2H, -CH $_2$), 1.48 (s, 9H, ^tBu).

[ES $^+$ MS] m/z 292 (MH $^+$).

4.1.5.2. Reacción de alquilación del 3-acetamido-*N*-1H-pirazol

Compuesto 93a: *N*-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 15.04 mmol de hidrocloreto de 4-(clorometil)-2-metiltiazol (Maybridge).

Temperatura: 25°C.

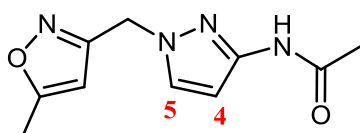
Rto.: 7.49 mmol, 52%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.39 (s, 1H, -NH-), 7.64 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H $_5$), 7.27 (s, 1H, H-tiazol), 6.45 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H $_4$), 5.22 (s, 2H, -CH $_2$ -), 2.61 (s, 3H, tiazol-CH $_3$), 1.95 (s, 3H, -CH $_3$).

[ES $^+$ MS] m/z 236 (MH $^+$).

Compuesto 93b: *N*-(1-((5-metilisoxazol-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.52 mmol de 3-(clorometil)-5-metilisoxazole (Across).

Temperatura: 25°C.

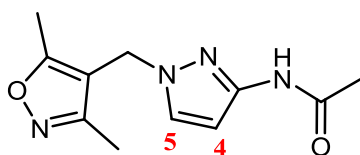
Rto.: 0.55 mmol, 36%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 85:15).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.40 (s a, 1H, -NH-), 7.69 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₅), 6.46 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₄), 6.00 (s, 1H, H-oxazol), 5.23 (s, 2H, -CH₂-), 2.34 (s, 3H, oxazol-CH₃), 1.94 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 221 (MH⁺).

Compuesto 93c: *N*-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.37 mmol de 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (Aldrich).

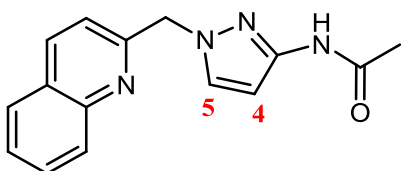
Temperatura: 25°C.

Rto.: 0.52 mmol, 38%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de hexano:acetato de etilo (100:0 a 15:85).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.66 (s a, 1H, -NH-), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz, H₅), 6.66 (d, 1H, *J* = 2.20 Hz, H₄), 4.90 (s, 2H, -CH₂-), 2.39 (s, 3H, oxazol-CH₃), 2.14-2.17 (m, 6H, oxazol-CH₃, -CH₃).

Compuesto 93d: *N*-(1-(quinolin-2-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.20 mmol de hidrocloreuro de 2-(clorometil)quinolina (Aldrich).

Temperatura: 80°C.

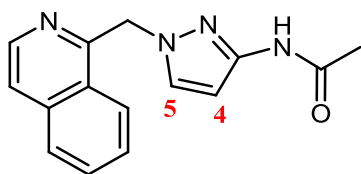
Rto.: 0.34 mmol, 28%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.06-8.12 (m, 2H, 2xH-quinolina), 7.64-7.81 (m, 2H, 2xH-quinolina), 7.54-7.57 (m, 1H, H-quinolina), 7.47 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_5), 7.06-7.09 (m, 1H, H-quinolina), 6.76 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_4), 5.49 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.14 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 267 (MH^+).

Compuesto 93e: *N*-(1-(isoquinolin-1-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)acetamida.



Reactivo de partida: 1.76 mmol de hidrobromuro de 1-(bromometil)isoquinolina (Apollo).

Temperatura: 80°C.

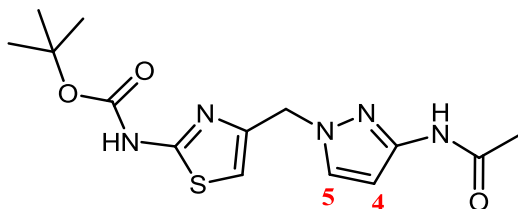
Rto.: 0.61 mmol, 38%.

Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.31 (s, 1H, $-\text{NH}$), 8.42-8.44 (m, 1H, H-quinolina), 8.27-8.29 (m, 1H, H-quinolina), 7.98-8.00 (m, 1H, H-quinolina), 7.65-7.81 (m, 4H, 3H-quinolina, H_5), 6.45 (d, 1H, $J = 2.27$ Hz, H_4), 5.82 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.89 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 267 (MH^+).

Compuesto 93f: (4-((3-acetamido-1*H*-pirazol-1-il)metil)thiazol-2-il)carbamato de *tert*-butilo.



Reactivo de partida: 1.60 mmol del compuesto 92f.

Temperatura: 80°C.

Rto.: 0.38 mmol, 24%.

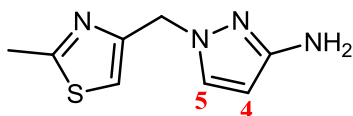
Cromatografía: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 95:5).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 11.46 (s, 1H, -NHCO-), 10.39 (s, 1H, -NH-), 7.60 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_5), 6.90 (s, 1H, H-tiazol), 6.45 (d, 1H, $J = 2.34$ Hz, H_4), 5.12 (s, 2H, - CH_2 -), 1.96 (s, 3H, - CH_3), 1.47 (s, 9H, ^tBu).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 238 ($\text{MH}^+ - 100$).

4.1.5.3. Síntesis de los derivados de tipo 3-aminopirazol

Compuesto 96a: 1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



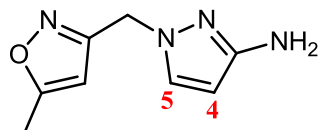
Reactivo de partida: 11.72 mmol del compuesto 93a.

Rto.: 11.07 mmol, 94%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.37 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.16 (s, 1H, H-tiazol), 5.40 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 5.04 (s, 2H, - CH_2 -), 4.53b (s a, 2H, - NH_2), 2.61 (s, 3H, - CH_3).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 195 (MH^+).

Compuesto 96b: 1-((5-metilisoxazol-3-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



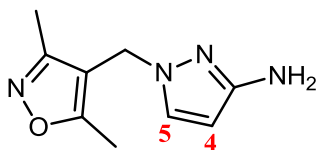
Reactivo de partida: 0.61 mmol del compuesto 93b.

Rto.: 0.61 mmol, cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.41 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 5.98 (s, 1H, H-oxazol), 5.40 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 5.03 (s, 2H, - CH_2 -), 4.60 (s a, 2H, - NH_2), 2.34 (s, 3H, - CH_3).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 179 (MH^+).

Compuesto 96c: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.



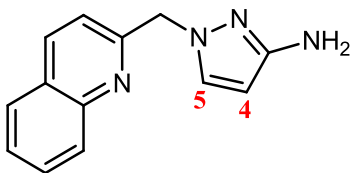
Reactivo de partida: 0.46 mmol del compuesto 93c.

Rto.: 0.38 mmol, 83%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.35 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_5), 5.35 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H_4), 4.81 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.54 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.34 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 193 (MH^+).

Compuesto 96d: 1-(quinolin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-amina.

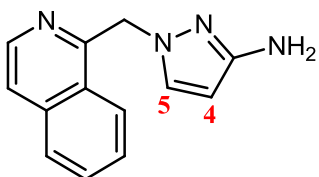


Reactivo de partida: 0.34 mmol del compuesto 93d.

Rto.: 0.30 mmol, 88%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.05-8.12 (m, 2H, 2H-quinolina), 7.70-7.81 (m, 2H, 2H-quinolina), 7.51-7.56 (m, 1H, H-quinolina), 7.32 (d, 1H, H_5), 7.13-7.16 (m, 1H, H-quinolina), 5.68 (d, 1H, H_4), 5.42 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.25 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

Compuesto 96e: 1-(isoquinolin-1-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-amina.



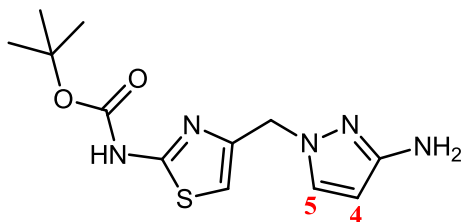
Reactivo de partida: 0.56 mmol del compuesto 93e.

Rto.: 0.44 mmol, 95%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.42-8.43 (m, 1H, H-quinolina), 8.33-8.34 (m, 1H, H-quinolina), 7.96-7.98 (m, 1H, H-quinolina), 7.74-7.79 (m, 2H, 2H-quinolina), 7.62-7.67 (m, 1H, H-quinolina), 7.44 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_5), 5.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.38 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_4), 4.50 (s a, 2H, $-\text{NH}_2$).

