

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 410**

51 Int. Cl.:

C07C 233/62 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2017** **PCT/US2017/051912**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** **WO18053353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2017** **E 17851664 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 3512846**

54 Título: **Inhibidores cetónicos de la lisina gingipaína**

30 Prioridad:

16.09.2016 US 201662395938 P
15.02.2017 US 201762459456 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.12.2024

73 Titular/es:

LIGHTHOUSE PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
5214F Diamond Heights Boulevard, 3470
San Francisco, CA 94131, US

72 Inventor/es:

KONRADI, ANDREI W.;
GALEMMO, ROBERT A., JR.;
DOMINY, STEPHEN S.;
LYNCH, CASEY C. y
HOLSINGER, LESLIE J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 992 410 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores cetónicos de la lisina gingipaína

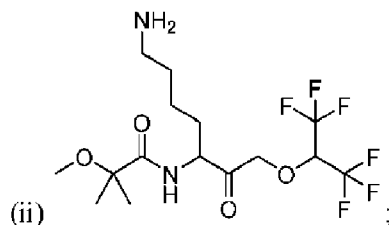
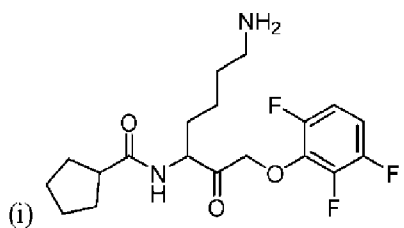
5 Antecedentes de la invención

La infección por la bacteria *Porphyromonas gingivalis* se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad periodontal, Alzheimer y otros trastornos cerebrales, enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, hepatopatía, nefropatía, nacimiento prematuro, artritis, neumonía y otros trastornos. *P. gingivalis* es una bacteria anaerobia asacarolítica gramnegativa en forma de bastón que se sabe que infecta la cavidad oral y se transloca sistémicamente a las arterias coronarias, aorta, tejido placentario, el cerebro, los riñones y el hígado. La bacteria también se ha identificado en tejidos cancerosos y se ha propuesto un mecanismo por el cual las gingipaínas pueden desencadenar la inmortalización y la metástasis. Véanse: Gandhimadhi, *et al.* Journal of Indian Society of Periodontology, 2010; 14(2):114-120; Liao, *et al.*, Med Hypotheses, 2009. 72(6): 732-5; Byrne, *et al.*, Oral Microbiol Immunol, 2009. 24(6): 469-77; Mahindra, *et al.*, J Maxillofac Oral Surg, 2009. 8(2): 108-13; Stelzel, *et al.*, J Periodontol, 2002. 73(8): 868-70; Katz, *et al.*, Journal of Dental Research, 2009. 88(6): 575-578; Poole, *et al.*, J Alzheimers Dis, 2015, 43(1): 67-80; Ishikawa, *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2013. 1832(12): 2035-2043; Inaba, *et al.*, Cellular Microbiology, 2014. 16(1): 131-145.

P. gingivalis produce unas proteasas denominadas gingipaínas, incluyendo la Arginina Gingipaína A (RgpA), la Arginina Gingipaína B (RgpB) y la Lisina Gingipaína (Kgp). Las gingipaínas contribuyen a muchas funciones del organismo, incluyendo su supervivencia y virulencia. Las gingipaínas pueden ser secretadas, transportadas a las superficies de membrana externa de *P. gingivalis*, o liberadas en vesículas de membrana externa por la bacteria. Las gingipaínas degradan una amplia gama de proteínas (por ejemplo, inmunoglobulinas, inhibidores de la proteinasa, actina y colágeno) que pueden provocar el colapso del citoesqueleto y la apoptosis en muchos tipos de células, y se ha descubierto que la inhibición de las gingipaínas previene la muerte celular inducida por *P. gingivalis*. Véanse: Travis, *et al.*, Adv Exp Med Biol, 2000. 477: 455-65; Sheets *et al.*, Infect Immun, 2005. 73(3): 1543-52; Sheets *et al.*, Infect Immun, 2006. 74(10): 5667-78; Stathopoulou, *et al.*, BMC Microbiol, 2009. 9: 107. Se necesitan nuevos compuestos para la inhibición de la actividad de la gingipaína y el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad de la gingipaína y la infección por *P. gingivalis*. Además, se necesitan compuestos para la detección y cuantificación de la actividad de la gingipaína con el fin de diagnosticar eficazmente a los sujetos infectados por *P. gingivalis*, identificar nuevos agentes terapéuticos y desarrollar nuevos métodos para tratar las enfermedades mediadas por la gingipaína. La presente invención aborda estas necesidades.

35 Breve resumen de la invención

En una primera realización, la invención proporciona un compuesto de acuerdo con la siguiente Fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización relacionada, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, la invención proporciona el compuesto o composición de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por *P. gingivalis*. Los métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz del compuesto o composición de la invención a un sujeto que lo necesite. En

algunas realizaciones, trastorno cerebral (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), enfermedad periodontal, diabetes, una enfermedad cardiovascular, artritis, artritis reumatoide, artrosis, artritis infecciosa, artritis psoriásica, riesgo elevado de parto prematuro, neumonía, cáncer, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, un trastorno de la retina, y glaucoma.

5

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** muestra que una selección de inhibidores de Kgp, incluyendo el compuesto de la invención, protegen a las células de neuroblastoma SH-SY5Y de la muerte celular inducida por *P. gingivalis*.

10

La **FIG. 2** muestra que una selección de inhibidores de Kgp, incluyendo el compuesto de la invención, evitan la degradación de la hemoglobina y la adquisición de hierro, un mecanismo clave de mejora de la supervivencia de *P. gingivalis*.

15

La **FIG. 3** muestra que el compuesto de la invención proporciona concentraciones plasmáticas aumentadas en ratones.

La **FIG. 4** muestra que el compuesto de la invención proporciona concentraciones cerebrales libres aumentadas en ratones.

20

La **FIG. 5A** muestra que las sondas de actividad **15a** y **38a** son útiles para la caracterización de frotis bacterianos. Un frotis bacteriano de *P. gingivalis* expuesto a la sonda de actividad **15a** o **38a** puede detectarse mediante microscopía de fluorescencia. La señal depende de la presencia de Kgp y no se detecta en un frotis bacteriano de la cepa W83 de *P. gingivalis* con una inactivación del gen Kgp.

25

La **FIG. 5B** muestra que la sonda de actividad **15a** es útil para la caracterización de cortes de tejido. Un corte de tejido gingival de un paciente con enfermedad periodontal se tiñe con el agente de inmunofluorescencia CAB102, un anticuerpo policlonal contra Kgp. Una sección de tejido secuencial separada produce una señal de fluorescencia tras la incubación con la sonda de actividad **15a**.

30

La **FIG. 6A** muestra una imagen de fluorescencia de un gel SDS-PAGE que contiene muestras de células Jurkat humanas con o sin infección por W83 de *P. gingivalis*. Las muestras se hicieron reaccionar con la sonda fluorescente **15a** o con el compuesto **73** inhibidor de Kgp no fluorescente (*N*-[7-amino-2-oxo-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)heptan-3-il]ciclopentanecarboxamida) antes de SDS-PAGE. Carril 1: sólo células. Carril 2: células + sonda **15a**. Carril 3: células + sonda **15a**, multiplicidad de infección (MOI) de *P. gingivalis*: 100. Carril 4: células + preincubación con el compuesto **73** seguido de la sonda **15a**, MOI: 100. Carril 5: células + sonda **15a**, MOI: 10. Carril 6: células + preincubación con el compuesto **73** seguido de la sonda **15a**, MOI: 10. Carril 7: Kgp purificada + sonda **15a**. Carril 8: Kgp purificada + tampón de lisis sin sonda **15a**.

35

La **FIG. 6B** muestra una imagen de fluorescencia de un gel SDS-PAGE que contiene cantidades valoradas de W83 de *P. gingivalis*. Carril A: 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC); Carril B: 10^6 UFC; Carril C: 10^5 UFC; Carril D: 10^4 UFC; Carril E: 10^3 UFC; Carril F: 10^2 UFC; Carril G: Kgp purificada. Los datos de fluorescencia valorados pueden utilizarse para cuantificar la infección por *P. gingivalis* en muestras biológicas.

40

La **FIG. 7** muestra imágenes de microscopio de fluorescencia de células bucales, obtenidas de la cavidad bucal de sujetos humanos, incubadas con la sonda de actividad **15a** y analizadas para la unión de la sonda de actividad. La tinción punteada con la sonda de actividad **15a** indica la presencia de Kgp en algunas células. La imagen de la izquierda muestra esta tinción punteada mientras que las células del panel de la derecha muestran células que no se tiñen con la sonda y se presume que no están infectadas con *P. gingivalis*. El colorante azul es una tinción con DAPI para núcleos celulares.

45

50

La **FIG. 8** muestra que la sonda de actividad de biotina **51a** puede utilizarse para marcar covalentemente Kgp en lisados de *P. gingivalis* para la posterior unión de Kgp marcada a perlas de estreptavidina. Después de la liberación de las perlas, la Kgp marcada se analizó por SDS-PAGE y se detectó en una transferencia de Western con el anticuerpo policlonal de Kgp CAB102. La Kgp se extrajo mediante este método y se detectó a partir de al menos 10^6 UFC de *P. gingivalis*. Carril 1: Kgp purificada. Carril 2: W83 de *P. gingivalis*, 10^2 UFC. Carril 3: W83, 10^4 UFC. Carril 4: W83, 10^6 UFC. Carril 5: Cepa de inactivación de Kgp, 10^6 CFU. Carril 6: sólo sonda **51a**.

55

La **FIG. 9A** muestra la visualización de lisado de W83 de *P. gingivalis* y un lisado de cepa de inactivación de Kgp de *P. gingivalis* mediante SDS-PAGE tras la incubación con el compuesto **71** de sonda.

60

La **FIG. 9B** muestra la visualización del lisado de *P. gingivalis* mediante SDS-PAGE tras la incubación con el compuesto **71** de sonda con o sin preincubación con microesferas conjugadas con el anticuerpo CAB 102.

La **FIG. 9C** muestra el análisis de lisado de W83 de *P. gingivalis* marcado mediante SDS-PAGE y visualización de la señal Cy5 (panel superior) o transferencia de Western con detección mediante el anticuerpo primario CAB 102

65

y detección quimioluminiscente (panel inferior).

La FIG. 10 muestra la pérdida ósea alveolar en ratones infectados con *P. gingivalis*, con o sin tratamiento con el Compuesto 1 de la presente invención.

La FIG. 11 muestra una reducción del ADN de *P. gingivalis* en el tejido cerebral de ratones infectados tras el tratamiento con el Compuesto 1 de la presente invención.

La FIG. 12 muestra una reducción en la pérdida de neuronas del hipocampo en el tejido cerebral de ratones infectados tras el tratamiento con el Compuesto 1 de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

I. General

La presente invención proporciona un compuesto potente para inhibir la lisina gingipaína (Kgp) de *P. gingivalis*. La invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que ciertos inhibidores presentan una mayor selectividad por Kgp que por proteasas endógenas, tales como las catepsinas, a la vez que presentan una actividad comparable a la de compuestos conocidos anteriormente. De manera adicional, el compuesto de la invención proporciona propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con los compuestos conocidos anteriormente. El compuesto puede utilizarse para prevenir la muerte celular, inflamación, y otros procesos patológicos en una variedad de enfermedades asociadas con la infección con *P. gingivalis*, incluyendo las afecciones relacionadas con el envejecimiento, tal como la enfermedad de Alzheimer.

II. Definiciones

Como se usan en el presente documento, los términos "*Porphyromonas gingivalis*" y "*P. gingivalis*" se refieren a la bacteria gramnegativa asacarolítica reconocida como microbio causante clave en la patogénesis de la periodontitis y afecciones relacionadas. "Infección por *P. gingivalis*" se refiere a la invasión y colonización de *P. gingivalis* en un tejido corporal, tal como las encías o el cerebro. La infección por *P. gingivalis* se caracteriza frecuentemente por lesiones y enfermedades tisulares posteriores.

Como se usa en el presente documento, el término "gingipaína" se refiere a proteasas de cisteína expresadas por *P. gingivalis* que tienen una especificidad similar a la tripsina (es decir, Lys-Xaa y Arg-Xaa). Las gingipaínas están reconocidas como los principales factores de virulencia de *P. gingivalis* y contribuyen a la fijación y colonización bacterianas, adquisición de nutrientes, evasión de las defensas del huésped e invasión de tejidos. Los términos "arginina gingipaína" y "Rgp" se utilizan indistintamente para referirse a las gingipaínas específicas de arginina RgpA y RgpB de *P. gingivalis*, clasificadas con el número EC 3.4.22.37. Los productos de traducción de los genes *rgpA* y *rgpB*, RgpA y RgpB, comparten un dominio proteasa similar a la caspasa (específico para los enlaces peptídicos Arg-Xaa) y un dominio similar a la inmunoglobulina. En RgpA, los dominios proteasa y similares a la inmunoglobulina van seguidos de una gran extensión C-terminal que contiene dominios hemaglutinina-adhesina.

Como se usan en el presente documento, los términos "halo" y "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, se refieren a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se usan en el presente documento, el término "haloalquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo alquilo donde algunos o todos los átomos de hidrógeno son reemplazados por átomos de halógeno. En cuanto a los grupos alquilo, los grupos haloalquilo pueden tener cualquier número adecuado de átomos de carbono, tal como C₁₋₆. Por ejemplo, haloalquilo incluye trifluorometilo, fluorometilo, etc. En algunos casos, el término "perfluoro" puede usarse para definir un compuesto o radical donde todos los hidrógenos están reemplazados por flúor. Por ejemplo, perfluorometilo se refiere a 1,1,1-trifluorometilo.

Como se usan en el presente documento, los términos "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refieren a una sustancia que facilita la administración de un agente activo a un sujeto. Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el excipiente es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no es nocivo para el receptor de la misma. Los excipientes farmacéuticos útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aglutinantes, cargas, disgregantes, lubricantes, deslizantes, recubrimientos, edulcorantes, aromas y colores.

Como se usa en el presente documento, el término "sal" se refiere a sales ácidas o básicas de los compuestos de la invención. Ejemplos ilustrativos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de ácido mineral (ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, y similares), sales de ácido orgánico (ácido acético, ácido propiónico, ácido glutámico, ácido cítrico y similares), sales de amonio cuaternario (yoduro de metilo, yoduro de etilo, y similares). Se entiende que las sales farmacéuticamente aceptables son no tóxicas.

Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente invención incluyen sales formadas con bases, a saber, sales catiónicas, tales como las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio,

calcio, magnesio, así como sales de amonio, tales como sales de amonio, trimetilamonio, dietilamonio y tris-(hidroximetil)-metilamonio.

Del mismo modo, las sales de adición de ácidos, tales como de ácidos minerales, ácidos orgánicos carboxílicos y orgánicos sulfónicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, también son posibles.

La forma neutra del compuesto se puede regenerar poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás, las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", y "que trata/n" se refieren a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología, afección o síntoma (por ejemplo, deterioro cognitivo), incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como atenuación; remisión; disminución de los síntomas o hacer que el síntoma, lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente; reducción de la tasa de avance del síntoma; disminución de la frecuencia o duración del síntoma o afección; o, en algunas situaciones, prevenir la aparición del síntoma. El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en cualquier parámetro objetivo o subjetivo; incluyendo, por ejemplo, el resultado de una exploración física.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una dosis de un compuesto, tal como un inhibidor de Kgp, que produce efectos terapéuticos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá ser comprobada por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11ª edición, 2006, Brunton, Ed., McGraw-Hill; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, 2005, Hendrickson, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad de Alzheimer" se refiere a una enfermedad progresiva del sistema nervioso central en seres humanos y otros mamíferos. Se manifiesta por demencia (especialmente en los ancianos); desorientación; pérdida de memoria; dificultad con el lenguaje, cálculo o habilidades visuoespaciales; y manifestaciones psiquiátricas. La enfermedad de Alzheimer se asocia a una neurodegeneración progresiva y a una patología característica, a saber, las placas beta amiloides y los ovillos tau.

Como se usa en el presente documento, el término "artrosis" se refiere a una enfermedad articular degenerativa crónica que resulta de la degradación del cartílago articular, tejido sinovial y hueso subyacente.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares.

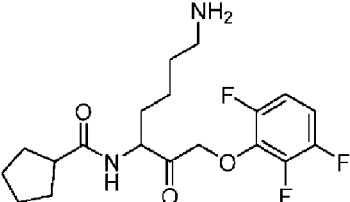
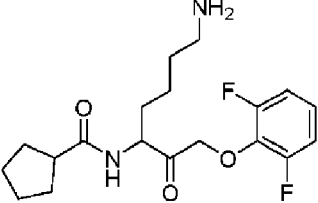
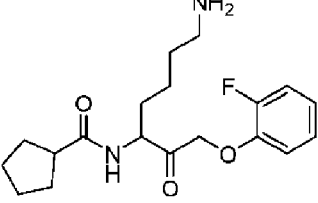
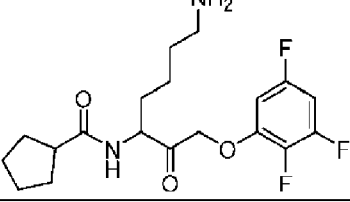
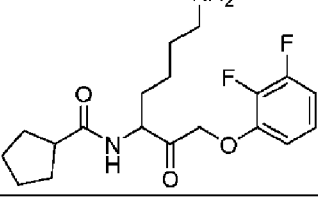
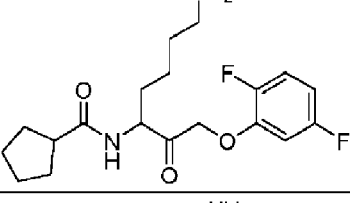
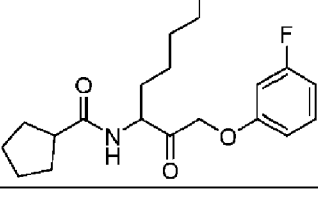
III. Inhibidores de la lisina gingipaína

La invención proporciona el compuesto 1, compuesto 1a, compuesto 69 y compuesto 69a como se establece en la Tabla 1 a continuación y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de referencia 2a a 20a, 21, 26a a 68a, 70 y 71 se recogen también en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Inhibidores de la lisina gingipaína (los compuestos de referencia están marcados con un "*").

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
1	

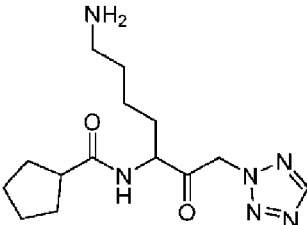
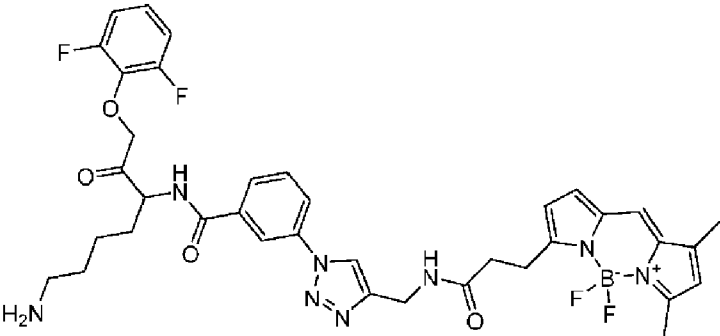
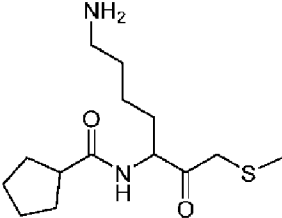
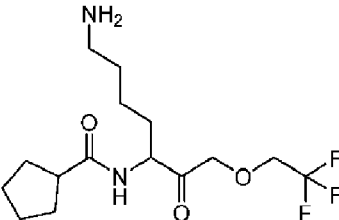
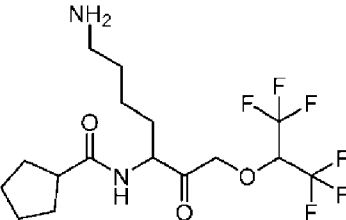
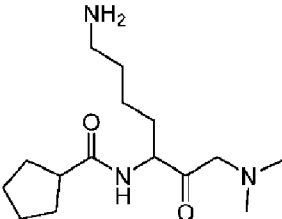
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
1 ^a	
2a*	
3a*	
4a*	
5a*	
6a*	
7a*	

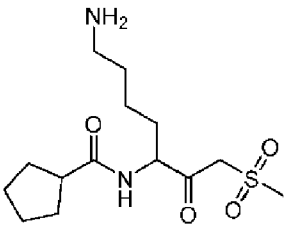
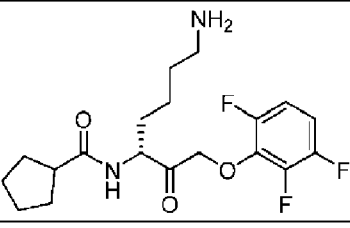
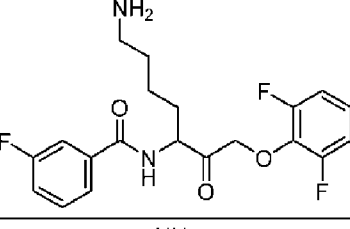
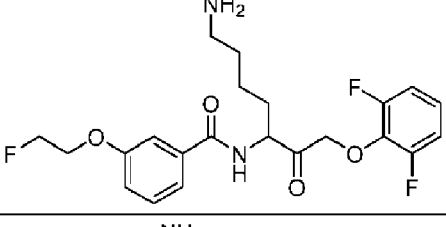
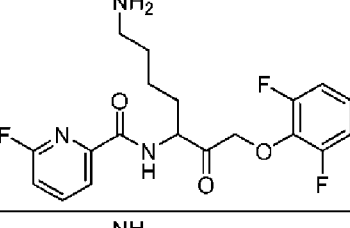
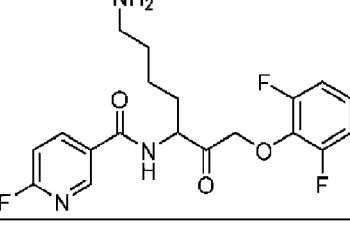
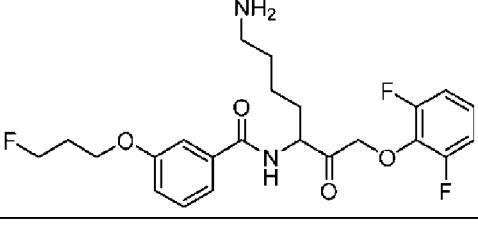
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
8a*	
9a*	
10a*	
11a*	
12a*	
13a*	

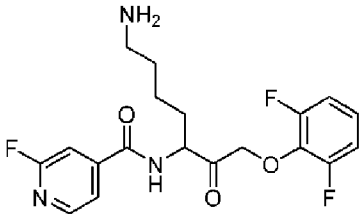
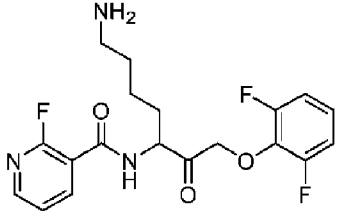
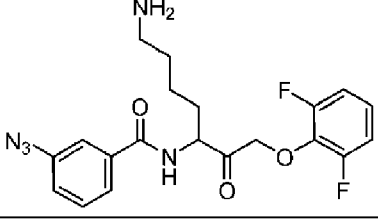
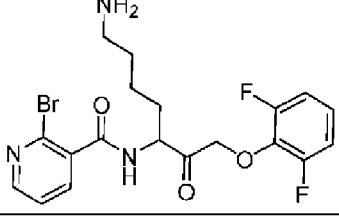
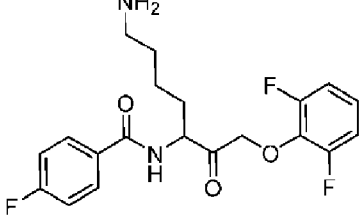
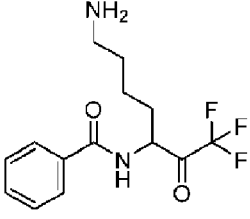
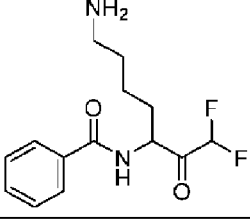
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
14a*	
15a*	
16a*	
17a*	
18a*	
19a*	

(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
20a*	
21*	
26a*	
27a*	
28a*	
29a*	
30a*	

(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
31a*	
32a*	
33a*	
34a*	
35a*	
36a*	
37a*	

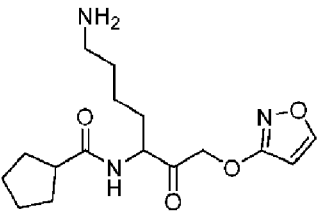
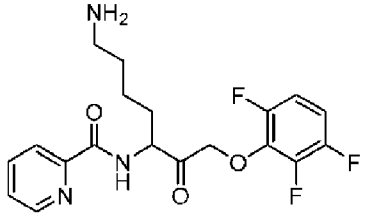
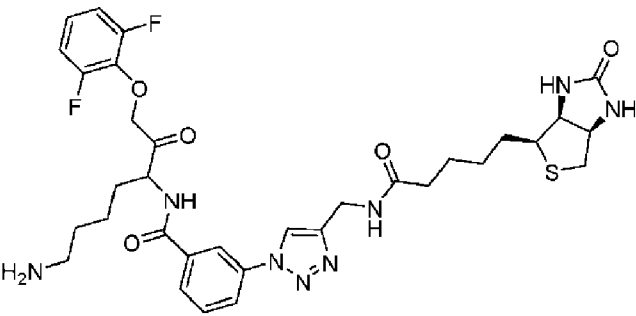
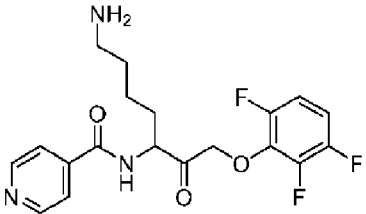
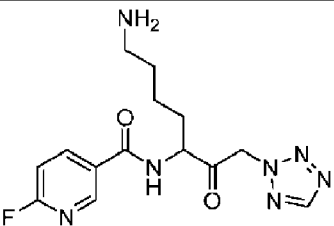
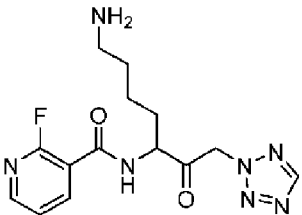
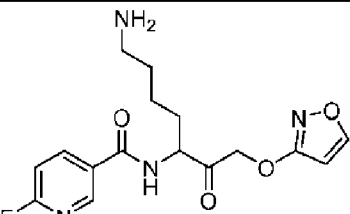
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
38a*	<p>Chemical structure of compound 38a*: A complex molecule featuring a central benzene ring substituted with a 4-aminobutyl group, a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group, a 1-((2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl)amino)-1H-1,2,3-triazole group, and a 1-((2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl)amino)-1H-1,2,3-triazole group. The triazole ring is further substituted with a 4-((2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl)amino)phenyl group and a 4-((2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl)amino)phenyl group.</p>
39a*	<p>Chemical structure of compound 39a*: A molecule consisting of a cyclopentyl ring connected via an amide bond to a 4-aminobutyl group, which is further connected via an amide bond to a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group.</p>
40a*	<p>Chemical structure of compound 40a*: A molecule consisting of a cyclopentyl ring connected via an amide bond to a 4-aminobutyl group, which is further connected via an amide bond to a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group.</p>
41a*	<p>Chemical structure of compound 41a*: A molecule consisting of a cyclopentyl ring connected via an amide bond to a 4-aminobutyl group, which is further connected via an amide bond to a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group.</p>
42a*	<p>Chemical structure of compound 42a*: A molecule consisting of a cyclopentyl ring connected via an amide bond to a 4-aminobutyl group, which is further connected via an amide bond to a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group.</p>
43a*	<p>Chemical structure of compound 43a*: A molecule consisting of a cyclopentyl ring connected via an amide bond to a 4-aminobutyl group, which is further connected via an amide bond to a 2-oxo-2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group.</p>

(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
44a*	<p>Chemical structure of compound 44a*: A molecule featuring a 4-azido-2-phenylbutanamide moiety linked via an ester bond to a 2,4-difluorophenyl group, which is further connected to a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety.</p>
45a*	<p>Chemical structure of compound 45a*: A complex molecule containing a 4-azido-2-phenylbutanamide moiety, a 2,4-difluorophenyl group, a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety, and a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety, all interconnected by various functional groups including amides and esters.</p>
46a*	<p>Chemical structure of compound 46a*: A molecule featuring a 4-azido-2-phenylbutanamide moiety linked via an ester bond to a 2,4-difluorophenyl group, which is further connected to a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety.</p>
47a*	<p>Chemical structure of compound 47a*: A molecule featuring a 4-azido-2-phenylbutanamide moiety linked via an ester bond to a 2,4-difluorophenyl group, which is further connected to a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety.</p>
48a*	<p>Chemical structure of compound 48a*: A molecule featuring a 4-azido-2-phenylbutanamide moiety linked via an ester bond to a 2,4-difluorophenyl group, which is further connected to a 4-(dimethylaminophenyl)benzamide moiety.</p>

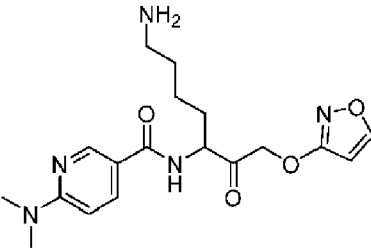
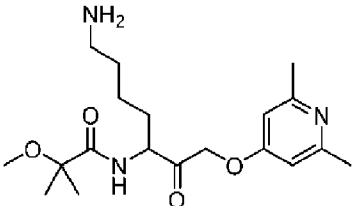
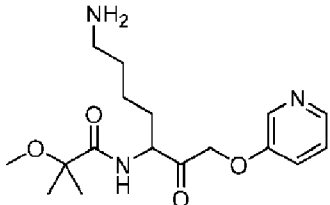
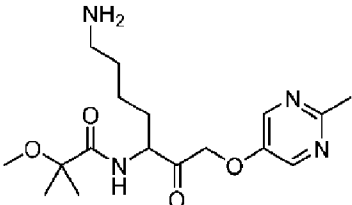
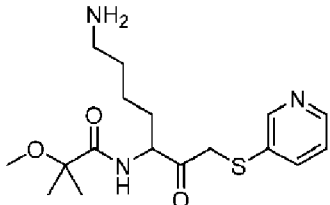
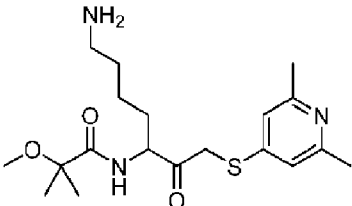
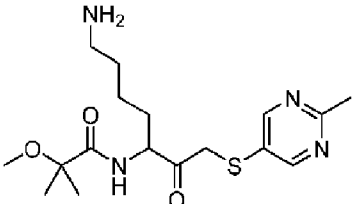
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
49a*	
50a*	
51a*	
52a*	
53a*	
54a*	
55a*	

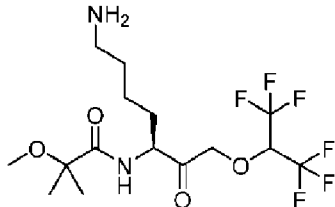
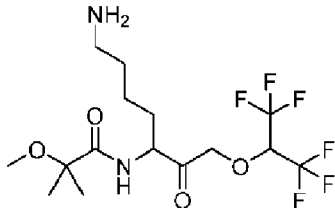
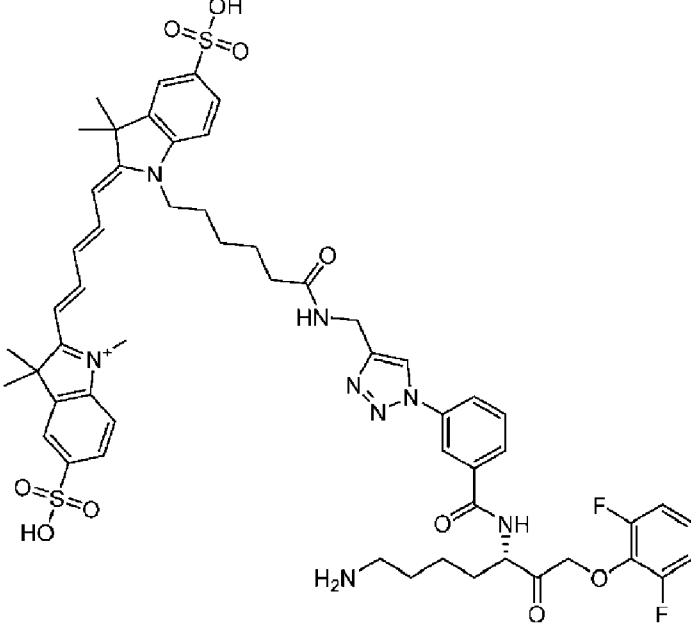
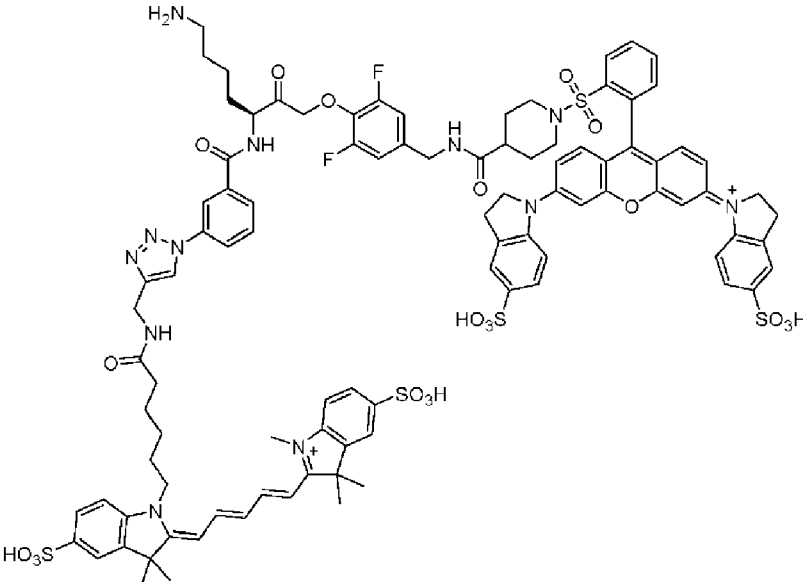
(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
56a*	
57a*	
58a*	
59a*	
60a*	
61a*	

(continuación)

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
62a*	
63a*	
64a*	
65a*	
66a*	
67a*	
68a*	

(continuación)

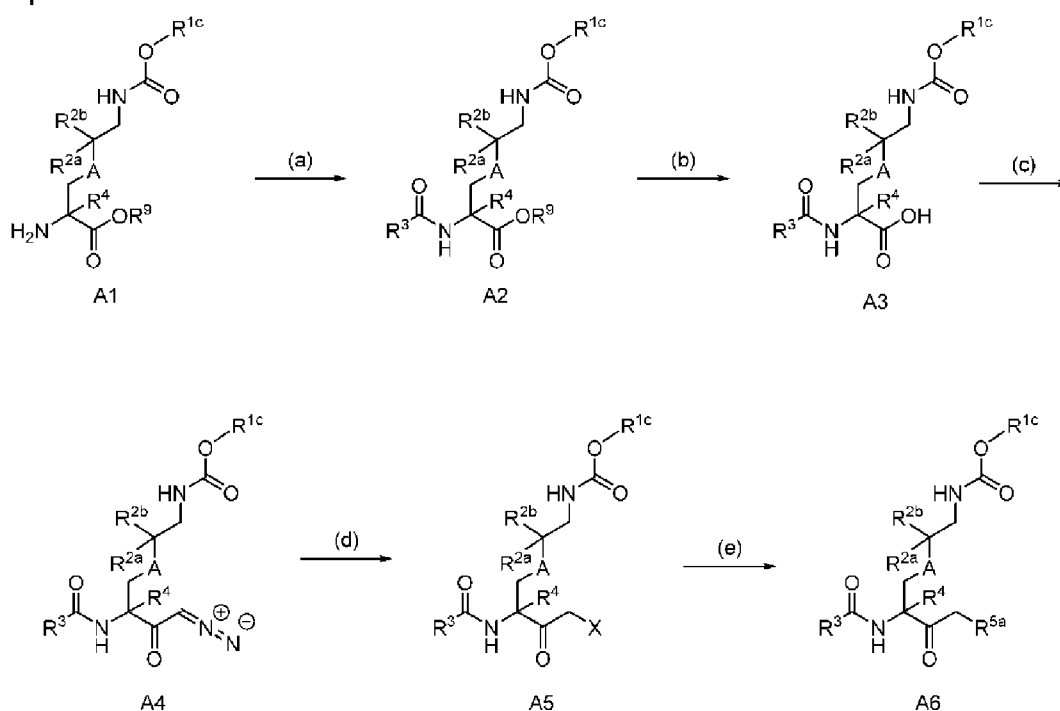
Compuesto N.º	Estructura del compuesto
69	
69a	
70*	
71*	

El compuesto de la presente invención y el compuesto para su uso de la presente invención abarcan los enantiómeros o diastereómeros terapéuticamente activos del compuesto. Todos los enantiómeros y diastereómeros del compuesto de la presente invención están incluidos en el alcance de la invención. El compuesto de la presente invención puede usarse como mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas) o como enantiómeros o diastereómeros aislados.

El compuesto de la invención puede prepararse de modo que incluya radionucleidos para su uso en aplicación de obtención de imágenes, tal como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede prepararse de modo que incluya uno o más radionucleidos seleccionados entre oxígeno-15 (^{15}O), nitrógeno-13 (^{13}N), carbono-11 (^{11}C), yodo-131 (^{131}I) y flúor-18 (^{18}F). Estos compuestos radiomarcados pueden utilizarse para la obtención de imágenes PET. El compuesto de la invención también puede prepararse en forma deuterada (es decir, con uno o más átomos de deuterio, ^2H , en lugar de un átomo más de hidrógeno), en forma tritiada (es decir, con uno o más átomos de tritio, ^3H , en lugar de un átomo más de hidrógeno), o en forma marcada con ^{14}C (es decir, que tiene uno o más átomos de ^{14}C en lugar de un átomo más de carbono).

El compuesto de la invención y los compuestos de referencia descritos anteriormente pueden prepararse utilizando materiales de partida A1 como se muestra en el Esquema 1. En A1, los grupos R^9 y R^{1c} preferidos pueden manipularse utilizando condiciones químicas que no afecten al otro. Por ejemplo, R^{1c} = bencilo puede eliminarse mediante hidrógeno y un catalizador de paladio-carbono, pero R^{1c} no se ve afectado por el ácido trifluoroacético, mientras que R^9 = t-butilo puede eliminarse mediante ácido trifluoroacético, pero R^9 no se ve afectado por el hidrógeno y un catalizador de paladio-carbono. Otras combinaciones complementarias apropiadas de R^9 y R^{1c} y los métodos para su modificación selectiva son conocidos en la técnica.

Esquema 1



A1 puede tratarse con un ácido carboxílico $\text{R}^3\text{CO}_2\text{H}$, y un inhibidor de la racemización (por ejemplo HOBt), y un agente deshidratante (por ejemplo EDAC), en un disolvente orgánico (por ejemplo, DMF), generando A2. De manera alternativa, A1 puede tratarse con R^3COX , en donde X es un grupo saliente (por ejemplo, cloruro), y una base orgánica (por ejemplo, Et_3N), en un disolvente orgánico (por ejemplo, CH_2Cl_2), generando A2. Una variedad de ácidos carboxílicos aplicables ($\text{R}^3\text{CO}_2\text{H}$) y derivados de los mismos (R^3COX) están disponibles comercialmente, o pueden prepararse según métodos conocidos. R^9 puede eliminarse mediante condiciones químicas adecuadas generando A3. A3 puede hacerse reaccionar con un cloroformiato (por ejemplo, cloroformiato de isobutilo, cloroformiato de etilo y similares) seguido de diazometano para proporcionar A4. A4 puede convertirse en A5 mediante tratamiento con un ácido hidrohálico (es decir, HX en donde X es un halógeno tal como Cl, Br o I). El desplazamiento del haluro de A5 usando un compuesto $\text{R}^{5a}\text{-H}$ (por ejemplo, un fenol halogenado o un compuesto heteroaromático) en presencia de una base puede proporcionar el compuesto A6 protegido, que puede ser desprotegido para proporcionar el producto. De manera alternativa, el ácido carboxílico A3 puede *N*-acilarse y ciclarse para obtener la correspondiente 5(4*H*)-oxazolona. La oxazolona puede hacerse reaccionar además con un anhídrido de un ácido carboxílico α -fluorado (por ejemplo, anhídrido trifluoroacético) para proporcionar una 5(4*H*)-oxazolona *C*-acilada que se descarbonila usando ácido oxálico para formar compuestos en los que R^5 es haloalquilo (véase, Kolb, *et al.* Liebig. Ann. Chem., 1990,

págs. 1-6; Kolb, *et al.* Tet. Lett. 1986, (27): págs. 1579-1582 y págs. 4437-4440).

IV. Composiciones farmacéuticas y administración de inhibidores de la lisina gingipaína

- 5 En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia y de la administración de fármacos. En general, los métodos para preparar las composiciones incluyen la etapa de asociar el principio activo con un portador que contiene uno o más ingredientes accesorios. Las composiciones farmacéuticas se preparan típicamente asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido o con ambos y después, si fuera necesario, dando forma al producto en la formulación deseada. Las composiciones pueden prepararse y/o envasarse convenientemente en forma de dosis unitaria.

15 Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención pueden formularse para uso oral. Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero sin limitación, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes, elixires, soluciones, parches bucales, geles orales, chicles, comprimidos masticables, polvos efervescentes y comprimidos efervescentes. Las composiciones para administración oral pueden formularse según cualquier método conocido por los expertos en la materia. Dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, agentes antioxidantes y conservantes, con el fin de proporcionar preparaciones sabrosas y farmacéuticamente elegantes.

25 Los comprimidos contienen generalmente el principio activo mezclado con excipientes no tóxicos aceptables farmacéuticamente, incluyendo: diluyentes inertes, tales como celulosa, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato de sodio, glucosa, manitol, sorbitol, lactosa, fosfato cálcico y fosfato sódico; agentes de granulación y disgregantes, tal como el almidón de maíz y el ácido algínico; agentes aglutinantes, tal como polivinilpirrolidona (PVP), celulosa, polietilenglicol (PEG), almidón, gelatina y goma arábiga; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. Los comprimidos pueden ser recubiertos o no recubiertos, entéricamente o de otro modo, mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta forma una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Los comprimidos también pueden recubrirse con una membrana semipermeable y osmogénes poliméricos opcionales según técnicas conocidas para formar composiciones de bomba osmótica para liberación controlada.

30 Las composiciones para administración oral pueden formularse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso (tal como el aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva).

Los inhibidores de Kgp también pueden administrarse por vía tópica en forma de solución, ungüento, crema, gel o suspensión, así como en enjuagues bucales, colirios y similares. Aún más, puede lograrse el suministro transdérmico de los inhibidores de Kgp mediante parches iontoforéticos y similares.

45 Las composiciones farmacéuticas que contienen inhibidores de Kgp también pueden presentarse en forma de soluciones y suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Las preparaciones inyectables estériles pueden formularse utilizando vehículos no tóxicos parenteralmente aceptables, incluyendo el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico, y disolventes aceptables, tal como el diol de 1,3-butano. Además, pueden emplearse aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos sintéticos.

50 En algunas realizaciones, el compuesto de la invención puede formularse con un polímero, tal como Pluronic F127 y administrarse por vía subcutánea. Pluronic es un hidrogel que se solidifica a temperatura corporal y puede proporcionar una administración prolongada de fármacos durante periodos de tiempo que van de días a semanas.

55 Las suspensiones acuosas pueden contener uno o más inhibidores de Kgp en mezcla con excipientes que incluyen, pero sin limitación: agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, oleagino-propilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes, tal como la lecitina, estearato de polioxietileno y monooleato de sorbitán de polietileno; y conservantes, tales como etilo, *n*-propilo y *p*-hidroxibenzoato. Los polvos y gránulos dispersables (adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua) pueden contener uno o más inhibidores de Kgp en mezcla con un agente dispersante, agente humectante, agente de suspensión o combinaciones de los mismos. Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo un inhibidor de Kgp en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida). Las suspensiones oleosas pueden contener uno o más agentes espesantes, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o

alcohol cetílico. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, tales como goma arábiga o goma de tragacanto; fosfolípidos de origen natural, tales como lecitina de soja; ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán; y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitán.