$[\text{ES}^+\text{MS}]$ m/z 225 (MH^+).

Compuesto 96f: (4-((3-amino-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiazol-2-il)carbamato de *tert*-butilo.



Reactivo de partida: 0.38 mmol del compuesto 93f.

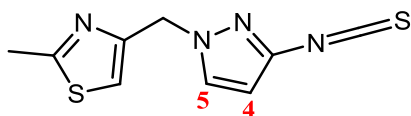
Rto.: 0.22 mmol, 58%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 11.4 (s a, 1H, -NHCO), 7.32 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 6.79 (s, 1H, H-tiazol), 5.39 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 4.94 (s, 2H, - CH_2 -), 4.52 (s, 2H, - NH_2), 1.49 (s, 9H, - ^tBu).

[ES^+MS] m/z 195 (MH^+).

4.1.5.4. Síntesis de los isotiocianatos

Compuesto 97a: 4-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-2-metiltiazol.



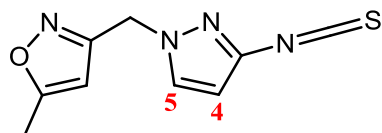
Reactivo de partida: 11.02 mmol del compuesto 96a.

Rto.: 10.88 mmol, 99%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.88 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_5), 7.38 (s, 1H, H-tiazol), 6.43 (d, $J = 2.49$ Hz, 1H, H_4), 5.31 (s, 2H, - CH_2 -), 2.65 (s, 3H, - CH_3).

[ES^+MS] m/z 237 (MH^+).

Compuesto 97b: 3-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-5-metilisoxazol.



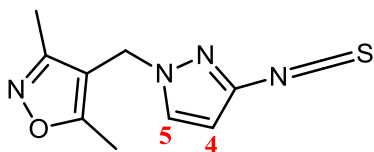
Reactivo de partida: 0.63 mmol del 96b.

Rto.: 0.58 mmol, 93%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.93 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 6.45 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_4), 6.12 (s, 1H, H-isoxazol), 5.35 (s, 2H, - CH_2 -), 2.36 (s, 3H, - CH_3).

[ES^+MS] m/z 221 (MH^+).

Compuesto 97c: 4-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol.



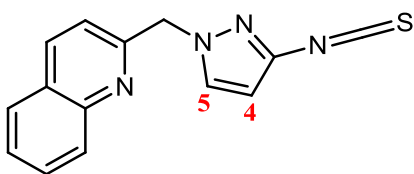
Reactivo de partida: 0.36 mmol del compuesto 96c.

Rto.: 0.36 mmol, cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.87 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 6.42 (m, 1H, H_4), 5.11 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.38 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.11 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

[ES^+MS] m/z 235 (MH^+).

Compuesto 97d: 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)quinolina.



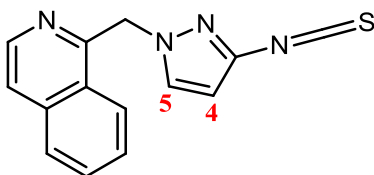
Reactivo de partida: 0.30 mmol del compuesto 96d.

Rto.: 0.25 mmol, 83%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.07-8.18 (m, 2H, 2H-quinolina), 7.73-7.84 (m, 3H, 3H-quinolina), 7.51-7.60 (m, 2H, H-quinolina, H_5), 6.24 (d, 1H, H_4), 5.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES^+MS] m/z 267 (MH^+).

Compuesto 97e: 1-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)isoquinolina.



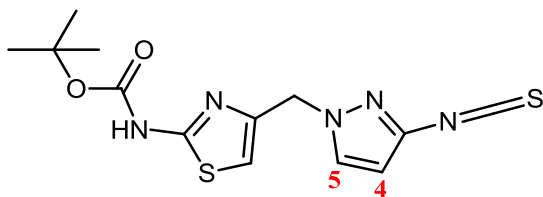
Reactivo de partida: 0.45 mmol del compuesto 96e.

Rto.: 0.37 mmol, 84%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.41-8.43 (m, 1H, H-quinolina), 8.34-8.36 (m, 1H, H-quinolina), 8.01-8.02 (m, 1H, H-quinolina), 7.96 (d, $J = 2.53$ Hz, 1H, H_5), 7.82-7.84 (m, 2H, 2H-quinolina), 7.72-7.74 (m, 1H, H-quinolina), 6.45 (d, $J = 2.53$ Hz, 1H, H_4), 5.97 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

[ES^+MS] m/z 267 (MH^+).

Compuesto 97f: (4-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiazol-2-il)carbamato de *tert*-butilo.

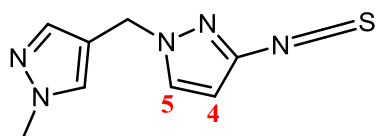


Reactivo de partida: 0.21 mmol del compuesto 96f.

Rto.: 0.20 mmol, 92%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 11.50 (s a, 1H, -NHCO-), 7.83 (d, 1H, H₅), 7.01 (s, 1H, H-tiazol), 6.43 (d, 1H, H₄), 5.22 (s, 2H, -NCH₂-), 1.47 (s, 9H, *tert*butilo).

Compuesto 97g: 3-isotiocianato-1-((1-metil-1*H*-pirazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol.



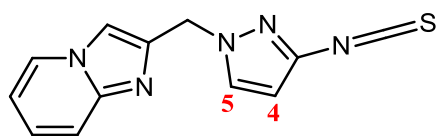
Reactivo de partida: 0.56 mmol de 1-((1-metil-1*H*-pirazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-amina.

Rto.: 0.56 mmol, 99%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.79 (d, *J* = 2.27 Hz, 1H, H₅), 7.69 (s, 1H, H-pirazol), 7.39 (s, 1H, H-pirazol), 6.37 (d, *J* = 2.4953b Hz, 1H, H₄), 5.10 (s, 2H, -CH₂-), 3.78 (s, 3H, -CH₃).

[ES⁺MS] m/z 220 (MH⁺).

Compuesto 97h: 2-((3-isotiocianato-1*H*-pirazol-1-il)metil)imidazo[1,2-*a*]piridina.



Reactivo de partida: 0.47 mmol de 1-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-amina.

Rto.: 0.29 mmol, 63%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.82-8.84 (m, 1H, H-imidazol), 8.24 (s, 1H, H-imidazol), 7.98 (d, *J* = 2.53b Hz, 1H, H₅), 7.84-7.85 (m, 3H, 3H-imidazol), 6.50 (d, *J* = 2.27 Hz, 1H, H₄), 5.62 (s, 2H, -CH₂-).

[ES⁺MS] m/z 256 (MH⁺).

fase reversa. Se utilizó una columna X-Bridge de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (30:70, 100:0) en condiciones neutras.

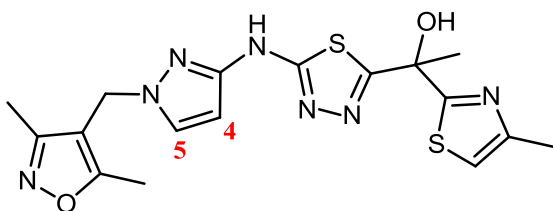
Rto.: 7.51 mmol, 70%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.89 (s a, 1H, -NH-), 7.75 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H₅), 7.31 (s, 1H, H-tiazol), 7.20 (s, 1H, -OH), 6.05 (s, 1H, H-oxazol), 5.95 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H₄), 5.26 (s, 2H, -CH₂-), 2.34 (s a, 3H, -CH₃), 2.29 (s, 3H, -CH₃), 1.97 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 12.22, 17.36, 28.76 (3CH₃), 46.90 (CH₂), 74.69 (C-OH), 94.64 (C₄), 101.66, 115.30 (CH_(oxazol), CH_(tiazol)), 132.80 (C₅), 149.09 (C-NH), 152.45, 160.86 (C_(tiazol)-CH₃, C_(Ar)-CH₂), 164.56, 168.68, 170.39, 175.73 (2C_(tiadiazol), C_(oxazol)-CH₃, C_(tiazol)-S).

[ES⁺MS] m/z 404 (MH⁺).

Compuesto 100: 1-(5-(((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.21 mmol del compuesto 97c y 0.23 mmol del compuesto 53b.