El uso de moléculas híbridas para promover el transporte activo o de nanopartículas puede utilizarse en ciertas realizaciones para aumentar el transporte de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo liposomas, proteínas, compuestos peptídicos modificados por ingeniería genética o anticuerpos que se unen a los receptores que transportan proteínas a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo el receptor LPR-1, el receptor de transferrina, el factor de crecimiento similar al EGF o el transportador de glutatión, pueden utilizarse para aumentar la penetración en el cerebro. Pueden utilizarse técnicas físicas, incluyendo la apertura osmótica, ultrasonidos, láser, estimulación del ganglio esfenopalantino, administración directa intracraneal, intratecal o intraventricular a través de una bomba.

Las composiciones farmacéuticas según la invención también pueden incluir uno o más agentes activos adicionales útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con *P. gingivalis*. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención en combinación con uno o más agentes activos adicionales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Hay varias terapias en desarrollo y en uso clínico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Las estrategias terapéuticas incluyen la reducción de los niveles circulantes de β -amiloide y tau (como se describe con más detalle a continuación), estabilizar microtúbulos, eliminar las placas ateroscleróticas, modular la autofagia, modular los niveles de neurotransmisores e inhibir los receptores GABA(A) $\alpha 5$. Dichas terapias pueden mantener y/o restaurar la función cognitiva en sujetos con enfermedad de Alzheimer; ralentizar el deterioro de la función cognitiva; y fomentar la neuroplasticidad y la recuperación del cerebro.

Los agentes activos que pueden combinarse con inhibidores de Kgp en composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, antibióticos (es decir, compuestos bactericidas y compuestos bacteriostáticos), inhibidores de la colinesterasa, moduladores de los receptores nicotínicos alfa-7, moduladores de la serotonina, moduladores de NMDA, terapias dirigidas a A β , terapias dirigidas a la ApoE, terapias dirigidas a la microglía, terapias dirigidas a la barrera hematoencefálica, terapias dirigidas a tau, terapias dirigidas al complemento y antiinflamatorios.

Cualquier antibiótico adecuado puede combinarse con el compuesto de la presente invención en las composiciones farmacéuticas de la invención. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el compuesto de la presente invención y un antibiótico que tiene una CMI₅₀ de *P. gingivalis* de menos de 25 μ g/ml. Por ejemplo, la CMI₅₀ de *P. gingivalis* del antibiótico puede ser inferior a 20 μ g/ml, inferior a 15 μ g/ml, inferior a 10 μ g/ml, inferior a 8 μ g/ml, inferior a 6 μ g/ml, o inferior a 5 μ g/ml. En algunas realizaciones, la CMI₅₀ de *P. gingivalis* del antibiótico es inferior a 1 μ g/ml. En algunas realizaciones, la CMI₅₀ de *P. gingivalis* del antibiótico es inferior a 0,2 μ g/ml.

Entre los ejemplos de compuestos bactericidas y bacteriostáticos se incluyen, pero sin limitación: quinolonas (por ejemplo, moxifloxacino, gemifloxacino, ciprofloxacina, ofloxacina, trovafloxacino, sitafloxacina y similares), β -lactámicos (por ejemplo, penicilinas, tal como la amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, penicilina G, y similares; y cefalosporinas, tal como la ceftriaxona y similares), macrólidos (por ejemplo, eritromicina, azitromicina, claritromicina y similares), carbapenems (por ejemplo, doripenem, imipenem, meropenem, ertapenem y similares), tiazolidas (por ejemplo, tizoxanidina, nitazoxanidina, RM 4807, RM 4809, y similares), tetraciclinas (por ejemplo, tetraciclina, minociclina, doxiciclina, eravaciclina y similares), clindamicina, metronidazol y satranidazol. Los compuestos bactericidas y bacteriostáticos también incluyen agentes que inhiben o interfieren de otro modo en la formación de biopelículas por bacterias gram-negativas anaerobias; tales agentes incluyen oxantel, morantel, tiabendazol y similares. Las composiciones de la invención pueden contener el compuesto de la presente invención con uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más) compuestos bactericidas/bacteriostáticos. Las composiciones que contienen compuestos bacteriostáticos/bacteriostáticos pueden contener además una clorhexidina (por ejemplo, digluconato de clorhexidina) sola o en combinación con un compuesto de zinc (por ejemplo, acetato de zinc), también pueden utilizarse en combinación con los antibióticos administrados.

En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de una penicilina (por ejemplo, amoxicilina) y metronidazol o una combinación de penicilina (por ejemplo, amoxicilina), metronidazol y una tetraciclina. En algunas realizaciones, el antibiótico se selecciona entre minociclina, doxiciclina, metronidazol, amoxicilina, clindamicina, augmentine, satranidazol, y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de inhibidores de la colinesterasa adecuados incluyen, pero sin limitación, donepezilo,

donepezilo/memantina, galantamina, rivastigmina y tacrina, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Algunos ejemplos de moduladores de serotonina adecuados son, pero sin limitación, idalopirdina, RVT-101, citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina y sertralina, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Entre los ejemplos de moduladores adecuados del receptor nicotínico alfa-7 incluyen, pero sin limitación, agonistas alfa-7 como la enceniclina y el APN1125. Los moduladores de NMDA adecuados incluyen, pero sin limitación, antagonistas de los receptores de NMDA, tal como la memantina y sus derivados.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener agentes activos dirigidos a dianas biomoleculares asociadas a enfermedades neurológicas. Dichas dianas incluyen los péptidos beta amiloides (también denominados beta amiloide, abeta o A β), apolipoproteína E (también denominada ApoE), y tau asociadas a microtúbulos (también denominadas proteínas tau, o simplemente tau).

Las terapias dirigidas a A β incluyen inhibidores de la producción de A β (tales como los inhibidores de la beta-secretasa, inhibidores de la gamma-secretasa, activadores de la alfa-secretasa), inhibidores de la agregación de A β , inhibidores de la oligomerización de A β y reguladores de la eliminación de A β , entre otros (véase, por ejemplo, Jia, *et al.* BioMed Research International, 2014. ID del artículo 837157, 22 páginas). Los ejemplos de terapias dirigidas a A β incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, pioglitazona, begacestat, atorvastatina, simvastatina, etazolato y tramiprosato, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Algunos ejemplos de terapias dirigidas a la ApoE son, pero sin limitación, los agonistas del receptor X retinoide (véase, Cramer, *et al.*, Science 2012. 335(6075): 1503-1506) y otros descritos por Liu *et al.* (Nat Rev Neurol. 2013. 9(2): 106-118). Las terapias dirigidas a tau incluyen, pero sin limitación, metiltioninio, leuco-metiltioninio, anticuerpos y las descritas por Lee, *et al.* (Cold Spring Harb PerspectMed 2011; 1:a006437).

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener terapias dirigidas al complemento. Estas terapias se dirigen a los componentes del sistema del complemento implicados en la respuesta inmunitaria innata. Las terapias dirigidas al complemento incluyen, pero sin limitación, las descritas por Ricklin y Lambris (Nat. Biotechnology 2007. 25(11): 1265-1275).

Los ejemplos de antiinflamatorios adecuados incluyen, pero sin limitación, AINE como la apazona, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, nabumetona, naproxeno, piroxicam y sulindac, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

V. Compuestos para su uso en métodos de inhibición de gingipaínas y tratamiento de afecciones asociadas con la infección por *P. gingivalis*

En el presente documento se describe un método de inhibición de una gingipaína. El método incluye poner en contacto una gingipaína con una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención. En algunos de estos métodos, la gingipaína es una lisina gingipaína (es decir, Kgp o una variante que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones y/u otras variaciones de la secuencia peptídica). La inhibición de la gingipaína generalmente incluye el contacto de la gingipaína con una cantidad del compuesto suficiente para reducir la actividad de la gingipaína en comparación con la actividad de la gingipaína en ausencia del compuesto. Por ejemplo, el contacto de la gingipaína con el inhibidor de la gingipaína de la presente invención puede dar lugar a una inhibición de la gingipaína de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 % (es decir, la actividad de la gingipaína inhibida varía entre el 99 % y el 1 % de la actividad de gingipaína en ausencia del compuesto). El nivel de inhibición de la gingipaína puede variar entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 50 %, o entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 60 %, o entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 70 %, o entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 80 %, o entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 90 %, o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 %. El nivel de inhibición de la gingipaína puede variar entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 90 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 80 %, o entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 %, o entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 60 %. En algunos casos, el contacto de la gingipaína con el compuesto de la presente invención producirá una inhibición completa (es decir, 100 %) de la gingipaína.

Como se ha descrito anteriormente, la infección por *P. gingivalis* y la actividad de la gingipaína se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad periodontal, Alzheimer y otros trastornos cerebrales, enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, hepatopatía, nefropatía, nacimiento prematuro, artritis, neumonía y otros trastornos. Véanse: Bostanci, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2012. 333(1): 1-9; Ghizoni, *et al.* J Appl Oral Sci, 2012. 20(1): 104-12; Gatz, *et al.* Alzheimers Dement, 2006. 2(2): 110-7; Stein, *et al.* J Am Dent Assoc, 2007. 138(10): 1314-22; quiz 1381-2; Noble, *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009. 80(11): 1206-11; Sparks Stein, *et al.* Alzheimers Dement, 2012. 8(3): 196-203; Velsko, *et al.* PLoS ONE, 2014. 9(5): e97811; Demmer, *et al.* J Dent Res, 2015. 94(9S): 201S-211S; Atanasova y Yilmaz. Molecular Oral Microbiology, 2014. 29(2): 55-66; Yoneda, *et al.* BMC Gastroenterol, 2012. 12: 16.

Las proteasas extracelulares producidas por *P. gingivalis*, incluyendo la Arginina Gingipaína A (RgpA), Arginina Gingipaína B (RgpB), y Lisina Gingipaína (Kgp), también pueden degradar una amplia gama de proteínas del tejido conjuntivo y del plasma (por ejemplo, colágeno, inmunoglobulinas e inhibidores de la proteinasa, etc.). Las gingipaínas pueden entrar en la circulación sistémica y/o en los sinoviocitos y condrocitos, y también pueden provocar la interrupción de la cascada calicreína-quinina, la coagulación sanguínea y los sistemas de defensa del huésped. Los pacientes con gingipaínas en las articulaciones y el sistema circulatorio pueden sufrir la muerte inducida por gingipaínas de las células sinoviales y/o los condrocitos, que contribuyen a la artrosis.

Recientemente se ha descubierto que RgpB y Kgp pueden infiltrarse en las articulaciones humanas y caninas, contribuyendo al desarrollo de la artrosis. Se cree que *P. gingivalis* y las gingipaínas pueden infiltrarse en los tejidos articulares por varias vías. Las gingipaínas pueden ser secretadas, transportadas a las superficies de membrana externa de *P. gingivalis*, o liberadas en vesículas de membrana externa por la bacteria. *P. gingivalis* se ha identificado previamente en tejidos periodontales, arterias coronarias, aorta, y recientemente, la liberación hepática de *P. gingivalis* y/o gingipaínas desde cualquiera de estos nichos a la circulación sistémica podría dar lugar a la translocación de *P. gingivalis* y/o gingipaínas a las articulaciones. Véanse: Travis, *et al.* Adv Exp Med Biol, 2000. 477: 455-65; Byrne, *et al.* Oral Microbiol Immunol, 2009. 24(6): 469-77; Mahendra, *et al.* J Maxillofac Oral Surg, 2009. 8(2): 108-13; Stelzel. Periodontol, 2002. 73(8): 868-70; Ishikawa, *et al.* Biochim Biophys Acta, 2013. 1832(12): 2035-2043.

P. gingivalis y/o las gingipaínas también pueden entrar en las articulaciones degradando las células endoteliales que protegen la barrera sangre/articulación, o por un evento traumático en la articulación, tal como una lesión de menisco, que reduce de manera permanente o transitoria la integridad de los tejidos articulares. Por ejemplo, en una lesión articular traumática, puede contribuir a la infiltración de *P. gingivalis* y/o gingipaínas en individuos infectados y al posterior desarrollo de artrosis crónica. Las personas con alto riesgo de sufrir lesiones articulares traumáticas, incluyendo los atletas de deportes de contacto como el fútbol, podrían tratarse de forma preventiva con inhibidores de la gingipaína para reducir el riesgo de artrosis relacionada con traumatismos.

P. gingivalis y las gingipaínas también pueden llegar a la articulación a través de otros mecanismos, incluyendo el transporte activo, transporte pasivo o liberación por macrófagos. La artrosis resultante de cualquiera de estos mecanismos puede limitarse a una sola articulación o presentarse en múltiples articulaciones.

Similar a los seres humanos, la infección por *P. gingivalis* y la enfermedad periodontal es una de las enfermedades infecciosas más comunes que afectan a perros y gatos adultos. Los perros y gatos con infección por *P. gingivalis* y gingipaínas en sus articulaciones y sistema circulatorio pueden experimentar enfermedad periodontal y artrosis debido a la muerte celular inducida por gingipaínas, que podrían tratarse o prevenirse con el compuesto de la invención. Los perros de edad avanzada desarrollan espontáneamente muchas características de la artrosis, incluyendo una artritis inflamatoria común de la rodilla asociada a la degeneración del ligamento cruzado anterior (LCA). Un estudio de Muir *et al.* sobre perros con artritis inflamatoria de rodilla y degeneración del LCA detectó ADN de diversas especies bacterianas en el 37 % de las articulaciones de rodilla de los perros afectados. Muir *et al.* plantearon la hipótesis de que las bacterias pueden ser un factor causal importante en la patogénesis de la artritis inflamatoria en perros. En el estudio de Muir *et al.*, no se detectó ADN de *P. gingivalis* en las articulaciones caninas. Véase, Muir, *et al.* Microb Pathog, 2007. 42(2-3): 47-55. Sin embargo, similar a los seres humanos, *P. gingivalis* es un patógeno oral común que afecta a perros adultos, y potencialmente podría translocarse de la cavidad oral a los tejidos articulares como resultado de una bacteriemia. Se ha demostrado que *P. gingivalis* infecta condrocitos *in vitro* provocando la apoptosis de los condrocitos, indicando una vía para la pérdida de cartilago en la artrosis de perros y seres humanos. Véanse: Rohner, *et al.* Calcif Tissue Int, 2010. 87(4): págs. 333-40; Houle, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2003. 221(2): págs. 181-5; Kataoka, *et al.* FASEB J, 2014. 28: 3564-3578; Pischon, *et al.* Ann Rheum Dis, 2009. 68(12): págs. 1902-7.

Por lo tanto, los inhibidores de Kgp pueden utilizarse para tratar enfermedades y afecciones, tales como trastornos cerebrales, causadas o afectadas de otro modo por *P. gingivalis*. De acuerdo con ello, en el presente documento se describe un método para tratar una enfermedad o afección asociada con la infección por *P. gingivalis*.

La presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afecciones asociadas con la infección por *P. gingivalis*.

El tratamiento incluye la administración de una cantidad eficaz del compuesto o composición de la invención, como se ha descrito anteriormente, a un sujeto que lo necesita.

En determinadas realizaciones, el compuesto de la invención es para su uso en la inhibición de Kgp activa en el cerebro de un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un animal (por ejemplo, un perro), y es citoprotector o neuroprotector. Por "neuroprotector", se entiende que el compuesto previene los cambios aberrantes en las neuronas o la muerte de estas. Los compuestos de la invención son, por tanto, útiles, por ejemplo, en el tratamiento de un trastorno cerebral (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, epilepsia, autismo, enfermedad de Parkinson, temblor esencial, demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, encefalopatía traumática crónica, ictus, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia de múltiples sistemas, esquizofrenia y depresión, etc.),

diabetes, enfermedad cardiovascular, artritis, artritis reumatoide, artrosis, artritis infecciosa, artritis psoriásica, trastornos retinianos (por ejemplo, degeneración macular asociada a la edad) y glaucoma.

5 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección asociada con la infección por *P. gingivalis* se selecciona entre un trastorno cerebral, enfermedad periodontal, diabetes, una enfermedad cardiovascular, artritis, artritis reumatoide, artrosis, nacimiento prematuro, neumonía, cáncer, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, un trastorno de la retina, y glaucoma.

10 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un trastorno cerebral.

En algunas realizaciones, el trastorno cerebral se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, epilepsia, autismo, enfermedad de Parkinson, temblor esencial, demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, encefalopatía traumática crónica, ictus, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia de múltiples sistemas, esquizofrenia y depresión.

En algunas realizaciones, el trastorno cerebral es la enfermedad de Alzheimer.

20 En algunas realizaciones, el compuesto para su uso se utiliza en un tratamiento que incluye además la administración al sujeto de uno o más agentes activos seleccionados entre un inhibidor de la colinesterasa, un modulador de la serotonina, un modulador de NMDA, una terapia dirigida a A β , una terapia dirigida a la ApoE, una terapia dirigida a la microglía, una terapia dirigida a la barrera hematoencefálica, una terapia dirigida a tau, una terapia dirigida al complemento y un antiinflamatorio.

25 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es enfermedad periodontal. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad hepática. En algunas realizaciones, la enfermedad hepática es esteatohepatitis no alcohólica. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un trastorno retinal. En algunas realizaciones, el trastorno retinal es la degeneración macular asociada a la edad.

30 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de páncreas o glioblastoma multiforme.

Los inhibidores de Kgp descritos en el presente documento pueden administrarse a cualquier dosis adecuada. En particular, el compuesto para su uso de la presente invención puede administrarse a cualquier dosis adecuada. En general, un inhibidor de Kgp se administra a una dosis que varía entre aproximadamente 0,1 miligramos y aproximadamente 1000 miligramos por kilogramo de peso corporal de un sujeto (es decir, aproximadamente 0,1-1000 mg/kg). La dosis del inhibidor de Kgp puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1000 mg/kg, o aproximadamente 1-500 mg/kg, o aproximadamente 25-250 mg/kg, o aproximadamente 50-100 mg/kg. La dosis del inhibidor de Kgp puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 mg/kg. Las dosis se pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente, la gravedad del trastorno tratado y la formulación particular que se está administrando. La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente. El tamaño de la dosis se podrá determinar también mediante la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración del fármaco en un paciente particular. La determinación de la dosis adecuada para una situación en particular se encuentra dentro de los conocimientos del profesional habitual. La dosis total puede dividirse y administrarse en porciones a lo largo de un periodo de tiempo adecuado para tratar el trastorno convulsivo.

Los inhibidores de Kgp pueden administrarse durante periodos de tiempo que variarán en función de la naturaleza del trastorno concreto, su gravedad, y el estado general del sujeto al que se administra el inhibidor de Kgp. Se puede llevar a cabo la administración, por ejemplo, por hora, cada 2 horas, tres horas, cuatro horas, seis horas, ocho horas, o dos veces al día incluyendo cada 12 horas, o cualquier intervalo intermedio de las mismas. La administración puede realizarse una vez al día, o una vez cada 36 horas o 48 horas, o una vez al mes o varios meses. Después del tratamiento, se puede vigilar a un sujeto para detectar cambios en su estado y aliviar los síntomas del trastorno. La dosis del inhibidor de Kgp puede aumentarse en caso de que el sujeto no responda significativamente a un nivel de dosis concreto, o la dosis puede disminuirse si se observa un alivio de los síntomas del trastorno, o si el trastorno se ha remediado, o si se observan efectos secundarios inaceptables con una dosis particular.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de Kgp puede administrarse al sujeto en un régimen de tratamiento que comprenda intervalos de al menos 1 hora, o 6 horas, o 12 horas, o 24 horas, o 36 horas, o 48 horas entre dosis. La administración puede realizarse a intervalos de al menos 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 o 240 horas (es decir, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días). En determinadas realizaciones, la administración del compuesto de la presente invención se lleva a cabo de forma crónica durante periodos que van desde varios meses a varios años. De acuerdo con ello, algunas realizaciones de la invención proporcionan el compuesto de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por *P. gingivalis* como se ha descrito anteriormente, en donde el compuesto se administra al sujeto durante al menos un mes. En algunas realizaciones, el

compuesto se administra al sujeto durante al menos un año. En algunas realizaciones, el compuesto se administra al sujeto durante al menos 10 años. En algunas realizaciones, el compuesto se administra al sujeto durante al menos 60 años.

- 5 La presente invención proporciona el compuesto de la presente invención para su uso en un método que implica la administración del inhibidor de Kgp de la invención que típicamente resulta en la reducción de los niveles circulantes de Kgp activa en un sujeto y/o la reducción de Kgp activa en el cerebro. En determinadas realizaciones, esta administración del inhibidor de Kgp de la invención da como resultado al menos una reducción del 20 % de los niveles circulantes de Kgp activa y/o al menos una reducción del 20 % de Kgp activa en el cerebro. Por ejemplo, los niveles
10 circulantes de Kgp y/o los niveles de Kgp en el cerebro se reducen preferentemente entre un 25 % y un 95 %, o entre un 35 % y un 95 %, o entre un 40 % y un 85 %, o entre un 40 % y un 80 % en comparación con los niveles correspondientes de Kgp 24 horas antes de la primera administración del inhibidor de Kgp.

- 15 Los inhibidores de Kgp pueden administrarse solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales, como se ha descrito anteriormente. El uno o más agentes terapéuticamente eficaces adicionales incluyen, por ejemplo: (i) un agente farmacéuticamente aceptable que inhibe la producción de RgpA, RgpB, y/o Kgp, la translocación de RgpA, RgpB, y/o Kgp en la circulación sistémica o el cerebro, y/o efectos patológicos (por ejemplo, efectos neurotóxicos) de RgpA, RgpB, y/o Kgp en un mamífero; (ii) un agente antibacteriano que sea bacteriostático o bactericida con respecto a *P. gingivalis*; (iii) uno o más anticuerpos que se unen a RgpA, RgpB y/o Kgp (por ejemplo, 18E6, que se unen a la primera mitad del dominio de inmunoglobulina de RgpB; anticuerpo monoclonal específico de Kgp, 7B9, que reconoce un epítipo dentro del dominio catalítico de Kgp; el anticuerpo RgpA 61Bg 1.3, versiones humanizadas de cualquiera de los anteriores, etc.); (iv) epítopos de anticuerpos que se unen a RgpA, RgpB y/o Kgp u otras proteínas expresadas por *P. gingivalis*; y (v) combinaciones de cualquiera de los anteriores.

- 25 Los agentes terapéuticamente activos adicionales también incluyen reductores del nivel de péptidos A β , reductores de tau de nivel patogénico, estabilizadores de microtúbulos, agentes capaces de eliminar las placas ateroscleróticas, agentes que reducen los niveles circulantes de β -amiloide y tau, moduladores de la autofagia, reguladores del nivel de neurotransmisores, inhibidores de los receptores GABA(A) $\alpha 5$, y agentes adicionales que ayuden a mantener y/o restaurar la función cognitiva y los déficits funcionales de la enfermedad de Alzheimer, y/o a ralentizar el deterioro de las funciones cognitivas y los déficits funcionales de la enfermedad de Alzheimer.

- 30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener el compuesto de la presente invención en combinación con ritonavir (RTV), que puede aumentar la biodisponibilidad e incrementar la penetración en la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, ritonavir suele combinarse con inhibidores péptidos orales de la proteasa del VIH para aumentar los niveles plasmáticos mediante la inhibición de la enzima P450 3A4 y disminuir de este modo el metabolismo de primer paso (véase, Walmsley, *et al.*, N Engl J Med, 2002. 346(26): 2039-46). Además, el RTV se une a la glicoproteína P, una bomba transmembrana de eflujo que se encuentra en muchos tejidos, incluyendo la barrera hematoencefálica, permitiendo a los compuestos coadministrados un mejor acceso al cerebro (véase, Marzolini, *et al.*, Mol Pharm, 2013. 10(6): 2340-9). Por consiguiente, puede utilizarse una combinación de RTV e inhibidores de Kgp
35 para aumentar las concentraciones plasmáticas y los niveles cerebrales de los inhibidores de la gingipaina. Como se describe en la solicitud de Pat. de los EE.UU. N.º 14/875.416 (publicada como US 2016/096830 A1), la administración oral de RTV 15 minutos antes del inhibidor de Kgp Kyt-36 aumenta la semivida, por lo que se espera que el RTV también aumente la semivida de otros inhibidores de Kgp.

- 45 En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse con inhibidores naturales de la gingipaina, incluyendo la melabaricona C, aislados de la nuez moscada o compuestos polifenólicos derivados de plantas, tales como el arándano rojo, el té verde, la manzana y el lúpulo pueden administrarse conjuntamente para el tratamiento o la prevención de trastornos cerebrales. Los péptidos antimicrobianos naturales y no naturales que incluyen: péptido de x-caseína (109-137) 34, histatina 5 y CL(14-25), CL(K25A) y CL(R24A, K25A), también pueden administrarse junto con el inhibidor de Kgp de la invención. (véase, por ejemplo, Taniguchi *et al.*, *Biopolymers*, 2014. 102(5): 379-89).

- 50 Los inhibidores de Kgp descritos en el presente documento pueden administrarse con anticuerpos dirigidos contra gingipainas u otras proteínas de *P. gingivalis*. Los anticuerpos pueden depender del daño a la barrera hematoencefálica para acceder al cerebro o de la interferencia periférica con las gingipainas y la propagación de *P. gingivalis*. Los anticuerpos también pueden ayudar a estimular la eficacia del sistema inmunitario para eliminar las bacterias. Los anticuerpos nuevos o existentes contra la RgpA, RgpB, o Kgp pueden ser utilizados incluyendo 18E6 y 7B9. Un anticuerpo RgpA 61BG 1.3 ha demostrado previamente su eficacia tópica en la prevención de la recolonización por *P. gingivalis* tras el tratamiento periodontal. Véase, Booth *et al.*, *Infect Immun*, 1996. 64(2): 422-7.
60 Los anticuerpos serían preferentemente humanizados para su uso en humanos. Se pueden utilizar métodos conocidos en el campo del suministro de productos biológicos para mejorar la semivida y la penetración en el cerebro incluyendo, pero sin limitación, suministro intravenoso, suministro subcutáneo, suministro intranasal, suministro intratecal, suministro intraarticular, transporte vectorial y suministro directo al cerebro.

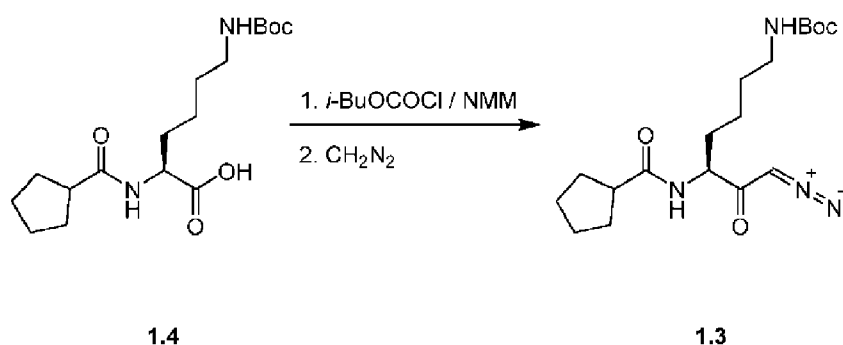
- 65 El compuesto de la invención es también para su uso en métodos de tratamiento que abarcan la administración del compuesto de la invención con uno o más de los siguientes agentes terapéuticamente activos adicionales o sales

farmacéuticamente aceptables de los mismos: un derivado de la arginina; histatina 5; baculovirus p35; un único mutante puntual del modificador de la citocina viral de la viruela bovina (CrmA (Asp > Lys)); fenilalanil-ureido-citrulinil-valil-cicloarginal (FA-70C1); (acicloxi)metilcetona (Cbz-Phe-Lys-CH₂OCO-2,4,6-Me₃Ph); peptidil cloro-metil cetonas (por ejemplo, derivados de clorometil cetona de la arginina, derivados de clorometil cetona de la lisina y similares);
 5 fluoro-metil-cetonas; bromometilcetonas; cetopéptidos; ácido 1-(3-fenilpropionil)piperidin-3(R,S)-carboxílico [4-amino-1(S)-(benzotiazol-2-carbonil)butil]amida (A71561); azapéptido de fumaramida; azapéptido de aceptores de Michael; compuestos de benzamida; aciclometilcetona; inhibidores del factor X activado (por ejemplo, DX-9065a); fracción no dializable del arándano; fracción de polifenoles del arándano rojo; inhibidor de la tripsina pancreática; Cbz-Phe-Lys-CH₂O-CO-2,4,6-Me₃-Ph; E-64; clorhexidina; zinc (por ejemplo, acetato de zinc); o una combinación de ambos, tres o
 10 más de cualquiera de los anteriores. En algunas de estas realizaciones, el Zn puede mejorar la potencia y selectividad de los compuestos (por ejemplo, clorhexidina, benzamida, etc.) utilizados en estos métodos.

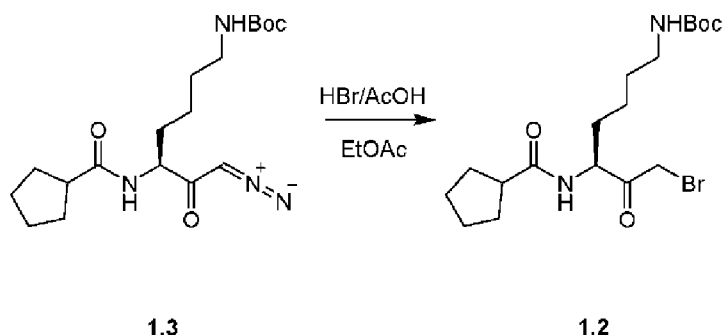
El inhibidor de Kgp de la invención puede administrarse en la misma composición que un agente terapéuticamente activo adicional. De manera alternativa, el agente terapéuticamente activo adicional puede administrarse antes por separado, simultáneamente o después de la administración del inhibidor de Kgp.

VIII. Ejemplos

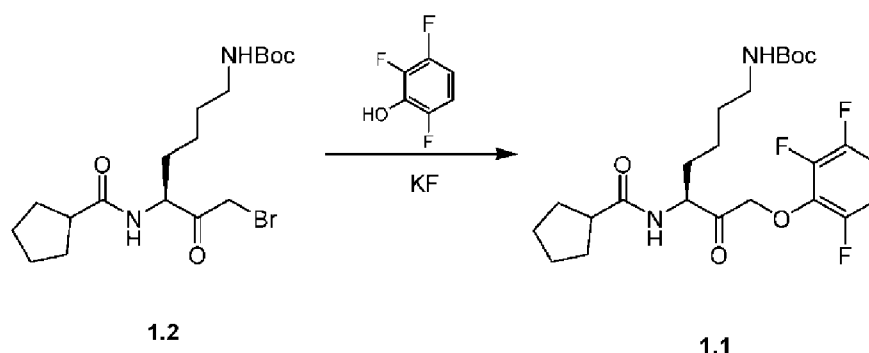
Ejemplo 1. Preparación de clorhidrato de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (1)



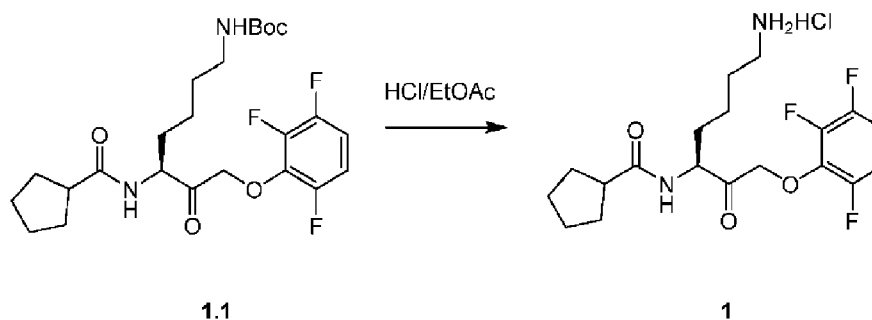
A una mezcla del compuesto **1.4** (23,0 g, 67,2 mmol, 1,00 equiv.) en THF (200 ml) se añadió NMM (6,79 g, 67,2 mmol, 7,38 ml, 1,00 equiv.), clorhidrato de carbono isobutilo (9,17 g, 67,2 mmol, 8,82 ml, 1,00 equiv.), y diazometano (5,65 g, 134 mmol, 2,00 equiv.) a -40 °C en N₂ a 103 kPa (15 psi). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La LCMS mostró que la reacción se había completado. Se añadió H₂O (200 ml) a la reacción y se extrajo con dos porciones de 300 ml de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con dos porciones de 200 ml de salmuera (200, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **1.3** en bruto (30,0 g, bruto) como un aceite de color amarillo.



A una mezcla del compuesto **1.3** (20,0 g, 54,6 mmol, 1,00 equiv.) en EtOAc (300 ml) se añadió bromuro de hidrógeno (29,8 g, 121,7 mmol, 20,0 ml, pureza del 33 %, 2,23 equiv.) a -20 °C en N₂ a 103 kPa (15 psi). La mezcla se agitó a -20 °C durante 10 min. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo = 0:1) mostró que la reacción se había completado. La reacción se basificó mediante adición de NaHCO₃ saturado hasta que el pH de la mezcla alcanzó 8, y la mezcla se extrajo con tres porciones de 500 ml de EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con dos porciones de 200 ml de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto **1.2** en bruto (15,0 g, bruto) como un sólido de color amarillo.

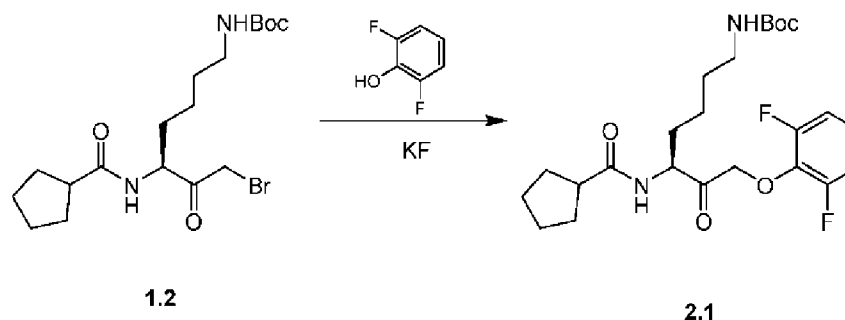


A una mezcla del compuesto **1.2** (4,00 g, 9,54 mmol, 1,00 equiv.) en DMF (40,0 ml) se añadió 2,6-difluorofenol (1,49 g, 11,4 mmol, 1,20 equiv.) y KF (1,66 g, 28,6 mmol, 670 μ l, 3,00 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 3 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo = 1:1) mostró que la reacción se había completado. Se añadió H₂O (150 ml) a la mezcla y se extrajo con dos porciones de 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con dos porciones de 100 ml de salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo = 100:1, 5:1) para proporcionar el compuesto **1.1** (2,50 g, 5,35 mmol, rendimiento del 56,1 %) como un sólido de color amarillo.

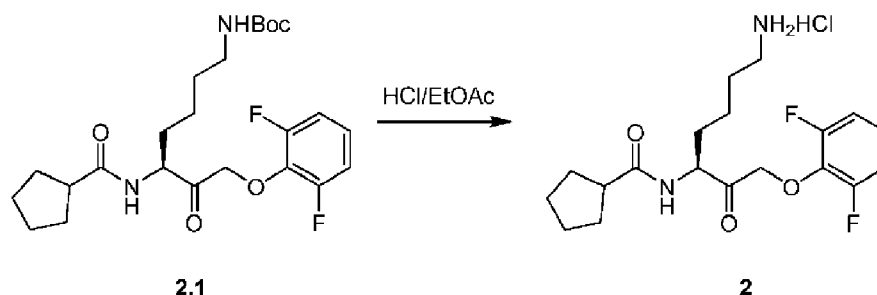


A una mezcla del compuesto **1.1** (4,00 g, 8,22 mmol, 1,00 equiv.) en EtOAc (3,00 ml) se añadió HCl/EtOAc (40,0 ml) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. La mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar sal de clorhidrato de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,6-difluorofenoxi)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida **1** (1,34 g, 3,16 mmol) como un sólido de color amarillo claro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₉H₂₅N₂F₃O₃: 387,2; encontrada 387,1; TR=2,508 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,21 - 1,83 (m, 15 H) 2,60 - 2,81 (m, 3 H) 4,30 (ddd, *J*= 9,70, 7,17, 4,52 Hz, 1 H) 5,02 - 5,22 (m, 2 H) 7,12 - 7,24 (m, 2 H) 7,98 (s a, 3 H) 8,32 (d, *J*= 7,28 Hz, 1 H).

Ejemplo 2. Preparación de clorhidrato de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (**2**)

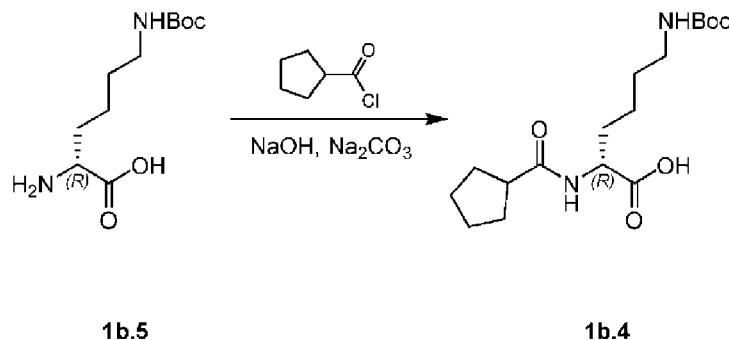


El compuesto **1.2** (4,00 g, 9,54 mmol, 1,00 equiv.) se preparó como se ha descrito anteriormente y se combinó con DMF (40,0 ml), 2,6-difluorofenol (1,49 g, 11,5 mmol, 1,20 equiv.), y KF (1,66 g, 28,6 mmol, 670 μ l, 3,00 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 3 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo = 1:1) mostró que la reacción se había completado. Se añadió H₂O (150 ml) a la mezcla y se extrajo con acetato de etilo (100 ml*2). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml*2), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo = 100:1, 5:1) para proporcionar el compuesto **2.1** (2,50 g, 5,35 mmol, rendimiento del 56,1 %) como un sólido amarillo.

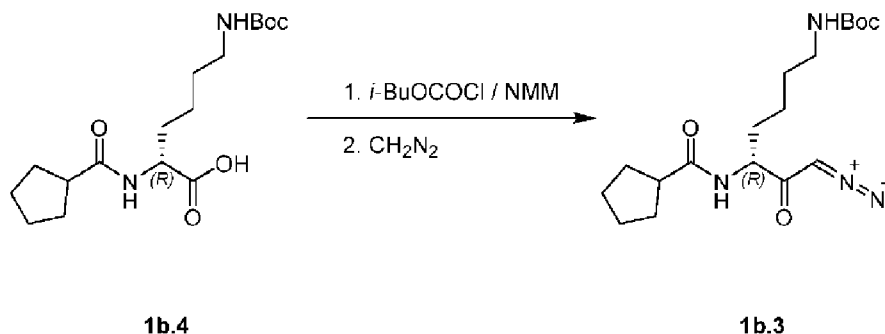


A una mezcla del compuesto **2.1** (3,50 g, 7,47 mmol, 1,00 equiv.) en EtOAc (2,00 ml) se añadió HCl/EtOAc (20,0 ml) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=1:1) mostró que la reacción se había completado. El residuo se purificó previamente mediante HPLC preparativa (ácida) para proporcionar sal de clorhidrato de (*S*)-*N*-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida **2** (1,13 g, 2,79 mmol) como un sólido de color amarillo claro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₉H₂₆N₂F₂O₃: 369,2; encontrada 369,1; TR=2,439 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,18 - 1,84 (m, 15 H) 2,56 - 2,82 (m, 3 H) 4,25 - 4,39 (m, 1 H) 4,92 - 5,13 (m, 2 H) 7,02 - 7,18 (m, 3 H) 7,91 (s a, 3 H) 8,27 (d a, *J*= 7,28 Hz, 1 H).

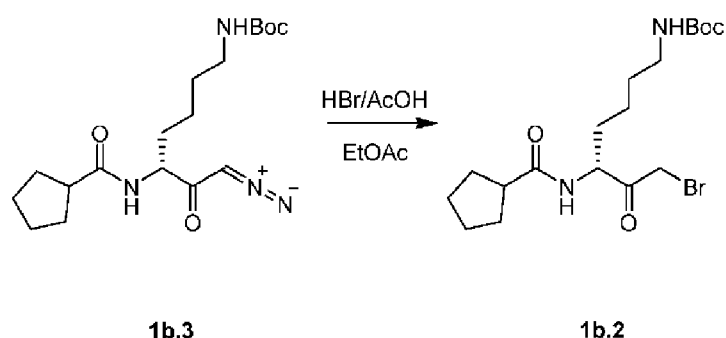
Ejemplo 3. Preparación de *N*-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)-heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida racémica



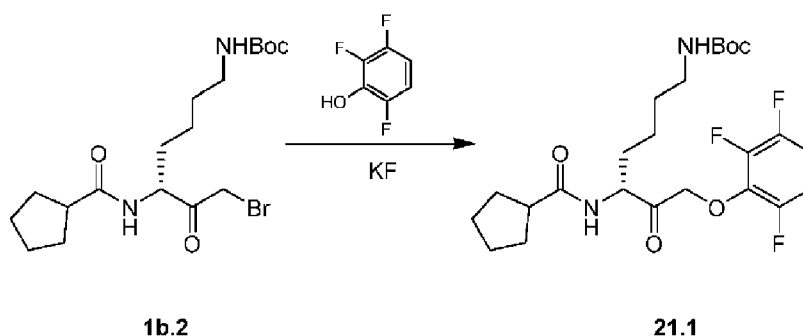
A una mezcla de ácido ciclopentanocarboxílico (4,40 g, 38,6 mmol, 4,19 ml, 0,95 equiv.) en DCM (50,0 ml) se añadió (COCl)₂ (5,87 g, 46,3 mmol, 4,05 ml, 1,14 equiv.) a 15 °C. La mezcla se agitó a 15 °C durante 30 min. Después se concentró al vacío para formar un residuo que se disolvió en EtOAc (40,0 ml). La solución resultante se añadió gota a gota a una mezcla del compuesto **1b.5** (10,0 g, 40,6 mmol, 1,00 equiv.), Na₂CO₃ (5,16 g, 48,7 mmol, 1,20 equiv.), y NaOH (1,64 g, 41,0 mmol, 1,01 equiv.) en H₂O (80,0 ml) a 0 °C. A continuación, la mezcla se agitó a 15 °C durante 14 horas. La LCMS mostró que la reacción se había completado. Se eliminó el acetato de etilo y la solución restante se enfrió a 0 °C antes de ajustar el pH a 6-7 con KHSO₄ sólido. La mezcla se filtró para recoger el compuesto **1b.4** (12,0 g, 35,0 mmol, rendimiento del 86,3 %) como un sólido de color blanco.



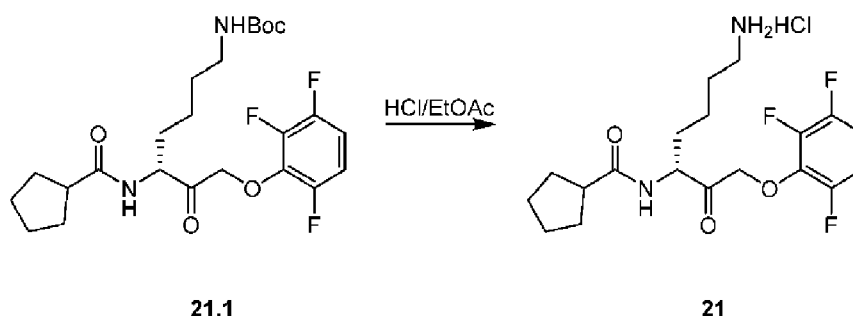
A una mezcla del compuesto **1b.4** (12,0 g, 35,0 mmol, 1,00 equiv.) en THF (300 ml) se añadió NMM (3,54 g, 35,0 mmol, 3,85 ml, 1,00 equiv.) carbonocloridato de isobutilo (4,79 g, 35,0 mmol, 4,61 ml, 1,00 equiv.), y diazometano (2,95 g, 70,1 mmol, 2,00 equiv.) a -40 °C en N₂ a 103 kPa (15 psi). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=0: 1) mostró que la reacción se había completado. Se añadió H₂O (100 ml) a la reacción y se extrajo con dos porciones de 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con dos porciones de 100 ml de salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **1b.3** (13,7 g, bruto) como un aceite de color amarillo.



A una mezcla del compuesto **1b.3** (13,7 g, 37,4 mmol, 1,00 equiv.) en EtOAc (140 ml) se añadió bromuro de hidrógeno (20,9 g, 85,3 mmol, 14,0 ml, 33 % de pureza, 2,28 equiv.) a -20 °C en N₂ a 103 kPa (15 psi). La mezcla se agitó a -20 °C durante 10 min. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. La reacción se basificó con NaHCO₃ sat. hasta que el pH alcanzó 8, y la mezcla se extrajo con tres porciones de 200 ml de EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con dos porciones de 100 ml de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto **1b.2** (8,80 g, bruto) como un sólido de color amarillo.