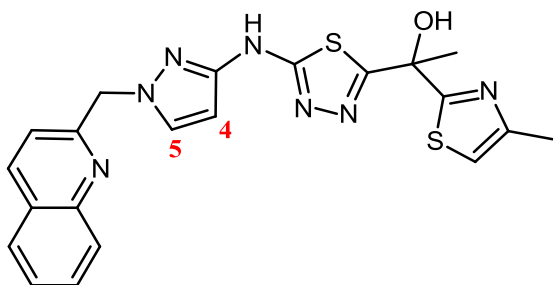
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Terra de dimensiones (10 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (20:80, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en el disolvente acuoso).

Rto.: 0.05 mmol, 20%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 10.89 (s a, 1H, -NH-), 7.72 (d, $J = 2.20$ Hz, 1H, H₅), 7.27 (s, 1H, H-tiazol), 7.22 (s, 1H, -OH), 5.85 (d, $J = 2.20$ Hz 1H, H₄), 5.01 (s, 2H, -CH₂-), 2.41 (s, 3H, -CH₃), 2.30 (s, 3H, -CH₃), 2.18 (s, 3H, -CH₃), 1.98 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, -CHCH₃).

[ES⁺MS] m/z 418 (MH⁺).

Compuesto 101: 1-(4-metiltiazol-2-il)-1-(5-((1-(quinolin-2-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.25 mmol del compuesto 97d y 0.25 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Bridge de dimensiones (19 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (30:70, 100:0) en condiciones básicas (0.1% de bicarbonato amónico en el disolvente acuoso).

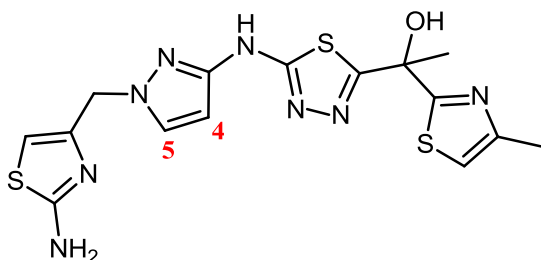
Rto.: 0.10 mmol, 38%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.90 (s a, 1H, -NH-), 7.94-8.00 (m, 1H, H-quinolina), 7.85 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, H_5), 7.74-7.80 (m, 1H, H-quinolina), 7.57-7.62 (m, 1H, H-quinolina), 7.24 (s, 1H, H-tiazol), 7.14-7.17 (m, 2H, H-quinolina, -OH), 6.03 (d, $J = 2.34$ Hz 1H, H_4), 5.51 (s, 2H, - CH_2 -), 2.26 (s a, 3H, - CH_3), 1.95 (s, 3H, - CHCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 17.33, 28.70 (2 CH_3), 57.56 (CH_2), 74.64 (C-OH), 94.63 (C_4), 115.26 (CH-tiazol), 119.99 (C_5), 127.03 (CH-Ar), 127.43 (C-Ar), 128.36, 129.02, 130.37, 133.30, 137.52 (5CH-Ar), 147.37 (C-Ar), 149.20 (C-pirazol-NH), 152.40 (C-tiadiazol-NH), 157.89, 164.64, 175.76 (2C-tiadiazol, $\text{C}(\text{Ar}, \text{CH}_2)$).

[ES^+MS] m/z 450 (MH^+).

Compuesto 102: 1-(5-((1-((2-aminotiazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.18 mmol del compuesto 97f y 0.18 mmol del compuesto 53b.

Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

Rto.: 0.05 mmol, 26%.

Reactivo de partida: 0.29 mmol del compuesto 97h y 0.29 mmol del compuesto 53b.

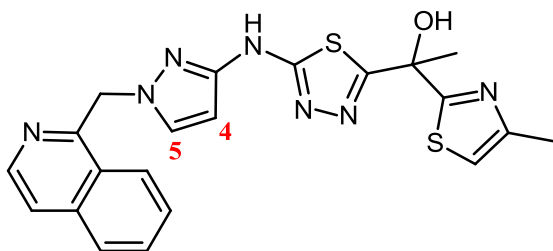
Purificación: El compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se utilizó una columna X-Bridge de dimensiones (30 mm x 150 mm) y como eluyente un gradiente lineal de acetonitrilo:agua (10:90, 100:0) en condiciones ácido (0.1% de ácido trifluoroacético en ambos disolventes).

Rto.: 0.06 mmol, 22%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.84 (s a, 1H, -NH-), 8.48-8.50 (m, 1H, H-imidazopiridina), 7.76 (s a, 1H, H-tiazol), 7.70 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H_5), 7.48-7.50 (m, 1H, H-imidazopiridina), 7.28 (s a, 1H, -OH), 7.22-7.26 (m, 1H, H-imidazopiridina), 7.18-7.19 (m, 1H, H-imidazopiridina), 6.86-6.90 (m, 1H, H-imidazopiridina), 5.96 (d, $J = 2.27$ Hz 1H, H_4), 5.32 (s, 2H, - CH_2 -), 2.27-2.28 (m, 3H, - CH_3), 1.97 (s a, 3H, - CH_3).

[ES^+MS] m/z 439 (MH^+).

Compuesto 105: 1-(5-((1-(isoquinolin-1-ilmetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etanol.



Reactivo de partida: 0.37 mmol del compuesto 97e y 0.37 mmol del compuesto 53b.

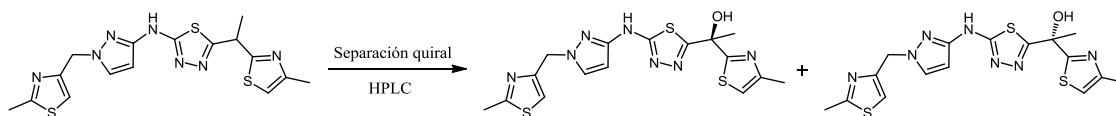
Purificación: Cromatografía en gel de sílice usando como eluyente un gradiente lineal de diclorometano:metanol (100:0 a 90:10).

Rto.: 0.13 mmol, 46%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 10.31 (s a, 1H, -NH-), 8.43-8.48 (m, 2H, 2H-isoquinolina), 8.42-8.43 (m, 1H, H-isoquinolina), 7.97-7.98 (m, 1H, H-isoquinolina), 7.71-7.80 (m, 3H, 1H-isoquinolina, H-tiazol, H_5), 7.60-7.64 (m, 1H, H-isoquinolina), 7.22 (s, 1H, -OH), 5.87-5.88 (m, 2H, - NCH_2 -), 5.68 (s a, 1H, H_4), 2.34 (s a, 3H, - CH_3), 1.81 (s a, 3H, - CH_3).

[ES^+MS] m/z 450 (MH^+).

4.1.5.6. Separación de los enantiómeros del compuesto 98



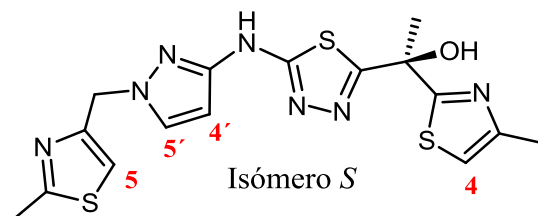
Compuesto 98

Compuesto 106

Compuesto 107

El compuesto **98** (300 mg, 0.715 mmol) se separó en sus dos enantiómeros correspondientes, compuesto **106** y compuesto **107**, por cromatografía líquida de alta resolución de tipo semipreparativo utilizando una columna de fase estacionaria quiral, CHIRALPAK-AD 20x250mm y un gradiente isocrático de ACN/MeOH-iPrOH (60:40) en una proporción 95:5, utilizando un 0.1% isopropilamina como aditivo. La mezcla de disolventes eluyó a un flujo de 17 mL/min y la longitud de onda empleada en la detección fue de 254 nm. El compuesto 98 se disolvió en 6 mL de una mezcla de metanol/acetonitrilo de grado de HPLC. Se necesitaron 4 inyecciones para separar la totalidad de la muestra. Tras colectar las fracciones deseadas y eliminar disolventes se obtuvieron los dos enantiómeros.

Compuesto 106: (S)-1-(4-metiltiazol-2-il)-1-(5-((1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)etanol.



El compuesto **106** eluyó en primer lugar, se obtuvieron (103 mg, 0.715 mmol, 67%) como sólido blanco.

Condiciones de la cromatografía analítica quiral: Se empleó una columna CHIRALPAK-AD 4.6x150mm y como eluyente una mezcla isocrática (95:5) de acetonitrilo (metanol:isopropanol)(60:40). Se utilizó como aditivo básico un 0.1% de isopropilamina en todos los disolventes. La mezcla eluyó a un flujo de 1mL/min. El tiempo de retención registrado para el compuesto fue de 7.48 min.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.93 (sa, 1H, -NH), 7.75 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H, H_{5'}), 7.38 (sa, 1H, H₅), 7.33 (s, 1H, -OH), 7.28-7.29 (m, 1H, 1H₄), 6.03 (d, *J* = 2.27 Hz, 1H, H_{4'}), 5.32 (s, 1H, -CH₂), 2.68 (s, 3H, -CH₃-tiazol), 2.37 (s, 3H, -CH₃-tiazol), 2.02 (d, *J* =

4.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

4.2.1 Ensayo de Inhibición de la enzima InhA (ensayo enzimático).

La enzima InhA es capaz de catalizar la reducción de 2-*trans*-enoil-CoA con oxidación concomitante de NADH a NAD⁺. El ensayo de valoración de su actividad está basado en la detección del NADH consumido durante la reacción enzimática.

El ensayo de inhibición se realizó utilizando la enzima recombinante InhA de *Mycobacterium tuberculosis*, expresada en *Escherichia coli* y posteriormente purificada. El ensayo estándar para la determinación de las constantes cinéticas y la actividad inhibitoria contenía: 5 nM de InhA, 50 μM de dodecenoil-CoA (DDCoA) y 50 μM de NADH como sustratos. El ensayo fue realizado en tampón PIPES pH 6,8 conteniendo 0,05% de BSA. Los compuestos a analizar como inhibidores enzimáticos fueron disueltos en 100 % de DMSO; tres diluciones progresivas 1:3 fueron utilizadas partiendo de una concentración inicial de 25 μM (o 1 μM en el caso de los compuestos más potentes como inhibidores) para la obtención de las curvas dosis-respuesta. El compuesto triclosan fue utilizado como control positivo en cada experimento. 1 μL de cada disolución de compuesto fue añadido a pocillos conteniendo 25 μL de una mezcla DDCoA + NADH, y la reacción fue iniciada mediante la adición de 50 μL de disolución de la enzima. La fluorescencia del NADH en el ensayo fue seguida durante 20 minutos a temperatura ambiente en un fluorímetro *Spectramax Molecular Devices*, con una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 380 nm. Los valores de concentración inhibitoria (IC₅₀) fueron determinados empleando las velocidades iniciales de consumo de NADH.

4.2.2 Ensayo de Inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ensayo en célula entera).

La valoración de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los compuestos analizados se realizó en placas de microtitulación de poliéster de 96 pocillos (fondo plano). Partiendo de una disolución inicial de 400 μM de cada compuesto, diez diluciones progresivas 1:2 en DMSO fueron realizadas. 5 μl de cada una de las disoluciones se añadieron a 95 μL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco; pocillos situados en filas A-H, columnas 1-10 en microplaca). El compuesto isoniazida fue utilizado como control positivo, utilizando 8 diluciones progresivas de

una disolución inicial 160 µg/ml de este compuesto. Al igual que con los compuestos a analizar, 5 µL de cada disolución de isoniazida control fueron añadidos a 95 µL de medio Middlebrook 7H9 (columna 11, posiciones A-H en microplaca). Un último ensayo blanco y de control de crecimiento celular fue incluido en la columna 12 de la microplaca en cada ensayo, conteniendo 5 µL de DMSO en el medio de cultivo.

El inóculo del cultivo inicial fue estandarizado en aproximadamente 1×10^7 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) y diluido 1:100 en medio Middlebrook 7H9 (medio Middlebrook ADC –albúmina, dextrosa y catalasa- enriquecido, un medio de cultivo deshidratado capaz de suplementar el crecimiento de especies de *mycobacterium*) para producir el inóculo final de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25618). 100 µl de este inóculo fueron añadidos a cada pocillo de la microplaca a ensayar, a excepción de los situados en posición G-12 y H-12 (ensayos blanco). Todas las microplacas fueron situadas en cajas selladas para evitar el secado de los pocillos, e incubadas a 37°C sin agitación durante 6 días. Una disolución de resazurin fue preparada mediante disolución de una tableta de este compuesto (VWR International Ind.) en 30 ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril. 25 µL de esta disolución fueron añadidos a cada pocillo. Transcurridas 48 horas se valoró la fluorescencia de cada ensayo utilizando un fluorímetro *Spectramax Molecular Devices*, con una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm, para determinar el valor de MIC para cada compuesto.

4.2.3 Ensayo *in vitro* para la determinación de cardiotoxicidad: inhibición del canal de potasio, hERG.

La metodología del ensayo se realizó se desarrolló según los fundamentos descritos en las siguientes referencias:

- Webster R, Leishman D and Walker D. Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsade de pointes. *Current Opinion in Drug Discovery and Development.*, **2002**, 5, 116-126
- De Bruin ML et al. Anti-hERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur. Heart J.* **2005**, 26, 590-597.
- Redfern WS et al. Relationship between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsades de pointes

for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc.Res.*, **2003**, 58, 32-45.

4.2.4. Ensayo *in vitro* para la determinación de la citotoxicidad en células HepG2.

La metodología del ensayo se realizó se desarrolló según los fundamentos descritos en la siguiente referencia:

- S.P.M. Crouch , R. Kozlowski a, K.J. Slater b and J. Fletcher . The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **1993**, 160, 81-88.

4.2.5. Ensayo *in vitro* para la determinación de la inhibición de los CYP3A4.

El perfil de inhibición de los compuestos se determinó siguiendo los fundamentos descritos en la siguiente referencia.

- Kajbaf, M.; Longhi, R.; Montanari, D.; Vinco, F.; Rigo, M.; Fontana, S.; Read, K. D.; A Comparative Study of the CYP450 Inhibition Potential of Marketed Drugs Using Two Fluorescence Based Assay Platforms Routinely Used in the Pharmaceutical Industry. *Drug Metabolism Lett.* **2011**, 5, 30-39.

4.2.6. Estabilidad en fracción microsomal.

En el ensayo se emplearon microsomas de hígado de ratón comerciales de Xenotech. Los microsomas (concentración final de proteína de 0,5 mg / ml), el MgCl₂ (concentración final 5 mM) y el compuesto a ensayar (concentración de sustrato final 0,5 M; concentración final de DMSO 0,5%) en 0,1 M tampón fosfato pH 7,4 fueron pre-incubados a 37 ° C antes de la adición de NADPH (concentración final 1 mM) para iniciar la reacción. El volumen final de incubación fue de 600 µL. Las incubaciones se realizaron por separado para cada compuesto del ensayo. Cada compuesto se incubó durante 30 minutos y se tomaron (90 µL) de incubado a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de la muestra a 200 µL de acetonitrilo: metanol (3: 1) que contenía un patrón interno . Las muestras terminadas se centrifugaron a 3700 rpm durante 15 minutos a 4 ° C para precipitar la proteína y realizar el análisis cuantitativo. Después de la precipitación de proteínas, las

muestras se analizaron usando condiciones específicas LC-MS /MS: a partir de una parcela de pico ln relación de área (área del pico de compuesto / área de pico del patrón interno) frente al tiempo, se determinó la pendiente de la línea. Posteriormente, la vida media y el aclaramiento intrínseco se calcularon usando las ecuaciones descritas a continuación:

Tasa constante de eliminación (k) = (- gradiente)

La mitad de la vida ($t_{1/2}$) (min) = $0,693 / k$

Aclaramiento intrínseco (Clint) ml / min / g de proteína) = $V \times 0.693 / t_{1/2}$

donde el volumen V = Incubación ml / g de proteína microsomal.

Las muestras biológicas humanas utilizadas se obtuvieron de forma ética y su uso en investigación se realizó con el consentimiento informado requerido.

4.2.7. ChromlogD (pH=7.4): Índice cromatográfico medida de la lipofilia.

La determinación del ChromlogD se llevó a cabo en un equipo de HPLC (Agilent 1100) empleando una columna LUNA (5 μ , C18. 50 x 3.0mm) y como fases móviles: una disolución 50 mM de acetato amónico en agua, ajustada a un pH 7.4 con amoníaco y acetonitrilo de grado de HPLC. Para la calibración del equipo se utilizaron los siguiente patrones, con los siguientes valores teóricos de CHI a pH= 7.4 : teofilina (18.4) , feniltetrazol (23.6), benzimidazol (34.3), colchicina (42.0), fenilteofilina (51.2), acetofenona (65.1), indol (71.5), propiofenona (77.4), butirofenona (87.5) y valerofenona (96.2). Las muestras se prepararon en dimetilsulfóxido a una concentración 10 mM en placas de microtitulación y el análisis se realizó a un flujo de 1 mL/min, a T=40°C utilizando el siguiente gradiente de disolventes (0.0 - 2.5 min 100% B, 2.5 - 3.0 min 100% B, 3.0 - 3.2 min 100% A y 3.2 - 4.0 min 100% A). Siendo B acetonitrilo de grado de HPLC y A la disolución acuosa 50 mM de acetato amónico en agua (pH=7.4). La detección se llevó a cabo por absorción en la región del UV a las distintas longitudes de onda: 215 nm, 230 nm, 256 nm, 350 nm y 450 nm. El cálculo del

chromlogD se siguió la siguiente fórmula matemática: $\text{chromlogD} = \text{CHI} \times 0.0857 - 2$. Siendo CHI= tiempo de retención (tR) x pendiente.