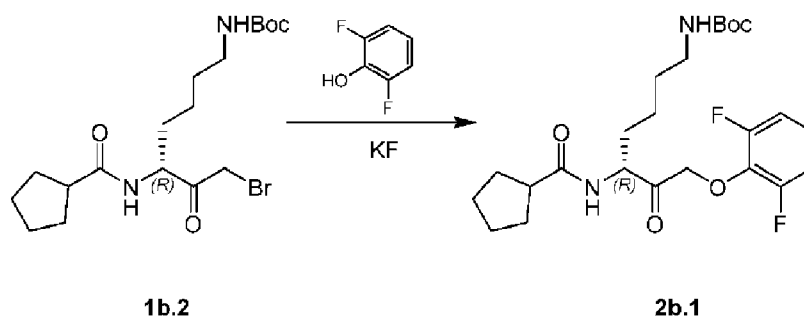
A una mezcla del compuesto **1b.2** (400 mg, 954 μmol, 1,00 equiv.) en DMF (10,0 ml) se añadió KF (166 mg, 2,86 mmol, 67,0 μl, 3,00 equiv.) y 2,3,6-trifluorofenol (170 mg, 1,14 mmol, 1,20 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. A continuación, la mezcla se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con tres porciones de 10 ml de EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto **21.1** (400 mg, 822 μmol, rendimiento del 86,2 %) como un aceite de color amarillo.



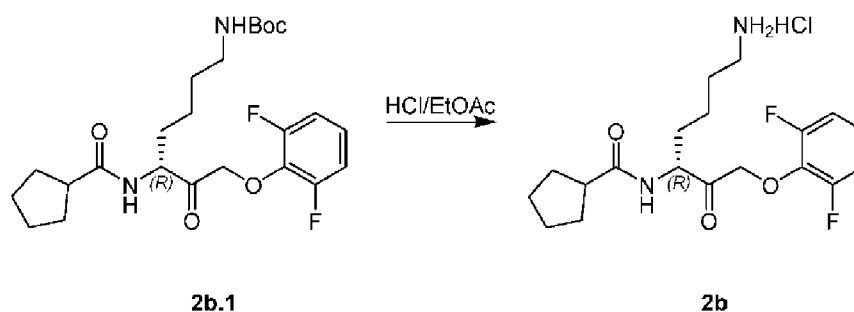
A una mezcla de compuesto **21.1** (400 mg, 822 μmol, 1,00 equiv.) en EtOAc (5,00 ml) se añadió HCl/EtOAc (822 μmol, 15,0 ml, 1,00 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. La reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **21** (90,0 mg, 213 μmol, rendimiento del 25,9 %) como un sólido de color amarillo claro.

El compuesto **1** (36 mg) y el compuesto **21** (36 mg) se mezclaron con agua (2 ml) y MeOH (0,5 ml). Después, el disolvente se eliminó mediante liofilización para proporcionar la sal de trifluoroacetato de *N*-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida racémica (72 mg).

Ejemplo 4. Preparación de *N*-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida racémica



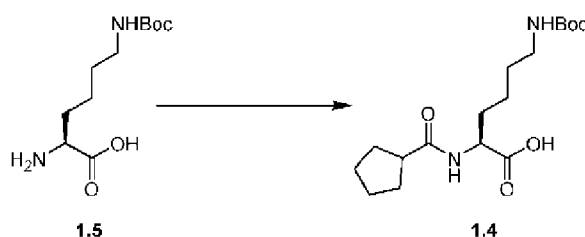
El compuesto **1b.2** (400 mg, 954 μ mol, 1,00 equiv.), preparado como se ha descrito anteriormente, se combinó con DMF (10,0 ml) KF (166 mg, 2,86 mmol, 67,0 μ l, 3,00 equiv.), y 2,6-difluorofenol (149 mg, 1,14 mmol, 1,20 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 h. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. La mezcla se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con tres porciones de 10 ml de EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar **2b.1** en bruto (400 mg, bruto) como un aceite de color amarillo.



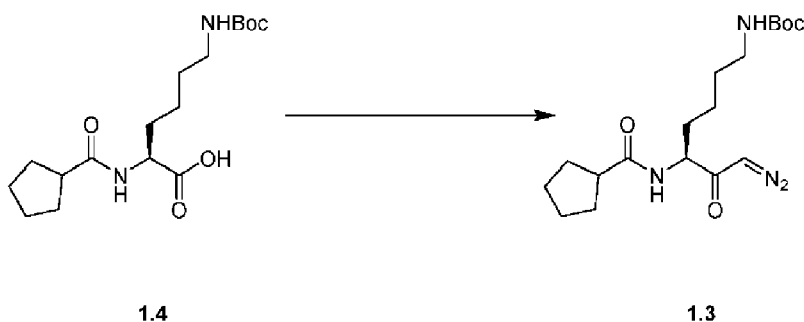
A una mezcla de **2b.1** (400 mg, 856 μ mol, 1,00 equiv.) en EtOAc (5,00 ml) se añadió HCl/EtOAc (856 μ mol, 15,0 ml, 1,00 equiv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min. La TLC (éter de petróleo: acetato de etilo=2:1) mostró que la reacción se había completado. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **2b** (70,0 mg, 173 μ mol, rendimiento del 20,2 %) como un sólido de color amarillo claro.

Se preparó una mezcla racémica de sal de trifluoroacetato de *N*-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxy)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (55 mg) combinando el compuesto **2** y el compuesto **2b** como se describió anteriormente para el compuesto **1** y el compuesto **21**.

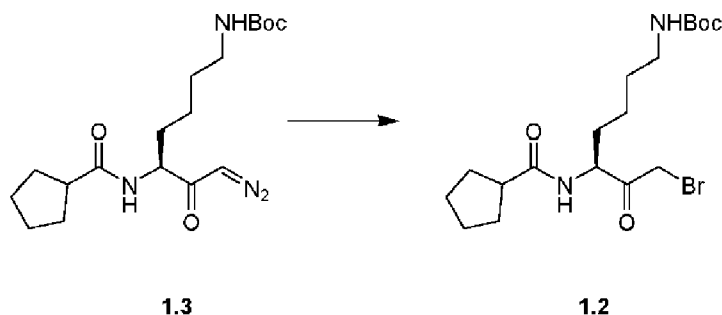
Ejemplo 5. Preparación de (*S*)-*N*-(7-amino-1-(2-fluorofenoxy)-2-oxoheptan-3-il)ciclo-pentanocarboxamida (**3**)



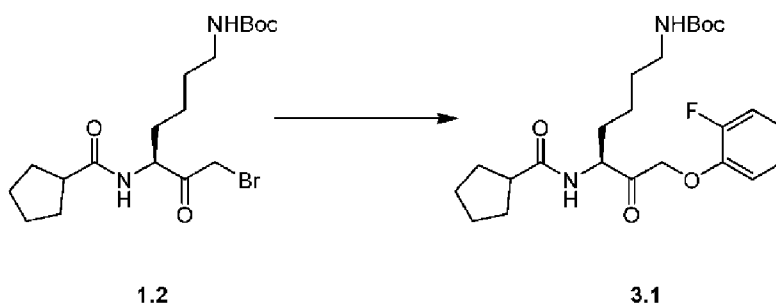
A una mezcla de compuesto **1.5** (10,00 g, 40,60 mmol, 1,00 equiv.) y cloruro de ciclopentanocarbonilo (5,92 g, 44,66 mmol, 5,43 ml, 1,10 equiv.) en EtOAc (20,00 ml) se añadieron Na₂CO₃ (5,16 g, 48,72 mmol, 1,20 equiv.) y NaOH (1,64 g, 41,01 mmol, 1,01 equiv.) en H₂O (80,00 ml) a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 10 °C durante 3 horas. Se eliminó el EtOAc ya continuación se enfrió la solución a 0 °C y se ajustó el pH a 6-7 con HCl (1 N). La suspensión se filtró, y la torta de filtración se lavó con 50 ml de PE y se secó al vacío para proporcionar el compuesto **1.4** (10,60 g, 30,96 mmol, rendimiento del 76,26 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₇H₃₀N₂O₅: 343,4; encontrada 343,2; TR = 1,022 min.



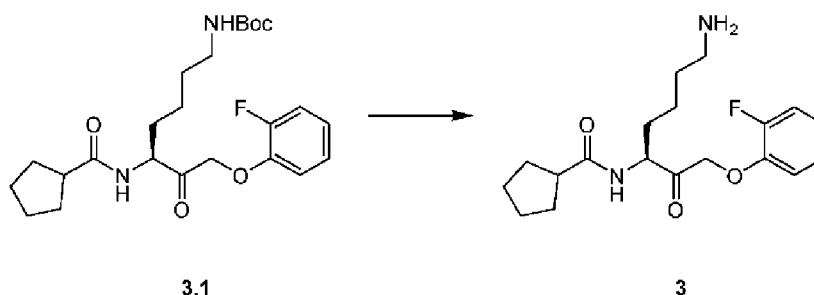
A una mezcla del compuesto **1.4** (2,00 g, 5,84 mmol, 1,00 equiv.) en THF (20,00 ml) se añadió NMM (708,86 mg, 7,01 mmol, 770.50 μ l, 1,20 equiv.) y carbonocloridato de isobutilo (797,61 mg, 5,84 mmol, 766,93 μ l, 1,00 equiv.) en una porción a -20 °C en N₂. La mezcla se agitó a -20 °C durante 1 hora. Se añadió una solución de diazometano en Et₂O (20 ml) a 0 °C y se agitó durante 2 horas. La mezcla se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (PE/EtOAc= 1/1) para proporcionar el compuesto **1.3** (130,00 mg, 354,76 μ mol) como un sólido de color amarillo. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₈H₃₀N₄O₄: 367,4; encontrada 339,2; TR = 0,772 min.



A una mezcla del compuesto **1.3** (130,00 mg, 354,75 μ mol, 1,00 equiv.) en EtOAc (1,00 ml) se añadió HBr/AcOH (150,00 μ l, pureza del 33 %) en una porción a -20 °C en N₂. La mezcla se agitó a -20 °C durante 10 min en atmósfera de N₂, se basificó con NaHCO₃ sat. hasta pH = 8, y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μ mol, rendimiento del 67,22 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₈H₃₁N₂O₄: 420,3; encontrada 316,2; TR = 0,709 min.

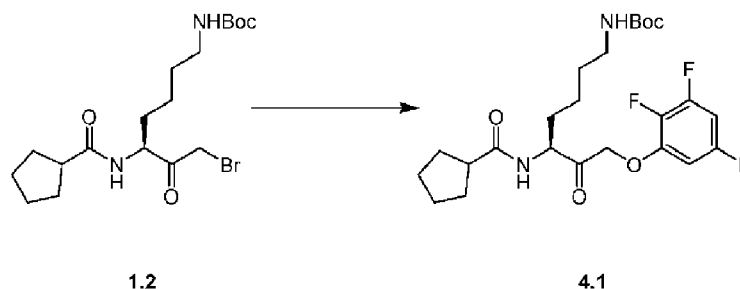


A una mezcla del compuesto **1.2** (50,00 mg, 119,23 μ mol, 1,00 equiv.) y 2-fluorofenol (13,37 mg, 119,23 μ mol, 11,05 μ l, 1,00 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (20,78 mg, 357,69 μ mol, 8,38 μ l, 3,00 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 5 ml 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **3.1** (15,00 mg, 33,29 μ mol, rendimiento del 27,92 %) como un aceite de color amarillo. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₂₄H₃₆N₂O₅F: 451,5; encontrada 451,4; TR = 0,929 min.

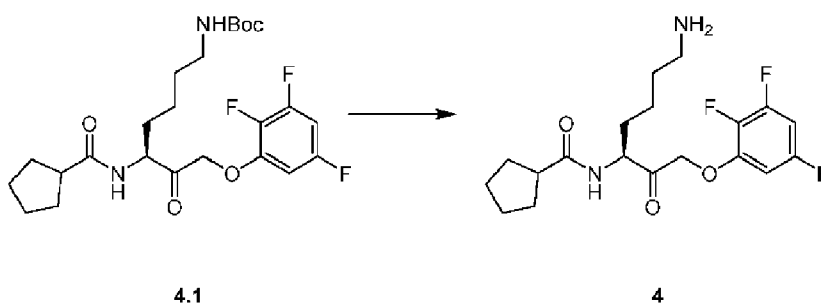


Una mezcla del compuesto **3.1** (15,00 mg, 33,29 μmol , 1,00 equiv.) en HCl/EtOAc (1,00 ml) se agitó a 20 °C durante 3 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **3** (2,00 mg, 5,71 μmol , rendimiento del 17,14 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{F}$: 351,4; encontrada 351,3; TR=2,477 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,25 - 1,83 (m, 17 H) 2,61 - 2,87 (m, 4 H) 4,24 - 4,43 (m, 1 H) 4,95 - 5,13 (m, 2 H) 6,87 - 7,27 (m, 4 H) 7,83 (s a, 3 H) 8,31 (d, $J=6,90$ Hz, 1 H).

Ejemplo 6. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,5-trifluorofenoxi)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (4)

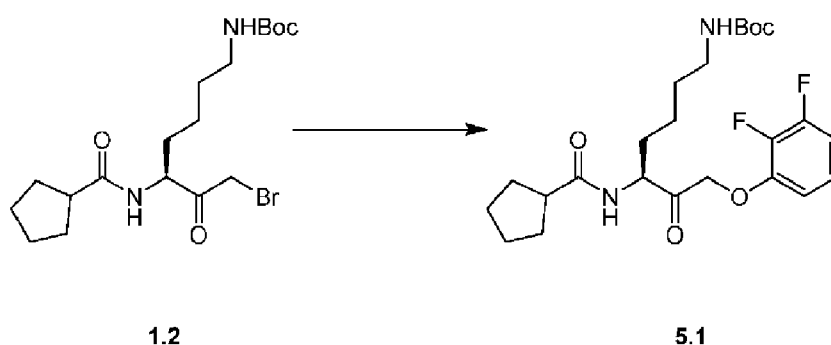


A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μmol , 1,00 equiv.) y 2,3,5-trifluorofenol (42,37 mg, 286,15 μmol , 1,20 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (41,56 mg, 715,38 μmol , 16,76 μl , 3,00 equiv.) en una porción a 25 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H_2O (50 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **4.1** (50,00 mg, 102,77 μmol , rendimiento del 43,10 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{F}_3\text{O}_5$: 487,2; encontrada 487,3; TR = 0,936 min.

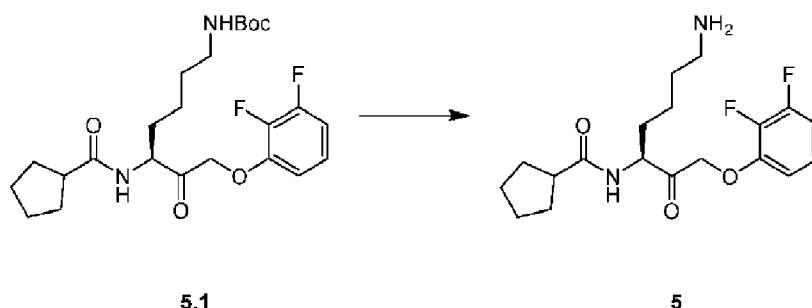


Una mezcla del compuesto **4.1** (50,00 mg, 102,77 μmol , 1,00 equiv.) en HCl/EtOAc (2,00 ml) se agitó en N_2 a 20 °C durante 15 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **4** (30,00 mg, 77,64 μmol , rendimiento del 75,55 %) como un sólido blanco. LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{F}_3\text{O}_3$: 387,2; encontrada 387,2; TR=2,321 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,24 - 1,85 (m, 15 H) 2,63 - 2,83 (m, 3 H) 4,20 - 4,35 (m, 1 H) 5,18 (d, $J=1,32$ Hz, 2 H) 6,83 - 7,14 (m, 2 H) 7,98 (s a, 3 H) 8,44 (d, $J=6,62$ Hz, 1 H).

Ejemplo 7. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,3-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (5)

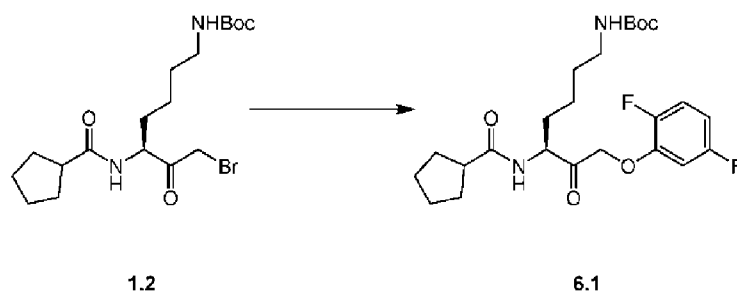


A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μ mol, 1,00 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (41,56 mg, 715,38 μ mol, 16,76 μ l, 3,00 equiv.) y 2,3-difluorofenol (37,23 mg, 286,15 μ mol, 1,20 equiv.) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H_2O (5ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 5ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, y se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **5.1** (50,00 mg, 106,72 μ mol, rendimiento del 44,75 %) como un sólido de color blanco.

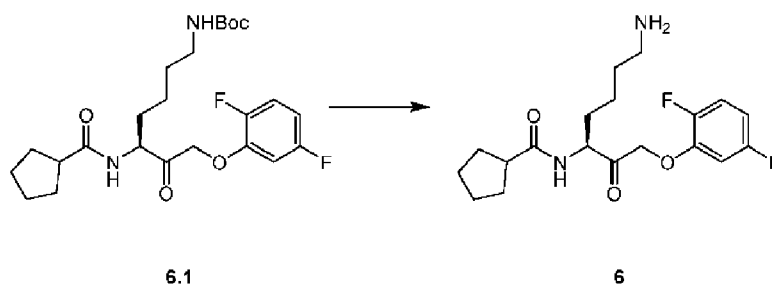


Una mezcla del compuesto **5.1** (50,00 mg, 106,72 μ mol, 1,00 eq) en HCl/EtOAc (2,00 ml) se agitó en N_2 a 20 °C durante 15 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **5** (15,00 mg, 40,71 μ mol, rendimiento del 38,15 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $C_{19}H_{26}N_2F_2O_3$: 369,2; encontrada 369,2; TR=2,246 min. RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1,23 - 1,83 (m, 15 H) 2,62 - 2,83 (m, 3 H) 4,32 (ddd, J = 9,59, 6,73, 4,63 Hz, 1 H) 5,03 - 5,19 (m, 2 H) 6,77 - 7,14 (m, 3 H) 7,90 (s a, 3 H) 8,36 (d, J = 6,83 Hz, 1 H).

Ejemplo 8. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,5-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (**6**)

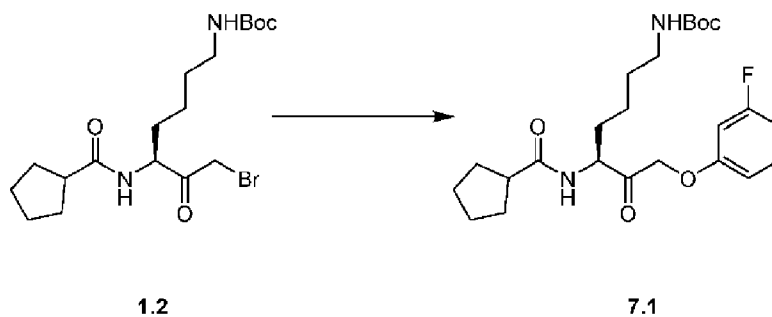


A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μ mol, 1,00 eq) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (41,56 mg, 715,38 μ mol, 16,76 μ l, 3,00 eq) y 2,5-difluorofenol (37,23 mg, 286,15 μ mol, 1,20 eq) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H_2O (5 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (5 ml*3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **6.1** (41,00 mg, 87,51 μ mol, rendimiento del 36,70 %) como un sólido de color blanco.

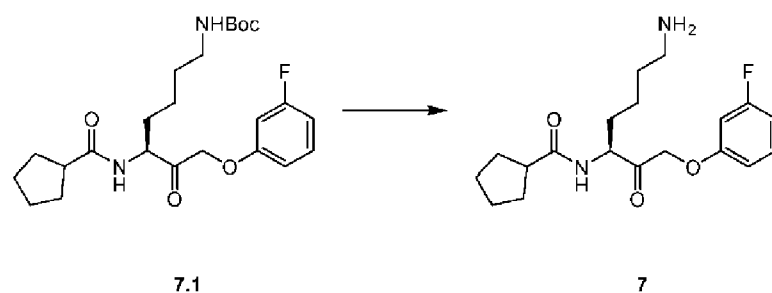


Una mezcla del compuesto **6.1** (41,00 mg, 87,51 μmol , 1,00 equiv.) en HCl/EtOAc (2,00 ml) se agitó en N_2 a 20 °C durante 15 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **6** (17,00 mg, 46,14 μmol , rendimiento del 52,73 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}]$ calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{F}_2\text{O}_3$: 369,2; encontrada 369,2; TR=2,239 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,10 - 1,85 (m, 16 H) 2,62 - 2,84 (m, 3 H) 4,31 (t a, $J = 10,23$ Hz, 1 H) 5,02 - 5,18 (m, 2 H) 6,69 - 7,33 (m, 3 H) 7,85 (s a, 3 H) 8,35 (d a, $J = 6,65$ Hz, 1 H).

10 Ejemplo 9. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(3-fluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (**7**)

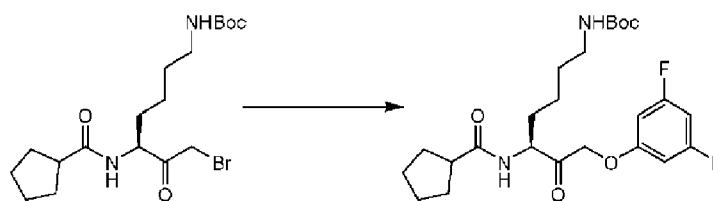


A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μmol , 1,00 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (41,56 mg, 715,38 μmol , 16,76 μl , 3,00 equiv.) y 3-fluorofenol (32,08 mg, 286,15 μmol , 26,30 μl , 1,20 equiv.) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H_2O (5 ml), la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 5 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **7.1** (47,00 mg, 104,32 μmol , rendimiento del 43,75 %) como un sólido de color blanco.



Una mezcla del compuesto **7.1** (47,00 mg, 104,32 μmol , 1,00 eq) en HCl/EtOAc (2,00 ml) se agitó en N_2 a 20 °C durante 15 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **7** (20,00 mg, 57,07 μmol , rendimiento del 54,71 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}]$ calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{FO}_3$: 351,2; encontrada 351,2; TR=2,205 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,19 - 1,85 (m, 15 H) 2,60 - 2,87 (m, 3 H) 4,33 (ddd, $J = 9,43, 6,67, 4,85$ Hz, 1 H) 4,93 - 5,13 (m, 2 H) 6,61 - 6,88 (m, 3 H) 7,68 (s a, 3 H) 8,27 (d, $J = 6,84$ Hz, 1 H).

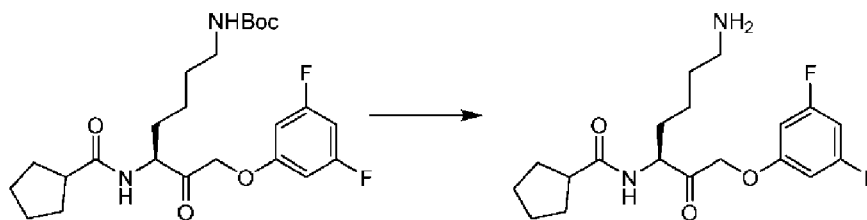
Ejemplo 10. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(3,5-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (**8**)



1.2

8.1

A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μ mol, 1,00 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió KF (41,56 mg, 715,38 μ mol, 16,76 μ l, 3,00 equiv.) y 3,5-difluorofenol (37,23 mg, 286,15 μ mol, 1,20 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H₂O (5 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 5 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. A continuación, el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **8.1** (50,00 mg, 106,72 μ mol, rendimiento del 44,75 %) como un sólido de color blanco.

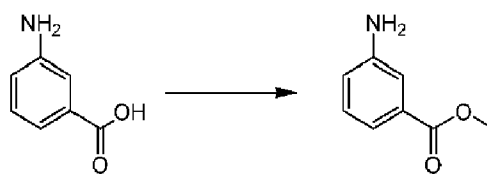


8.1

8

Una mezcla del compuesto **8.1** (50,00 mg, 106,72 μ mol, 1,00 equiv.) en HCl/EtOAc (2,00 ml) se agitó en N₂ a 20 °C durante 4 horas. La solución se evaporó para eliminar los disolventes orgánicos. La solución acuosa residual se liofilizó para obtener la sal de clorhidrato del compuesto **8** (20,00 mg, 54,29 μ mol, rendimiento del 50,87 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₉H₂₆N₂F₂O₃: 369,2; encontrada 369,1; TR=2,750 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,24 - 1,82 (m, 15 H) 2,61 - 2,83 (m, 3 H) 4,32 (ddd, *J*=9,43, 6,67, 4,85 Hz, 1 H) 4,96 - 5,08 (m, 2 H) 6,67 (dd, *J*=9,48, 2,21 Hz, 2 H) 6,79 (tt, *J*=9,43, 2,26 Hz, 1 H) 7,67 (s a, 3 H) 8,26 (d, *J*= 6,84 Hz, 1 H).

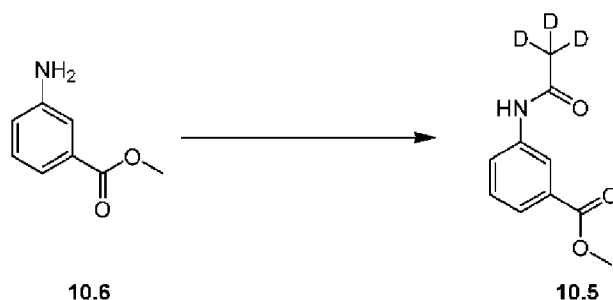
Ejemplo 11. Preparación de (R)-3-(acetamido-2,2,2-d₃)-N-(7-amino-1-(2,6-difluoro-fenoxi)-2-oxoheptan-3-il)benzamida (10)



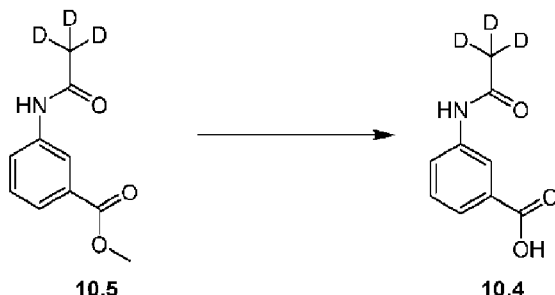
10.7

10.6

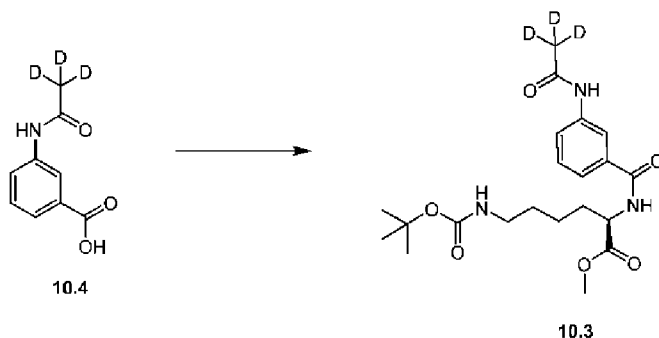
A una solución del compuesto **10.7** (10,00 g, 72,92 mmol, 1,00 equiv.) en MeOH (100,00 ml) se añadió SOCl₂ (17,35 g, 145,84 mmol, 10,58 ml, 2,00 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 65 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H₂O (20ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto **10.6** (13,10 g, bruto) como sólido de color blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₈H₉NO₂: 152,1; encontrada 152,2; TR=1,191 min. RMN ¹H (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 3,35 (s, 3 H) 3,95 (s, 3 H) 7,65 - 7,72 (m, 2 H) 8,07 (s, 1 H) 8,10-8,16 (m, 1 H).



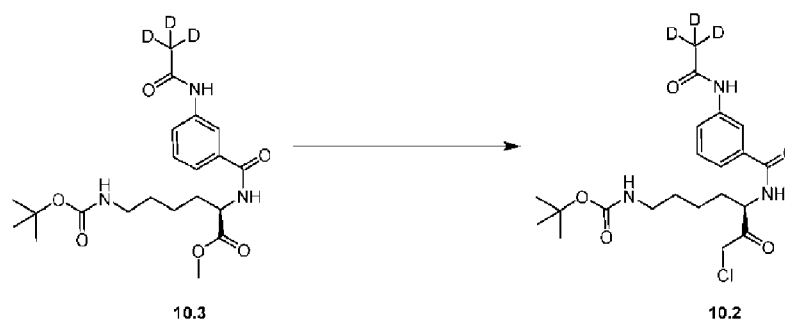
A una mezcla del compuesto **10.6** (3,77 g, 24,97 mmol, 1,00 equiv.), HOBt (3,71 g, 27,47 mmol, 1,10 equiv.), y EDCI (4,79 g, 24,97 mmol, 1,00 equiv.) en DMF (50,00 ml) se añadió DIEA (16,14 g, 124,85 mmol, 21,80 ml, 5,00 equiv.) y 2,2,2-trideuterioacetato de deuterio (1,60 g, 24,97 mmol, 1,00 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 15 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H₂O (20ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=10:1 a 2:1) para proporcionar el compuesto **10.5** (2,90 g, 14,78 mmol, rendimiento del 59,19 %) como un aceite incoloro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₀H₈D₃NO₃: 197,1; encontrada 197,2; TR=0,634 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 3,91 (s, 3 H) 7,41 (t, *J*= 7,94 Hz, 1 H) 7,51 (s a, 1 H) 7,78 (d, *J*= 7,72 Hz, 1 H) 7,92 (d a, *J*= 8,16 Hz, 1 H) 8,01 (s, 1 H).



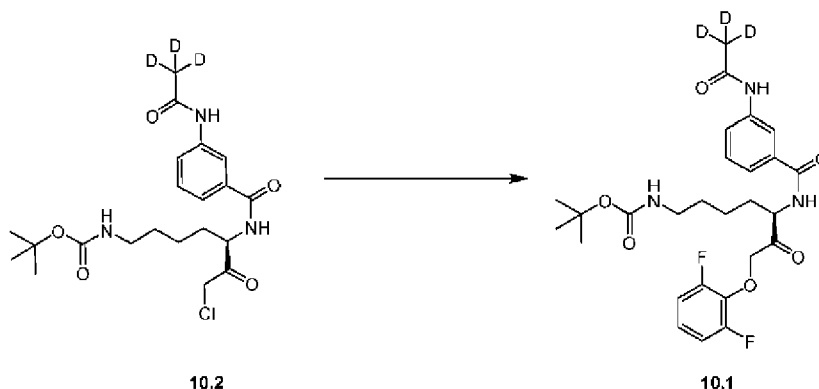
A una solución del compuesto **10.5** (2,90 g, 14,78 mmol, 1,00 equiv.) en MeOH (36,00 ml) se añadió NaOH (1,18 g, 29,56 mmol, 2,00 equiv.) en H₂O (12,00 ml) en una porción a 15 °C en N₂. La mezcla se agitó a 15 °C durante 15 horas. Se eliminó el EtOAc y a continuación se enfrió la solución a 0 °C, y el pH se ajustó a 6-7 con HCl (1 N). La suspensión se filtró y la torta de filtración se lavó con 50 ml de PE y se secó al vacío para obtener el compuesto **10.4** (2,10 g, bruto) como un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 7,41 (t, *J*= 7,94 Hz, 1 H) 7,75 (dt, *J*= 7,72, 1,32 Hz, 1 H) 7,82 (ddd, *J*= 8,05, 2,21, 0,99 Hz, 1 H) 8,21 (t, *J*= 1,87 Hz, 1 H).



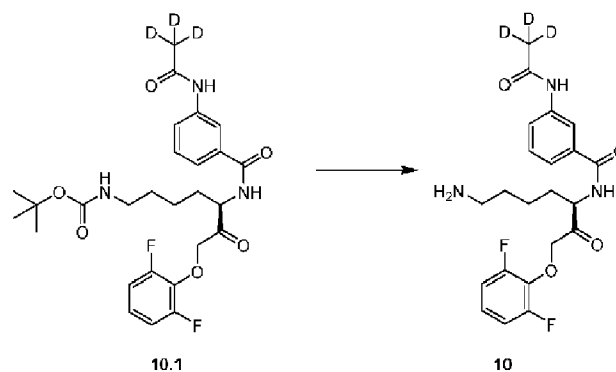
A una mezcla del compuesto **10.4** (1,00 g, 5,49 mmol, 1,00 equiv.), HOBt (815,81 mg, 6,04 mmol, 1,10 equiv.), y EDCI (1,16 g, 6,04 mmol, 1,10 equiv.) en DMF (2,00 ml) se añadió DIEA (2,84 g, 21,96 mmol, 3,83 ml, 4,00 equiv.) y (2*S*)-2-amino-6-(*tert*-butoxicarbonilamino)hexanoato de metilo (1,43 g, 5,49 mmol, 1,00 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 15 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se vertió en H₂O (30 ml), la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=4:1 a 0:1) para proporcionar el compuesto **10.3** (1,90 g, 4,48 mmol, rendimiento del 81,53 %) como un sólido de color amarillo claro. LCMS (ESI): *m/z*: [M+H] calc. para C₂₁H₂₈D₃N₃O₆: 425,2; encontrada 325,3; TR=0,757 min. RMN ¹H(400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1,31 - 1,54 (m, 14 H) 1,70 - 1,97 (m, 2 H) 2,11 - 2,19 (m, 1 H) 3,00 - 3,12 (m, 2 H) 3,71 (s, 3 H) 4,64 - 4,81 (m, 2 H) 7,11 (d a, *J*=7,50 Hz, 1 H) 7,28 - 7,36 (m, 1 H) 7,47 (d a, *J*=7,28 Hz, 1 H) 7,75 (s a, 1 H) 7,95 (d a, *J*= 7,72 Hz, 1 H) 8,47 (s a, 1 H).



A una solución de DIPA (760,95 mg, 7,52 mmol, 1,06 ml, 4,00 equiv.) en THF (15,00 ml) se añadió n-BuLi (481,73 mg, 7,52 mmol, 4,00 equiv.) a 0 °C en N₂. Después de 0,5 h, el compuesto **10.3** (800,00 mg, 1,88 mmol, 1,00 equiv.) y cloro(yodo)metano (1,33 g, 7,52 mmol, 545,83 µl, 4,00 equiv.) se añadieron a la mezcla a -78 °C en N₂. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 1,5 h. Se añadió agua (20 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto **10.2** (900,00 mg, bruto) como un aceite de color marrón oscuro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₂₁H₂₇D₃ClN₃O₅: 442,2; encontrada 339,3; TR=0,748 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1,35 - 1,59 (m, 17 H) 1,67 (s a, 3 H) 1,76 - 2,02 (m, 3 H) 3,11 (d a, *J*= 6,17 Hz, 2 H) 3,77 (s, 3 H) 4,60 - 4,82 (m, 2 H) 6,87 (s a, 1 H) 7,40 (t a, *J*= 7,61 Hz, 1 H) 7,52 (s a, 1 H) 7,66 - 7,82 (m, 2 H) 7,92 (s a, 1 H).



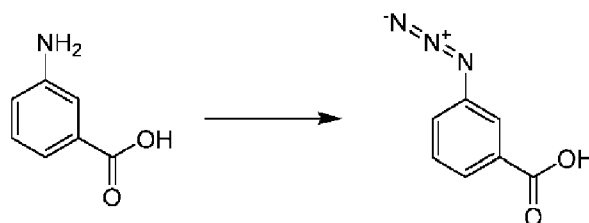
A una mezcla del compuesto **10.2** (200,00 mg, 451,52 µmol, 1,00 equiv.) y 2,6-difluorofenol (58,74 mg, 451,52 µmol, 1,00 equiv.) en DMF (4,00 ml) se añadió DIEA (175,06 mg, 1,35 mmol, 236,57 µl, 3,00 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **10.1** (20,00 mg, 37,27 µmol, rendimiento del 8,26 %) como un sólido de color marrón oscuro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₂₇H₃₀D₃F₂N₃O₆: 537,3; encontrada 481,3; TR=1,208 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1,41 (s a, 18 H) 1,80 (s a, 2 H) 2,08 - 2,24 (m, 2 H) 3,13 (s a, 3 H) 4,91 (s a, 3 H) 5,24 (s a, 1 H) 6,88 - 7,05 (m, 5 H) 7,37 - 7,46 (m, 3 H) 7,56 (s a, 2 H) 7,78 (s a, 1 H) 7,93 (s a, 1 H)



A una solución del compuesto **10.1** (10,00 mg, 18,64 µmol, 1,00 equiv.) en DCM (10,00 ml) se añadió TFA (3,08 g, 27,01 mmol, 2,00 ml, 1449,18 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 4 horas, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (en condiciones de TFA) para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **10** (1,00 mg, 2,29 µmol, rendimiento del 12,29 %) como un sólido de color marrón oscuro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₂₂H₂₂D₃F₂N₃O₄: 437,2; encontrada 437,3; TR=2,042 min. RMN ¹H (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 1,48 - 1,87 (m, 5 H) 2,13 (br s, 1 H) 2,91 - 2,99 (m, 2 H) 4,90 - 5,08 (m, 5

H) 6,94 - 7,12 (m, 3 H) 7,39 - 7,46 (m, 1 H) 7,54 - 7,65 (m, 2 H) 8,13 (s, 1 H).

Ejemplo 12. Preparación del inhibidor de gingipaina biotinilado (11)



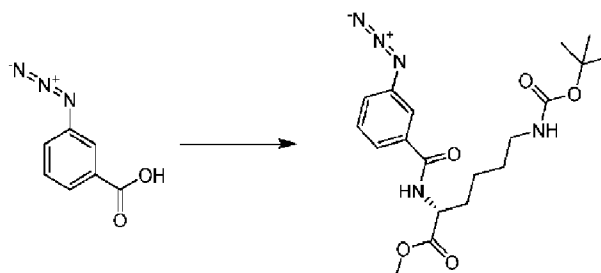
5

10.7

11.6

A una solución del compuesto **10.7** (5,00 g, 36,46 mmol, 1,00 equiv.) en CH₃CN (50,00 ml) se añadió t-BuONO (5,64 g, 54,69 mmol, 6,48 ml, 1,50 equiv.) y TMSN₃ (5,04 g, 43,75 mmol, 5,73 ml, 1,20 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 15 °C durante 1 hora, se filtró y se concentró al vacío. Se añadió H₂O (20 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 × 10 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto **11.6** (4,00 g, bruto) como sólido blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₇H₅N₃O₂: 164,0; encontrada 164,1; TR=0,705 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 2,71 (d, *J*=9,48 Hz, 1 H) 6,93 - 6,98 (m, 1 H) 7,27 - 7,32 (m, 1 H) 7,44 - 7,57 (m, 1 H) 7,79 - 7,84 (m, 1 H) 7,90 - 7,95 (m, 1 H).

15



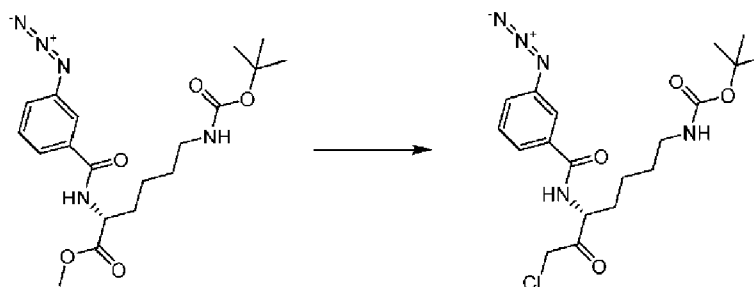
11.6

11.5

A una mezcla del compuesto **11.6** (2,00 g, 12,26 mmol, 1,00 equiv.), HOBT (1,82 g, 13,49 mmol, 1,10 equiv.), y EDCI (2,59 g, 13,49 mmol, 1,10 equiv.) en DMF (40,00 ml) se añadió (2S)-2-amino-6-(*tert*-butoxicarbonilamino)hexanoato de metilo (3,19 g, 12,26 mmol, 1,00 equiv.) y DIEA (6,34 g, 49,04 mmol, 8,57 ml, 4,00 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 15 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se vertió en H₂O (20 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 × 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=10:1 a 2:1) para proporcionar el compuesto **11.5** (3,50 g, 8,63 mmol, rendimiento del 70,39 %) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₁₉H₂₇N₅O₅: 406,2; encontrada 350,2; RT=0,840 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1,39 (s, 10 H) 1,46 - 1,56 (m, 3 H) 1,75 - 2,00 (m, 2 H) 3,05 - 3,14 (m, 2 H) 3,77 (s, 3 H) 4,64 (s, 1 H) 4,72 - 4,80 (m, 1 H) 6,94 (d, *J*=7,06 Hz, 1 H) 7,14 (ddd, *J*=8,05, 2,32, 0,88 Hz, 1 H) 7,40 (t, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,47 - 7,56 (m, 2 H)

20

25



11.5

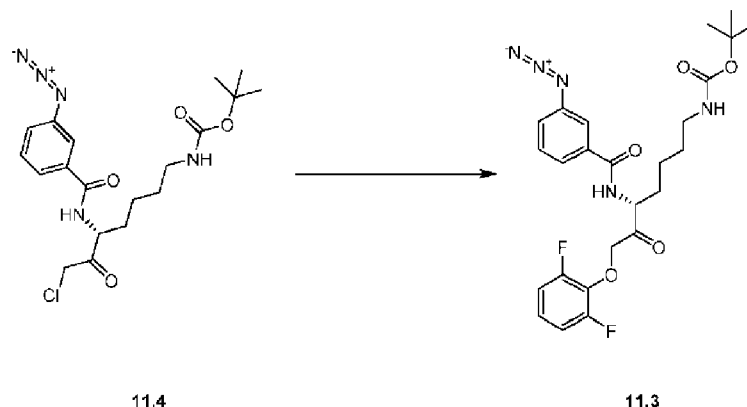
11.4

30

A una solución de DIPA (2,25 g, 22,20 mmol, 3,12 ml, 6,00 equiv.) en THF (40,00 ml) se añadió n-BuLi (1,42 g, 22,20 mmol, 6,00 equiv.) a 0 °C en N₂. Después de 0,5 h, el compuesto **11.5** (1,50 g, 3,70 mmol, 1,00 equiv.) y

cloro(yodo)metano (2,61 g, 14,80 mmol, 1,07 ml, 4,00 equiv.) se añadieron a la mezcla a -78 °C en N₂. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se añadió a agua (20 ml), y la solución se extrajo con EtOAc (3 × 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo que proporcionó el compuesto **11.4** (1,50 g, bruto)

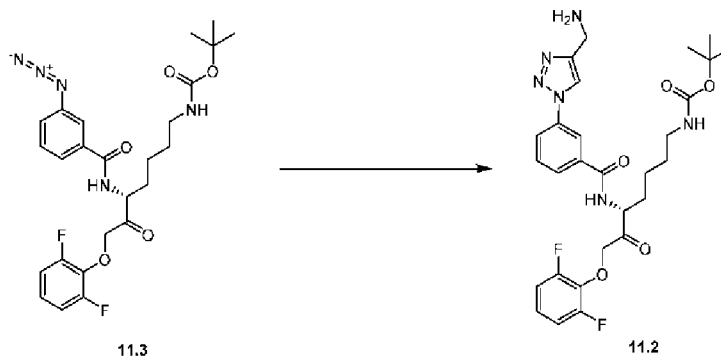
5



A una mezcla del compuesto **11.4** (1,50 g, 3,54 mmol, 1,00 equiv.) y 2,6-difluorofenol (460,34 mg, 3,54 mmol, 1,00 equiv.) en DMF (15,00 ml) se añadió DIEA (1,37 g, 10,62 mmol, 1,85 ml, 3,00 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se añadió a agua (20 ml) y la solución se extrajo con EtOAc (3 × 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=10:1 a 2:1) para proporcionar el compuesto **11.3** (400,00 mg, 772,92 μmol, rendimiento del 21,83 %) como un aceite de color amarillo claro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H]⁺ calc. para C₂₅H₂₉F₂N₅O₅: 518,2; encontrada 518,3; TR = 0,912 min.

10

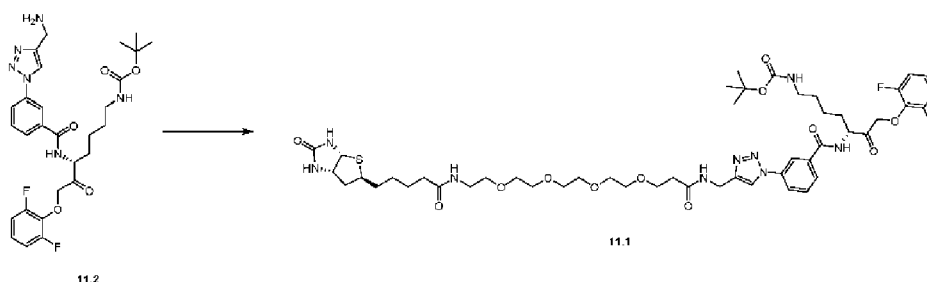
15



A una mezcla del compuesto **11.3** (270,00 mg, 521,72 μmol, 1,00 equiv.) y prop-2-in-1-amina (28,74 mg, 521,72 μmol, 33,41 μl, 1,00 equiv.) en CH₃CN (4,00 ml) se añadieron CuSO₄ (4,16 mg, 26,09 μmol, 4,00 μl, 0,05 equiv.) y ascorbato sódico (20,67 mg, 104,34 μmol, 0,20 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condiciones de TFA) para proporcionar el compuesto **11.2** (70,00 mg, 122,25 μmol, rendimiento del 23,43 %) como un aceite de color marrón oscuro. LCMS (ESI): *m/z*: [M + H]⁺ calc. para C₂₈H₃₄F₂N₆O₅: 573,3; encontrada 573,5; TR=0,846 min. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1,19 - 1,69 (m, 8 H) 2,04 (s a, 1 H) 2,67 - 3,25 (m, 3 H) 4,45 (s a, 1 H) 4,72 - 5,15 (m, 2 H) 6,78 - 7,09 (m, 2 H) 7,58 - 8,01 (m, 2 H) 8,16 - 8,49 (m, 1 H) 8,63 - 9,26 (m, 1 H).

20

25

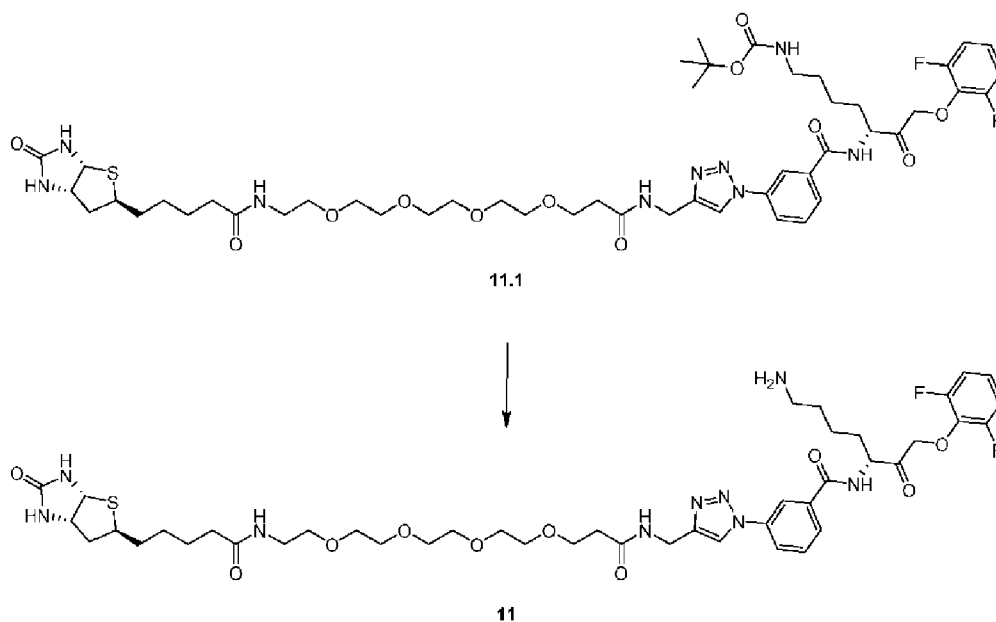


30

A una mezcla de BIOTINA-DPEG(4)-COOH (34,34 mg, 69,86 μmol, 1,00 equiv.), HOBt (9,44 mg, 69,86 μmol, 1,00

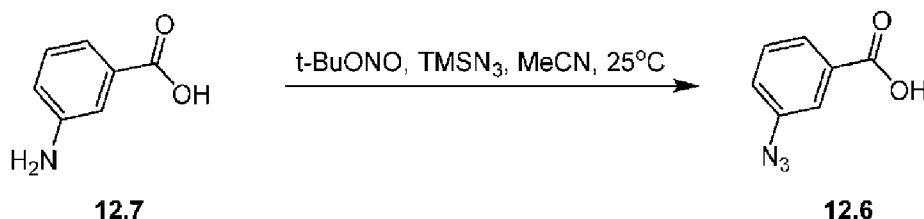
equiv.), y EDCI (13,39 mg, 69,86 μmol , 1,00 equiv.) en DMF (1,00 ml) se añadió el compuesto **11.2** (40,00 mg, 69,86 μmol , 1,00 equiv.) y DIEA (36,11 mg, 279,44 μmol , 4,00 equiv.) en una porción a 0 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condiciones de TFA) para proporcionar el compuesto **11.1** (20,00 mg, 19,12 μmol , rendimiento del 27,37 %) como un sólido de color blanco.

5 LCMS (ESI): m/z : $[M + H]^+$ calc. para $\text{C}_{49}\text{H}_{69}\text{F}_2\text{N}_9\text{O}_{12}\text{S}$: 1046,5; encontrada 1046,3; TR=1,115 min. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,21 - 1,34 (m, 12 H) 1,35 - 1,75 (m, 9 H) 1,85 (dd a, J = 9,59, 3,64 Hz, 1 H) 2,05 (t, J = 7,39 Hz, 2 H) 2,35 - 2,42 (m, 1 H) 2,38 (t, J = 6,50 Hz, 1 H) 2,53 - 2,60 (m, 2 H) 2,80 (dd, J = 12,35, 5,07 Hz, 1 H) 2,89 (d a, J = 5,95 Hz, 2 H) 3,08 (ddd, J = 8,49, 6,06, 4,63 Hz, 1 H) 3,16 (q, J = 5,88 Hz, 2 H) 3,44 - 3,50 (m, 15 H) 3,62 (t, J = 6,50 Hz, 3 H) 4,11 (dd, J = 7,72, 4,41 Hz, 1 H) 4,29 (dd, J = 7,72, 4,41 Hz, 1 H) 4,40 (d, J = 5,73 Hz, 2 H) 4,59 - 4,67 (m, 1 H) 5,06 - 5,20 (m, 2 H) 6,76 (t a, J = 5,51 Hz, 1 H) 7,06 - 7,14 (m, 3 H) 7,71 (t, J = 8,05 Hz, 1 H) 7,82 (t, J = 5,62 Hz, 1 H) 7,95 - 8,00 (m, 1 H) 8,06 (ddd, J = 8,16, 2,21, 0,88 Hz, 1 H) 8,36 (t, J = 1,76 Hz, 1 H) 8,45 (t, J = 5,51 Hz, 1 H) 8,64 (s, 1 H) 8,95 (d, J = 7,28 Hz, 1 H).

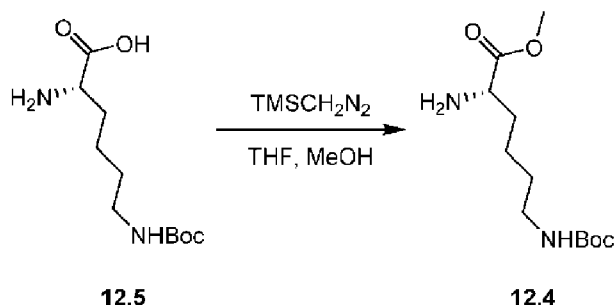


15 Una solución del compuesto **11.1** (20,00 mg, 19,12 μmol , 1,00 equiv.) en TFA (1,03 g, 9,00 mmol, 666,11 μl , 470,61 equiv.) se agitó en N_2 a 20 °C durante 4 horas. La mezcla se filtró y se concentró al vacío para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **11** (18,00 mg, 16,98 μmol , rendimiento del 88,81 %, TFA) como un sólido de color blanco. LCMS (ESI): m/z : $[M + H]^+$ calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{F}_2\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}$: 946,4; encontrada 946,6; TR=2,076 min. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,10 - 1,77 (m, 14 H) 1,82 - 1,95 (m, 1 H) 2,05 (t, J = 7,40 Hz, 2 H) 2,17 (t, J = 8,03 Hz, 1 H) 2,30 - 2,42 (m, 2 H) 2,53 - 2,60 (m, 3 H) 2,64 - 2,71 (m, 2 H) 2,73 - 2,85 (m, 3 H) 3,04 - 3,12 (m, 2 H) 3,17 (q, J = 5,86 Hz, 3 H) 3,44 - 3,52 (m, 14 H) 3,63 (brt, J = 6,46 Hz, 2 H) 4,08 - 4,15 (m, 1 H) 4,26 - 4,33 (m, 1 H) 4,40 (d, J = 5,52 Hz, 2 H) 4,63 - 4,72 (m, 1 H) 5,07 - 5,21 (m, 2 H) 6,31 - 6,42 (m, 2 H) 6,95 - 6,99 (m, 1 H) 6,97 (s, 1 H) 7,06 - 7,15 (m, 3 H) 7,23 (s, 1 H) 7,58 - 7,76 (m, 4 H) 7,81 (t a, J = 5,46 Hz, 1 H) 7,95 - 8,01 (m, 1 H) 7,98 (d, J = 7,91 Hz, 1 H) 8,07 (dd, J = 8,03, 1,25 Hz, 1 H) 8,38 (s, 1 H) 8,45 (t, J = 5,52 Hz, 1 H) 8,63 - 8,66 (m, 1 H) 8,64 (s, 1 H) 8,98 (d, J = 7,53 Hz, 1 H).

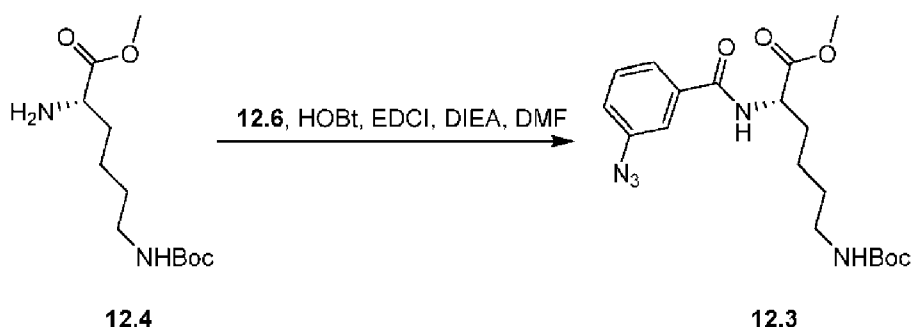
Ejemplo 13. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-azidobenzamida (**12**)



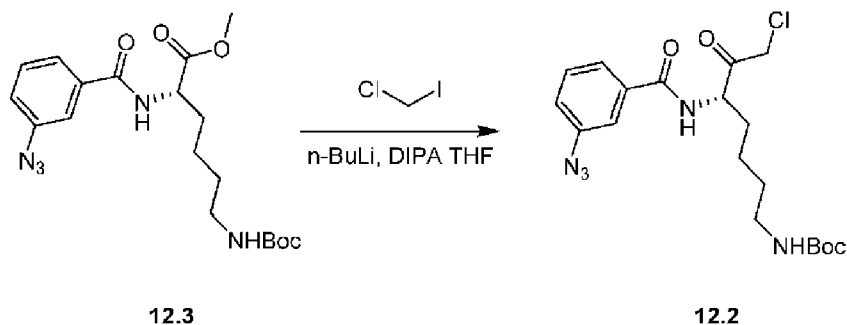
30 A una mezcla del compuesto **12.7** (5,00 g, 36,46 mmol, 1,00 equiv.) y t-BuONO (5,64 g, 54,69 mmol, 6,48 ml, 1,50 equiv.) en CH_3CN (70,00 ml) se añadió TMSN₃ (5,04 g, 43,75 mmol, 5,73 ml, 1,20 equiv.) en una porción a 18 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La reacción se diluyó con H_2O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , DCM: MeOH = 10: 1) para proporcionar el compuesto **12.6** (3,00 g, 18,39 mmol, rendimiento del 50,44 %) como un sólido de color amarillo.



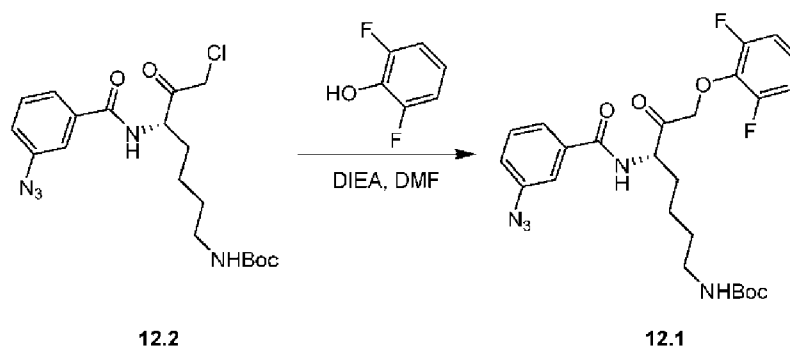
A una solución del compuesto **12.5** (20,00 g, 81,20 mmol, 1,00 equiv.) en THF (160,00 ml) y MeOH (40,00 ml) se añadió TMSCHN₂ (27,82 g, 243,60 mmol, 3,00 equiv.) gota a gota a 25 °C en N₂. La mezcla se agitó a 25 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo) para proporcionar el compuesto **12.4** (8,00 g, 30,73 mmol, rendimiento del 37,85 %) como un aceite incoloro.



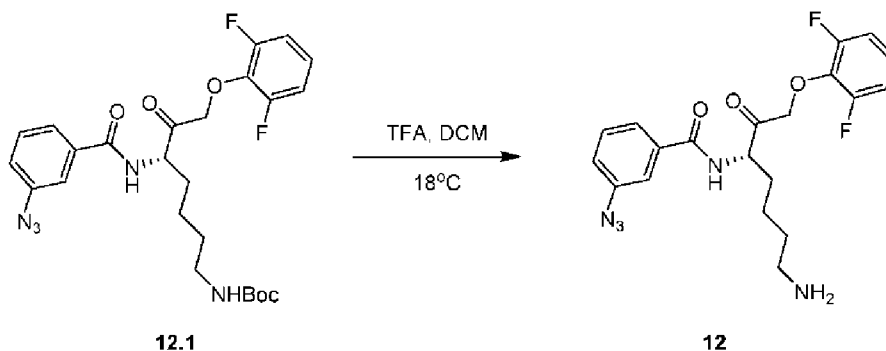
A una mezcla del compuesto **12.6** (1,25 g, 7,68 mmol, 1,00 equiv.) y EDCI (1,62 g, 8,45 mmol, 1,10 equiv.) en DMF (20,00 ml) se añadió HOBT (1,14 g, 8,45 mmol, 1,10 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, a continuación, la mezcla se añadió gota a gota una solución del compuesto **12.4** (2,00 g, 7,68 mmol, 1,00 equiv.) en DMF (5 ml). Se añadió gota a gota DIPEA (2,98 g, 23,04 mmol, 4,03 ml, 3,00 equiv.) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. La reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=1:1) para proporcionar el compuesto **12.3** (2,80 g, 6,91 mmol, rendimiento del 89,97 %) como un aceite de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD-d₄) δ ppm 1,40 (s, 8 H) 1,44 - 1,58 (m, 4 H) 1,80 - 2,00 (m, 2 H) 3,00 - 3,10 (m, 2 H) 3,74 (s, 3 H) 4,58 (dd, J= 9,26, 5,07 Hz, 1 H) 7,25 (ddd, J= 8,05, 2,32, 1,10 Hz, 1 H) 7,49 (t, J= 7,83 Hz, 1 H) 7,56 (t, J= 1,76 Hz, 1 H) 7,63 - 7,69 (m, 1 H). LCMS (ESI): *m/z*: [M + H]⁺ calc. para C₁₉H₂₇O₅N₅: 405; encontrada 350, 306; TR = 0,897 min.



A una solución de DIPA (1,50 g, 14,80 mmol, 2,08 ml, 6 equiv.) en THF (15,00 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 5,92 ml, 6,00 equiv.) a 0 °C, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. A la mezcla se añadió una solución del compuesto **12.3** (1,00 g, 2,47 mmol, 1,00 equiv.) y cloro(yodo)metano (2,18 g, 12,35 mmol, 895,11 µl, 5,00 equiv.) en THF (15,00 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó a -78 °C durante 30 min. Se añadió NH₄Cl acuoso saturado (10 ml) y, a continuación, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃(20) acuoso saturado y salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto **12.2** (2,00 g, bruto) como un aceite de color amarillo que se usó en la etapa siguiente.

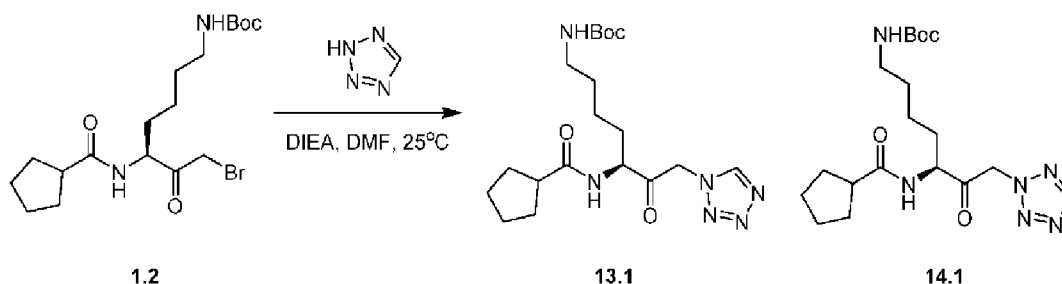


A una mezcla del compuesto **12.2** (2,00 g, 4,72 mmol, 1,00 equiv.) y 2,6-difluorofenol (613,79 mg, 4,72 mmol, 1,00 equiv.) en DMF (5,00 ml) se añadió DIPEA (2,44 g, 18,87 mmol, 3,30 ml, 4,00 equiv.) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 10 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar el compuesto **12.1** (200,00 mg, 386,46 μmol, rendimiento del 8,19 %) como un aceite de color amarillo.

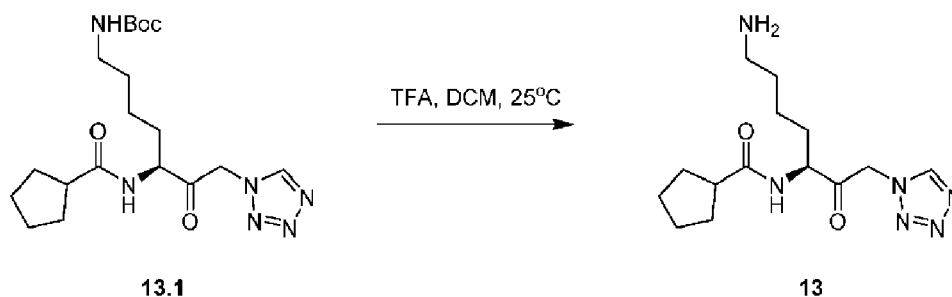


A una solución del compuesto **12.1** (100,00 mg, 193,23 μmol, 1,00 equiv.) en DCM (5,00 ml) se añadió TFA (1,54 g, 13,51 mmol, 1,00 ml, 69,90 equiv.) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **12** (80,00 mg, 191,66 μmol, 99,19 % como un aceite de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, metanol-d₄) δ ppm 1,49 - 1,67 (m, 2 H) 1,67 - 1,88 (m, 3 H) 2,11 (dddd, J= 13,84, 9,48, 6,78, 4,30 Hz, 1 H) 2,89 - 2,99 (m, 2 H) 4,91 - 5,08 (m, 3 H) 6,95 - 7,05 (m, 2 H) 7,05 - 7,12 (m, 1 H) 7,26 - 7,31 (m, 1 H) 7,48 - 7,54 (m, 1 H) 7,56 (t, J= 1,87 Hz, 1 H) 7,64 - 7,70 (m, 1 H). LCMS (ESI): *m/z*: [M + H] calc. para C₂₀H₂₁F₂O₃N₅: 418; encontrada 418; TR = 3,08min.

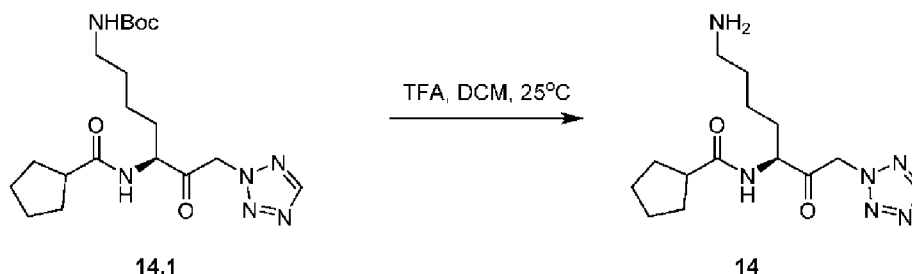
Ejemplo 14. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(1H-tetrazol-1-il)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (13) y (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2H-tetrazol-2-il)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (14)



A una solución del compuesto **1.2** (50,00 mg, 119,23 μmol, 1,00 equiv.) en DMF (3,00 ml) se añadieron DIEA (46,23 mg, 357,70 μmol, 62,47 μl, 3,00 equiv.) y tetrazol (0,45 M, 264,96 μl, 1,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (condiciones de TFA). El compuesto **13.1** (5,00 mg, 12,24 μmol, rendimiento del 10,27 %) se obtuvo en forma de un sólido de color blanco, y se obtuvieron 5 g del compuesto **14.1** en forma de un sólido de color blanco.

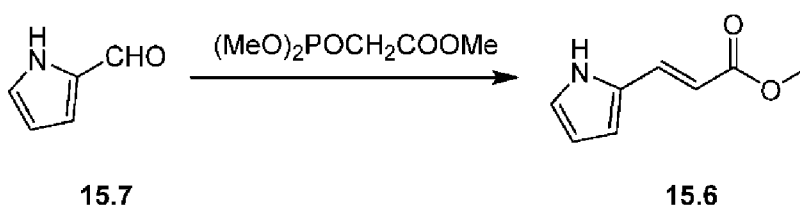


Una mezcla del compuesto **13.1** (5,00 mg, 12,24 μmol , 1,00 equiv.) en DCM (5,00 ml) y TFA (1,00 ml) se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **13** (5,00 mg, 11,84 μmol , rendimiento del 96,71 %, TFA). RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,25 - 1,57 (m, 4 H) 1,58 - 1,81 (m, 12 H) 1,84 - 2,09 (m, 6 H) 2,68 - 2,84 (m, 1 H) 2,94 (t a, $J=7,50$ Hz, 3 H) 4,44 - 4,58 (m, 1 H) 5,51 - 5,79 (m, 2 H) 9,06 - 9,18 (m, 1 H). LCMS (ESI): m/z : $[M + H]^+$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_6 \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$: 423; encontrada 309; TR = 1,208 min.

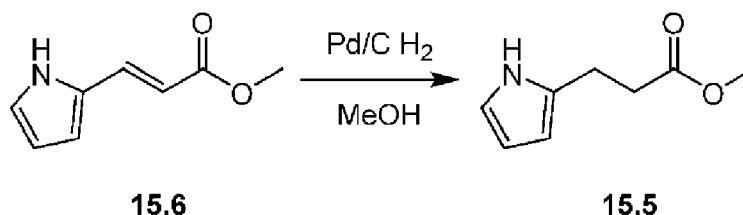


Una mezcla del compuesto **14.1** (5,00 mg, 12,24 μmol , 1,00 equiv.) en DCM (5,00 ml) y TFA (1,00 ml) se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **14** (5,00 mg, 11,84 μmol , rendimiento del 96,71 %, TFA). RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,20 - 1,53 (m, 5 H) 1,54 - 1,80 (m, 12 H) 1,82 - 2,08 (m, 5 H) 2,64 - 2,83 (m, 1 H) 2,93 (t a, $J=7,28$ Hz, 3 H) 4,55 (dd, $J=9,37, 4,74$ Hz, 1 H) 5,71 - 5,94 (m, 2 H) 8,76 (s, 1 H). LCMS (ESI): m/z : $[M + H]^+$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$: 423; encontrada 309; TR = 1,606 min.

Ejemplo 15. Preparación de una sonda fluorescente de la actividad de la gingipaína: (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-((3-(5,5-difluoro-7,9-dimetil-5H-514,614-dipirrol-1,2-c:2',1'-f)[1,3,2]diazaborinin-3-il)propanamido)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (15**)**



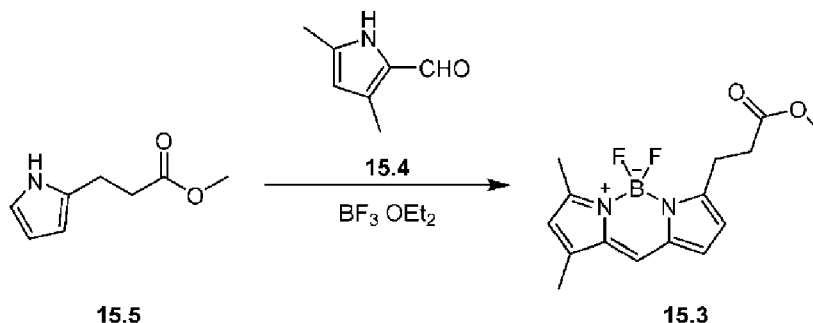
A una mezcla de compuesto **15.7** (5,00 g, 52,58 mmol, 1,00 equiv.) y 2-dietoxifosforilacetato de metilo (11,05 g, 52,58 mmol, 1,00 equiv.) en THF (60,00 ml) se añadió K_2CO_3 (14,53 g, 105,16 mmol, 2,00 equiv.) en una porción a 50 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 50 °C durante 10 horas. La reacción se diluyó con H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=5: 1) para proporcionar **15.6** (8,60 g, 56,89 mmol, rendimiento del 108,20 %) como un sólido de color blanco.



A una solución del compuesto **15.6** (8,60 g, 56,89 mmol, 1,00 equiv.) en MeOH (100,00 ml) se añadió Pd-C (10 %, 0,9

g) en N₂. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó en H₂ a 345 kPa (50psi) a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=5: 1) para proporcionar el compuesto **15.5** (5,00 g, 32,64 mmol, rendimiento del 57,37 %) como un aceite incoloro.

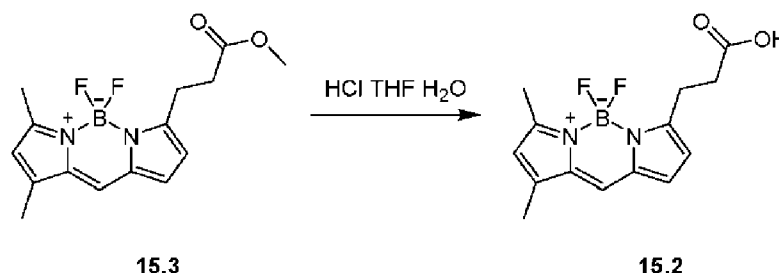
5



A una mezcla de compuesto **15.5** (3,00 g, 19,58 mmol, 1,00 equiv.) y compuesto **15.4** (2,65 g, 21,54 mmol, 1,10 equiv.) en DCM (60,00 ml) se añadió POCl_3 (3,30 g, 21,54 mmol, 2,00 ml, 1,10 equiv.) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas, seguido de la adición de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (11,12 g, 78,32 mmol, 9,67 ml, 4,00 equiv.) y DIEA (10,63 g, 82,24 mmol, 14,36 ml, 4,20 equiv.) gota a gota a 18 °C. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se filtró, se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con DCM (3 × 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=1:4) para proporcionar el compuesto **15.3** (3,00 g, 9,80 mmol, rendimiento del 50,05 %) como un sólido de color rojo.

10

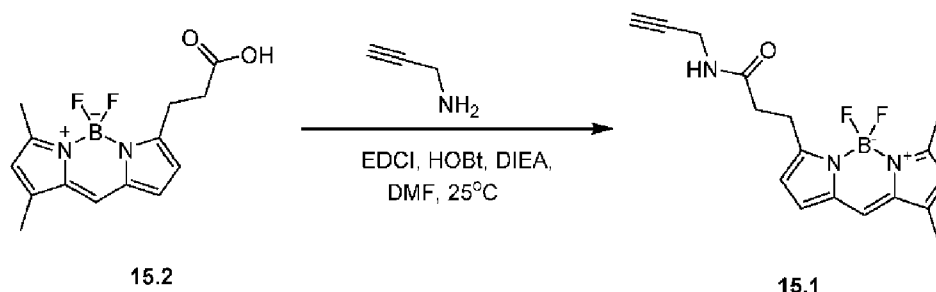
15



A una mezcla del compuesto **15.3** (1,00 g, 3,27 mmol, 1,00 equiv.) en THF (120,00 ml) y H₂O (80,00 ml) se añadió HCl (51,11 g, 519,15 mmol, 50,11 ml, pureza del 37 %, 158,76 equiv.) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de DCM (100 ml) y, a continuación, se extrajo con DCM (3 × 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, DCM:MeOH = 20:1) para proporcionar el compuesto **15.2** (700,00 mg, 2,40 mmol, rendimiento del 73,29 %) como un sólido de color rojo.

20

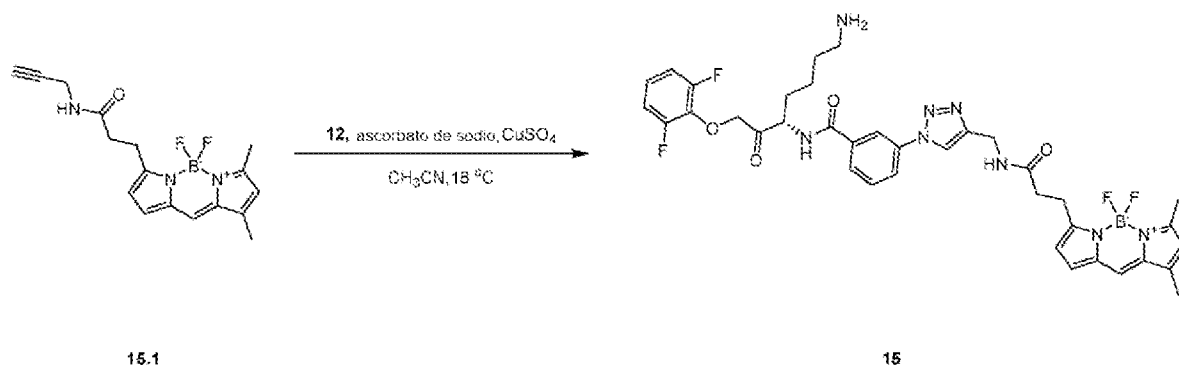
25



A una mezcla del compuesto **15.2** (300,00 mg, 1,03 mmol, 1,00 equiv.) y HOBT (152,66 mg, 1,13 mmol, 1,10 equiv.) en DMF (3,00 ml) se añadió EDCI (216,58 mg, 1,13 mmol, 1,10 equiv.) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. Después, se añadieron propargilamina (56,57 mg, 1,03 mmol, 65,78 μl , 1,00 equiv.) y DIPEA (398,22 mg, 3,08 mmol, 538,13 μl , 3,00 equiv.) en una porción a 0 °C, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (4 ml) y se extrajo con EtOAc (3 × 3 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante TLC preparatoria (SiO₂, DCM:MeOH = 20: 1) para proporcionar el compuesto **15.1** (150,00 mg, 455,72 μmol , rendimiento del 44,24 %) como un sólido de color rojo.

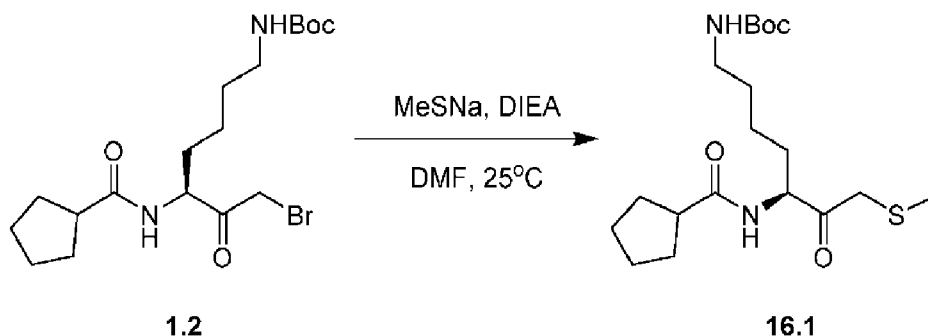
30

35

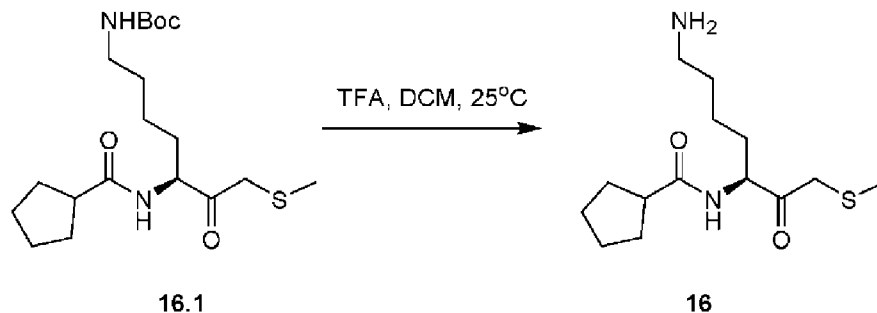


A una mezcla de compuesto **15.1** (100,00 mg, 303,81 μmol , 1,00 equiv.) y compuesto **12** (126,81 mg, 303,81 μmol , 1,00 equiv.) en acetonitrilo (2,00 ml) se añadió una solución de CuSO_4 (2,42 mg, 15,19 μmol , 2,33 μl , 0,05 equiv.) en H_2O (100,00 μl) en una porción y ascorbato sódico (120,38 mg, 607,62 μmol , 2,00 equiv.) a 18 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar la sal de trifluoroacetato del compuesto **15** (5,00 mg, 6,70 μmol , rendimiento del 2,21 %) como un sólido de color rojo. RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,46 - 1,68 (m, 1 H) 1,46 - 1,67 (m, 1 H) 1,69 - 1,90 (m, 1 H) 2,04 - 2,18 (m, 2 H) 2,19 - 2,31 (m, 3 H) 2,48 (s, 2 H) 2,69 (t a, $J=7,45$ Hz, 2 H) 2,95 (s a, 2 H) 3,19 - 3,28 (m, 2 H) 4,52 (s, 2 H) 5,04 (s a, 3 H) 6,19 (s, 1 H) 6,31 (d a, $J=3,51$ Hz, 1 H) 6,91 - 7,12 (m, 4 H) 7,31 - 7,32 (m, 1 H) 7,35 (s, 1 H) 7,68 (t a, $J=8,11$ Hz, 1 H) 7,65 - 7,71 (m, 1 H) 7,95 - 8,04 (m, 2 H) 8,25 - 8,36 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}]$ calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{F}_4\text{O}_4\text{N}_8\text{B}$: 746; encontrada 747; TR = 2,117 min

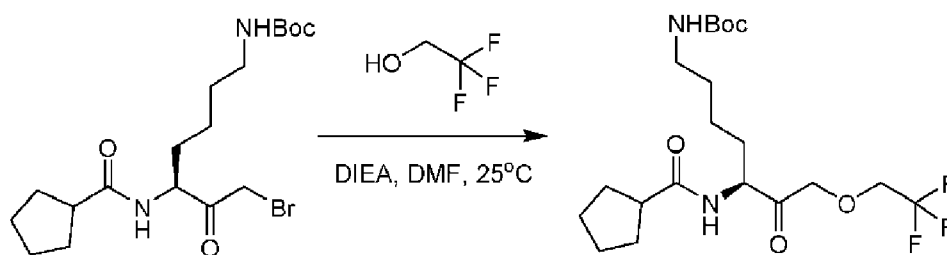
15 Ejemplo 16. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(metiltio)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentano-carboxamida (**16**)



A una solución del compuesto **1.2** (100,00 mg, 240 μmol , 1,00 equiv.) en DMF (2,00 ml) se añadió metilsulfanilsodio (16 mg, 240 μmol , 15 μl , 1,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 0,5 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (TFA). El compuesto **16.1** (50,00 mg, 99,89 μmol , rendimiento del 55,16 %, TFA) se obtuvo como un aceite de color amarillo.



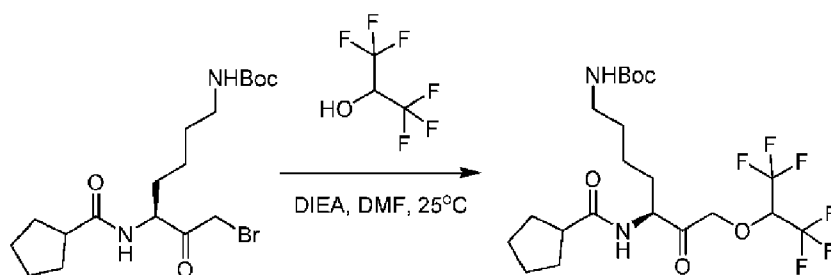
A una solución del compuesto **16.1** (50,00 mg, 129,35 μmol , 1,00 equiv.) en DCM (5,00 ml) se le añadió TFA (1,00 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 5 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar la sal de trifluoroacetato del compuesto **16** (5,00 mg, 17,46 μmol , rendimiento del 13,50 %). RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,33 - 1,54 (m, 2 H) 1,55 - 1,79 (m, 11 H) 1,80 - 1,99 (m, 4 H) 2,06 (s, 3 H) 2,64 - 2,80 (m, 1 H) 2,86 - 2,99 (m, 2 H) 3,36 (d, $J=1,54$ Hz, 2 H) 4,67 (dd, $J=9,48, 4,41$ Hz, 1 H). LCMS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}]$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{SO}_2\text{N}_2$: 287; encontrada 287; TR = 1,826 min.

Ejemplo 17. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroetoxi)heptan-3-il)ciclo-pentanocarboxamida (17)**1.2****17.1**

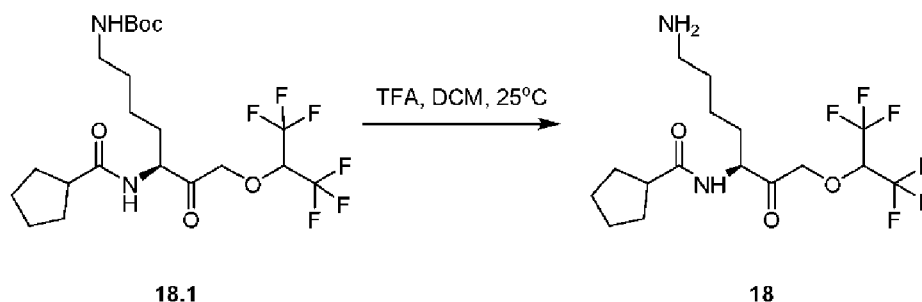
A una solución del compuesto **1.2** (50,00 mg, 119,23 μ mol, 1,00 equiv.) en DMF (2,00 ml) se añadió K_2CO_3 (49,44 mg, 357,69 μ mol, 3,00 equiv.) y 2,2,2-trifluoroetanol-1-ol (11,93 mg, 119,23 μ mol, 8,58 μ l, 1,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (TFA). El compuesto **17.1** (10,00 mg, 22,81 μ mol, rendimiento del 19,13 %) se obtuvo como un aceite de color amarillo.

**17.1****17**

A una solución del compuesto **17.1** de *tert*-butilo (10,00 mg, 22,81 μ mol, 1,00 equiv.) en DCM (2,50 ml) se añadió TFA (500,00 μ l). La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar la sal de trifluoroacetato del compuesto **17** (5,00 mg, 14,78 μ mol, rendimiento del 64,78 %) como un aceite de color amarillo. RMN 1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,32 - 1,51 (m, 3 H) 1,53 - 1,78 (m, 10 H) 1,80 - 1,96 (m, 4 H) 2,72 (quin, J=7,88 Hz, 1 H) 2,86 - 2,99 (m, 2 H) 3,96 - 4,08 (m, 2 H) 4,36 - 4,55 (m, 3 H). LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $C_{15}H_{25}O_3N_2F_3$: 339; encontrada 339; TR = 2,060 min.

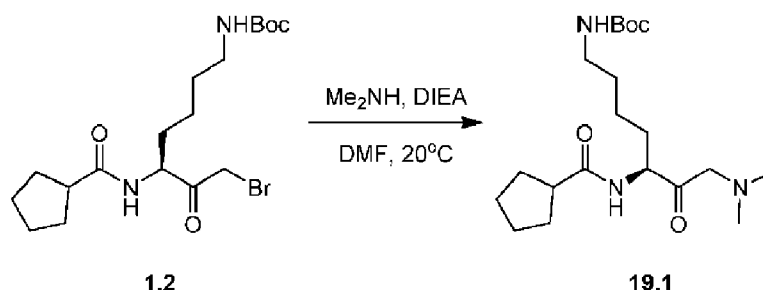
Ejemplo 18. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-il)oxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (18)**1.2****18.1**

A una solución del compuesto **1.2** (50,00 mg, 119,23 μ mol, 1,00 equiv.) en DMF (2,00 ml) se añadió K_2CO_3 (49,44 mg, 357,69 μ mol, 3,00 equiv.) y 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (20,04 mg, 119,23 μ mol, 1,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (TFA). El compuesto **18.1** (15,00 mg, 29,62 μ mol, rendimiento del 24,84 %) se obtuvo como un aceite de color amarillo.

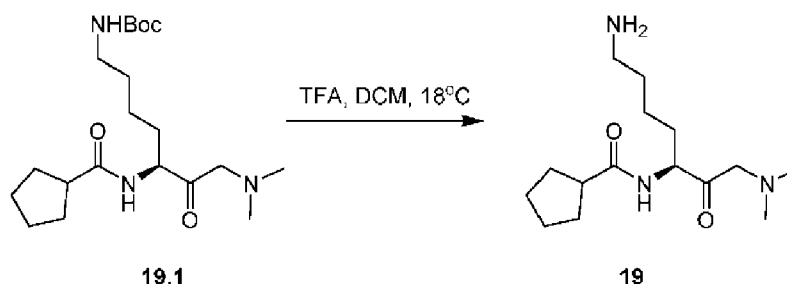


A una solución del compuesto **18.1** (15,00 mg, 29,62 μmol , 1,00 equiv.) en DCM (5,00 ml) se le añadió TFA (1,00 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar la sal de trifluoroacetato del compuesto **18** (5,00 mg, 12,30 μmol , rendimiento del 41,54 %) como un aceite de color amarillo. RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,35 - 1,54 (m, 2 H) 1,55 - 1,78 (m, 10 H) 1,80 - 1,97 (m, 3 H) 2,65 - 2,79 (m, 1 H) 2,85 - 2,98 (m, 2 H) 4,45 - 4,54 (m, 1 H) 4,60 - 4,78 (m, 1 H) 4,98 - 5,08 (m, 1 H). LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_2\text{F}_6$: 407; encontrada 407; TR = 2,356 min.