4.2.8. Unión a albúmina en suero humano.

Los compuestos da ensayar se disolvieron en dimetilsulfóxido a una concentración 10 mM, de las cuales se tomaron 10 uL y se diluyeron con 990 uL de una mezcla 50:50 de la fase móvil A y la fase móvil B. Siendo A, una disolución acuosa de acetato amónico 50 mM (pH=7.4) y B 2-propanol. El análisis se realizó en un equipo de HPLC Agilent 1100, empleando una columna Chromtech HSA 50 x 3.0 mm (5 micras) con un flujo de 1.8 mL/min, a T=30°C utilizando el siguiente gradiente de disolventes (0.0 – 3.0 min (0-30% B), 3.0 – 5.0 min (30% B), 5.0 - 5.1 min (30-0%) B y 5.1 - 6 min (0% B). La detección se llevó a cabo por absorción en la región del UV a las distintas longitudes de onda: 215 nm y 254 nm. Para la calibración del equipo se utilizaron los siguiente patrones, con los siguientes valores teóricos de unión a albúmina en suero humano: warfarina (98 %), nizatidina (35%), bromazepam (60%), carbamazepina (75 %), budesonid (88 %), nicardipina (95 %), indometacina (99 %), piroxicam (94.5 %), naproxeno (99.7 %), ketoprofeno (98.9%) y diclofenaco (99.8%).

4.2.10. Ensayo *in vivo* de farmacocinética en ratón.

Los estudios de farmacocinética se han llevado a cabo en ratones hembra C57BL/6J (18-20 g). Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.

El compuesto objeto de estudio ha sido administrado por vía intravenosa (4 mg/kg a 10 ml/kg), en solución compuesta por Encapsina20%/salino 80%, y por vía oral (50 mg/kg a 20ml/kg) como suspensión en 1% metil-celulosa (el sólido fue previamente sometido a micronización para reducir el tamaño de partícula y facilitar su absorción).

Tras administración de una dosis única por vía intravenosa y oral, se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos post-administración a n=4 ratones por tiempo:

Vía intravenosa (4 mg/kg): 10, 20 y 30 minutos, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 8 horas.

Vía oral (50 mg/kg): 15, 30 y 45 minutos, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 8 horas.

A los tiempos post-tratamiento indicados anteriormente se extrajo la sangre a cada ratón mediante asfixia por CO₂ seguida de punción cardiaca. Dos alícuotas de 50 ul se mezclaron inmediatamente con el mismo volumen de saponina para producir el lisado de la sangre. Todas las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su análisis para

determinar la cantidad de compuesto presente en la mismas mediante una técnica de LC/MS-MS (límite de cuantificación 5 ng/ml).

Una vez determinada la concentración de compuesto por cada tiempo de muestreo se procedió al análisis farmacocinético de los perfiles concentración-tiempo mediante análisis No Compartmental con el software WinNonlin 5.2 (Pharsight, Certara L.P).

Los estudios de farmacocinética fueron éticamente revisados y llevados a cabo de acuerdo con la Directiva Europea 86/609/EEC y la política GSK de Cuidado, Bienestar y Tratamiento de los animales.

4.2.10. Ensayo *in vivo* para la determinación de la eficacia terapéutica en el modelo de infección aguda de ratón.

La metodología de este ensayo el modelo de infección aguda en se ha desarrollado por el grupo de eficacia terapéutica en nuestras instalaciones y se encuentra descrita en la siguiente referencia bibliográfica.

- Rullas J. et al. Antimicrob. Agents Chemother, **2010**, *54*, 2262 –2264.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo dentro de un proyecto de investigación de la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) y está dirigido al desarrollo de nuevos inhibidores de la enoil-ACP-reductasa (InhA) de *Mycobacterium tuberculosis*, con el objeto de explorar la aplicabilidad terapéutica en el tratamiento de la tuberculosis. Así, se ha desarrollado la síntesis de nuevos derivados del compuesto identificado como cabeza de serie **GSK1**, considerando las modificaciones estructurales de las denominadas región derecha e izquierda de la molécula (Fig.41).

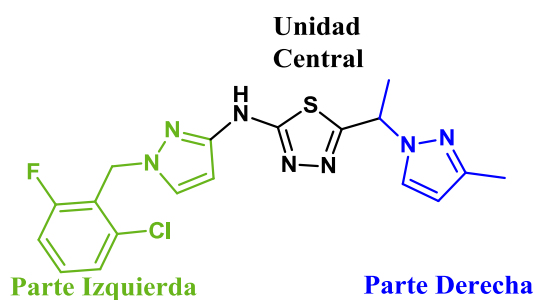


Figura 41. Estructura compuesto **GSK1**.

A continuación se enumeran las conclusiones extraídas de este trabajo de investigación:

Secciones 3.2 y 3.3

1. Se ha optimizado la ruta sintética necesaria para la obtención de los compuestos objetivo, descritos en estas secciones.
 - El grupo protector acetilo resultó ser el más adecuado para lograr la regioselectividad deseada en el primer paso de la ruta sintética.
 - Para evitar la sulfonación del benceno en aquellos casos en los que el anillo está activado frente a la sustitución electrófila aromática, la ciclación con oxiclورو de fósforo en condiciones de reflujo resultó ser la alternativa preferida a la ciclación con ácido sulfúrico concentrado.
2. Como resultado de las modificaciones realizadas a cabo en la región izquierda, variando sustituyentes y patrones de sustitución en el grupo fenilo, se

obtuvieron nuevos derivados de la estructura **GSK1**. De los cuales doce mostraron una actividad enzimática de unidades de nanomolar, presentando dos de ellos una MIC del orden de unidades de micromolar.

- Se concluye que es necesaria la presencia de un grupo halógeno en la posición *orto* para mantener los niveles de actividad en célula entera mostrados por el cabeza de serie **GSK1**.
 - La sustitución en posición *para* conlleva una considerable pérdida de actividad tanto a nivel enzimático como a nivel celular.
 - La introducción de sustituyentes polares en el anillo no mejora la actividad.
 - La metilación del nitrógeno puente de la estructura conlleva una drástica pérdida de actividad tanto a nivel enzimático como en célula entera.
3. La optimización de la separación quiral mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase estacionaria quiral y la posterior caracterización por dicroísmo circular vibracional puso de manifiesto que en la serie de los 1,3,4-tiadiazoles, los enantiómeros que conforman el racémico presentaron distintas propiedades biológicas, siendo el enantiómero de configuración *S* el responsable de la actividad biológica.
 4. El compuesto **58**, identificado como el más prometedor de la serie, presentó claras desventajas a nivel de estabilidad microsomal y potencial riesgo de interacciones fármaco-fármaco. Se concluyó por tanto que era necesario seguir trabajando en la región izquierda de la molécula con el objetivo de eliminar o mitigar los problemas identificados en esta serie.

Sección 3.4

5. Se han optimizado las etapas necesarias para la obtención de los compuestos objetivo.
6. El reemplazo del anillo de benceno por el heterociclo de piridina genera un aumento de polaridad en la estructura provocando una reducción de la actividad tanto a nivel enzimático como celular y una mejora de la estabilidad

microsomal. En cuanto a la inhibición de los CYP3A4 no se encontró un efecto claro.

7. Como resultado del reemplazo del anillo de benceno por el heterociclo de piridina se obtuvieron 16 derivados de los cuales 2 mostraron una actividad enzimática del orden de unidades de nanomolar, uno de ellos presentó un valor submicromolar de MIC.
 - La presencia de un halógeno en posición *orto* favorece la interacción enzimática, mientras que la sustitución en posición *para* conlleva una pérdida de actividad tanto enzimática como celular. Estas observaciones coinciden con las vistas en la serie de los arilos lo que indica que el SAR analizado en el capítulo anterior puede ser extensivo a la familia de los 1,3,4-tiadiazoles o al menos servir como guía en el diseño de nuevos derivados.
8. El cambio estructural del 3,5-dimetilpirazol por el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol no tiene un impacto claro a nivel de interacción enzimática, sin embargo procura una mejora de la potencia a nivel celular.
9. Teniendo en cuenta el estudio de la influencia de los diferentes parámetros físico-químicos en la actividad a nivel celular, realizado en esta sección, se corrobora que la inhibición del crecimiento de la micobacteria depende de diferentes parámetros como lipofilia, solubilidad y permeabilidad a parte de la necesaria interacción enzimática. Se concluye también que el 1-(4-metiltiazol-2-il)etanol proporciona a las moléculas las propiedades físico-químicas adecuadas para poder llegar a ser fármacos.
10. El compuesto **90** presenta el mejor perfil farmacológico en la serie. Al no presentar los valores de exposición esperados en los ensayos *in vivo* este derivado no fue progresado a estudios más avanzados. Se concluye que es necesario seguir optimizando la región izquierda de la molécula.

Sección 3.4

11. Como resultado del ejercicio de exploración de distintos sistemas heterocíclicos, se obtuvieron 8 derivados de los cuales cinco presentaron valores de MIC del orden de unidades de micromolar y submicromolar en uno de los casos, ninguno mostró una actividad enzimática de unidades de nanomolar.
 - La introducción de sustituyentes polares afecta negativamente a la actividad, tanto a nivel de enzima como de célula entera.
 - La presencia de un átomo de nitrógeno en posición 2, parece ser requerida para favorecer el reconocimiento por el enzima. El diseño y ensayo de nuevos derivados sería necesario para corroborar esta hipótesis.
 - La exploración de sistemas benzocondensados no reportó ninguna ventaja a nivel de actividad o propiedades ADMET.
12. El reemplazo del anillo de benceno por el 4-metiltiazol ha permitido identificar al compuesto **106**, como el derivado más prometedor de esta serie.
13. El compuesto **106** fue progresado al ensayo de eficacia de infección aguda en ratón mostrando una capacidad significativa de reducir la carga bacteriana. Este compuesto presentó una $ED_{99} = 87$ mg/kg, comparable con alguno de los compuestos que actualmente se encuentran en ensayos clínicos.

Conclusión final

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido desarrollado dentro del proyecto de investigación “InhA: inhibidores de la ACP-enoilreductasa de tuberculosis” y ha contribuido a la identificación de un nuevo inhibidor directo de la enzima InhA que actualmente se encuentra en estudios de combinación.

El esfuerzo realizado en la escritura de esta tesis me ha permitido ampliar los conocimientos en la disciplina de Química Médica, desarrollando una mejor capacidad de análisis de resultados así como una visión global del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial anual sobre la tuberculosis 2014. **2014**.
2. Center for the Control Disease and Prevention. The difference between latent TB infection and active TB disease. Tuberculosis Program. **2005**.
3. Tuberculosis-Patogenia-Situación Actual.
<http://www.svnp.es/sites/default/files/infectbc.pdf> (consultado el 22 de octubre de 2015)
4. Center for the Control Disease and Prevention. Tuberculosis Education and Training network. Chapter 2: Transmission and Pathogenesis of TB. **2011**.
5. Vergel, G. M.; Tasé, M. J.; Groning, E.; Martínez, C. Antimicrobianos en enfermedades producidas por micobacterias: tuberculosis y lepra. In *Farmacología en el Proceso de Atención en Enfermería. Parte II. Fármacos para las enfermedades producidas por agentes biológicos*, 1st edn.; Yudexy,S.; Pacheco, P., Eds.; Editorial Ciencias Médicas: La Habana, **2009**; pp:115-127.
6. Mathema, B.; Kurepina, N. E.; Bifani, P. J.; Kreiswirth, B. N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microb Rev* **2006**, *19*, 658-685.
7. Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **2011**, *469*, 483-490.
8. Caminero, J. A. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología* **2001**, *37*, 35-42.
9. Center for the Control Disease and Prevention. Tuberculosis Education and Training network. Chapter 6: Treatment of Tuberculosis Disease. **2011**.
10. Cole, S. T.; Riccardi, G. New tuberculosis drugs on the horizon. *Curr Opin Microbiol* **2011**, *14*, 570-576.
11. Organización Mundia de la Salud. Estrategia Alto a la Tuberculosis. **2006**.
12. New Molecular Entity Approvals for 2012.
<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation> (consultado el: 22 de octubre de 2015)
13. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H. W. H.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science* **2005**, *307*, 223-227.

14. Koul, A.; Vranckx, L.; Dendouga, N.; Balemans, W.; Van den Wyngaert, I.; Vergauwen, K.; Göhlmann, H. W. H.; Willebrords, R.; Poncelet, A.; Guillemont, J.; Bald, D.; Andries, K. Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 25273-25280.
15. Rao, S. P. S.; Alonso, S.; Rand, L.; Dick, T.; Pethe, K. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* **2008**, *105*, 11945-11950.
16. Diacon, A. H.; Pym, A.; Grobusch, M.; Patientia, R.; Rustomjee, R.; Page-Shipp, L.; Pistorius, C.; Krause, R.; Bogoshi, M.; Churchyard, G.; Venter, A.; Allen, J.; Palomino, J. C.; De Marez, T.; van Heeswijk, R. P. G.; Lounis, N.; Meyvisch, P.; Verbeeck, J.; Parys, W.; de Beule, K.; Andries, K.; Neeley, D. F. M. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2397-2405.
17. World Health Organization. Treatment of Tuberculosis Guidelines 4th edn. 2010.
18. Khan, T. BD live. Council nod to little-tested killer-TB drug. **2013**. (Disponibile en: <http://www.bdlive.co.za/national/health/2013/01/08/council-nod-to-little-tested-killer-tb-drug>. Consultado el: 22 de octubre de 2015)
19. Migliori, G. B.; Sotgiu, G.; Gandhi, N. R.; Falzon, D.; DeRiemer, K.; Centis, R.; Hollm-Delgado, M. G.; Palmero, D.; Pérez-Guzmán, C.; Vargas, M. H.; Ambrosio, L.; Spanevello, A.; Bauer, M.; Chan, E. D.; Schaaf, H. S.; Keshavjee, S.; Holtz, T. H.; Menzies, D.; Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* **2013**, *42*, 169-179.
20. Lin, P. L.; Dartois, V.; Johnston, P. J.; Janssen, C.; Via, L.; Goodwin, M. B.; Klein, E.; Barry, C. E.; Flynn, J. L. Metronidazole prevents reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in macaques. *Proc Natl Acad Sci* **2012**, *109*, 14188-14193.
21. Working Group on New TB Drugs. Drug Pipeline. Pretomanid (PA-824). **2013**. (Disponibile en: <http://www.newtbdrugs.org/project.php?id=25>. Consultado el: 22 de octubre de 2015).
22. Otsuka Pharmaceutical Development & Commercialization, I. Safety and efficacy trial of delamanid for 6 months in patients with multidrug resistant Tuberculosis. **2015**. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01424670> (consultado el: 22 de octubre de 2015)

23. Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E. PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. *Science* **2008**, 322, 1392-1395.
24. Manjunatha, U. B. H. I. & B. C. E. The mechanism of action of PA824: Novel insights from transcriptional profiling. *Commun Integr Biol* **2009**, 2, 215-218.
25. Diacon, A. H.; Dawson, R.; du Bois, J.; Narunsky, K.; Venter, A.; Donald, P. R.; van Niekerk, C.; Erond, N.; Ginsberg, A. M.; Becker, P.; Spigelman, M. K. Phase II dose-ranging trial of the early bactericidal activity of PA-824. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, 56, 3027-3031.
26. Diacon, A. H.; Dawson, R.; von Groote-Bidlingmaier, F.; Symons, G.; Venter, A.; Donald, P. R.; van Niekerk, C.; Everitt, D.; Winter, H.; Becker, P.; Mendel, C. M.; Spigelman, M. K. 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *The Lancet* **2015**, 380, 986-993.
27. Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H.; Sasaki, H.; Shimokawa, Y.; Komatsu, M. OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med* **2006**, 3, 2131-2144.
28. Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2006**, 103, 431-436.
29. Manjunatha, U. H.; Lahiri, R.; Randhawa, B.; Dowd, C. S.; Krahenbuhl, J. L.; Barry, C. E. Mycobacterium leprae is naturally resistant to PA-824. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, 3350-3354.
30. Hurdle, J. G.; Lee, R. B.; Budha, N. R.; Carson, E. I.; Qi, J.; Scherman, M. S.; Cho, S. H.; McNeil, M. R.; Lenaerts, A. J.; Franzblau, S. G.; Meibohm, B.; Lee, R. E. A microbiological assessment of novel nitrofuranylamides as anti-tuberculosis agents. *J Antimicrob Chemother* **2008**, 62, 1037-1045.
31. Nuermberger, E. L.; Yoshimatsu, T.; Tyagi, S.; O'Brien, R. J.; Vernon, A. N.; Chaisson, R. E.; Bishai, W. R.; Grosset, J. H. Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**, 169, 421-426.