Ejemplo 19. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(dimetilamino)-2-oxoheptan-3-il)ciclo-pentanocarboxamida (19)



A una mezcla del compuesto **1.2** (100,00 mg, 238,46 μmol , 1,00 equiv.) y N-metilmetanamina (19,44 mg, 238,46 μmol , 21,85 μl , 1,00 eq, HCl) en DMF (1,00 ml) se añadió DIPEA (123,28 mg, 953,86 μmol , 166,59 μl , 4,00 equiv.) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 hora. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar el compuesto **19.1** (50,00 mg, 130,37 μmol , rendimiento del 54,67 %) como un aceite incoloro. LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_3$: 383; encontrada 384; TR = 0,672min



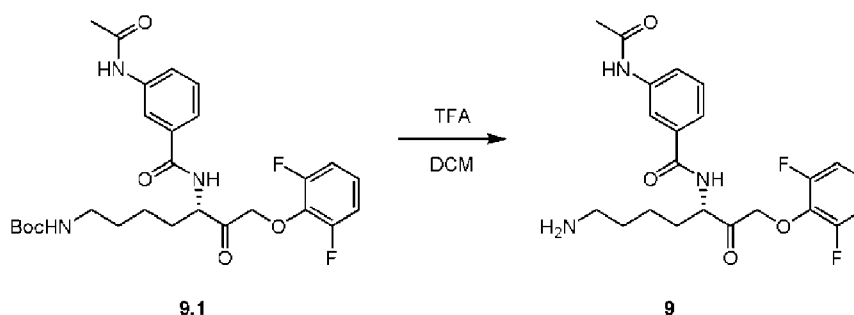
El compuesto **19.1** (50,00 mg, 130,37 μmol , 1,00 equiv.) se disolvió en DMF (1,00 ml), se añadió a la mezcla TFA (1,12 g, 9,85 mmol, 728,95 μl , 75,52 equiv.) y se agitó a 18°C durante 10 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar la sal de trifluoroacetato del compuesto **19** (50,00 mg, bruto) como un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,39 - 1,58 (m, 3 H) 1,59 - 1,66 (m, 2 H) 1,66 - 1,78 (m, 7 H) 1,87 - 1,98 (m, 3 H) 2,68 - 2,81 (m, 1 H) 2,90 (s, 6 H) 2,92 - 2,97 (m, 2 H) 4,28 - 4,32 (m, 1 H) 4,32 - 4,42 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z : [M + H] calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{N}_3$: 283; encontrada 284; TR = 2,365min

Ejemplo 20. Preparación de (S)-3-acetamido-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)benzamida (9)

9.3

9.2

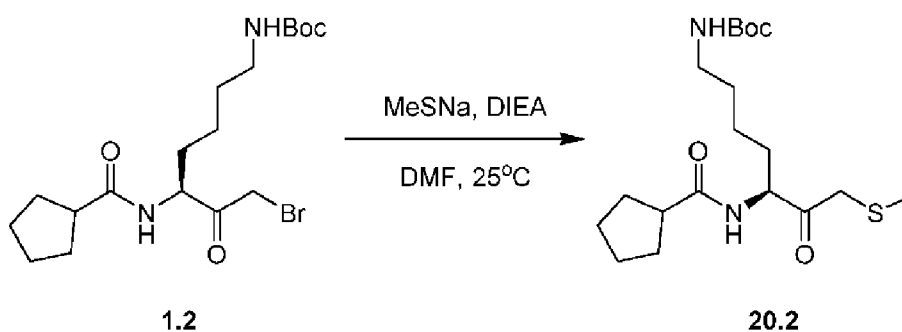
46



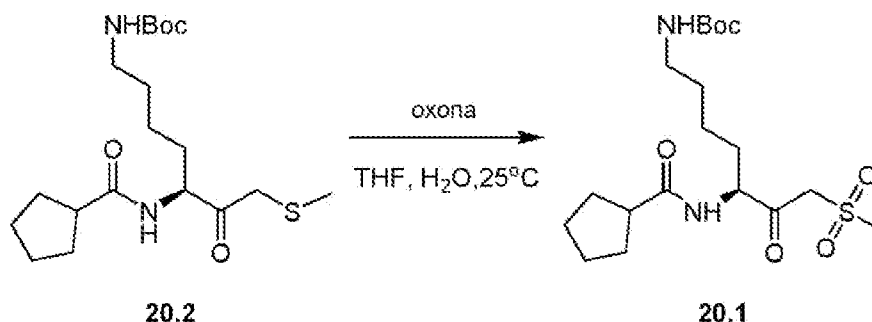
A una solución del compuesto **9.1** (5,00 mg, 9,37 μmol , 1,00 equiv.) en DCM (2,00 ml) se añadió TFA (2,14 mg, 18,74 μmol , 1,39 μl , 2,00 equiv.) en N_2 . La mezcla se agitó a 25 °C durante 16 horas. Se concentró para proporcionar el residuo. La sal de trifluoroacetato del compuesto **9** (5,00 mg, 9,13 μmol , rendimiento del 97,47 %, TFA) se obtuvo como un aceite de color rojo. LCMS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}]$ calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4$: 433,18; encontrada 434,2; TR=2,052 min. RMN ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm 1,44 - 1,88 (m, 1 H) 1,44 - 1,51 (m, 1 H) 1,51 - 1,84 (m, 1 H) 1,52 - 1,82 (m, 1 H) 1,52 - 1,85 (m, 1 H) 1,83 - 1,85 (m, 1 H) 2,07 - 2,20 (m, 1 H) 2,94 (t a, J=6,50 Hz, 1 H) 4,90 - 5,10 (m, 1 H) 4,91 - 5,10 (m, 1 H) 6,91 - 7,13 (m, 1 H) 7,33 - 7,47 (m, 1 H) 7,49 - 7,68 (m, 1 H) 8,03 - 8,18 (m, 1 H)

Se sintetizaron compuestos adicionales según los procedimientos de los ejemplos anteriores.

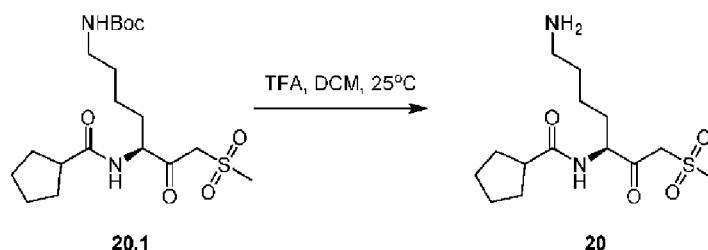
Ejemplo 21. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(metilsulfonyl)-2-oxoheptan-3-il)-ciclopentanocarboxamida (**20**)



A una solución del compuesto **1.2** (200,00 mg, 476,93 μmol , 1,00 equiv.) en DMF (3,00 ml) se añadió metilsulfanilsodio (33,43 mg, 476,93 μmol , 30,39 μl , 1,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 0,5 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa, y el compuesto **20.2** (80,00 mg, 206,96 μmol , rendimiento del 43,39 %) se obtuvo como un aceite de color amarillo.

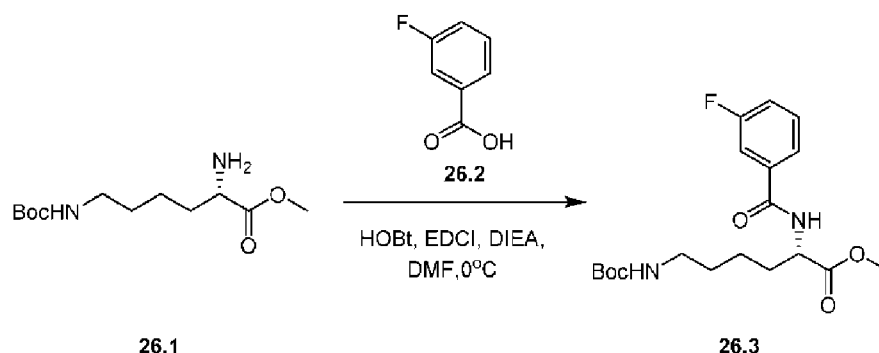


A una solución del compuesto **20.2** (60,00 mg, 155,22 μmol , 1,00 equiv.) en THF (2,00 ml) y H_2O (600,00 μl) se añadió oxona (190,85 mg, 310,44 μmol , 2,00 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa, y el compuesto **20.1** (20,00 mg, 47,78 μmol , rendimiento del 30,78 %) se obtuvo como un sólido de color blanco.

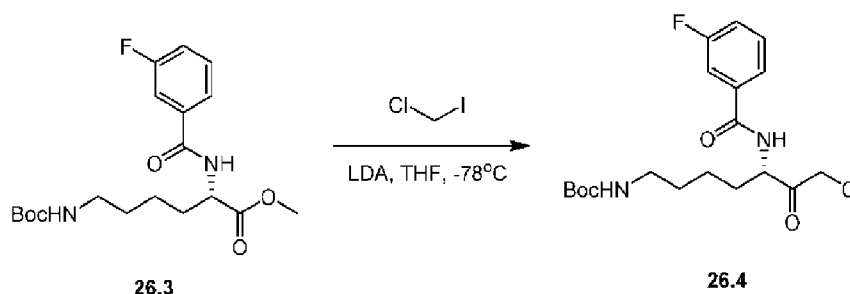


El compuesto **20.1** (20,00 mg, 47,78 μ mol, 1,00 equiv.) en TFA (1,00 ml) y DCM (5,00 ml) se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar la sal de trifluoroacetato del compuesto **20** (10,00 mg, 31,40 μ mol, 65,73 % de rendimiento) como un aceite de color amarillo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,18 - 1,39 (m, 1 H) 1,18 - 1,39 (m, 1 H) 1,39 - 1,66 (m, 9 H) 1,67 - 1,88 (m, 3 H) 2,58 - 2,86 (m, 3 H) 3,08 (s, 3 H) 4,15 - 4,32 (m, 1 H) 4,39 - 4,61 (m, 2 H) 7,70 (s a, 3 H) 8,23 (d, J = 7,06 Hz, 1 H). LCMS (ESI): m/z : [M + H]⁺ calc. para C₁₄H₂₆SO₄N₂: 319; encontrada 319; TR = 1,916 min.

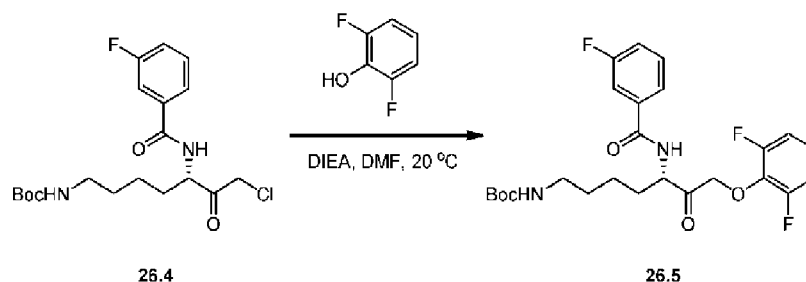
Ejemplo 22. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-fluorobenzamida (**26**)



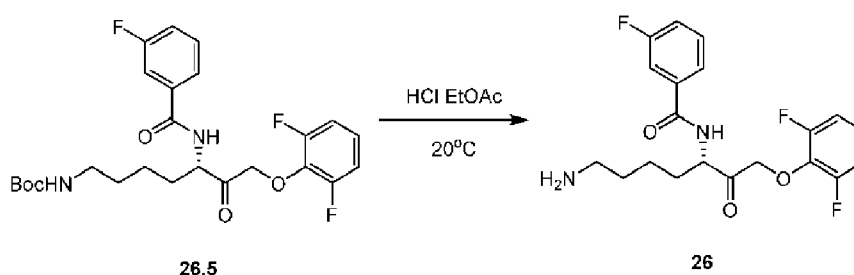
A una mezcla del compuesto **26.1** (420,44 mg, 3,0 mmol, 1 equivalente) y EDCI (632,77 mg, 3,3 mmol, 1,1 equivalentes), HOBT (446,01 mg, 3,3 mmol, 1,1 equivalentes) en DMF (10 ml) se añadió el compuesto **26.2** (1 g, 3 mmol, 1 equivalente) y DIEA (1,55 g, 12 mmol, 2,09 ml, 4 equivalentes) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 horas. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 10:1 a 1:1) para dar el compuesto **26.3** (600 mg, 1,57 mmol, rendimiento del 52,3 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]⁺: 383; TR = 0,824 min.



Una mezcla de n-BuLi (301,51 mg, 4,71 mmol, 6 equivalente) y DIPA (476,28 mg, 4,71 mmol, 661,49 μ l, 6 equivalente) en THF (6 ml) se agitó a 0 °C en N₂. Después de 0,5 h, se añadió el compuesto **26.3** (300 mg, 784,46 μ mol, 1 equivalente) y yodoclorometano (553,45 mg, 3,14 mmol, 227,76 μ l, 4 equivalente) a la mezcla anterior a -78 °C en N₂. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 2 h. A la mezcla de reacción se añadió agua (20 ml) y después se extrajo con EtOAc (20 \times ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se obtuvo **26.4** (200 mg, 499 μ mol, rendimiento del 63,6 %) como un aceite de color marrón.

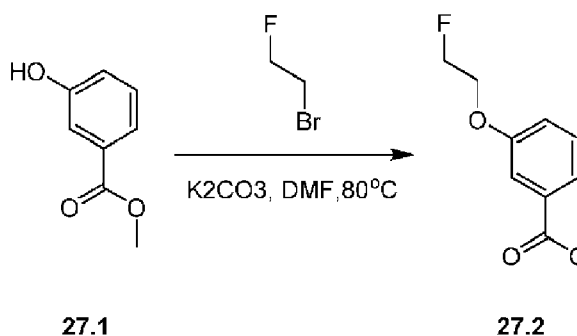


A una mezcla del compuesto **26.4** (200 mg, 499 μmol , 1 equivalente) y 2,6-difluorofenol (64,9 mg, 499 μmol , 1 equivalente) en DMF (4 ml) se añadió DIEA (193,44 mg, 1,5 mmol, 261,41 μl , 3 equivalentes) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC a escala preparativa (condiciones TFA). El compuesto **26.5** (18 g, 36,4 μmol , 1 equivalente) se obtuvo en forma de un sólido de color blanco. LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 496; TR = 0,886 min.

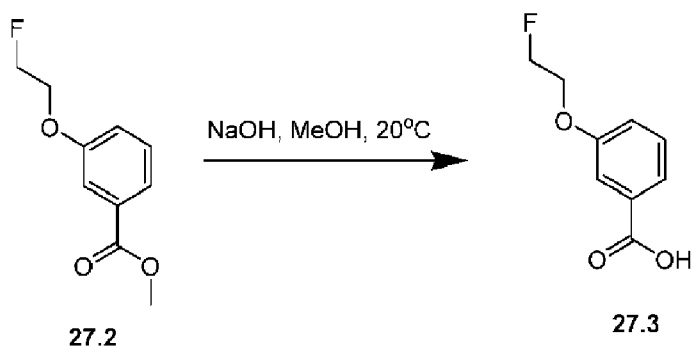


Una mezcla del compuesto **26.5** (18 mg, 36,4 μmol , 1 equivalente) en HCl/EtOAc (10 ml) se agitó a 20 °C durante 4 horas; después se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (condiciones TFA) para dar el compuesto **26** (12 mg) como un aceite incoloro; LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 395; TR = 1,53 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,48 - 1,63 (m, 2 H), 1,67 - 1,86 (m, 3 H), 2,07 - 2,18 (m, 1 H), 2,89 - 2,99 (m, 2 H), 4,92 - 4,96 (m, 1 H), 4,96 - 5,06 (m, 2 H), 6,95 - 7,03 (m, 2 H), 7,03 - 7,12 (m, 1 H), 7,29 - 7,35 (m, 1 H), 7,51 (td, J = 7,99, 5,62 Hz, 1 H), 7,60 (dt, J = 9,70, 2,09 Hz, 1 H), 7,67 - 7,71 (m, 1 H).

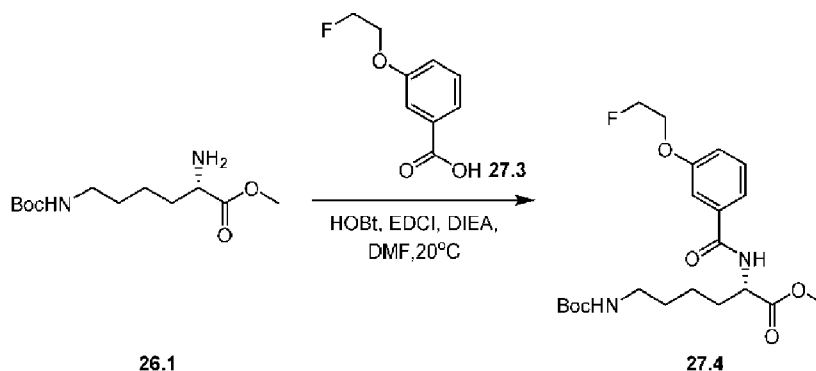
Ejemplo 23. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(2-fluoroetoxi)benzamida (**27**)



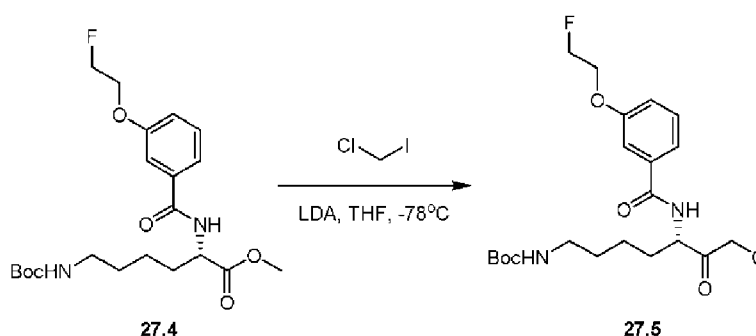
A una mezcla de **27.1** (1 g, 6,57 mmol, 1 equivalente) y 1-fluoro-2-bromoetano (834,44 mg, 6,57 mmol, 1 equivalente) en DMF (10 ml) se añadió K_2CO_3 (2,72 g, 19,71 mmol, 3 equivalentes) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 80 °C durante 15 horas. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo / acetato de etilo = 10 / 1 a 2 / 1) para dar el compuesto **27.2** (890 mg, 4,49 mmol, rendimiento del 68,35 %) como un aceite incoloro; LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 199; TR = 0,77 min.



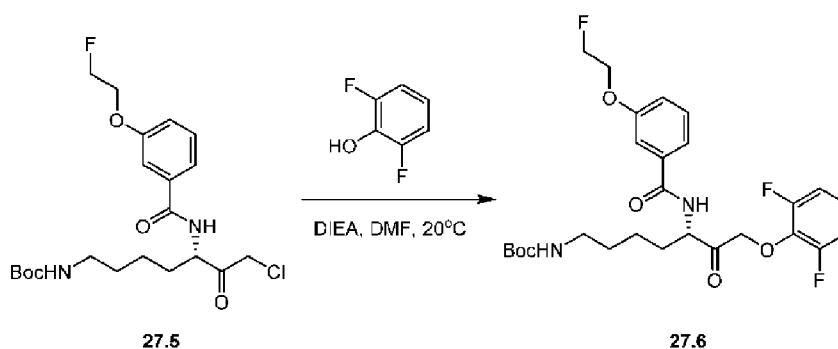
Una solución de **27.2** (890 mg, 4,49 mmol, 1 equivalente) en MeOH (27 ml) y NaOH (1 M, 8,98 ml, 2 equivalente) se agitó a 20 °C durante 15 horas. Las capas acuosas combinadas se extrajeron con EtOAc (40 ml × 2) para eliminar las impurezas neutras. La fase acuosa se acidificó con HCl acuoso hasta pH 5 y se extrajo con EtOAc (40 ml). El compuesto **27.3** (600 mg, 3,26 mmol, rendimiento del 72,6 %) se obtuvo como un aceite incoloro.



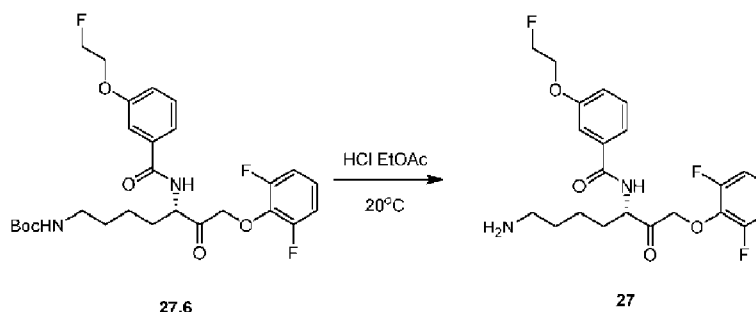
- 10 A una mezcla del compuesto **27.3** (600 mg, 3,26 mmol, 1 equivalente) y HOBt (484,54 mg, 3,59 mmol, 1,1 equivalentes) EDCI (687,44 mg, 3,59 mmol, 1,1 equivalentes) en DMF (10 ml) se añadió **26.1** (967,54 mg, 3,26 mmol, 1 equivalente, HCl) y DIEA (1,69 g, 13,04 mmol, 2,28 ml, 4 equivalentes) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se añadió a agua (20 ml) y a continuación se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **27.4** (1,17 g, 2,74 mmol, rendimiento del 84 %) como un aceite incoloro; LCMS [M + H]⁺: 427; TR = 0,825 min.



- 20 Se añadió n-BuLi (270,37 mg, 4,22 mmol, 6 equivalentes) a DIPA (427,08 mg, 4,22 mmol, 593,17 µl, 6 equivalentes) en THF (6 ml) en una porción a 0 °C en N₂. Después de 0,5 h, se añadió el compuesto **27.4** (300 mg, 703,43 µmol, 1 equivalente) y yodoclorometano (744,43 mg, 4,22 mmol, 306,35 µl, 6 equivalente) a la mezcla anterior a -78 °C en N₂. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 2 h. A la mezcla de reacción se añadió agua (20 ml) y después se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto **27.5** (300 mg, bruto) se obtuvo como un aceite de color marrón.

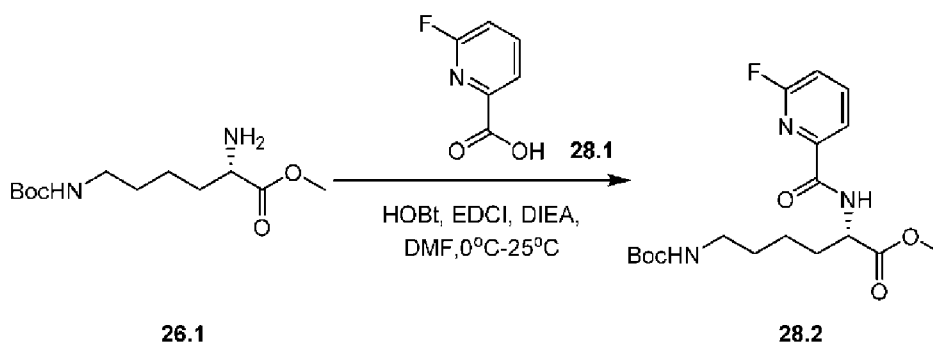


A una mezcla del compuesto **27.5** (300 mg, 674,3 μmol , 1 equivalente) y 2,6-difluorofenol (87,72 mg, 674,28 μmol , 1 equivalente) en DMF (4 ml) se añadió DIEA (261,43 mg, 2,02 mmol, 353,29 μl , 3 equivalente) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (TFA). El compuesto **27.6** (72 mg, 133,7 μmol , rendimiento del 19,8 %) se obtuvo como un sólido de color marrón; LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 539; TR = 2,85 min.

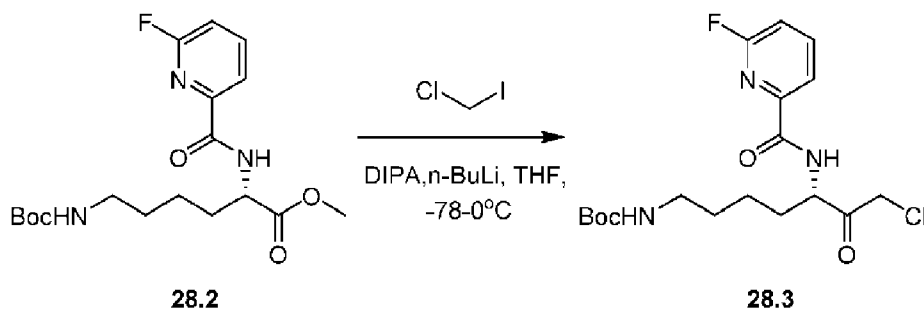


A una solución de **27.6** (72 mg, 133,7 μmol , 1 equivalente) en DCM (1 ml) se añadió TFA (304,87 mg, 2,67 mmol, 197,97 μl , 20 equivalentes). La mezcla se agitó a 20 °C durante 4 horas. Se filtró y se concentró al vacío para dar el Compuesto 27 (50 mg, 75,02 μmol , rendimiento del 56 %, 2TFA); LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 667; TR = 0,69 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,37 - 1,55 (m, 2 H), 1,57 - 1,59 (m, 2 H), 1,69 - 1,72 (m, 2 H), 1,73 - 1,85 (m, 2 H), 2,75 - 2,79 (t, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 4,26 - 4,27 (d, $J = 4,0$ Hz, 1 H), 4,33 - 4,34 (d, $J = 3,6$ Hz, 2 H), 4,34 - 4,35 (m, 1 H), 4,69 - 4,71 (m, 1 H), 4,81 - 4,82 (m, 1 H), 5,09 - 5,13 (dd, $J = 1,6$ Hz, 2 H), 7,09 - 7,12 (m, 4 H), 7,39 - 7,48 (m, 4 H), 7,73 (s, 2 H), 8,77 - 8,78 (d, $J = 7,6$ Hz, 2 H).

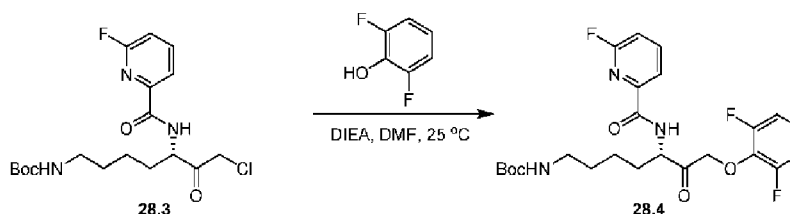
Ejemplo 24. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-6-fluoropicolinamida (**28**)



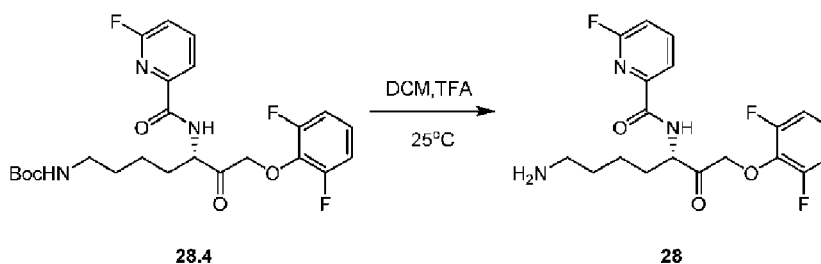
A una solución del compuesto **28.1** (366,07 mg, 2,6 mmol, 1,1 equivalentes) en DMF (15 ml) se añadió HOBt (350,77 mg, 2,6 mmol, 1,1 equivalentes) y EDCI (497,65 mg, 2,60 mmol, 1,1 equivalentes). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. A continuación, a la mezcla se añadió el compuesto **26.1** (700 mg, 2,36 mmol, 1 equivalente, HCl) y DIEA (1,22 g, 9,44 mmol, 1,65 ml, 4 equivalentes); la mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H_2O (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (5 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , DCM: MeOH = 10:1) para dar el compuesto **28.2** (750 mg, 1,96 mmol, rendimiento del 83 %) como un aceite de color amarillo; LCMS $[\text{M} + \text{H} - \text{Boc}]^+$: 384; TR = 0,817 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CLOROFORMO}-d$) δ ppm 1,42 (s, 11 H), 1,53 (d a, $J = 6,17$ Hz, 2 H), 1,65 (s, 1 H), 1,75 - 2,05 (m, 2 H), 3,12 (d a, $J = 6,17$ Hz, 2 H), 3,78 (d, $J = 0,66$ Hz, 3 H), 4,57 (s a, 1 H), 4,67 - 4,89 (m, 1 H), 6,97 - 7,18 (m, 1 H), 7,87 - 8,03 (m, 1 H), 8,05 - 8,22 (m, 2 H).



A una solución de DIPA (526,19 mg, 5,2 mmol, 730,82 μ l, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 2,08 ml, 5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂; después a la mezcla se añadió la solución del compuesto **28.2** (400 mg, 1,04 mmol, 1 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (917,18 mg, 5,2 mmol, 377,44 μ l, 5 *equivalentes*) en THF (10 ml). Esto se agitó a -78 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de NH₄Cl saturado (20 ml) a 25 °C y se extrajo con acetato de etilo (15 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ saturado (10 ml), NaHCO₃ saturado (10 ml) y salmuera (10 ml); después se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto **28.3** (500 mg, bruto) como un aceite de color amarillo.

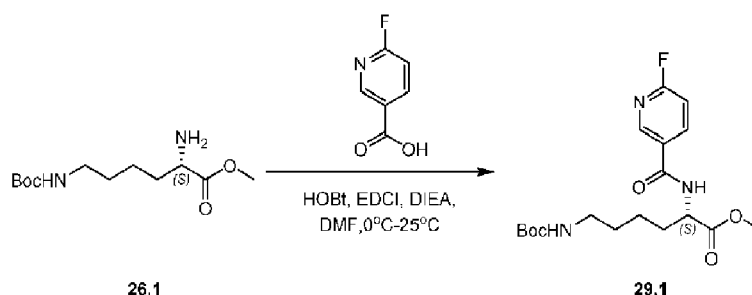


A una solución del compuesto **28.3** (500 mg, 1,24 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (8 ml) se añadió DIEA (481 mg, 3,72 mmol, 649,69 μ l, 3 *equivalentes*) y 2,6-difluorofenol (241,97 mg, 1,86 mmol, 1,5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condiciones de TFA) para dar el compuesto **28.4** (50 mg, 101 μ mol, rendimiento del 8 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]⁺: 496; TR = 2,84 min.



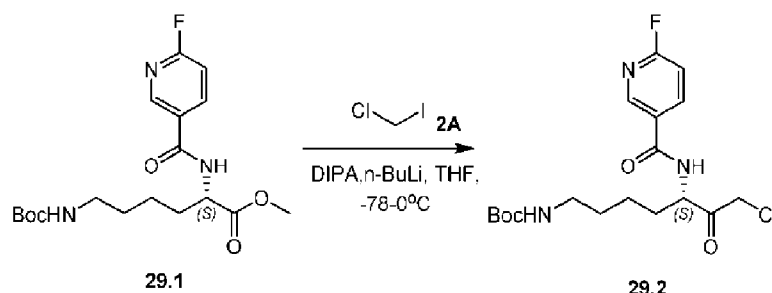
A una solución de **28.4** (50 mg, 101 μ mol 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) se le añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas; después se concentró a presión reducida para dar el compuesto **28** (20 mg, 50,6 μ mol, rendimiento del 50 %); LCMS [M + H]⁺: 396; TR = 2,11 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,21 - 1,44 (m, 2 H), 1,45 - 1,65 (m, 2 H), 1,71 - 2,01 (m, 2 H), 2,69 - 2,85 (m, 2 H), 4,55 - 4,76 (m, 2 H), 4,97 - 5,34 (m, 2 H), 7,03 - 7,21 (m, 2 H), 7,48 (dd, *J* = 8,27, 1,65 Hz, 1 H), 7,68 (s a, 3 H), 7,99 (dd, *J* = 7,28, 1,76 Hz, 1 H), 8,22 (c, *J* = 8,08 Hz, 1 H), 8,98 (d, *J* = 8,38 Hz, 1 H).

Ejemplo 25. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptano-3-il)-6-fluoronicotinamida (29)

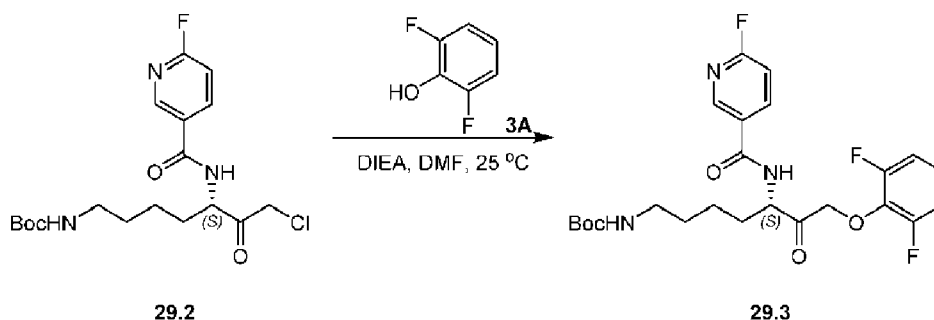


A una solución de ácido 6-fluoronicotínico (366,3 mg, 2,6 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DMF (15 ml) se añadió HOBt (351 mg, 2,6 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (497,65 mg, 2,60 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. A continuación, a la mezcla se añadió el compuesto **26.1** (700 mg, 2,36 mmol, 1 *equivalente*, sal HCl) y DIEA (1,22 g, 9,44 mmol, 1,65 ml, 4 *equivalentes*); la mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (5 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 2/1) para dar el compuesto **29.1** (300 mg, 782,45 μmol, rendimiento del 33,15 %); LCMS [M + H - Boc]⁺: 384; TR = 0,7 min. RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,40 (s, 11 H), 1,48 - 1,59 (m, 3 H), 1,63 (s, 1 H), 1,76

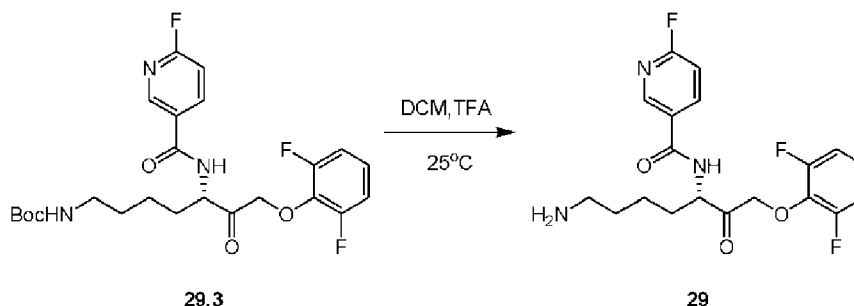
- 2,04 (m, 2 H), 3,13 (d a, *J*=6,15 Hz, 2 H), 4,47 - 4,86 (m, 2 H), 6,93 (s a, 1 H), 7,01 (dd, *J* = 8,53, 2,76 Hz, 1 H), 8,29 (td, *J* = 7,97, 2,38 Hz, 1 H), 8,72 (s, 1 H).



A una solución de DIPA (396 mg, 3,91 mmol, 549,82 μl, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 1,56 ml, 5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂. Después se añadió la mezcla a una solución de **29.1** (300 mg, 782,43 μmol, 1 *equivalente*) y cloroyodometano (690 mg, 3,91 mmol, 284 μl, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml); esto se agitó a -78 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se interrumpió mediante la adición de NH₄Cl saturado (20 ml) y después se extrajo con acetato de etilo (15 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ saturado (10 ml), NaHCO₃ saturado (10 ml) y salmuera (10 ml). Esta se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **29.2** (500 mg, bruto) como un aceite de color amarillo.



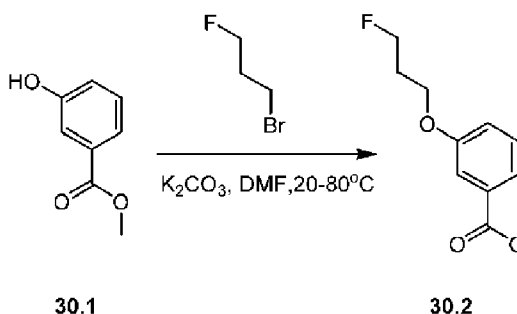
A una solución de **29.2** (300,00 mg, 746,53 μmol, 1,00 *equivalente*) y 2,6-difluorofenol (145,7 mg, 1,12 mmol, 1,5 *equivalentes*) en DMF (6 ml) se añadió DIEA (289 mg, 2,24 mmol, 391 μl, 3 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas, después se evaporó y se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar **29.3** (40 mg, 81 μmol, rendimiento del 11 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]⁺: 496; TR = 0,874 min.



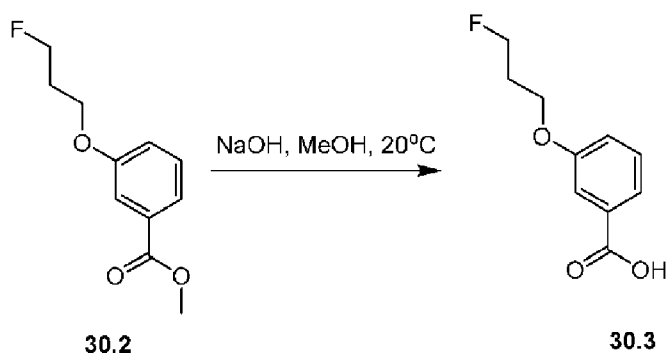
A **29.3** (40 mg, 81 μmol, 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas y después se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (condiciones TFA) para

dar el compuesto 29, (10 mg, 25 μ mol, rendimiento del 31 %); LCMS $[M + H]^+$: 396; TR = 0,7 min. RMN 1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,43 - 1,67 (m, 2 H), 1,67 - 1,89 (m, 3 H), 2,05 - 2,20 (m, 1 H), 2,86 - 3,01 (m, 2 H), 4,93 - 5,11 (m, 3 H), 6,92 - 7,16 (m, 2 H), 7,19 (dd, J = 8,60, 2,65 Hz, 1 H), 8,38 (td, J = 8,05, 2,65 Hz, 1 H), 8,71 (d, J = 2,43 Hz, 1 H).

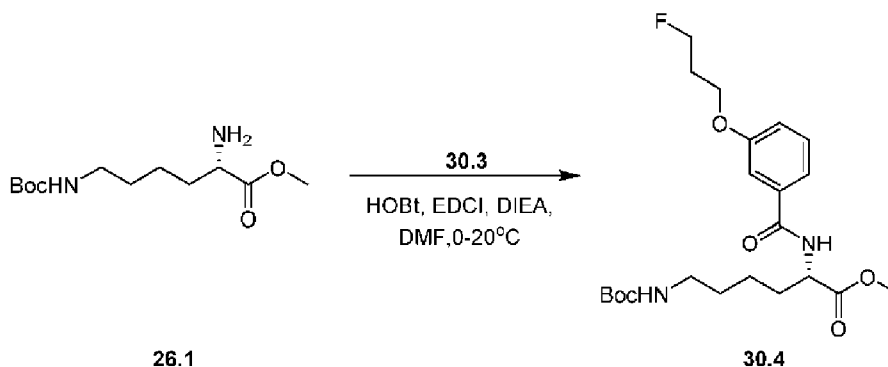
Ejemplo 26. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(3-fluoropropoxi)benzamida (30)



A una mezcla **30.1** (540,13 mg, 3,55 mmol, 1 equivalente) y **30.2** (500 mg, 3,55 mmol, 1 equivalente) en DMF (10 ml) se añadió K_2CO_3 (981,29 mg, 7,1 mmol, 2 equivalentes); la mezcla se agitó a 80 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20x ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo = 10/ 1 a 1/ 1) para dar **30.2** (440 mg, 2,07 mmol, rendimiento del 58 %) como un aceite incoloro; LCMS $[M + H]^+$: 213; TR = 0,82 min.

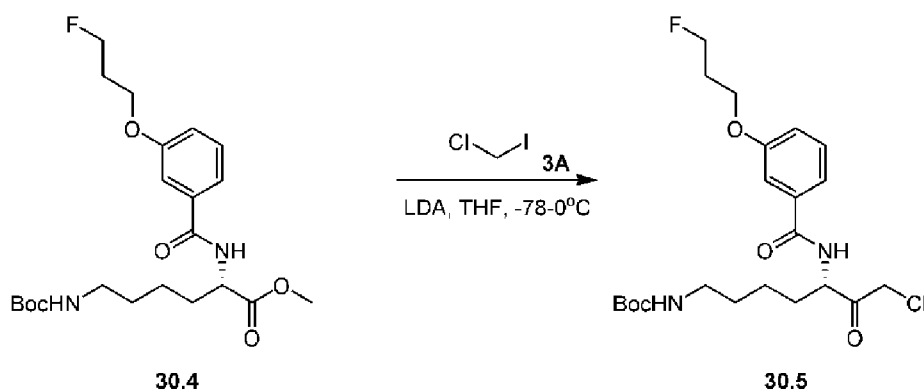


El compuesto **30.2** (440 mg, 2,07 mmol, 1 equivalente) en MeOH (12 ml) con NaOH (1 M, 4,14 ml, 2 equivalente) se agitó a 20 °C durante 15 horas. La reacción se diluyó con agua (40 ml) y después se extrajo con EtOAc (40 ml x 2) para eliminar las impurezas neutras. La fase acuosa se acidificó con HCl acuoso a pH 5, después se extrajo con acetato de etilo (40 ml). **30.3** (160 mg, 807 μ mol, rendimiento del 39 %) se obtuvo como un sólido de color blanco; LCMS $[M + H]^+$: 199; TR = 1,01 min.

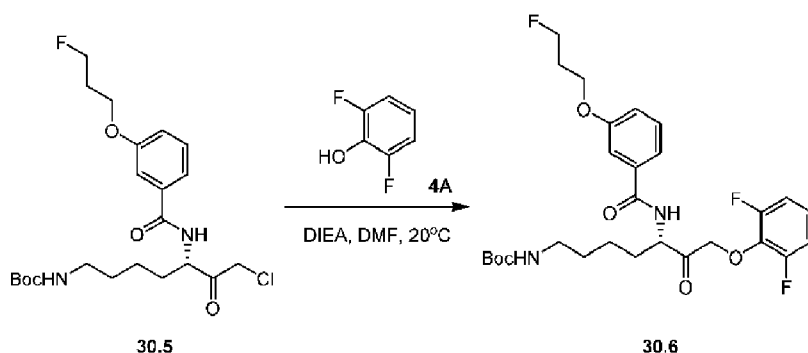


A **30.3** (160 mg, 807,31 μ mol, 1 equivalente) y EDCI (170,24 mg, 888,04 μ mol, 1,1 equivalentes), HOBT (120 mg, 888 μ mol, 1,1 equivalentes) en DMF (2 ml) se añadió el compuesto **26.1** (210,17 mg, 807,31 μ mol, 1 equivalente) y DIEA (417,34 mg, 3,23 mmol, 563,97 μ l, 4 equivalentes) en una porción a 0 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión

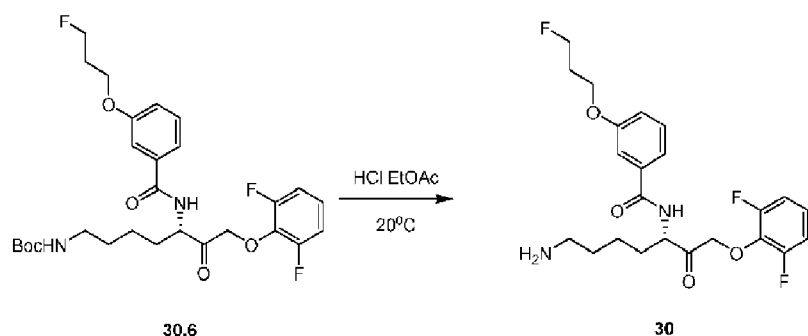
reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo = 10/ 1 a 1/ 1) para dar **30.4** (240 mg, 545 μmol , rendimiento del 67,5 %) como un sólido de color blanco; LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 441; TR = 0,84 min.



A una mezcla de $n\text{-BuLi}$ (209,41 mg, 3,27 mmol, 6 equivalentes) se añadió DIPA (330,8 mg, 3,3 mmol, 460 μl , 6 equivalentes) en THF (6 ml) en una porción a 0 °C en N_2 . Después de 0,5 h, **30.4** (240 mg, 545 μmol , 1 equivalente) y cloro(yodo)metano (577 mg, 3,3 mmol, 237,3 μl , 6 equivalente) se añadió a la mezcla anterior a -78 °C en N_2 . La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 ml) y después se extrajo con EtOAc (20 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida y se obtuvo **30.5** (200 mg, bruto) como un aceite de color marrón.



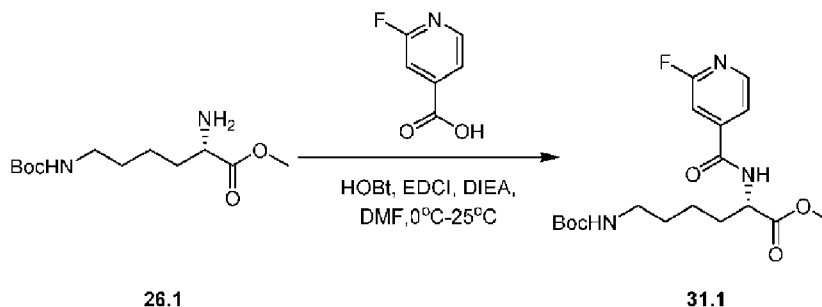
A **30.5** (200 mg, 436 μmol , 1 equivalente) y 2,5-difluorofenol (57 mg, 436 μmol , 1 equivalente) en DMF (4 ml) se añadió DIEA (168,96 mg, 1,31 mmol, 228,32 μl , 3 equivalentes); la mezcla se agitó a 20 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condiciones de TFA) para dar el compuesto **30.6** (13 mg, 23,5 μmol , rendimiento del 5,4 %); LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 553; TR = 0,91 min.



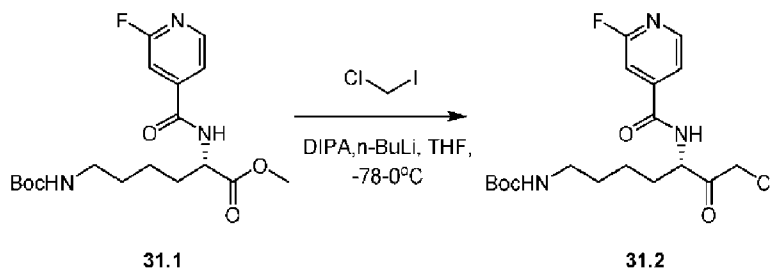
A **30.6** (13 mg, 23,53 μmol , 1 equivalente) en DCM (500 μl) se añadió TFA (160,97 mg, 1,41 mmol, 104,53 μl , 60 equivalentes). La mezcla se agitó a 20 °C durante 3 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condiciones de TFA) para dar el compuesto **30** (2 mg, 4,42 μmol , rendimiento del 19 %) como un aceite incoloro; LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 453; TR = 0,7 min. RMN ^1H (400 MHz, $\text{METANOL-}d_4$) δ ppm 1,47 - 1,63 (m, 2 H), 1,67 - 1,86 (m, 2 H), 2,10 - 2,23 (m, 2 H), 2,85 - 3,01 (m, 2 H), 4,10 - 4,20 (m, 1 H), 4,11 - 4,20 (m, 1 H), 4,57 (t, J = 5,84 Hz, 1 H), 4,69 (t, J = 5,84 Hz, 1 H), 4,90 - 5,07 (m, 4 H), 6,95 - 7,03 (m, 2 H), 7,03 - 7,11 (m, 1 H), 7,14 (ddd, J = 7,94, 2,54, 1,21 Hz, 1 H), 7,35 - 7,46 (m, 3 H).

Ejemplo 27. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptano-3-il)-2-fluoroisonicotinamida

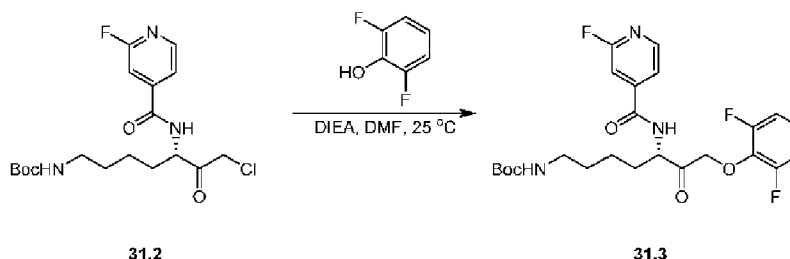
(31)



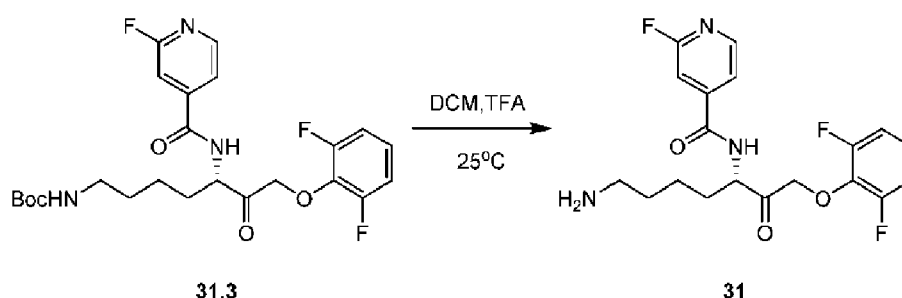
- 5 A una solución de 2-fluoro-4-carboxipiridina (523 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DMF (15 ml) se añadió HOBt (501 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (710,5 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. A continuación, a la mezcla se añadió **26.1** (1 g, 3,37 mmol, 1 *equivalente*, sal de HCl) y DIEA (1,74 g, 13,48 mmol, 2,35 ml, 4 *equivalentes*); la mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (5 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=2:1) para dar el compuesto **31.1** (800 mg, 2,1 mmol, rendimiento del 62 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H - Boc]: 384; TR = 0,8 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,27 - 1,62 (m, 14 H), 1,69 - 2,08 (m, 2 H), 3,05 (t, *J* = 6,50 Hz, 2 H), 3,75 (s, 3 H), 4,59 (dd, *J* = 9,37, 4,96 Hz, 1 H), 7,46 (s, 1 H), 7,69 (dt, *J* = 5,29, 1,54 Hz, 1 H), 8,35 (d, *J* = 5,29 Hz, 1 H)



- 20 A DIPA (659,8 mg, 6,52 mmol, 916,4 µl, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 2,61 ml, 5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂; después se añadió la mezcla a una solución de **31.1** (500 mg, 1,3 mmol, 1 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (1,15 g, 6,52 mmol, 473,3 µl, 5 *equivalentes*) en THF (10 ml); esto se agitó a -78 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se interrumpió con una solución saturada de NH₄Cl (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (15 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ saturado (10 ml), NaHCO₃ saturado (10 ml) y salmuera (10 ml). Esta se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **31.2** (620 mg).

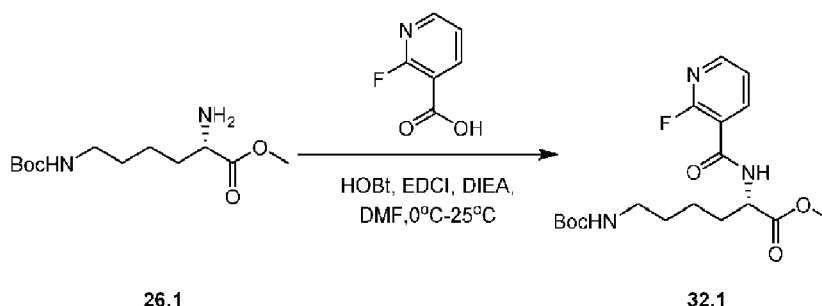


- 30 A **31.2** (620 mg, 1,54 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió DIEA (598,2 mg, 4,63 mmol, 808,36 µl, 3 *equivalentes*) y 2,6-difluorofenol (301,1 mg, 2,31 mmol, 1,5 *equivalentes*); esto se agitó a 25 °C durante 15 horas. Después de un procesamiento acuoso, el residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condiciones de TFA) para dar **31.3** (20 mg, 40,36 µmol, rendimiento del 3 %).

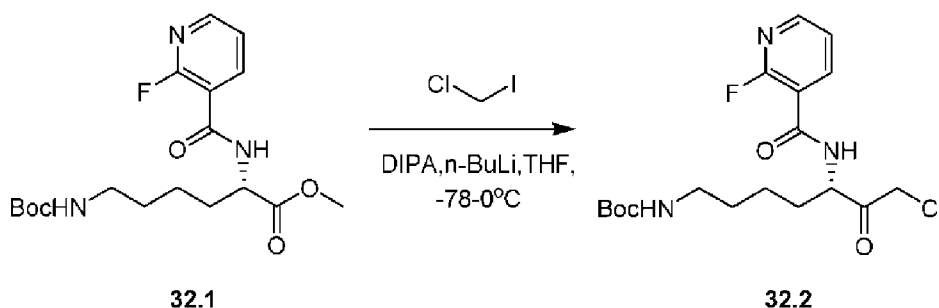


31.3 (50 mg, 101 μ mol, 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (condiciones de TFA) para dar el compuesto **31** (10 mg, 25,3 μ mol, rendimiento del 25 %); LCMS [M + H]: 396; TR = 1,3 min. RMN 1 H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,40 - 1,91 (m, 5 H), 2,03 - 2,22 (m, 1 H), 2,83 - 3,03 (m, 2 H), 4,87 - 5,15 (m, 3 H), 6,90 - 7,17 (m, 2 H), 7,38 - 7,53 (m, 1 H), 7,60 - 7,74 (m, 1 H), 8,24 - 8,39 (m, 1 H).

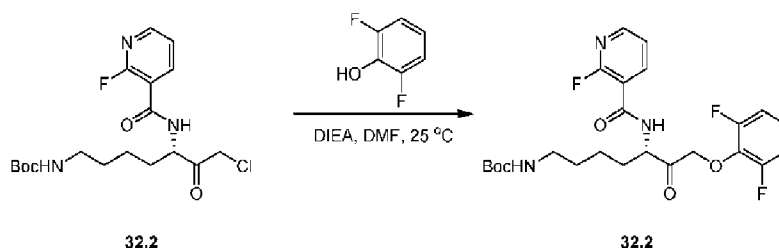
Ejemplo 28. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptano-3-il)-2-fluoronicotinamida (**32**)



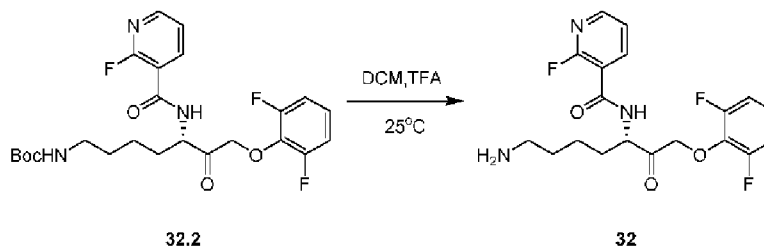
A ácido 2-(fluoro)nicotínico (366,3 mg, 2,6 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DMF (15 ml) se añadió HOBT (350,8 mg, 2,6 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (497,65 mg, 2,6 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h; después a la mezcla se añadió **26.1** (700 mg, 2,36 mmol, 1 *equivalente*, sal HCl) y DIEA (1,22 g, 9,44 mmol, 1,65 ml, 4 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se interrumpió con H₂O (50 ml) y después se extrajo con acetato de etilo (30 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), después se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 2/ 1) para dar **32.1** (600 mg, 1,56 mmol, rendimiento del 66 %) como un aceite de color marrón; LCMS [M + H]: 284; TR = 0,7 min. RMN 1 H (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 1,42 (s, 11 H), 1,54 (dt, J = 13,68, 6,84 Hz, 3 H), 1,63 (s, 1 H), 1,76 - 2,10 (m, 2 H), 3,12 (d a, J = 6,15 Hz, 2 H), 3,80 (s, 3 H), 4,57 (s a, 1 H), 4,76 - 4,90 (m, 1 H), 7,30 - 7,48 (m, 2 H), 8,36 (d a, J = 4,52 Hz, 1 H), 8,55 (ddd, J = 9,66, 7,72, 1,95 Hz, 1H).



A DIPA (527,8 mg, 5,2 mmol, 733 μ l, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 2,1 ml, 5 *equivalentes*); la mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂. Después se añadió la mezcla a **32.2** (400 mg, 1,04 mmol, 1 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (920 mg, 5,22 mmol, 378,6 μ l, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml); esto se agitó a -78 °C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se interrumpió con NH₄Cl saturado (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (15 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ saturado (10 ml), NaHCO₃ saturado (10 ml) y salmuera (10 ml); esto se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **32.2** (620 mg).

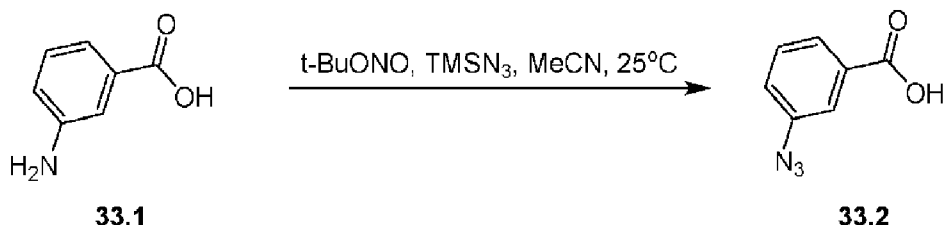


A **32.2** (500 mg, 1,24 mmol, 1 *equivalente*) y 2,6-difluorofenol (242,8 mg, 1,87 mmol, 1,5 *equivalentes*) en DMF (6 ml) se añadió DIEA (482,41 mg, 3,73 mmol, 652 μ l, 3 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condiciones de TFA) para dar el compuesto **32.2** (20 mg, 40,4 μ mol, rendimiento del 3 %); LCMS [M + H]: 496; TR = 0,86 min.

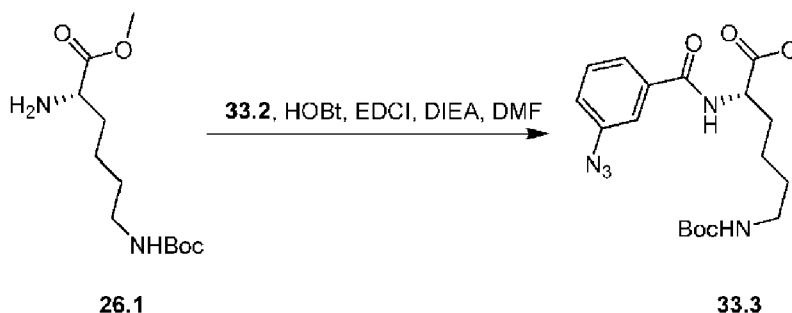


32.2 (20 mg, 40,4 μ mol, 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (condiciones de TFA) para dar el compuesto **32** (5 mg, 12,65 μ mol, rendimiento del 31 %); LCMS [M + H]: 396; TR = 1,25 min. RMN 1 H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,44 - 1,87 (m, 5 H), 2,06 - 2,22 (m, 1 H), 2,85 - 3,03 (m, 2 H), 4,89 - 5,12 (m, 3 H), 6,93 - 7,05 (m, 2 H), 7,06 - 7,15 (m, 1 H), 7,45 (ddd, J = 7,22, 5,02, 1,87 Hz, 1 H), 8,26 (ddd, J = 9,48, 7,50, 1,98 Hz, 1 H), 8,30-8,40 (m, 1H).

Ejemplo 29. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptano-3-il)-3-azidobenzamida (**33**)

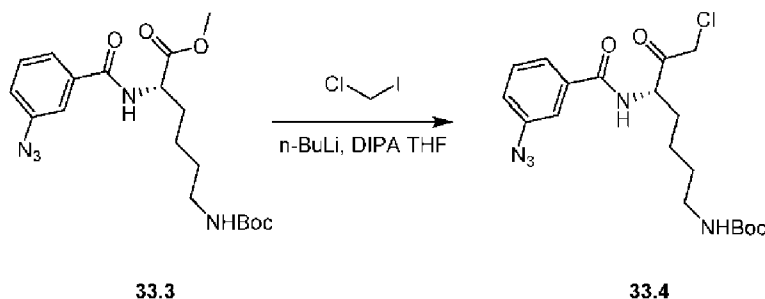


A **33.1** (5 g, 36,5 mmol, 1 *equivalente*) y t-BuONO (5,64 g, 54,7 mmol, 6,5 ml, 1,5 *equivalentes*) en AcN (70 ml) se añadió TMSN₃ (5,04 g, 43,75 mmol, 5,73 ml, 1,2 *equivalentes*) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Este material se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, DCM: MeOH = 10:1) para dar **33.2** (3 g, 18,4 mmol, rendimiento del 50 %).

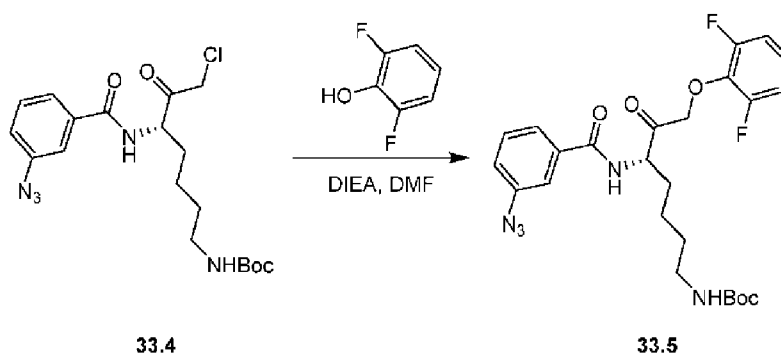


A **33.2** (1,25 g, 7,68 mmol, 1 *equivalente*) y EDCI (1,62 g, 8,45 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DMF (20 ml) se añadió HOBt (1,14 g, 8,45 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora; después se añadió gota a gota una solución del compuesto **26.1** (2 g, 7,68 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) seguida de la adición de DIPEA (2,98 g, 23,04 mmol, 4,03 ml, 3 *equivalentes*). Esta mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (15 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml

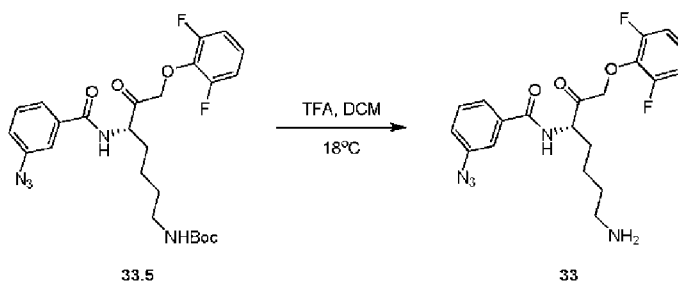
x 1), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 1/ 1) para dar **33.3** (2,8 g, 6,91 mmol, rendimiento del 90 %). RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,40 (s, 8 H), 1,44 - 1,58 (m, 4 H), 1,80 - 2,00 (m, 2 H), 3,00 - 3,10 (m, 2 H), 3,74 (s, 3 H), 4,58 (dd, *J* = 9,26, 5,07 Hz, 1 H), 7,25 (ddd, *J* = 8,05, 2,32, 1,10 Hz, 1 H), 7,49 (t, *J* = 7,83 Hz, 1 H), 7,56 (t, *J* = 1,76 Hz, 1 H), 7,63 - 7,69 (m, 1 H).



A una solución de DIPA (1,5 g, 14,8 mmol, 2,08 ml, 6 equivalentes) en THF (15 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 5,92 ml, 6 equivalentes) a 0 °C; la mezcla se agitó durante 30 min. Esto se añadió a **33.3** (1 g, 2,47 mmol, 1 equivalente) y cloro(yodo)metano (2,18 g, 12,35 mmol, 895,11 µl, 5 equivalentes) en THF (15 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó a -78 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se interrumpió añadiendo NH₄Cl (10 ml), y a continuación se extrajo con EtOAc (15 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ (20 ml), y salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄; después se filtró y se concentró para dar **33.4** (2 g) que se usó para la etapa siguiente.

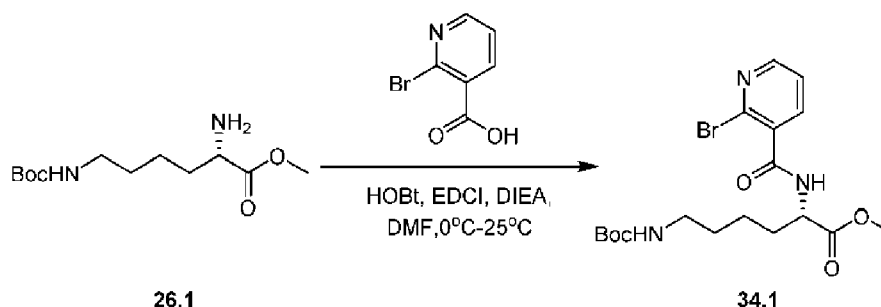


A **33.4** (2 g) y 2,6-difluorofenol (614 mg, 4,72 mmol, 1 equivalente) en DMF (5 ml) se añadió DIPEA (2,44 g, 18,87 mmol, 3,3 ml, 4 equivalentes); esta mezcla se agitó a 20 °C durante 10 horas. Después de un procesamiento acuoso, el residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar **33.5** (200 mg, 386,46 µmol, rendimiento del 8 %).

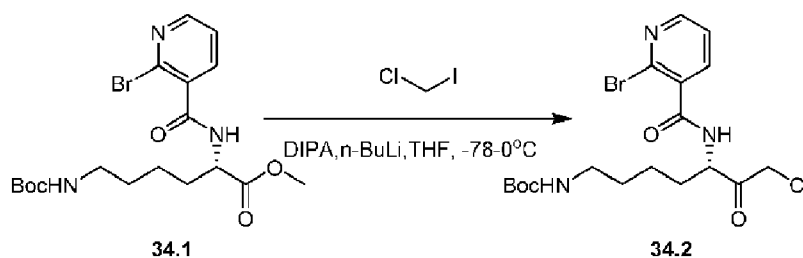


33.5 (100 mg, 193,23 µmol, 1 equivalente) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 18 °C durante 10 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida, después se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar el Compuesto **33** (80 mg, 192 µmol, rendimiento del 99 %) como aceite de color amarillo; LCMS [M + H]⁺: 418; RT = 3,1 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,49 - 1,67 (m, 2 H) 1,67 - 1,88 (m, 3 H) 2,11 (dddd, *J* = 13,84, 9,48, 6,78, 4,30 Hz, 1 H) 2,89 - 2,99 (m, 2 H) 4,91 - 5,08 (m, 3 H) 6,95 - 7,05 (m, 2 H) 7,05 - 7,12 (m, 1 H) 7,26 - 7,31 (m, 1 H) 7,48 - 7,54 (m, 1 H) 7,56 (t, *J* = 1,87 Hz, 1 H) 7,64 - 7,70 (m, 1 H).

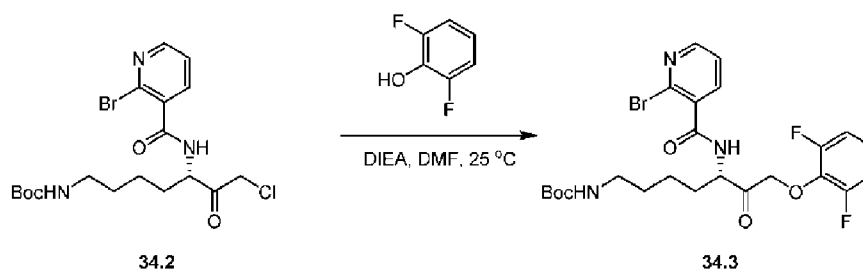
Ejemplo 30. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptano-3-il)-2-bromonicotinamida (34**)**



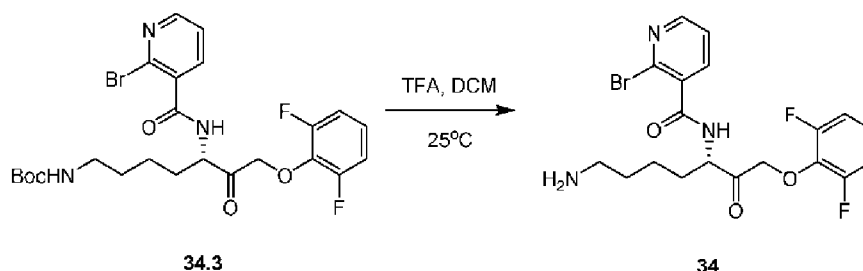
Al ácido 2-(bromo)nicotínico (748,71 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DMF (30 ml) se añadió HOBT (501 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (710,5 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*); esto se agitó a 0 °C durante 1 h. A esta mezcla se añadió el compuesto **26.1** (1 g, 3,37 mmol, 1 *equivalente*, sal HCl) y DIEA (1,74 g, 13,48 mmol, 2,35 ml, 4 *equivalente*); esto se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 2/1) para dar **34.1** (950 mg, 2,14 mmol, rendimiento del 63,5 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 345; TR = 0,73 min. RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,29 - 1,60 (m, 16 H), 1,76 - 2,04 (m, 2 H), 2,98 - 3,27 (m, 2 H), 3,80 (s, 3 H), 4,59 (s a, 1 H), 4,71 - 4,86 (m, 1 H), 6,95 (d a, *J* = 6,61 Hz, 1 H), 7,36 (dd, *J* = 7,61, 4,74 Hz, 1 H), 7,92 (dd, *J* = 7,61, 1,87 Hz, 1 H), 8,45 (dd, *J* = 4,85, 1,98 Hz, 1 H)



A DIPA (1,08 g, 10,69 mmol, 1,50 ml, 5 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 4,28 ml, 5 *equivalentes*); esta mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂. Esta mezcla se añadió a **34.1** (950 mg, 2,14 mmol, 1 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (1,89 g, 10,7 mmol, 776,65 µl, 5 *equivalentes*) en THF (10 ml) y se agitó a -78 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se interrumpió con NH₄Cl (20 ml) a 25 °C y se extrajo con acetato de etilo (15 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ saturado (10 ml), NaHCO₃ (10 ml) y salmuera (10 ml). Esto se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **34.2** (1,1 g).

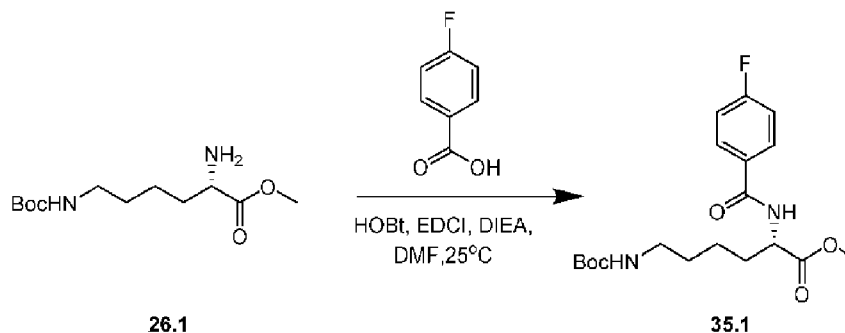


A **34.2** (1,1 g, 2,38 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (10 ml) se añadió DIEA (921,63 mg, 7,13 mmol, 1,25 ml, 3 *equivalentes*) y 2,6-difluorofenol (463,84 mg, 3,57 mmol, 1,5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas; después del procesamiento acuoso, el producto se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar **34.3** (150 mg, 269,6 µmol, rendimiento del 11 %).

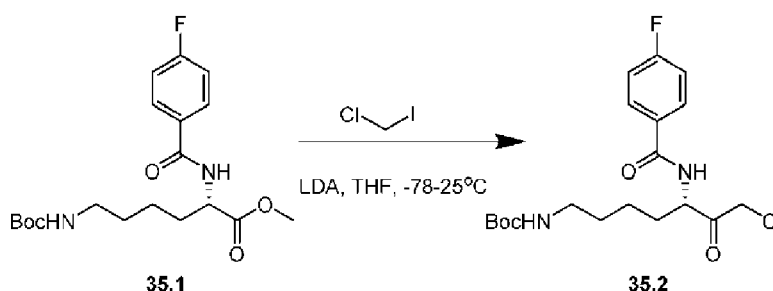


34.3 (150 mg, 270 μ mol, 1 *equivalente*) en DCM (10 ml) y TFA (2 ml) se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el compuesto 34 (100 mg, 219,16 μ mol, rendimiento del 81,3 %); LCMS [M + H]: 456; TR = 2,28 min. RMN 1 H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,51 - 1,88 (m, 6 H), 1,97 - 2,21 (m, 1 H), 2,95 (t a, J = 7,50 Hz, 2 H), 4,96 (dd, J = 9,70, 4,19 Hz, 1 H), 5,00 - 5,14 (m, 1 H), 6,93 - 7,15 (m, 2 H), 7,41 - 7,56 (m, 1 H), 7,73 - 7,89 (m, 1 H), 8,35 - 8,48 (m, 1 H).

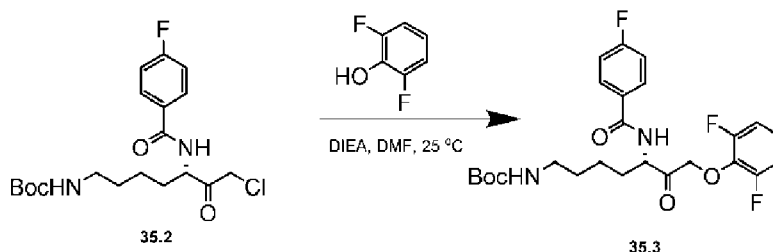
Ejemplo 31. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-4-fluorobenzamida (35)



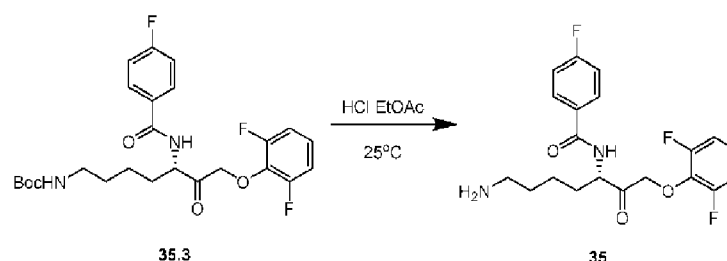
Al ácido 4-(fluoro)benzoico (538,2 mg, 3,84 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (15 ml) se añadió HOBT (570,75 mg, 4,22 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (809,74 mg, 4,22 mmol, 1,1 *equivalentes*); la mezcla se agitó a 25 °C durante 0,5 h. A la mezcla se añadió **26.1** (1 g, 3,84 mmol, 1 *equivalente*) y DIEA (1,99 g, 15,36 mmol, 2,68 ml, 4 *equivalentes*); la reacción se agitó durante 14 h. La mezcla de reacción se interrumpió con la adición de H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ saturado (25 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **35.1** (1,10 g); LCMS [M + H]: 369; TR = 0,8 min.



A DIPA (1,32 g, 13,05 mmol, 1,83 ml, 5 *equivalentes*) en THF (10 ml) se añadió n-BuLi (835,98 mg, 13,05 mmol, 5 *equivalentes*); esto se agitó a 25° durante 0,5 h en N₂. La mezcla se añadió a **35.1** (1 g, 2,61 mmol, 1 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (5 *equivalentes*) en THF (10 ml), después se agitó a -78° durante 2 h. La mezcla de reacción se interrumpió añadiendo cloruro amónico saturado (30 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con hidrogenosulfito sódico saturado (25 ml) y salmuera. Esto se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **35.2** (800 mg, 2 mmol, rendimiento del 77 %). El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional; LCMS [M + H]: 402; TR = 0,8 min.

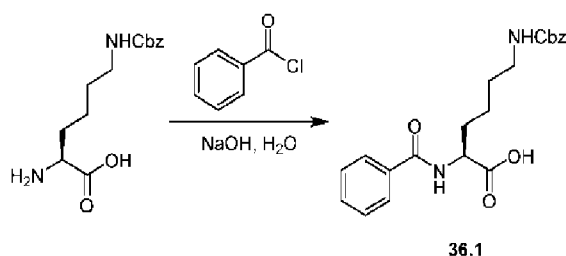


A **35.2** (800 mg, 2 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (10 ml) se añadió DIEA (773,76 mg, 5,99 mmol, 1,05 ml, 3 *equivalentes*) y 2,6-difluorofenol (389,42 mg, 2,99 mmol, 1,5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. Después de un procesamiento acuoso, se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar **35.3** (80 mg, 161,78 μ mol, rendimiento del 8 %); LCMS [M + H]: 495; TR = 0,94 min.

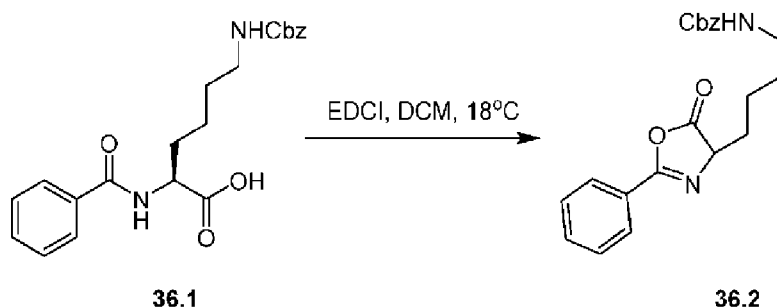


35.3 (80 mg, 232,95 μmol) en HCl/EtOAc (15 ml) se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 35 (50 mg, 205,51 μmol , rendimiento del 88 %); LCMS [M + H]: 244; TR = 0,104 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,51 - 1,65 (m, 2 H), 1,67 - 1,87 (m, 3 H), 2,05 - 2,18 (m, 1 H), 2,95 (d, J = 5,29 Hz, 2 H), 4,90 - 4,95 (m, 1 H), 4,95 - 5,07 (m, 2 H), 6,96 - 7,02 (m, 2 H), 7,03 - 7,12 (m, 1 H), 7,22 (t, J = 8,82 Hz, 2 H), 7,92 (dd, J = 8,82, 5,29 Hz, 2 H).

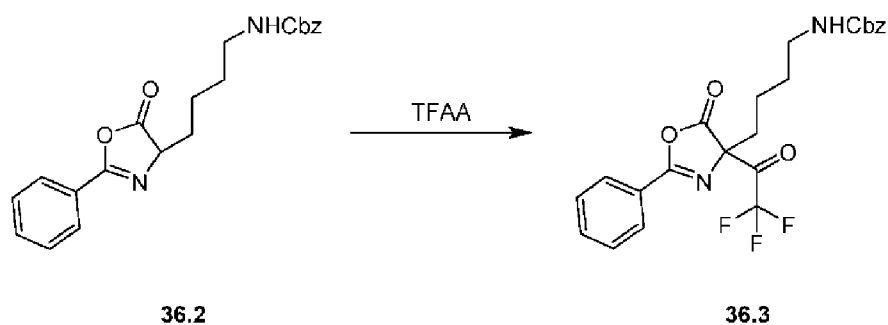
Ejemplo 32. Preparación de N-(7-amino-1,1,1-trifluoro-2-oxoheptan-3-il)benzamida (36)



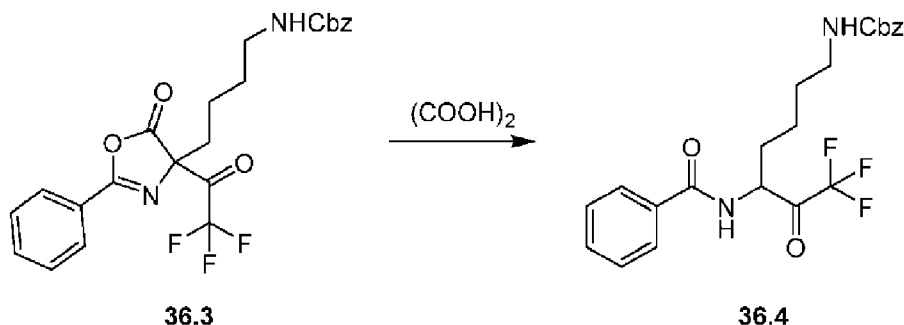
A ϵ -Cbz lisina (2,4 g, 8,56 mmol, 1 equivalente) en H₂O (6 ml) se añadió NaOH (684,93 mg, 17,12 mmol, 2 equivalentes) en una porción a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. A continuación, se añadió a la mezcla cloruro de benzilo compuesto (1,20 g, 8,56 mmol, 994,64 μ l, 1 equivalente) gota a gota, y la mezcla se agitó durante 9 horas. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con EtOAc (10 ml) para dar **36.1** (4 g) como un sólido de color blanco: LCMS [M + H]: 385; TR = 0,77 min.



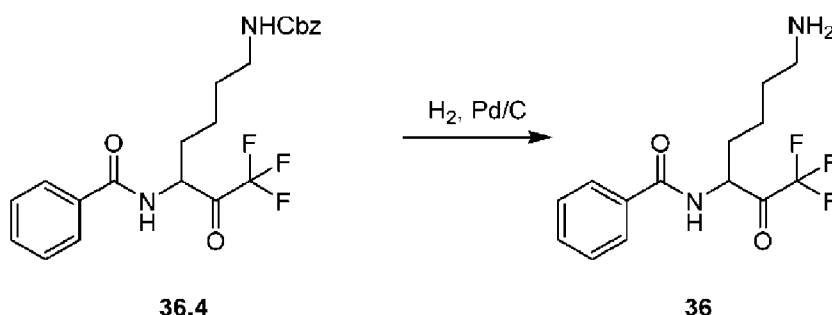
A **36.1** (4 g, 10,41 mmol, 1 equivalente) en DCM (40 ml) se añadió EDCI (2 g, 10,41 mmol, 1 equivalente) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (40 ml) y después se extrajo con DCM (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ (50 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **36.2** (5 g); LCMS [M + H]: 367; TR = 0,87 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,33 - 2,02 (m, 7 H), 3,10 - 3,17 (m, 2 H), 4,35 - 4,54 (m, 1 H), 4,98 - 5,06 (m, 2 H), 7,28 - 7,38 (m, 5 H), 7,42 - 7,50 (m, 2 H), 7,52 - 7,58 (m, 1 H), 7,76 - 7,86 (m, 2 H).



A **36.2** (3 g, 8,19 mmol, 1 *equivalente*) se añadió TFAA (2,06 g, 9,83 mmol, 1,37 ml, 1,2 *equivalentes*); esto se agitó a 40 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar **36.3** (3,5 g, 7,57 mmol, rendimiento del 92 %); LCMS [M + H]: 463; TR = 0,96 min.

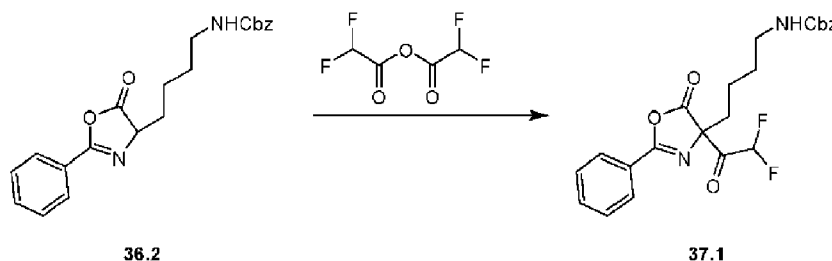


A **36.3** (3 g, 6,49 mmol, 1 *equivalente*) se añadió ácido oxálico (934,53 mg, 10,38 mmol, 916 µl, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 120 °C durante 5 min. Después se interrumpió mediante la adición de H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones de TFA) para dar **36.4** (200 mg, 458,27 µmol, rendimiento del 7 %); LCMS [M + H]: 437; TR = 0,9 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,21 - 1,96 (m, 7 H), 3,04 - 3,16 (m, 2 H), 4,30 - 4,51 (m, 1 H), 4,99 (s, 1 H), 7,27 - 7,34 (m, 3 H), 7,40 - 7,47 (m, 1 H), 7,48 - 7,56 (m, 1 H), 7,74 - 7,83 (m, 1 H).

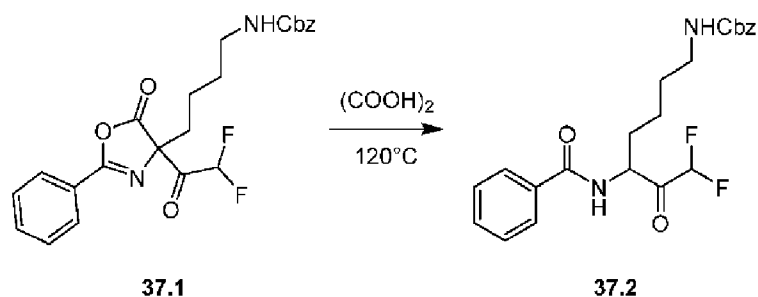


A **36.4** (100 mg, 229,14 µmol, 1,00 *equivalente*) en i-PrOH (10 ml) y HCl (1 M, 2 ml, 8,73 *equivalentes*) se añadió Pd-C (10 %, 0,02 g) en N₂. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó en H₂ a 345 kPa (50 psi) a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa (condiciones neutras) para dar el compuesto 36 (20 mg, 66,16 µmol, rendimiento del 29 %); LCMS [M + H]: 303; TR = 1,73 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,27 - 2,04 (m, 6 H), 2,88 (s a, 1 H), 4,50 (t a, *J* = 12,04 Hz, 1 H), 7,44 - 7,52 (m, 2 H), 7,53 - 7,61 (m, 1 H), 7,73 - 7,90 (m, 2 H).

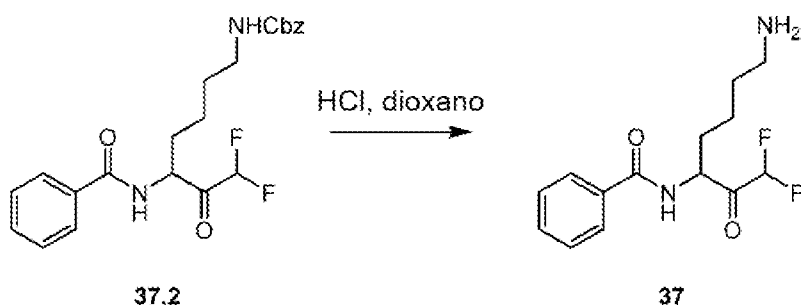
25 Ejemplo 33. Preparación de N-(7-amino-1,1-difluoro-2-oxoheptan-3-il)benzamida (**37**)



36.2 (1,2 g, 3,28 mmol, 1 *equivalente*) en anhídrido difluoroacético (1,71 g, 9,83 mmol, 3 *equivalentes*) se agitó a 40 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar **37.1** (1,2 g, bruto); LCMS [M + H]: 445; TR = 0,91 min.

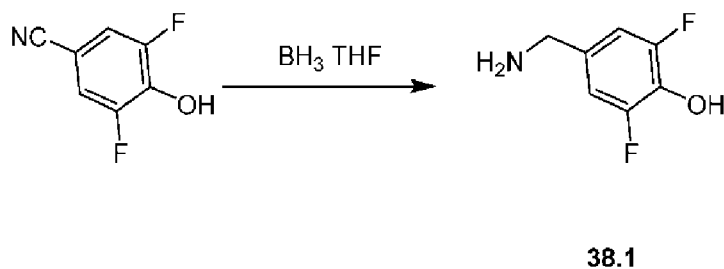


37.1 (1,2 g, 2,70 mmol, 1 *equivalente*) y ácido oxálico (486,18 mg, 5,40 mmol, 476,64 μ l, 2 *equivalentes*) se agitó a 120 °C durante 10 min en N₂. La mezcla se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo) para dar **37.2** en bruto, después se purificó más por HPLC a escala semipreparativa (condiciones neutras) para dar **37.2** puro (120 mg, 286,79 μ mol, rendimiento del 80 %); LCMS [M + H]: 419; TR = 0,79 min.

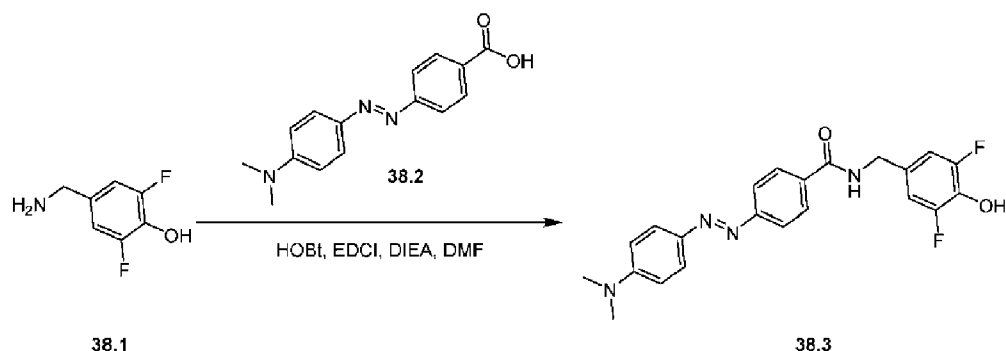


37.2 (10 mg, 23,9 μ mol, 1 *equivalente*) en HCl (1 ml) y dioxano (1 ml) se agitó a 50 °C durante 2 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (condiciones neutras) para dar el compuesto **37** (120 mg, 287 μ mol, rendimiento del 80 %); LCMS [M + H]: 285; TR = 2,0 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,38 - 1,57 (m, 1 H), 1,72 - 1,97 (m, 5 H), 2,01 - 2,14 (m, 1 H), 3,70 - 3,85 (m, 1 H), 4,05 (dd a, *J* = 12,35, 6,84 Hz, 1 H), 5,95 - 6,29 (m, 1 H), 7,44 - 7,60 (m, 4 H), 7,81 - 7,90 (m, 2 H).

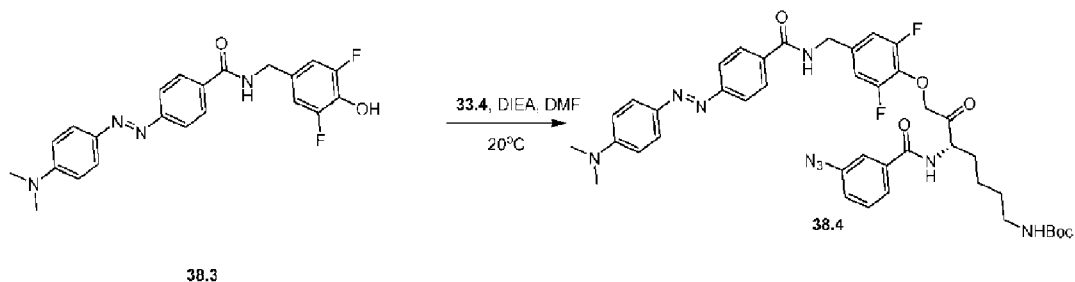
Ejemplo 34. Preparación de una sonda fluorescente de actividad de gingipaína con desactivador escindible: (S,E)-N-(7-amino-1-(4-((4-(dimetilamino)fenil)diazetil)benzamido)-metil)-2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-((3-(5,5-difluoro-7,9-dimetil-5H-514,614-dipirrololo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-il)propanamido)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (38)



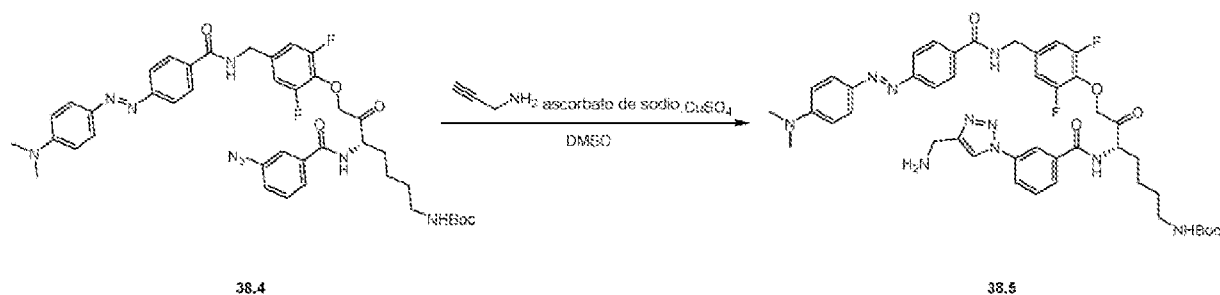
A 2,6-Difluoro-4-cianofenol (2,5 g, 16,12 mmol, 1 *equivalente*) se añadió BH₃-THF (1 M, 64,48 ml, 4 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 70 °C durante 10 horas. La reacción se interrumpió mediante adición de HCl (6 M, 5 ml) a 25 °C y después se concentró a presión reducida para dar **38.1** (7,1 g, bruto) como un sólido de color blanco.