32. Ma, Z.; Lienhardt, C.; McIlleron, H.; Nunn, A. J.; Wang, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *The Lancet* **2010**, *375*, 2100-2109.
33. Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 388-404.
34. Rosenthal, I. M.; Zhang, M.; Williams, K. N.; Peloquin, C. A.; Tyagi, S.; Vernon, A. A.; Bishai, W. R.; Chaisson, R. E.; Grosset, J. H.; Nuermberger, E. L. Daily dosing of rifapentine cures tuberculosis in three months or less in the murine model. *PLoS Med* **2007**, *4*, 1931-1939.
35. The Tuberculosis Trials Consortium. Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients: a randomised clinical trial. *The Lancet* **2002**, *360*, 528-534.
36. TB Alliance. Change starts in clinical trials. Annual Report 2013. (Disponible en: <http://www.tballiance.org/annualreport2013/clinical.htm>. Consultado el: 22 de octubre de 2015).
37. Vasan, M.; Neres, J.; Williams, J.; Wilson, D. J.; Teitelbaum, A. M.; Remmel, R. P.; Aldrich, C. Inhibitors of the salicylate synthase (MbtI) from *Mycobacterium tuberculosis* discovered by high-throughput screening. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 2079-2087.
38. Burk, O.; Wojnowski, L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Arch Pharmacol* **2004**, *369*, 105-124.
39. Guzelian, J.; Barwick, J. L.; Hunter, L.; Phang, T. L.; Quattrochi, L. C.; Guzelian, P. S. Identification of genes controlled by the pregnane X receptor by microarray analysis of mRNAs from pregnenolone 16 α -carbonitrile treated rats. *Toxicol Sci* **2006**, *94*, 379-387.
40. Burk, O.; Koch, I.; Raucy, J.; Hustert, E.; Eichelbaum, M.; Brockmüller, J.; Zanger, U. M.; Wojnowski, L. The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic Sensors regnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem* **2004**, *279*, 38379-38385.
41. Barry III, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research* **1998**, *37*, 143-179.
42. Brennan, P. J.; Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 29-63.

43. Lu, X. Y.; You, Q. D.; Chen, Y. D. Recent progress in the identification and development of InhA direct inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mini Rev Med Chem* **2010**, *10*, 181-192.
44. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R. Jr. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**, 227-230.
45. Dessen, A.; Quemard, A.; Blanchard, J. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1995**, *267*, 1638-1641.
46. Vilchèze, C.; Morbidoni, H. R.; Weisbrod, T. R.; Iwamoto, H.; Kuo, M.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 4059-4067.
47. Scior, T.; Garces-Eisele, S. J. Isoniazid is not a lead compound for its pyridyl ring derivatives, isonicotinoyl amides, hydrazides, and hydrazones: a critical review. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 2205-2219.
48. Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7645-7650.
49. Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2003**, *100*, 13881-13886.
50. Fox, H. H. The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science* **1952**, *116*, 129-134.
51. Pansy, F.; Stander, H.; Donovan, R. In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide. *Am Rev Tuberc* **1952**, *65*, 761-764.
52. Sacchettini, J. C.; Blanchard, J. S. The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. *Res in Microbiol* **1996**, *147*, 36-43.
53. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **1992**, *358*, 591-593.
54. Ghiladi, R. A.; Medzihradzky, K. F.; Rusnak, F. M.; Ortiz de Montellano, P. R. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 13428-13442.

55. Johnsson, K.; Schultz, P. G. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 7425-7426.
56. Johnsson, K.; King, D. S.; Schultz, P. G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 5009-5010.
57. Basso, L. A.; Zheng, R. J.; Blanchard, J. S. Kinetics of inactivation of WT and C234S mutant of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase by activated isoniazid. *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 11301-11302.
58. Scior, T.; Meneses Morales, I.; Garcés Eisele, S. J.; Domeyer, D.; Laufer, S. Antitubercular isoniazid and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* - a review. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **2002**, *335*, 511-525.
59. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H. R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1998**, *279*, 98-102.
60. Lei, B.; Wei, C. J.; Tu, S. C. Action mechanism of antitubercular isoniazid: activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 2520-2526.
61. Abbadi, S. H.; Sameaa, G. A.; Morlock, G.; Cooksey, R. C. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *International. J Infect Dis* **2009**, *13*, 673-678.
62. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; Brennan, P. J.; Loch, C.; Besra, G. S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 28326-31.
63. McMurry, L. M.; Oethinger, M.; Levy, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **1998**, *394*, 531-532.
64. Levy, C. W.; Roujeinikova, A.; Sedelnikova, S.; Baker, P. J.; Stuitje, A. R.; Slabas, A. R.; Rice, D. W.; Rafferty, J. B. Molecular basis of triclosan activity. *Nature* **1999**, *398*, 383-384.
65. McMurry, L. M.; McDermott, P. F.; Levy, S. B. Genetic Evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, 711-713.
66. Stewart, M. J.; Parikh, S.; Xiao, G.; Tonge, P. J.; Kisker, C. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *J Mol Biol* **1999**, *290*, 859-865.

67. Sullivan, T. J.; Truglio, J. J.; Boyne, M. E.; Novichenok, P.; Zhang, X.; Stratton, C. F.; Li, H. J.; Kaur, T.; Amin, A.; Johnson, F.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* **2006**, *1*, 43-53.
68. Lu, H.; Tonge, P. J. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 11-20.
69. Heath, R. J.; Yu, Y. T.; Shapiro, M. A.; Olson, E.; Rock, C. O. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 30316-30320.
70. Pan, P.; Tonge, P. J. Targeting InhA, the FASII enoyl-ACP reductase: SAR studies on novel inhibitor scaffolds. *Curr Top Med Chem* **2012**, *12*, 672-693.
71. Hogenauer, G.; Woisetschlager, M. A diazaborine derivative inhibits lipopolysaccharide biosynthesis. *Nature* **1981**, *293*, 662-664.
72. Bergler, H.; Hogenauer, G.; Turnowsky, F. Sequences of the envM gene and of 2 mutated alleles in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **1992**, *138*, 2093-2100.
73. Baldock, C.; Rafferty, J. B.; Sedelnikova, S. E.; Baker, P. J.; Stuitje, A. R.; Slabas, A. R.; Hawkes, T. R.; Rice, D. W. A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase. *Science* **1996**, *274*, 2107-2110.
74. Baldock, C.; de Boer, G. J.; Rafferty, J. B.; Stuitje, A. R.; Rice, D. W. Mechanism of action of diazaborines. *Biochem Pharmacol* **1998**, *55*, 1541-1550.
75. De Boer, G. J.; Pielage, G. J. A.; Nijkamp, H. J.; Slabas, A. R.; Rafferty, J. B.; Baldock, C.; Rice, D. W.; Stuitje, A. R. Molecular genetic analysis of enoyl-acyl carrier protein reductase inhibition by diazaborine. *Mol Microbiol* **1999**, *31*, 443-450.
76. Roujeinikova, A.; Sedelnikova, S.; De Boer, G. J.; Stuitje, A. R.; Slabas, A. R.; Rafferty, J. B.; Rice, D. W. Inhibitor binding studies on enoyl reductase reveal conformational changes related to substrate recognition. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 30811-30817.
77. Levy, C. W.; Baldock, C.; Wallace, A. J.; Sedelnikova, S.; Viner, R. C.; Clough, J. M.; Stuitje, A. R.; Slabas, A. R.; Rice, D. W.; Rafferty, J. B. A study of the structure-activity relationship for diazaborine inhibition of *Escherichia coli* enoyl-ACP reductase. *J Mol Biol* **2001**, *309*, 171-180.