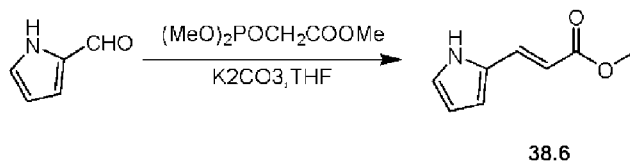
A **38.2** (6,09 g, 22,62 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (15 ml) se añadió HOBt (3,36 g, 24,88 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (4,77 g, 24,88 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, después se añadió **38.1** (3,60 g, 22,62 mmol, 1 *equivalente*) y DIEA (11,70 g, 90,48 mmol, 15,81 ml, 4,00 *equivalentes*); esta mezcla se agitó a 25 °C durante 11 horas. La reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Esto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1) para dar **38.3** (400 mg, 974,6 µmol) como un sólido de color rojo. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 3,11 (s, 6 H), 4,48 (s, 2 H), 6,84 (d, *J* = 9,29 Hz, 2 H), 6,90 - 6,98 (m, 2 H), 7,78 - 7,90 (m, 4 H), 7,94 - 8,01 (m, 2 H).



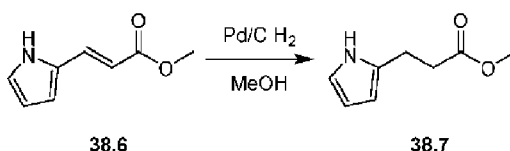
A **33.4** (1 g, 2,36 mmol, 1 *equivalente*) y **38.3** (100 mg, 243,65 µmol, 0,1 *equivalentes*) en DMF (10 ml) se añadió DIPEA (1,22 g, 9,44 mmol, 1,65 ml, 4 *equivalentes*) en una porción a 20 °C en N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Esto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1) para dar **38.4** (250 mg, 313,34 µmol) como un sólido de color rojo.



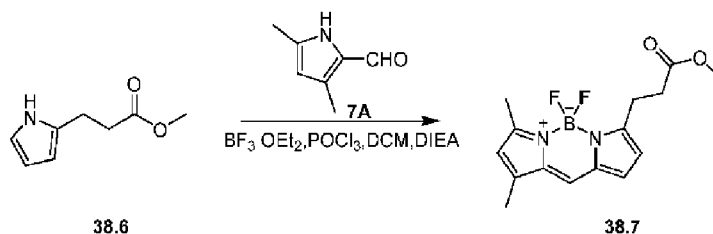
A una mezcla de **38.4** (220 mg, 275,74 µmol, 1 *equivalente*) y prop-2-in-1-amina (15,19 mg, 275,74 µmol, 17,66 µl, 1 *equivalente*) en DMSO (2 ml) se añadió la solución de CuSO₄ (8,8 mg, 55,15 µmol, 8,46 µl, 0,2 *equivalentes*) en H₂O (100 µl) y ascorbato sódico (109,25 mg, 551,48 µmol, 2 *equivalentes*) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 5 min. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (5 ml) y se extrajo con EtOAc (5 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para dar **38.5** (250 mg) en forma de un sólido marrón; LCMS [M + H]⁺: 853; TR = 1,14 min.



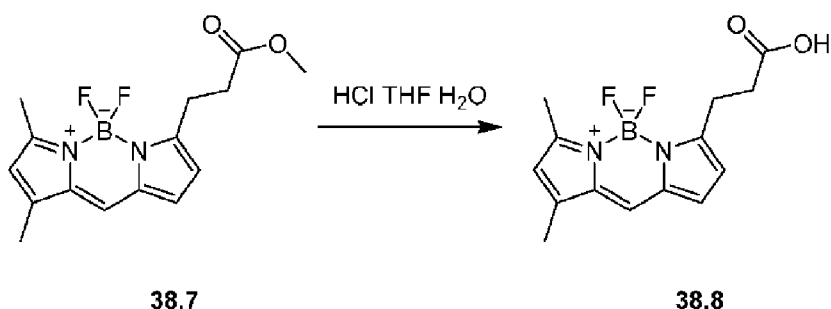
A 2-formilpirrol (5 g, 52,58 mmol, 1 *equivalente*) y 2-dietoxifosforilacetato de metilo (11,05 g, 52,58 mmol, 1 *equivalente*) en THF (60 ml) se añadió K₂CO₃ (14,53 g, 105,16 mmol, 2 *equivalentes*) a 50 °C en N₂. La mezcla se agitó a 50 °C durante 10 horas. La reacción se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Este material se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 5/1) para dar **38.6** (8,6 g, 57 mmol) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 152; TR = 0,68 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 3,69 - 3,76 (m, 3 H), 6,04 - 6,13 (m, 1 H), 6,15 - 6,21 (m, 1 H), 6,31 (dt, J=3,91, 2,12 Hz, 1 H), 6,45 - 6,57 (m, 1 H), 6,92 (d, J= 1,32 Hz, 1 H), 6,98 - 7,21 (m, 1 H), 7,44 - 7,59 (m, 1 H).



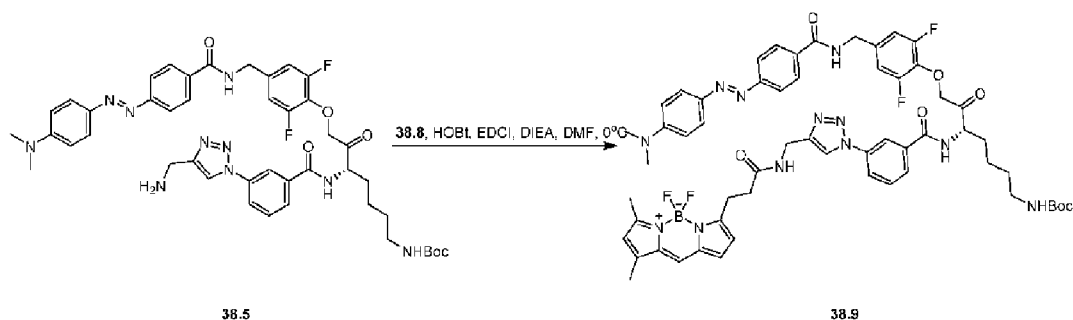
A **38.6** (8,6 g, 56,89 mmol) en MeOH (100 ml) se añadió Pd-C (10 %, 0,9 g) en N₂. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó en H₂ a 345 kPa (50 psi) a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró. Este material se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 5/1) para dar **38.6** (5 g, 32,64 mmol); LCMS [M + H]: 154; TR = 0,55 min. RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,66 (t, J=6,78 Hz, 2 H), 2,93 (t, J= 6,71 Hz, 2 H), 3,62 - 3,78 (m, 3 H), 5,80 - 5,99 (m, 1 H), 6,12 (q, J=2,76 Hz, 1 H) 6,60 - 6,76 (m, 1 H), 8,54 (s, 1 H).



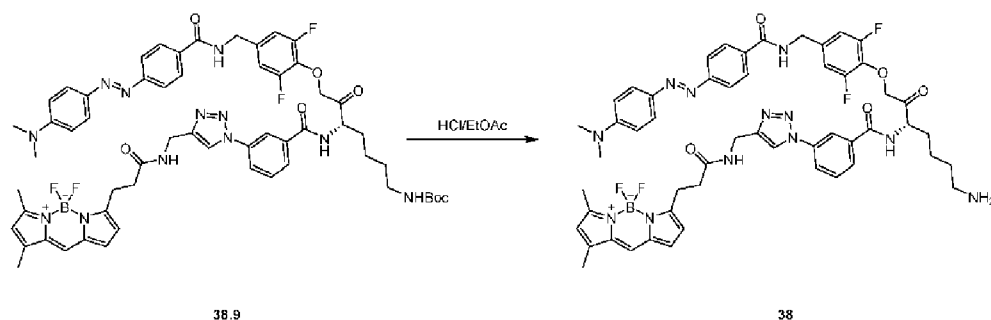
A **38.6** (3 g, 19,58 mmol, 1 *equivalente*) y compuesto 2-formil-3,5-dimetilpirrol (2,65 g, 21,54 mmol, 1,1 *equivalentes*) en DCM (60 ml) se añadió POCl₃ (3,3 g, 21,54 mmol, 2 ml, 1,1 *equivalentes*) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas, a continuación se añadió BF₃·Et₂O (11,12 g, 78,32 mmol, 9,67 ml, 4 *equivalentes*) y DIEA (10,63 g, 82,24 mmol, 14,36 ml, 4,2 *equivalentes*) gota a gota a 18 °C. Esta mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se filtró, después se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con DCM (50 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Esto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 1/4) para dar el compuesto **38.7** (3 g, 9,80 mmol). RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,25 (s, 3 H), 2,57 (s, 3 H), 2,78 (t, J= 7,59 Hz, 2 H), 3,30 (t, J= 7,65 Hz, 2 H), 3,67 - 3,78 (m, 3 H), 6,11 (s, 1 H), 6,27 (d, J= 3,89 Hz, 1 H), 6,88 (d, J= 3,89 Hz, 1 H), 7,08 (s, 1 H).



38.7 (1,2 g, 3,92 mmol, 1 *equivalente*) y HCl (50 ml, 37 %) en THF (120 ml) y H₂O (80 ml) se agitó a 18 °C durante 24 horas. La mezcla de reacción se particionó con DCM (80 ml) y la capa acuosa se extrajo con DCM (100 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Este material se purificó mediante TLC a escala preparativa (SiO₂, DCM: MeOH = 10:1) para dar **38.8** (700 mg, 2,4 mmol) como un sólido de color rojo.

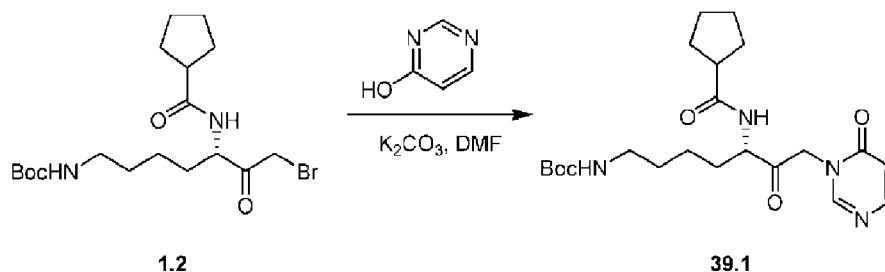


A una mezcla de **38.8** (109,59 mg, 375,18 μ mol, 2 equivalentes) y HOBt (152,08 mg, 1,13 mmol, 6 equivalentes) en DMF (2 ml) se añadió EDCI (215,76 mg, 1,13 mmol, 6 equivalentes) a 0 °C en N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 10 min. A esta mezcla se añadió **38.5** (160 mg, 187,59 μ mol, 1 equivalente) y DIPEA (145,46 mg, 1,13 mmol, 196,57 μ l, 6 equivalentes), esta mezcla se agitó a 0 °C durante 20 min. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (5 ml) y se extrajo con EtOAc (5 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante TLC a escala preparativa (SiO₂, EtOAc) para dar **38.9** (60 mg, 53,24 μ mol); LCMS [M + H]: 1128; TR = 1,45 min.

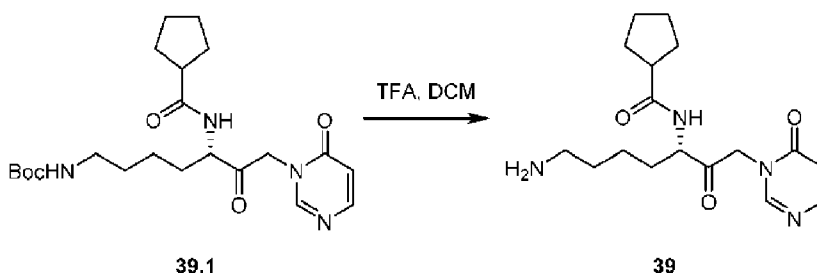


38.9 (50 mg, 44,37 μ mol, 1 equivalente) se añadió a HCl/ EtOAc (5 ml), y la mezcla se agitó a 18 °C durante 10 min. La reacción se concentró a presión reducida, a continuación se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condición TFA) para dar el compuesto **38** (10 mg, 9,74 μ mol); LCMS [M + H]: 1027; TR = 2,82 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,23 - 1,59 (m, 4 H), 1,67 (d a, *J* = 9,48 Hz, 1 H), 1,85 (d a, *J* = 6,62 Hz, 1 H), 2,21 (s, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 2,53 (d a, *J* = 7,94 Hz, 2 H), 2,74 (d a, *J* = 6,39 Hz, 2 H), 3,04 (s, 5 H), 3,06 - 3,11 (m, 1 H), 4,39 (d a, *J* = 5,51 Hz, 5 H), 4,64 (s a, 1 H), 4,99 - 5,20 (m, 2 H), 6,25 (s, 1 H), 6,32 (d a, *J* = 3,97 Hz, 1 H), 6,81 (d a, *J* = 9,04 Hz, 2 H), 6,96 - 7,10 (m, 2 H), 7,52 - 7,62 (m, 3 H), 7,68 (t a, *J* = 8,05 Hz, 1 H), 7,79 (dd a, *J* = 8,60, 4,41 Hz, 3 H), 7,90 - 8,01 (m, 2 H), 8,04 (d, *J* = 7,72 Hz, 1 H), 8,36 (s, 1 H), 8,47 - 8,58 (m, 1 H), 8,64 (s, 1 H), 8,96 (d a, *J* = 7,50 Hz, 1 H), 9,07 - 9,20 (m, 1 H).

Ejemplo 35. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(6-oxopirimidin-1(6H)-il)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (**39**)

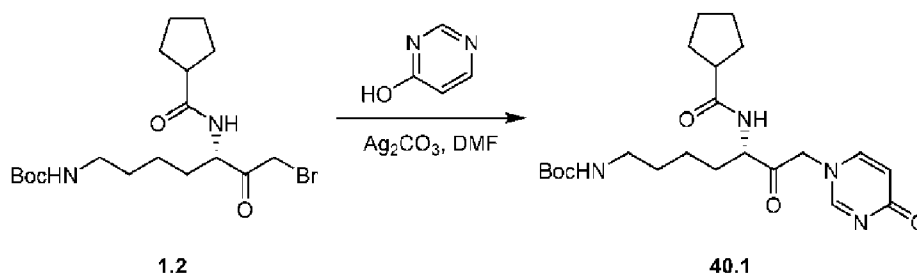


A **1.2** (150 mg, 357,7 μ mol, 1 equivalente) en DMF (2 ml) se añadió K₂CO₃ (148,31 mg, 1,07 mmol, 3 equivalentes) y 4-hidroxilpirimidina (34,37 mg, 357,7 μ mol, 1 equivalente). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condición TFA) para dar el compuesto **39.1** (40 mg, 92,05 μ mol); LCMS [M + H]: 435; TR = 0,76 min.

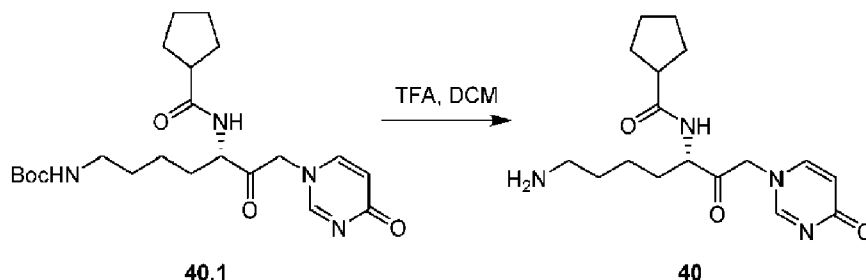


39.1 (40 mg, 92,05 μ mol, 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el Compuesto **39** (20 mg, 59,8 μ mol, rendimiento del 65 %); LCMS [M + H]: 335; TR = 0,25 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,37 - 1,57 (m, 2 H), 1,57 - 1,81 (m, 10 H), 1,83 - 2,06 (m, 3 H), 2,63 - 2,83 (m, 1 H), 2,94 (t a, J = 7,50 Hz, 2 H), 4,52 (dd, J = 8,49, 5,40 Hz, 1 H), 4,95 - 4,99 (m, 1 H), 4,97 (s, 1 H), 6,51 (d, J = 6,61 Hz, 1 H), 8,00 (d, J = 6,61 Hz, 1 H), 8,32 (s, 1 H).

Ejemplo 36. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(4-oxopirimidin-1(4H)-il)heptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (40)

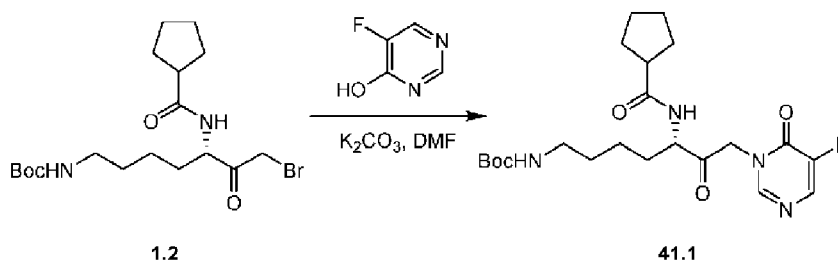


A **1.2** (100 mg, 238,46 μ mol, 1 *equivalente*) en DMF (3 ml) se añadió Ag_2CO_3 (197,27 mg, 715,38 μ mol, 3,00 *equivalentes*) y 4-hidroxipirimidina (22,91 mg, 238,46 μ mol, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condición de TFA) para dar **40.1** (30 mg, 69,04 μ mol, rendimiento del 29 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 435; TR = 0,74 min.

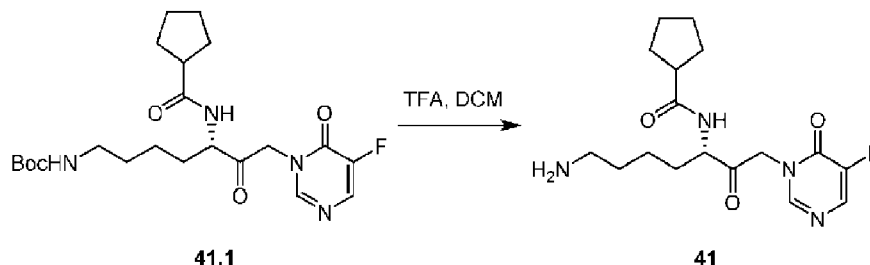


40.1 (30 mg, 69 μ mol, 1 *equivalente*) en TFA (1 ml) y DCM (5 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el Compuesto **40** (2 mg, 6 μ mol); LCMS [M + H]: 335; TR = 0,43 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,24 - 1,57 (m, 4 H), 1,58 - 1,81 (m, 10 H), 1,82 - 2,03 (m, 4 H), 2,66 - 2,84 (m, 1 H), 2,86 - 3,03 (m, 2 H), 4,31 - 4,48 (m, 1 H), 4,95 - 5,19 (m, 2 H), 6,30 (d, J = 7,58 Hz, 1 H), 7,62 (d a, J = 7,34 Hz, 1 H), 8,23 (s a, 1 H).

Ejemplo 37. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(5-fluoro-6-oxopirimidin-1(6H)-il)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (41)

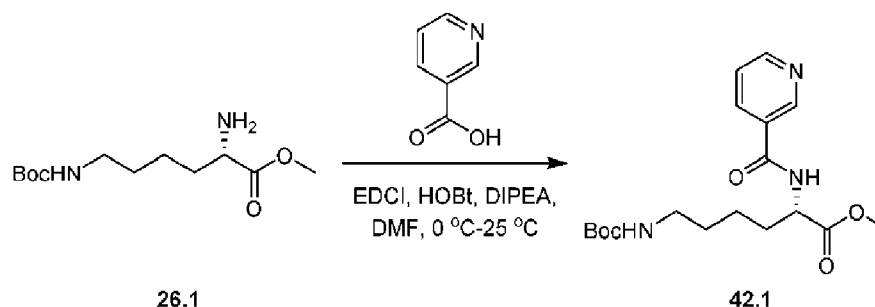


A **1.2** (150 mg, 357,7 μ mol, 1 *equivalente*) en DMF (2 ml) se añadió K_2CO_3 (148,31 mg, 1,07 mmol, 3 *equivalentes*) y 5-fluoropirimidin-4-ol (40,81 mg, 357,7 μ mol, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa a escala (condición de TFA) para dar **41.1** (50,00 mg, 110,49 μ mol, rendimiento del 30,89 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 453; TR = 0,8 min.

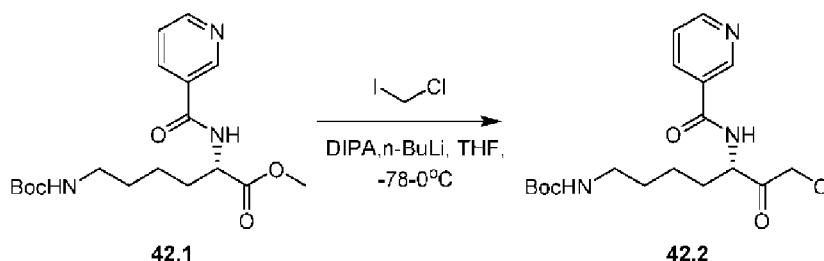


41.1 (50 mg, 110,49 μ mol, 1 *equivalente*) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el compuesto **41** (30 mg, 85,13 μ mol, rendimiento del 77 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 353; TR = 0,16 min. RMN 1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,28 - 1,47 (m, 2 H), 1,48 - 1,73 (m, 9 H), 1,75 - 1,98 (m, 3 H), 2,56 - 2,73 (m, 1 H), 2,86 (t a, J = 7,52 Hz, 2 H), 4,44 (dd, J = 8,56, 5,50 Hz, 1 H), 4,90 - 5,04 (m, 2 H), 7,95 (d, J = 2,45 Hz, 1 H), 8,05 (s, 1 H).

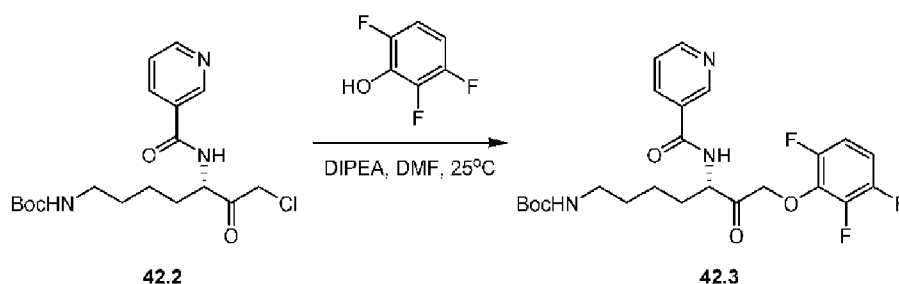
Ejemplo 38. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)nicotinamida (**42**)



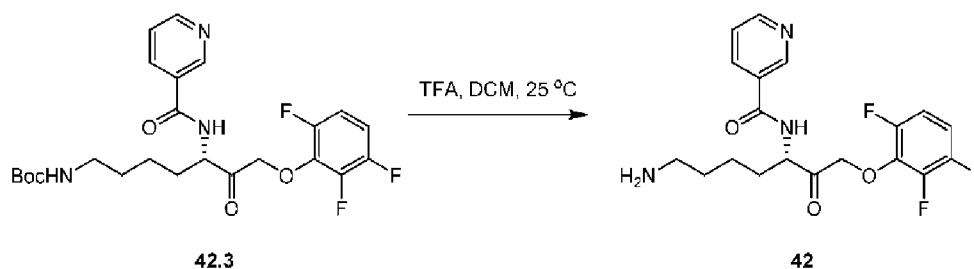
Al ácido nicotínico (497,86 mg, 4,04 mmol, 339 μ l, 1,2 *equivalente*) en DMF (10 ml) se añadió HOBt (501 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (710,5 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. Después se añadió la mezcla a DIPEA (1,74 g, 13,48 mmol, 2,35 ml, 4 *equivalentes*) y **26.1** (1 g, 3,37 mmol, 1,00 *equivalente*, sal HCl) y se agitó a 25 °C durante 11 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo = 20/1 a 0/1) para dar **42.1** (800 mg, 2,19 mmol, rendimiento del 65 %) como aceite incoloro. RMN 1H (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 1,41 (s a, 10 H), 1,54 (d a, J = 6,11 Hz, 3 H), 1,81 - 2,06 (m, 3 H), 3,14 (s a, 2 H), 3,80 (d a, J = 2,69 Hz, 3 H), 4,06 - 4,20 (m, 1 H), 7,04 (s a, 1 H), 7,40 (d a, J = 5,14 Hz, 1 H), 8,16 (s a, 1 H), 8,76 (s a, 1 H), 9,07 (s a, 1 H).



A una solución de DIPA (648 mg, 6,4 mmol, 9 μ l, 6 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 2,56 ml, 6 *equivalentes*); esto se agitó a 0 °C durante 1 hora. A **42.1** (390 mg, 1,07 mmol, 1 *equivalente*) en THF (5 ml) se añadió cloro(yodo)metano (1,13 g, 6,4 mmol, 464,8 μ l, 6 *equivalentes*); esto se agitó a -78 °C durante 30 min. A continuación, se combinaron las dos mezclas y se agitaron a -78 °C durante 2 h. La reacción se interrumpió mediante la adición de NH_4Cl (15 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de Na_2SO_3 (15 ml), Solución de $NaHCO_3$ (15 ml) y salmuera (15 ml); esto se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para dar **42.2** (410 mg); LCMS [M + H]: 384; TR = 0,79 min.

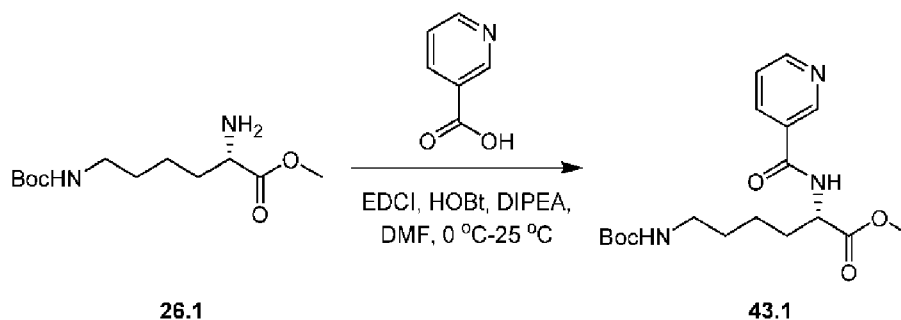


A **42.2** (410 mg, 1,07 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió DIPEA (553,15 mg, 4,28 mmol, 747,5 μ l, 4 *equivalentes*) y 2,3,6-trifluorofenol (158,45 mg, 1,07 mmol, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. El residuo se purificó mediante HPLC a escala semipreparativa (columna: Waters Xbridge 150 \times 25 \times 5 μ ; fase móvil: [A: agua (TFA al 0,1 %); B: AcN]; gradiente de B: 24 %-65 % en 12 min) para dar **42.3** (40 mg, 90 μ mol); LCMS [M + H]: 496; TR = 0,80 min.

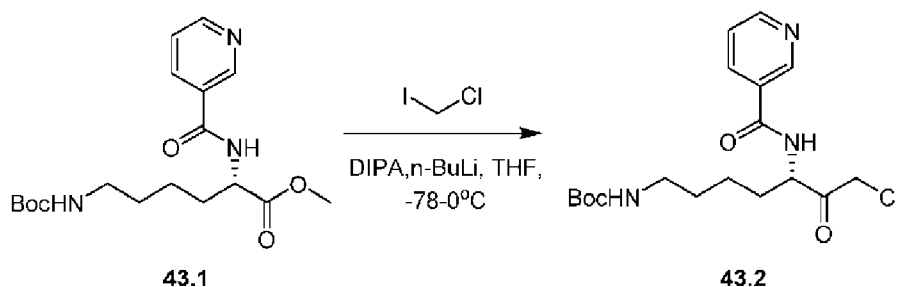


A **42.3** (40,00 mg, 80,73 μ mol) en CH_2Cl_2 (5 ml) se añadió TFA (1 ml) y se agitó a 25 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente y dar el compuesto 42 (20 mg, 50,59 μ mol, rendimiento del 63 %); LCMS [M + H]: 396; TR = 0,76 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,48 - 1,67 (m, 2 H), 1,70 - 1,91 (m, 3 H), 2,08 - 2,19 (m, 1 H), 2,91 - 3,03 (m, 1 H), 2,97 (t a, J = 7,03 Hz, 1 H), 4,95 - 5,01 (m, 1 H), 5,05 - 5,25 (m, 2 H), 6,94 - 7,09 (m, 2 H), 7,68 - 7,81 (m, 1 H), 8,39 - 8,51 (m, 1 H), 8,75 - 8,85 (m, 1 H), 9,01 - 9,14 (m, 1 H).

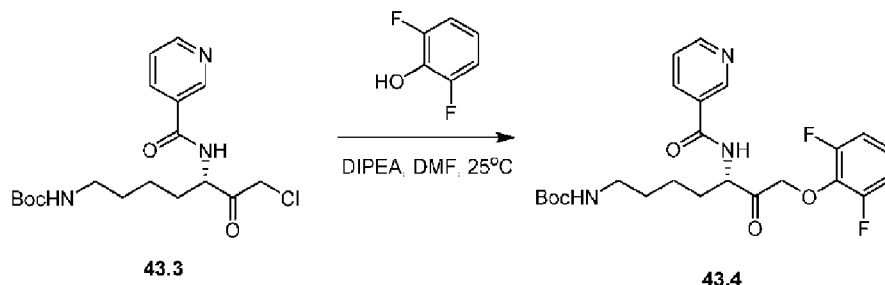
Ejemplo 39. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)nicotinamida (43)



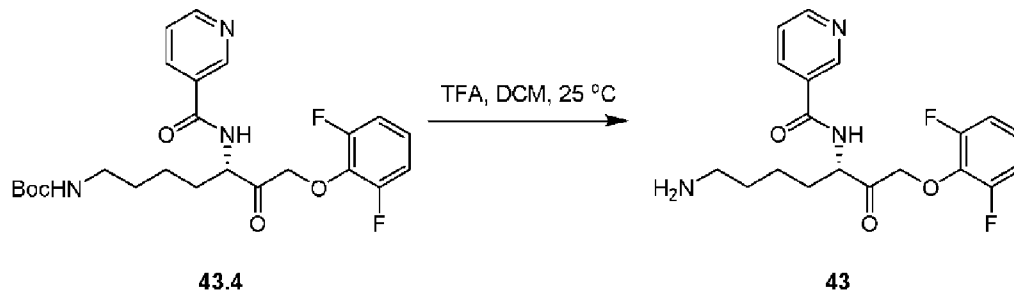
Al ácido nicotínico (497,86 mg, 4,04 mmol, 338,68 μ l, 1,2 *equivalente*) en DMF (10 ml) se añadió HOBt (500,8 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*) y EDCI (710,5 mg, 3,71 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. A la mezcla se añadió DIPEA (1,74 g, 13,48 mmol, 2,35 ml, 4 *equivalentes*) y **26.1** (1 g, 3,37 mmol, 1 *equivalente*, HCl); esto se agitó a 25 °C durante 11 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo = 20:1 a 0:1) para dar **43.1** (800 mg, 2,19 mmol); LCMS [M + H]: 366; TR = 0,69 min. RMN ^1H (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 1,39 (s, 9 H), 1,49 - 1,59 (m, 2 H), 1,78 - 2,05 (m, 5 H), 3,12 (d a, J = 5,70 Hz, 2 H), 3,79 (s, 2 H), 3,78 - 3,81 (m, 1 H), 4,65 (s a, 1 H), 4,79 (d a, J = 5,26 Hz, 1 H), 7,02 (d a, J = 5,70 Hz, 1 H), 7,39 (dd, J = 7,67, 5,04 Hz, 1 H), 8,15 (d a, J = 7,89 Hz, 1 H), 8,74 (d a, J = 4,38 Hz, 1 H), 9,06 (s a, 1 H).



A una solución de DIPA (662 mg, 6,54 mmol, 919 μ l, 6 *equivalentes*) en THF (5 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 2,62 ml, 6 *equivalentes*); esto se agitó a 0 °C durante 1 h. **43.1** (400 mg, 1,09 mmol, 1 *equivalente*) en THF (5 ml) se añadió cloro(yodo)metano (1,15 g, 6,54 mmol, 474,7 μ l, 6 *equivalentes*) y se agitó a -78 °C durante 30 min. A continuación se añadió la mezcla anterior y se agitó a -78 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de 15 ml de solución de NH_4Cl a 25 °C, y se extrajo con EtOAc (15 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de Na_2SO_3 (15 ml), Solución de NaHCO_3 (15 ml) y salmuera (15 ml); después se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró para dar **43.2** (500 mg).

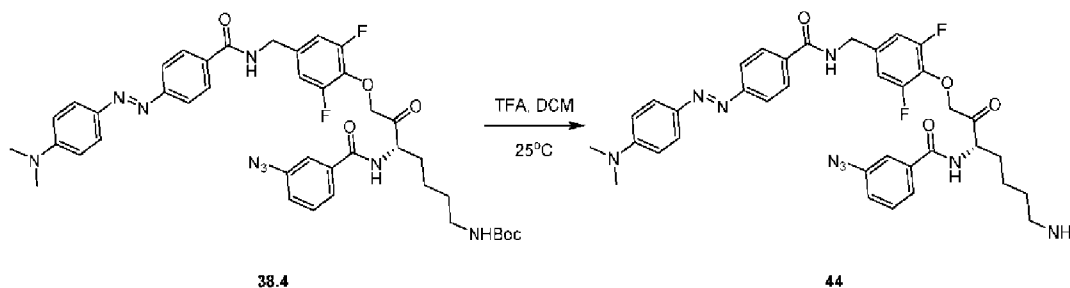


A **43.3** (500 mg, 1,30 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió DIPEA (672,05 mg, 5,2 mmol, 908,18 μ l, 4 *equivalentes*) y 2,6-difluorofenol (186,03 mg, 1,43 mmol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Waters Xbridge 150 \times 25 \times 5 μ ; fase móvil: [A: agua (TFA al 0,1 %), B: AcN]; gradiente de B: del 23 % al 63 %, durante 12 min) para dar **43.4** (40 mg, 86,30 μ mol).



43.4 (40 mg, 83,77 μ mol) en CH_2Cl_2 (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 7 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 43 (15 mg); LCMS [M + H]: 378; TR = 0,61 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,51 - 1,68 (m, 2 H), 1,72 - 1,90 (m, 3 H), 2,08 - 2,24 (m, 1 H), 2,97 (t a, J = 6,60 Hz, 2 H), 4,97 - 5,12 (m, 3 H), 6,95 - 7,06 (m, 2 H), 7,06 - 7,15 (m, 1 H), 7,71 - 7,83 (m, 1 H), 8,50 (d a, J = 7,95 Hz, 1 H), 8,82 (d a, J = 3,67 Hz, 1 H), 9,03 - 9,17 (m, 1 H).

Ejemplo 40. Preparación de (S,E)-N-(7-amino-1-(4-((4-(dimetilamino)fenil)di-azetil)benzamido)metil)-2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-azidobenzamida (44**)**



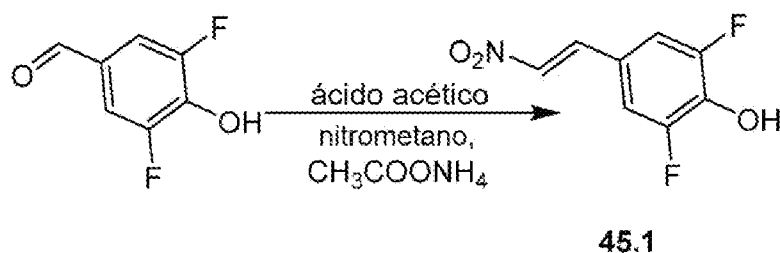
A una solución de **38.4** (100 mg, 125,34 μmol , 1 *equivalente*) en CH_2Cl_2 (5 ml) se añadió TFA (1.54 g, 13,51 mmol, 1 ml, 107,76 *equivalentes*) y se agitó a 25 °C durante 12 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (Waters Xbridge 150 \times 25x 5 μ ; fase móvil: [A: agua (TFA al 0,1 %) & B: ACN]; % de B: 31 %-61 %, 12 min) para dar el

5 Compuesto **44** (40 mg, 57,33 μmol , rendimiento del 46 %) como un sólido de color rojo; LCMS [M + H]: 698; TR = 2,764 min. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,29 - 1,46 (m, 2 H), 1,52 (dt, J = 14,28, 7,30 Hz, 2 H), 1,63 - 1,74 (m, 1 H), 1,79 - 1,91 (m, 1 H), 2,71 - 2,81 (m, 2 H), 3,07 (s, 5 H), 4,42 (d a, J = 5,73 Hz, 2 H), 4,54 - 4,67 (m, 1 H), 4,95 - 5,19 (m, 2 H), 6,84 (d a, J = 9,04 Hz, 2 H), 7,01 - 7,11 (m, 2 H), 7,30 (d a, J = 7,94 Hz, 1 H), 7,52 (t a, J = 7,83 Hz, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,63 (s a, 2 H), 7,68 (d a, J = 7,72 Hz, 1 H), 7,82 (dd, J = 8,71, 4,74 Hz, 3 H), 7,94 - 8,10 (m, 1 H), 8,85 (d a, J = 7,50 Hz, 1 H), 9,11 - 9,24 (m, 1 H).

10

Ejemplo 41. Preparación de (S,E)-N-(7-amino-1-(4-(2-(4-((4-dimetilamino)fenil)di-azetil)benzamido)etil)-2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-((3-(5,5-difluoro-7,9-dimetil-5H-5i4,6i4-dipirrolol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-il)propanamido)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (45**)**

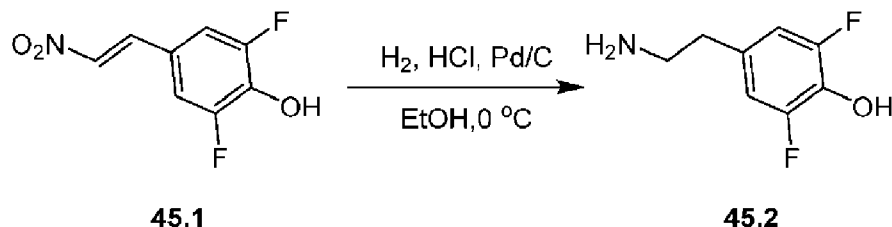
15



A una solución de 3,5-difluoro-4-hidroxibenzaldehído (5 g, 31,63 mmol, 1 *equivalente*) en ácido acético (50,00 ml) se añadió nitrometano (11,58 g, 189,78 mmol, 10,25 ml, 6,00 *equivalentes*) y $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (9,75 g, 126,52 mmol, 4,00 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 110 °C durante 1,5 hora. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=20/1 a 1:1) para dar **45.1** (4,60 g, 22,87 mmol, rendimiento del 72 %) como un sólido de color amarillo. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 7,33 - 7,40 (m, 2 H), 7,77 - 7,89 (m, 1 H), 7,90 - 8,01 (m, 1 H).

20

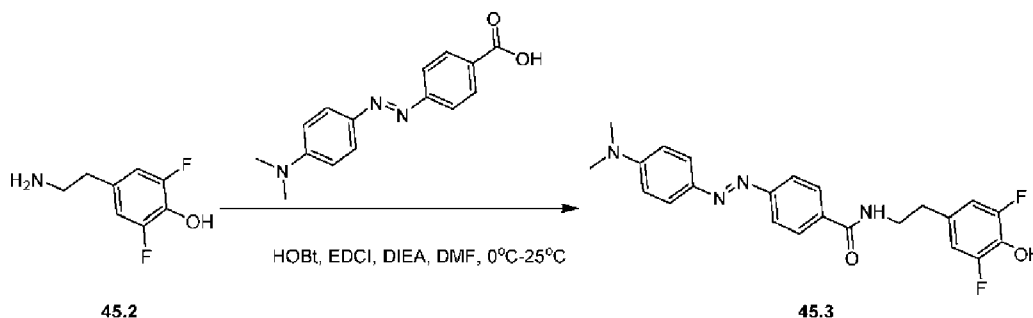
25



A una solución de **45.1** (2,10 g, 10,44 mmol, 1,00 *equivalente*) en EtOH (200,00 ml) se añadió HCl (6 M, 12,60 ml, 7,24 *equivalentes*) y Pd/C (10 g, 1,5 g) en atmósfera de Ar a 0 °C. La suspensión se desgasificó y se purgó con H_2 durante 3 veces. La mezcla se agitó en H_2 a 103 kPa (15 Psi) a 0 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar EtOH para dar **45.2** (2,00 g, bruto) como un sólido de color marrón; LCMS [M + H]: 174; RT= 0,102 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 2,88 (t, J = 7,52 Hz, 2 H) 3,08 - 3,20 (m, 2 H), 6,85 - 6,93 (m, 2 H).

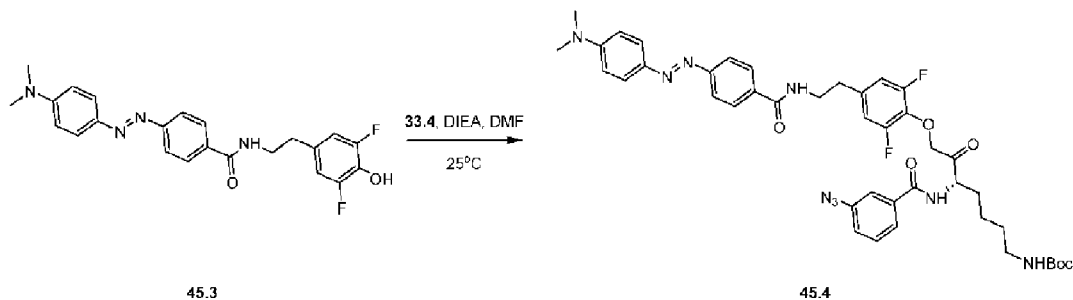
30

35

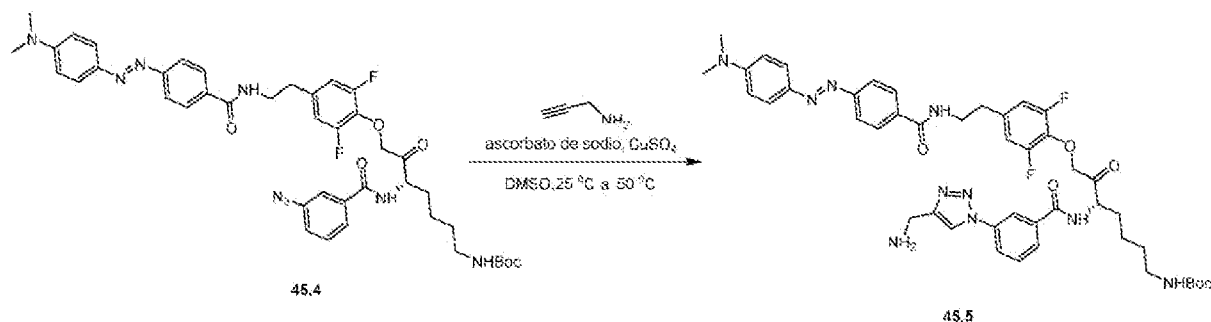


A una solución del compuesto diazo (3,11 g, 11,55 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (20,00 ml) se añadió EDCI (2,44 g, 12,71 mmol, 1,10 *equivalentes*) y HOBt (1,72 g, 12,71 mmol, 1,10 *equivalentes*) y se agitó a 0 °C durante 1 h.