78. He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. R. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* **2006**, *49*, 6308-6323.
79. Wall, M. D.; Oshin, M.; Chung, G. A. C.; Parkhouse, T.; Gore, A.; Herreros, E.; Cox, B.; Duncan, K.; Evans, B.; Everett, M.; Mendoza, A. Evaluation of N-(phenylmethyl)-4-[5-(phenylmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl]benzamide inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 2740-2744.
80. Encinas, L.; O'Keefe, H.; Neu, M.; Remuiñán, M. J.; Patel, A. M.; Guardia, A.; Davie, C. P.; Pérez-Macías, N.; Yang, H.; Convery, M. A.; Messer, J. A.; Pérez-Herrán, E.; Centrella, P. A.; Álvarez-Gómez, D.; Clark, M. A.; Huss, S.; O'Donovan, G. K.; Ortega-Muro, F.; McDowell, W.; Castañeda, P.; Arico-Muendel, C. C.; Pajk, S.; Rullbs, J.; Angulo-Barturen, I. i.; Álvarez-Ruiz, E.; Mendoza-Losana, A.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J.; Evindar, G. Encoded library technology as a source of hits for the discovery and lead optimization of a potent and selective class of bactericidal direct inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *J Med Chem* **2014**, *57*, 1276-1288.
81. Ward, W. H. J.; Holdgate, G. A.; Rowsell, S.; McLean, E. G.; Pauptit, R. A.; Clayton, E.; Nichols, W. W.; Colls, J. G.; Minshull, C. A.; Jude, D. A.; Mistry, A.; Timms, D.; Camble, R.; Hales, N. J.; Britton, C. J.; Taylor, I. W. F. Kinetic and structural characteristics of the inhibition of enoyl (Acyl Carrier Protein) reductase by triclosan. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12514-12525.
82. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: compound activity and structural data. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 20851-20859.
83. Staveski, M. M.; Sneddon, S. F.; Yee, C.; Janjigian, A. InhA inhibitors and methods of use thereof. [US40045 2001056974]. **2001**.
84. Freundlich, J.; Wang, F.; Vilchèze, C.; Gulten, G.; Langley, R.; Schiehser, G.; Jacobus, D.; Jacobs, W.; Sacchettini, J. Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 241-248.
85. Martínez-Hoyos, M.; Perez-Herran, E.; Gulten, G.; Encinas, L.; Álvarez-Gómez, D.; Emilio A.; Ferrer-Bazaga, S.; García-Pérez, A.; Ortega, F.; Angulo-Barturen, I.; Rullas-Trincado, J.; Blanco Ruano, D.; Torres, P.; Castañeda, P.; Huss, S.; Fernández-Menéndez, R.; González, S.; Ballell, LL.; Barros, D.; Modha, S.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J.D.; García-Bustos, J.F.; Lavandera, J.L.; Sacchettini, J.C.; Jimenez, M.S.; Martín-Casabona, N.; Castro-Pichel, J.; Mendoza-Losana, A. (in press). New

- antitubercular drug for an old target: GSK693 as a novel InhA direct inhibitor. *Chem Biol* **2015**
86. Roussel, C.; Rio, A. D.; Pierrot-Sanders, J.; Piras, P.; Vanthuynne, N. Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers. *J Chromatogr A* **2004**, *1037*, 311-328.
 87. Allenmarck, S.; Gawronski, J. Determination of absolute configuration—an overview related to this special issue. *Chirality* **2008**, *20*, 606-608.
 88. Freedman, T.; Cao, X.; Dukor, R.; Nafie, L. Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. *Chirality* **2003**, *15*, 743-758.
 89. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J. J. The determination of absolute configuration of chiral molecules using vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy. *Chirality* **2008**, *20*, 643-646.
 90. Hirata, T.; Shiro, M.; Nagao, Y. A facile synthesis of 2-acylimino-3-biphenylmethyl-1,3,4-thiadiazoline derivatives. *Heterocycles* **1997**, *44*, 133-138.
 91. Subramanyam, C. 4-methoxybenzyl (PMB), a versatile protecting group for the regiospecific lithiation and functionalization of pyrazoles. *Synth Commun* **1995**, *25*, 761-774.
 92. Dai, Y.; Hartandi, K.; Ji, Z.; Ahmed, A. A.; Albert, D. H.; Bauch, J. L.; Bouska, J. J.; Bousquet, P. F.; Cunha, G. A.; Glaser, K. B.; Harris, C. M.; Hickman, D.; Guo, J.; Li, J.; Marcotte, P. A.; Marsh, K. C.; Moskey, M. D.; Martin, R. L.; Olson, A. M.; Osterling, D. J.; Pease, L. J.; Soni, N. B.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Tapang, P.; Reuter, D. R.; Davidsen, S. K.; Michaelides, M. R. Discovery of N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Med Chem* **2007**, *50*, 1584-1597.
 93. Wag, X.; Spear, K. L.; Fulp, A. B.; Seconi, D.; Suzuki, T.; Ishii, T.; Moritomo, A.; Kubota, H. Polycyclic thiazoles as potassium ion channel modulators. [US 2005/0227989 A1]. **2005**.
 94. García, F. Parámetros para el análisis de las reacciones en química sostenible. *An Quím* **2009**, *105*, 42-49.
 95. Yang, S. J.; Lee, S. H.; Kwak, H. J.; Gong, Y. D. Regioselective synthesis of 2-amino-substituted 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives via reagent-based cyclization of thiosemicarbazide intermediate. *J Org Chem* **2013**, *78*, 438-444.

96. Murry Mc, J. Química del Benceno: Sustitución Electrónica Aromática, Sulfonación Aromática. In *Química Orgánica*; 3rd edn.; Grepe, P.; Ed.; Grupo Editorial Iberoamérica, S.A de C.V.: Mexico, **1994**; pp:540.
97. Raslan, M. A.; Khalil, M. A.; Heterocyclic Synthesis Containing Bridgehead Nitrogen Atom: Synthesis of 3-[(2*H*)-2-Oxobenzo[*b*]pyran-3-yl]-s-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiazine and Thiazole Derivatives. *Heteroat Chem* **2003**, *14*, 114-120.
98. LaMattina, J. L.; Mularski, C. J. Alpha.-hydroxy thioamides: useful intermediates for the synthesis of functionalized thiazoles. *J Org Chem* **1986**, *51*, 413-415.
99. Schwarz, G. 2,4-Dimethylthiazole. *Org Synth* **1945**, *3*, 332.
100. Kirihara, M.; Ogawa, S.; Noguchi, T.; Okubo, K.; Monma, Y.; Shimizu, I.; Shimosaki, R.; Hatano, A.; Hirai, Y. Chemoselective bromination of active methylene and methyne compounds by potassium bromide, hydrochloric acid and hydrogen peroxide. *Synlett* **2006**, *14*, 2287-2289.
101. Cavicchioni, G. Bromoamides as starting materials in the synthesis of α -hydroxy and α -alkoxy derivatives. *Synth Commun* **1994**, *24*, 2223-2227.
102. Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D. Structure-Brain Exposure Relationships. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7559-7583.
103. Kim, H. O.; Kahn, M. The synthesis of aminoazole analogs of lysine and arginine: the Mitsunobu reaction with lysinol and argininol. *Synlett* **1999**, *8*, 1239-1240.
104. Rullas, J.; García, J. I.; Beltrán, M.; Cardona, P. J.; Cáceres, N.; García-Bustos, J. F.; Angulo-Barturen, I. Fast standardized therapeutic-efficacy assay for drug discovery against tuberculosis. *Ant Agents Chem* **2010**, *54*, 2262-2264.

7. RESUMEN EN INGLÉS

The work described in this report has been developed in the DDW (Diseases of the Developing World) GlaxoSmithKline center in Tres Cantos (Madrid) under the direction of Dra. Julia Castro Pichel and Dra. Esther Fernández Velando. This work was done in collaboration with the GATB (Global Alliance for Tuberculosis) organization.

The main objective of this research program has been to identify new InhA inhibitors within the family of thiadiazoles, these molecules should be active against TB-MDR strains and TB-XDR type. These new compounds would be administered in combination, replacing one or more of the drugs used in current regimens of directly observed therapy. The identified compounds should be able to be administered orally, well tolerated and show low generation frequency of resistance.

In the development of this research project the design and synthesis of new modifications in the overall structure of **GSK1**, hit of the thiadiazole series, have been carried out with the aim of improving the enzymatic activity as well as the whole cell potency and physicochemical profile of the new compounds.

Molecules result of the proposed modifications were evaluated in the appropriate biological studies, assessing their potential as anti-TB drugs. After the biological evaluation exercise and SAR study of the series compound **106** was identified as the most promising structure. This compound has been progressed to the Pre-Candidate and is currently in combination studies, contributing that way to the identification of a novel direct inhibitor of the well validated enzyme InhA.