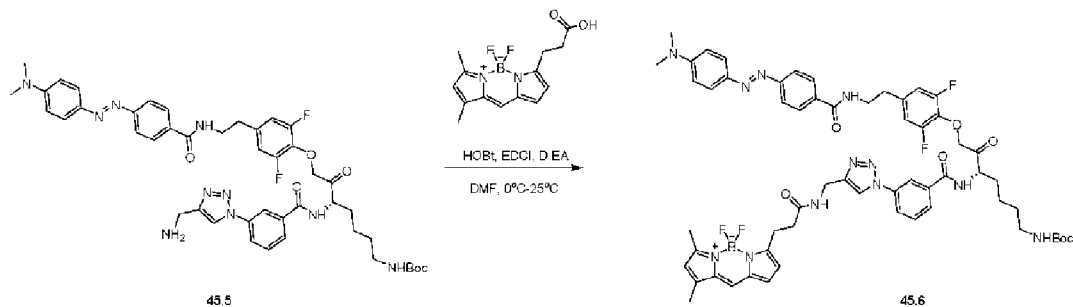
Después se añadió a la mezcla **45.2** (2,00 g, 11,55 mmol, 1,00 *equivalente*) y DIPEA (5,97 g, 46,20 mmol, 8,07 ml, 4,00 *equivalentes*) y se agitó a 25 °C durante 11 h. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=20/1 a 1:1) para dar **45.3** (600 mg, 1,41 mmol). LCMS [M + H]: 425; TR = 0,848 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3,04 - 3,09 (m, 6 H), 3,43 - 3,51 (m, 1 H), 4,37 (d a, *J* = 5,99 Hz, 1 H), 4,54 (d a, *J* = 5,75 Hz, 1 H), 6,76 - 7,02 (m, 3 H), 6,79 (s a, 1 H), 7,71 - 7,85 (m, 4 H), 7,88 - 8,01 (m, 2 H).



A una solución de **45.3** (310,00 mg, 730,37 μmol, 0,18 equivalentes) en DMF (10,00 ml) se añadió **33.4** (1,70 g, 4,01 mmol, 1,00 *equivalente*) y DIPEA (2,07 g, 16,04 mmol, 2,80 ml, 4,00 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=20/1 a 1:1) para dar **45.4** (350 mg) LCMS [M + H]: 813; TR = 1,393 min.

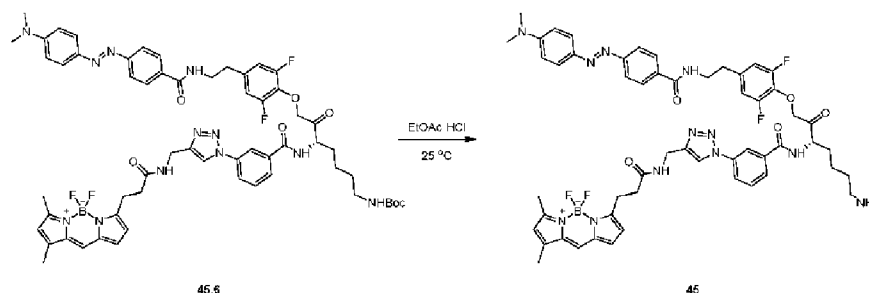


A una solución de **45.4** (200,00 mg, 246,34 μmol, 1,00 *equivalente*) en DMSO (2,00 ml) se añadió el compuesto 14A (13,57 mg, 246,34 μmol, 15,78 μl, 1,00 *equivalente*) y CuSO₄ (1,97 mg, 12,32 μmol, 1,89 μl, 0,05 *equivalente*) en H₂O (200,00 μl) y ascorbato sódico (97,61 mg, 492,68 μmol, 2,00 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=20/1 a 1:1) para dar **45.5** (130 mg).



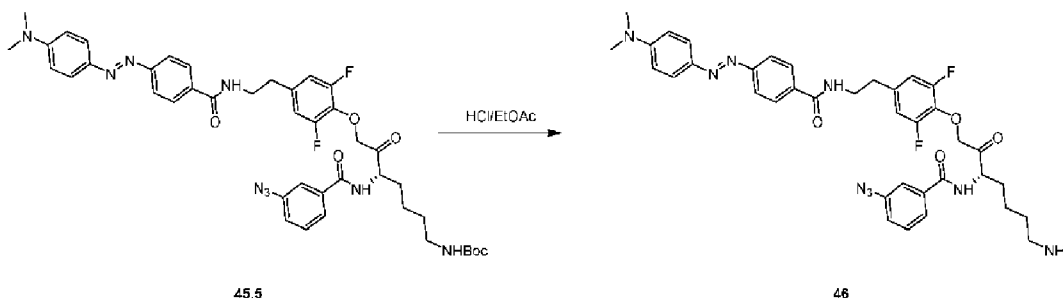
A una mezcla de colorante difluoroborato (48,18 mg, 164,95 μmol, 1,10 *equivalentes*) en DMF (2,00 ml) se añadió EDCI (31,62 mg, 164,95 μmol, 1,10 *equivalentes*) y HOBT (22,29 mg, 164,95 μmol, 1,10 *equivalentes*) a 0 °C y se agitó durante 1 h. Después se añadió a la mezcla **45.5** (130,00 mg, 149,95 μmol, 1,00 *equivalente*) y DIPEA (77,52 mg, 599,80 μmol, 104,76 μl, 4,00 *equivalentes*) y se agitó a 25 °C durante 11 h. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó

mediante cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo) para dar **45.6** (120,00 mg); LCMS [M + H]: 1142; TR = 1,461 min.



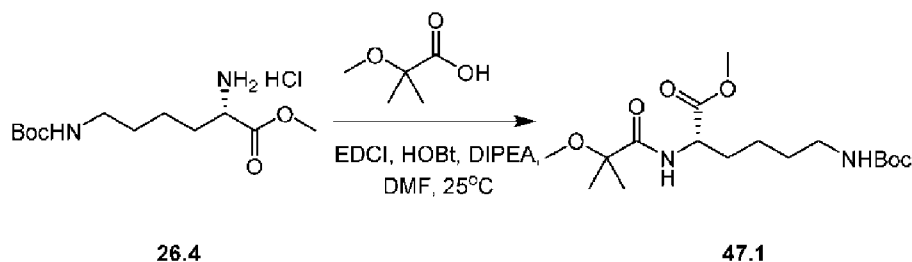
A una solución del compuesto **15** (120,00 mg, 105,17 μ mol, 1,00 *equivalente*) en HCl/EtOAc (5,00 ml) se agitó a 25 °C durante 0,1 hora. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Luna C18 100 \times 30 \times 5u; fase móvil: A: agua (TFA al 0,1 %), B: ACN; % de B: 30 %-60 %, 10min) para dar el compuesto **45** (20,00 mg, 19,21 μ mol, rendimiento del 18,27 %) como sólido de color rojo. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,33-1,51 (m, 2H), 1,56 (dt, *J* = 14,00, 7,06 Hz, 2 H), 1,73 (dd a, *J* = 9,29, 4,40 Hz, 1 H), 1,90 (d a, *J* = 6,24 Hz, 1 H), 2,25 (s, 3 H), 2,46 (s, 3 H), 2,74 - 2,87 (m, 5 H), 3,08 (s, 6 H), 3,46 - 3,55 (m, 2 H), 4,44 (d a, *J* = 5,01 Hz, 2H), 4,64 - 4,73 (m, 1 H), 5,01 - 5,18 (m, 2 H), 6,30 (s, 1 H), 6,36 (d, *J* = 4,03 Hz, 1H), 6,86 (d, *J* = 9,17 Hz, 2 H), 7,01 - 7,11 (m, 3 H), 7,62 - 7,76 (m, 4 H), 7,78 - 7,87 (m, 4H), 7,92 - 8,11 (m, 4 H), 8,40 (s, 1 H), 8,57 (t a, *J* = 5,50 Hz, 1 H), 8,61 - 8,70 (m, 2 H), 8,99 (d a, *J* = 7,34 Hz, 1 H).

Ejemplo 42. Preparación de una sonda fluorescente de actividad de gingipaina con desactivador escindible: (S,E)-N-(7-amino-1-(4-(2-(4-((4-(dimetilamino)fenil)diazenil)benzoamido)etil)-2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-azidobenzamida (46**)**



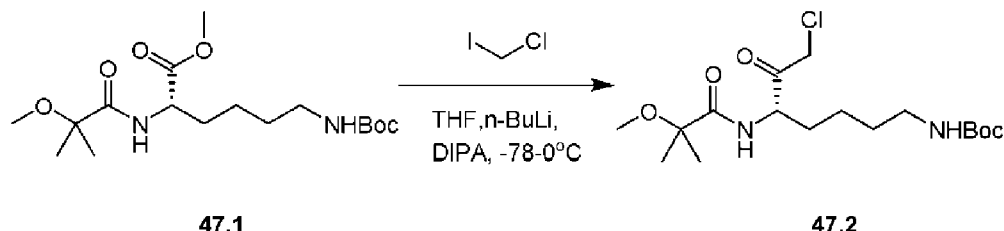
A una solución de **45.5** (150,00 mg, 188,01 μ mol, 1,00 *equivalente*) en HCl/EtOAc (5,00 ml) se agitó a 25 °C durante 0,2 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Waters Xbridge Prep OBD C18 150 \times 30 \times 5 u; fase móvil: A: agua (TFA al 0,1 %), B: ACN; % de B: 26 %-66 %, 12 min) para dar el compuesto **46** (10,00 mg, 14,33 μ mol, rendimiento del 7,62 %) como un sólido de color rojo; LCMS [M + H]: 712; TR = 2,76 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,52 - 1,60 (m, 2 H), 1,67 - 1,85 (m, 4 H), 2,09 (s a, 1 H), 2,85 - 3,00 (m, 4 H), 3,13 (s, 6 H), 3,61 (t a, *J* = 7,24 Hz, 2 H), 4,52 (s, 1 H), 4,92 - 5,04 (m, 2 H), 6,87 (d, *J* = 8,77 Hz, 2 H), 6,95 (d a, *J* = 9,21 Hz, 1 H), 7,03 (d a, *J* = 9,65 Hz, 1 H), 7,27 (d a, *J* = 7,89 Hz, 1 H), 7,47 - 7,53 (m, 1 H), 7,55 (s a, 1 H), 7,65 (d a, *J* = 7,02 Hz, 1 H), 7,80 - 7,91 (m, 5 H), 7,98 (d, *J* = 8,77 Hz, 1 H).

Ejemplo 43. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (47**)**

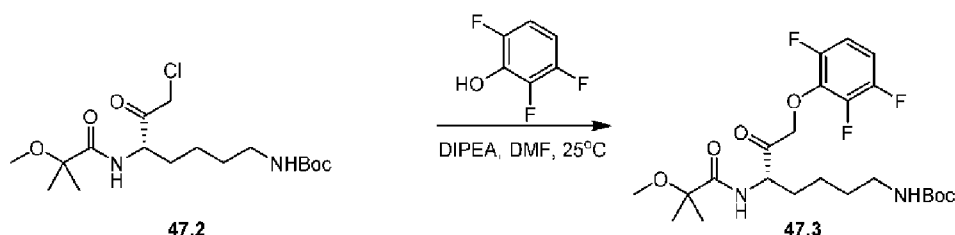


A una solución de ácido 2-metoxi-2-metil-propanoico (398,03 mg, 3,37 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (15,00 ml) se añadió HOBT (500,89 mg, 3,71 mmol, 1,10 *equivalentes*) y EDCI (710,63 mg, 3,71 mmol, 1,10 *equivalentes*), la mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. A continuación, a la mezcla se añadió DIPEA (1,74 g, 13,48 mmol, 2,35 ml, 4,00

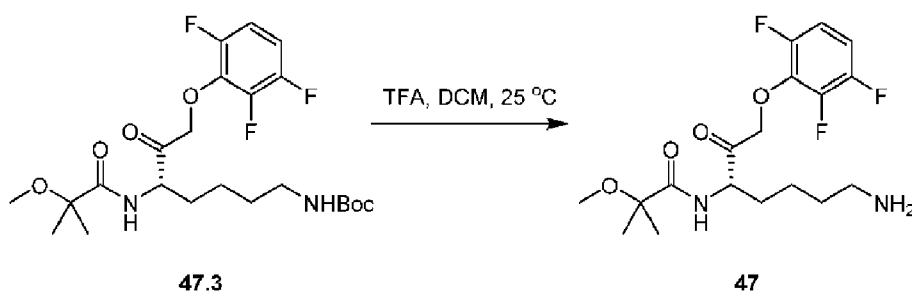
equivalentes) y **26.4** (1,00 g, 3,37 mmol, 1,00 *equivalente*, HCl). La mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 2:1) para dar **47.1** (1,00 g, 2,77 mmol, rendimiento del 82,33 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 361; TR = 0,780min. RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,20 - 1,58 (m, 17 H), 1,60 - 1,75 (m, 1 H), 1,81 - 1,94 (m, 1 H), 3,09 (d a, *J* = 6,17 Hz, 2 H), 3,29 (s, 3 H), 3,74 (s, 3 H), 4,45 - 4,73 (m, 2 H), 7,09 (d a, *J* = 8,38 Hz, 1 H).



A una solución de DIPEA (1,54 g, 15,24 mmol, 2,14 ml, 5,50 *equivalentes*) en THF (10 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 6,09 ml, 5,50 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 h en N₂. Después se añadió la mezcla a la solución del compuesto **2** (1,00 g, 2,77 mmol, 1,00 *equivalente*) y cloro(yodo)metano (2,69 g, 15,24 mmol, 1,11 ml, 5,50 *equivalentes*) en THF (10 ml) se agitó a -78 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo para dar **47.2** (1,30 g, bruto) como un aceite de color marrón.

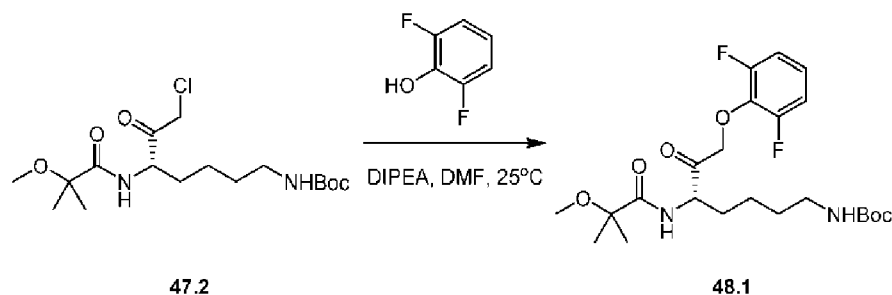


A una solución del compuesto **47.2** (650,00 mg, 1,72 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió DIPEA (666,88 mg, 5,16 mmol, 901,19 µl, 3,00 *equivalentes*) y 2, 3, 6-trifluorofenol (280,17 mg, 1,89 mmol, 1,10 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar **47.3** (50,00 mg, 128,07 µmol, rendimiento del 7,45 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 391; TR = 0,877min.

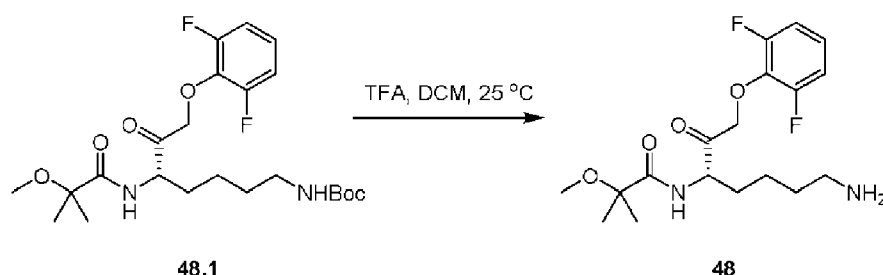


Una mezcla de **47.3** (50,00 mg, 101,93 µmol, 1,00 *equivalente*) en DCM (5,00 ml) y TFA (1,00 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el compuesto **47** (30,00 mg, 76,84 µmol, 75,39 % de rendimiento) como un aceite de color marrón; LCMS [M + H]: 391; TR = 0,681min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,26 - 1,39 (m, 6 H), 1,39 - 1,56 (m, 2 H), 1,57 - 1,84 (m, 3 H), 1,96 - 2,12 (m, 1 H), 2,82 - 3,01 (m, 2 H), 3,27 - 3,31 (m, 3 H), 4,68 (dd, *J* = 9,60, 4,34 Hz, 1 H), 4,95 - 5,15 (m, 1 H), 6,89-7,12 (m, 2H).

Ejemplo 44. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (48)

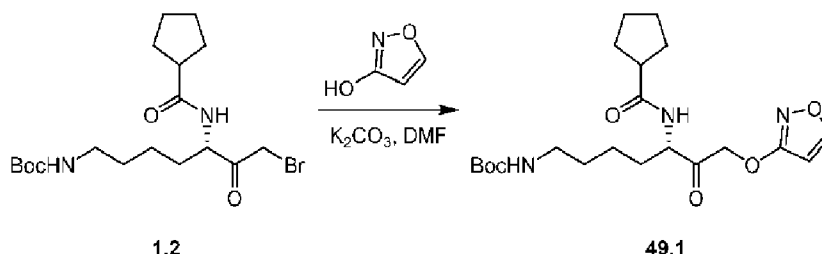


5 A una solución de **47.2** (650,00 mg, 1,72 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió DIPEA (666,88 mg, 5,16 mmol, 901,19 μ l, 3,00 *equivalentes*) y 2, 6-difluorofenol (246,13 mg, 1,89 mmol, 1,10 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 14 horas. El residuo se purificó por HPLC preparativa (condición de TFA) para dar **48.1** (50,00 mg, 134,26 μ mol, 7,81 % de rendimiento) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 473; TR = 0,864min.

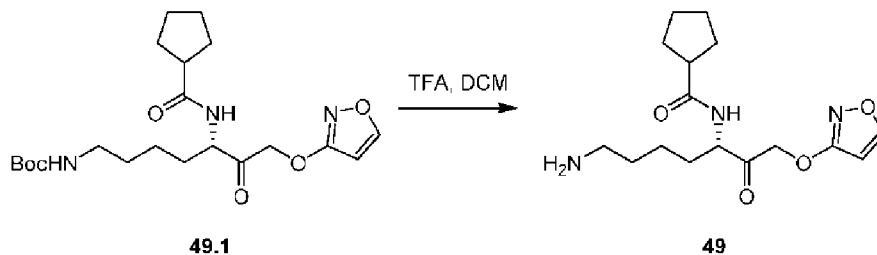


10 **48.1** (50,00 mg, 105,82 μ mol, 1,00 *equivalente*) en DCM (5,00 ml) y TFA (1,00 ml) se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 48 (30,00 mg, 80,56 μ mol, rendimiento del 76,13 %); LCMS [M + H]: 373; TR = 0,671min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,18 - 1,39 (m, 6 H), 1,41 - 1,56 (m, 2H), 1,57 - 1,82 (m, 3 H), 1,88 - 2,15 (m, 1 H), 2,78 - 3,03 (m, 2 H), 3,25 - 3,31 (m, 3 H), 4,74 (dd, J = 9,54, 4,28 Hz, 1 H), 4,90 - 5,03 (m, 2 H), 6,89 - 7,20 (m, 3 H).

15 **Ejemplo 45. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(isoxazol-3-iloxi)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (49)**



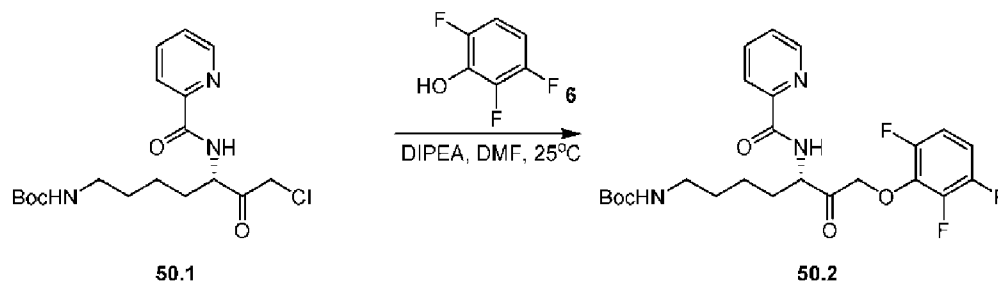
20 A una solución de **1.2** (0,3 g, 715,39 μ mol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió K_2CO_3 (296,62 mg, 2,15 mmol, 3 *equivalente*) y el isoxazol (66,94 mg, 786,92 μ mol, 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se interrumpió añadiendo H_2O (10 ml) a 25 °C y se extrajo con acetato de etilo (15 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un producto en bruto. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=2:1) para dar **49.1** (100 mg, 236,13 μ mol, rendimiento del 33,01 %) como un sólido de color amarillo; LCMS [M + H + Na]: 446; TR = 1,443min.



30 A una solución de **49.1** (0,1 g) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 14 h. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar el compuesto 49 (20 mg, 61,85 μ mol, rendimiento del 26,19 %) como un aceite de color

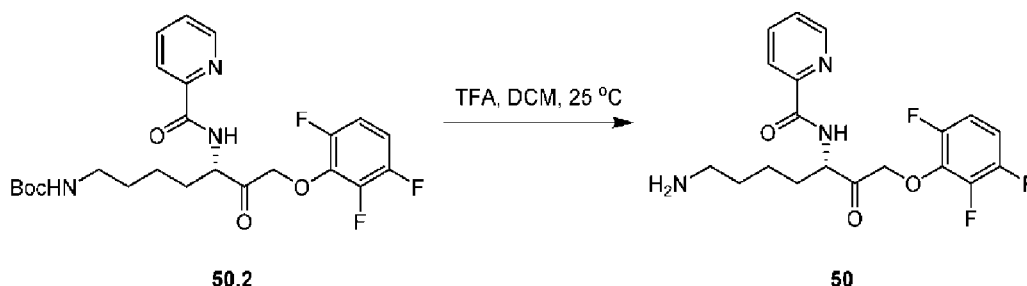
amarillo; LCMS [M + H]: 324; TR = 2,072 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,37 - 1,55 (m, 2 H), 1,57 - 1,80 (m, 10 H), 1,89, (dd a, J = 12,68, 5,62 Hz, 3 H), 2,73 (quint., J = 7,77 Hz, 1 H), 2,93 (t a, J = 6,84 Hz, 2 H), 4,52 (dd, J = 9,04, 5,07 Hz, 1 H), 4,96 - 5,17 (m, 2 H), 6,17 (d, J = 1,54 Hz, 1 H), 8,38 (d, J = 1,54 Hz, 1 H).

5 Ejemplo 46. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)picolinamida (50)



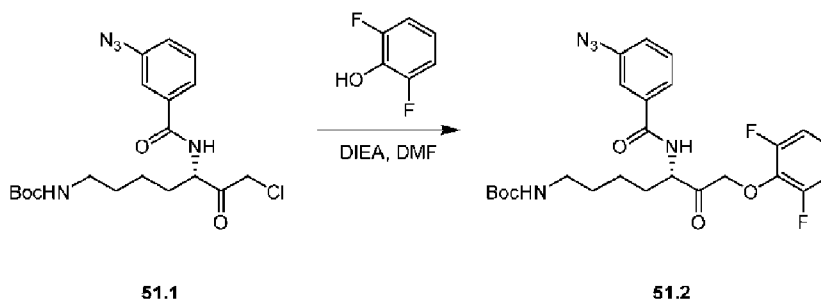
10 **50.1** se preparó de la misma manera que **34.2**, pero con el ácido piridina-2-carboxílico sustituyendo al ácido 2-bromonicotínico.

15 A **50.1** (600,00 mg, 1,56 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (5,00 ml) se añadió DIPEA (606,02 mg, 4,69 mmol, 818,94 μl , 3,00 *equivalentes*) y 2, 3, 6-trifluorofenol (231,45 mg, 1,56 mmol, 1,00 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar el compuesto **50.2** (50,00 mg, 100,91 μmol , rendimiento del 6,47 %) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 496; TR = 1,302 min.

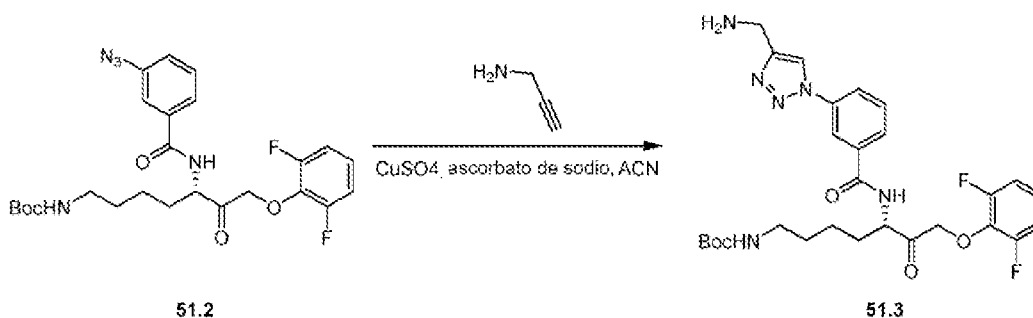


20 Esta reacción se llevó a cabo de la misma manera que la del compuesto 34. El producto obtenido se purificó mediante HPLC preparativa (condición TFA) para dar el Compuesto 50 (10 mg); LCMS [M + H]: 396; TR = 2,187 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,43 - 1,62 (m, 2 H), 1,62 - 1,93 (m, 3 H), 2,06 - 2,24 (m, 1 H), 2,93 (t a, J = 7,28 Hz, 2 H), 4,97 (dd a, J = 9,48, 4,19 Hz, 1 H), 5,03 - 5,21 (m, 2 H), 6,91 - 7,07 (m, 2 H), 7,60 (dd, J = 6,95, 5,40 Hz, 1 H), 8,00 (td, J = 7,66, 1,65 Hz, 1 H), 8,12 (d, J = 7,72 Hz, 1 H), 8,60 - 8,74 (m, 1 H).

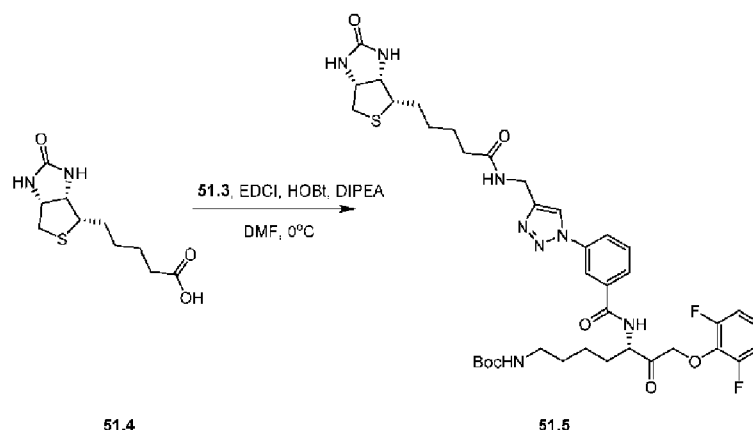
25 Ejemplo 47. Preparación de una sonda de actividad de gingipaina biotinilada: N-((S)-7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (51)



30 A **51.1** (2,00 g, 4,72 mmol, 1,00 *equivalente*) y el fenol (613,79 mg, 4,72 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió DIPEA (2,44 g, 18,87 mmol, 3,30 ml, 4,00 *equivalentes*) en una porción a 20 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 20 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=1:1) para dar **51.2** (160,00 mg, 309,17 μmol , rendimiento del 6,55 %) como un sólido de color amarillo; LCMS [M + H]: 518; TR = 0,909 min.

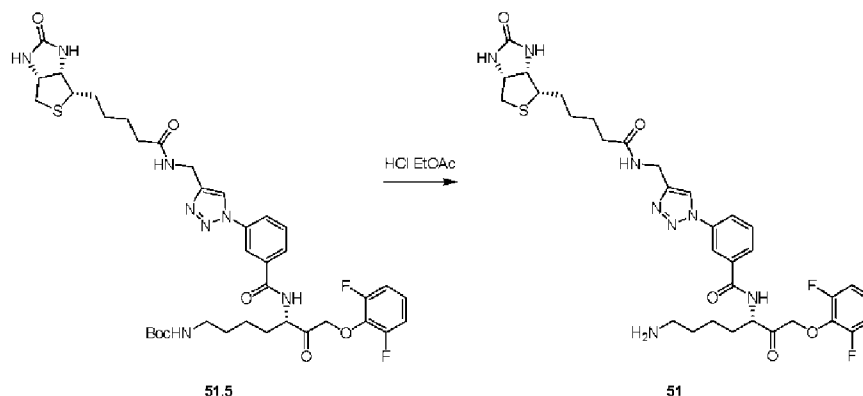


A **51.2** (140,00 mg, 270,52 μmol , 1,00 *equivalente*) y la aminopropina (14,90 mg, 270,52 μmol , 17,33 μl , 1,00 *equivalente*) en DMSO (3,00 ml) se añadió la solución de CuSO_4 (8,64 mg, 54,10 μmol , 8,31 μl , 0,20 *equivalentes*) en H_2O (100,00 μl). La mezcla se agitó a 18 °C durante 5 min. La mezcla de reacción se diluyó con 10 ml de H_2O y se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **51.3** (150,00 mg, bruto) como un sólido de color rojo.



A una mezcla del compuesto **51.4** (64,00 mg, 261,96 μmol , 1,00 *equivalente*) y HOBT (38,94 mg, 288,16 μmol , 1,10 *equivalentes*) en DMF (2,00 ml) se añadió EDCI (55,24 mg, 288,16 μmol , 1,10 *equivalentes*) en una porción a 0 °C en N_2 . La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, a continuación se añadió a la mezcla **51.3** (150,00 mg, 261,96 μmol , 1,00 *equivalente*) y

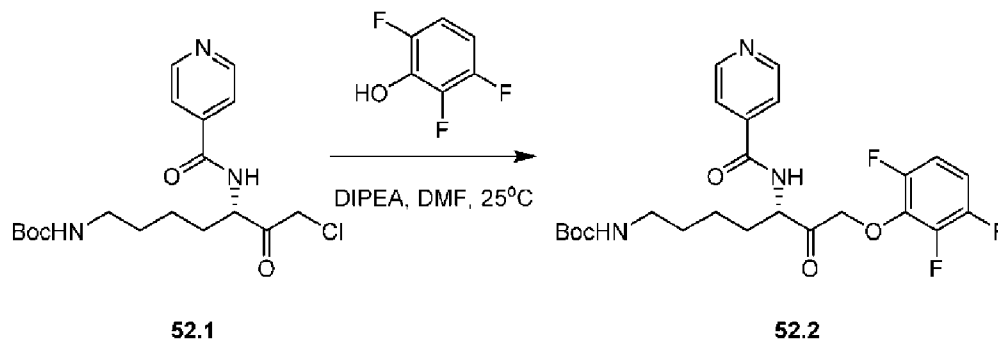
DIPEA (101,57 mg, 785,88 μmol , 137,26 μl , 3,00 *equivalentes*) en una porción a 0 °C, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con 10 ml de H_2O y se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **51.5** (200,00 mg, 250,34 μmol , rendimiento del 95,57 %) como un sólido de color amarillo; LCMS $[\text{M} + \text{H}]$: 799; TR = 1,373 min.



51.5 (200 mg) se disolvió en HCl/EtOAc (5 ml), y la mezcla se agitó a 18 °C durante 1 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición TFA)

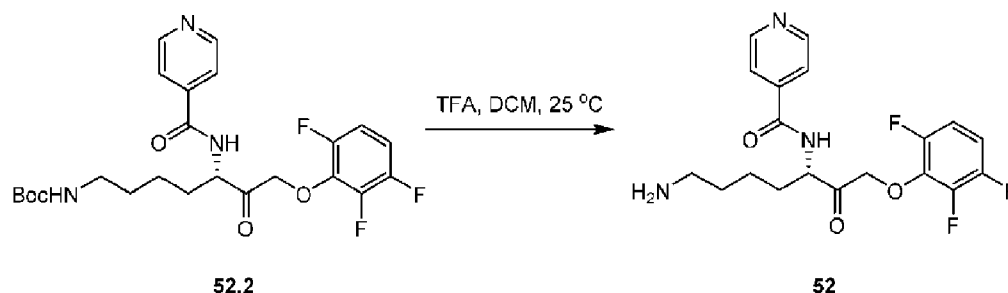
para dar el Compuesto 51 (40 mg) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 699; TR = 2,391 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,34 - 1,46 (m, 2 H), 1,48 - 1,63 (m, 3 H), 1,64 - 1,77 (m, 4 H), 1,77 - 1,91 (m, 2 H), 2,08 - 2,20 (m, 1 H), 2,27 (t, J = 7,17 Hz, 2 H), 2,62 (d, J = 12,79 Hz, 1 H), 2,80 - 2,89 (m, 1 H), 2,95 (t a, J = 6,50 Hz, 2 H), 3,11 - 3,19 (m, 1 H), 4,24 (dd, J = 7,94, 4,41 Hz, 1 H), 4,43 (dd, J = 7,50, 4,63 Hz, 1 H), 4,53 (s, 2 H), 4,98 (d a, J = 3,75 Hz, 1 H), 5,00 - 5,10 (m, 2 H), 6,96 - 7,05 (m, 2 H), 7,06 - 7,13 (m, 1 H), 7,68 - 7,74 (m, 1 H), 7,95 - 8,00 (m, 1 H), 8,02 - 8,08 (m, 1 H), 8,35 (t, J = 1,76 Hz, 1 H), 8,46 (s, 1 H).

Ejemplo 48. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2,3,6-trifluorofenoxi)heptan-3-il)isonicotinamida (52)



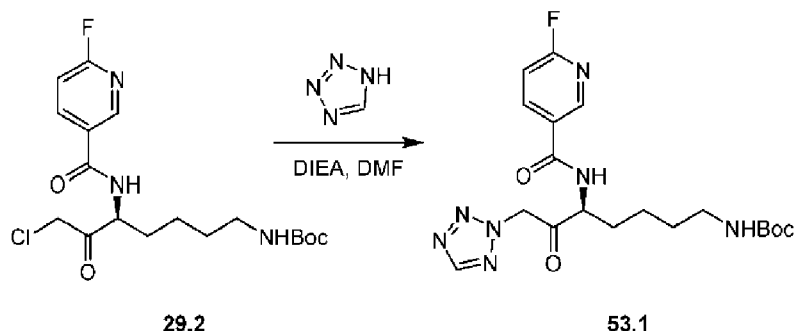
52.1 se preparó de la misma manera que **34.2**, pero con el ácido piridina-4-carboxílico sustituyendo al ácido 2-bromonicotínico.

A **52.1** (783,60 mg, 2,04 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió DIPEA (791,46 mg, 6,12 mmol, 1,07 ml, 3,00 *equivalentes*) y el trifluorofenol (302,28 mg, 2,04 mmol, 1,00 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=10/1 a 1/1) para dar el compuesto **52.2** (50,00 mg); LCMS [M + H]: 496; TR = 0,777 min.

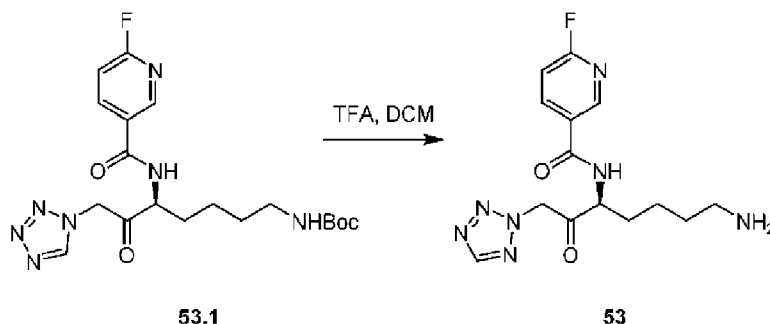


A **52.2** (10,00 mg, 20,18 μmol, 1,00 *equivalente*) en DCM (500,00 μl) se añadió TFA (154,00 mg, 1,35 mmol, 100,00 μl, 66,93 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **52** (7,50 mg, 18,97 μmol); LCMS [M + H]: 397; TR = 2,128 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,49 - 1,66 (m, 2 H), 1,67 - 1,92 (m, 3 H), 2,04 - 2,21 (m, 1 H), 2,94 (t a, J = 7,61 Hz, 2 H), 4,95 (dd, J = 9,70, 4,41 Hz, 1 H), 5,05 - 5,18 (m, 2 H), 6,88 - 7,13 (m, 2 H), 7,86 - 8,00 (m, 2 H), 8,79 (d a, J = 4,19 Hz, 2 H).

Ejemplo 49. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2H-tetrazol-2-il)heptan-3-il)-6-fluoronicotinamida (53)

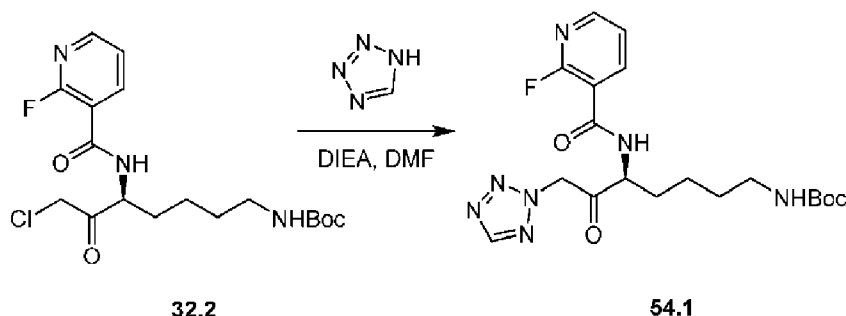


A **29.2** (1,70 g, 4,23 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió tetrazol (0,45 M, 10,34 ml, 1,10 *equivalentes*) y DIPEA (2,19 g, 16,92 mmol, 2,96 ml, 4,00 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 10 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Luna C18 100 × 30 × 5u; fase móvil: A: agua (TFA al 0,1 %) y B: ACN; % de B: 20 %-60 %, 10min) para dar **53.1** (10,00 mg).

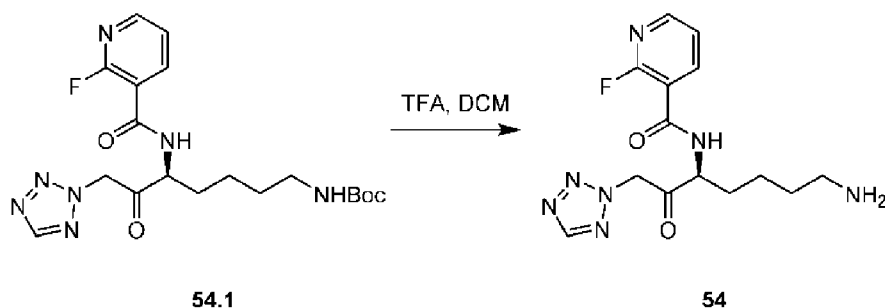


A **53.1** (10,00 mg) en DCM (2,50 ml) se añadió TFA (0,5 ml). La mezcla se agitó a 10 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **53** (2,00 mg, 5,96 μmol); LCMS [M + H]: 336; TR = 0,593 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,49 - 1,66 (m, 2 H), 1,67 - 1,80 (m, 2 H), 1,83 - 1,93 (m, 1 H), 2,06 - 2,16 (m, 1 H), 2,89 - 3,00 (m, 2 H), 4,79 (s a, 1 H), 5,87 - 6,01 (m, 2 H), 7,15 - 7,24 (m, 1 H), 8,35 - 8,46 (m, 1 H), 8,68 - 8,79 (m, 2 H).

Ejemplo 50. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(2H-tetrazol-2-yl)heptan-3-yl)-2-fluoronicotinamida (**54**)

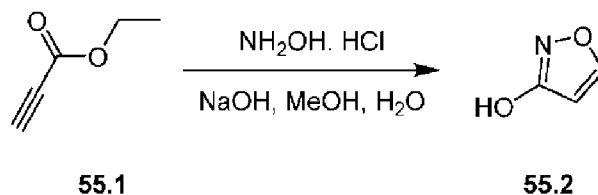


A **32.2** (1,70 g, 4,23 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (10,00 ml) se añadió tetrazol (0,45 M, 10,34 ml, 1,10 *equivalentes*) y DIPEA (2,19 g, 16,92 mmol, 2,96 ml, 4,00 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 10 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Luna C18 100 × 30 × 5 u; fase móvil: A: agua (TFA al 0,1 %) y B: ACN; % de B: 20 %-60 %, 10 min) para dar **54.1** (5,00 mg).

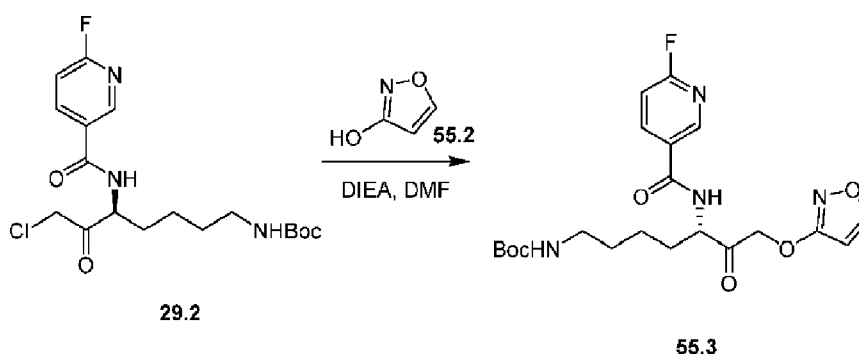


A **54.1** (5,00 mg) en DCM (2,50 ml) se añadió TFA (0,5 ml). La mezcla se agitó a 10 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **54** (2,00 mg); LCMS [M + H]: 336; TR = 3,720 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,51 - 1,66 (m, 2 H), 1,70 - 1,79 (m, 2 H), 1,81 - 1,91 (m, 1 H), 2,03 - 2,19 (m, 1 H), 2,96 (t a, J = 7,61 Hz, 2 H), 3,77 (s, 1 H), 4,84 (d a, J = 4,85 Hz, 1 H), 5,96 (d, J = 2,65 Hz, 2 H), 7,46 (ddd, J = 7,22, 5,13, 1,76 Hz, 1 H), 8,25 - 8,41 (m, 2 H), 8,68 - 8,80 (m, 1 H).

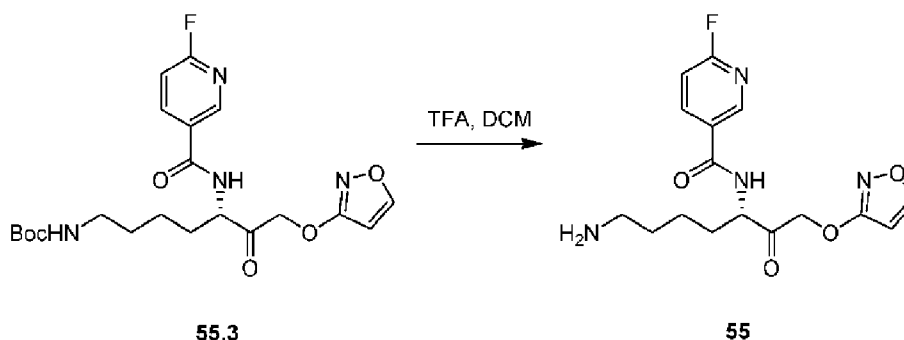
Ejemplo 51. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(isoxazol-3-ilo)2-oxoheptan-3-yl)-6-fluoronicotinamida (**55**)



Una mezcla **55.1** (10,00 g, 101,94 mmol, 1,00 *equivalente*), clorhidrato de hidroxilamina (9,21 g, 132,52 mmol, 1,30 *equivalentes*), NaOH (15,25 g, 381,26 mmol, 3,74 *equivalentes*) en H₂O (150,00 ml) y MeOH (170,00 ml) se agitó a 25 °C durante 100 horas. La mezcla se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y, a continuación, se saturó con cloruro sódico. La solución se extrajo con DCM (8 × 150 ml), se combinaron los extractos, se secaron y se evaporó el disolvente. El residuo sólido se lavó con isohexano caliente (3 × 100 ml) y la suspensión final se dejó enfriar y el sólido resultante se recogió por filtración, se secó al vacío para dar **55.2** (4,00 g, 47,03 mmol, rendimiento del 46,13 %) como un sólido de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 6,04 (d, *J* = 1,76 Hz, 1 H), 8,10 (d, *J* = 1,76 Hz, 1 H), 11,11 (s a, 1 H).

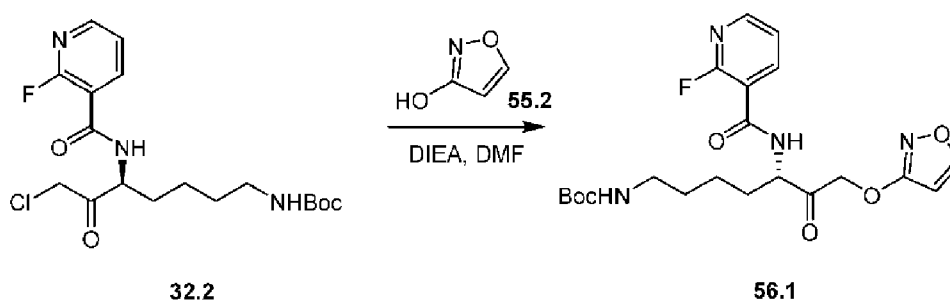


A **29.2** (200,00 mg, 497,69 μmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (3,00 ml) se añadió K₂CO₃ (206,36 mg, 1,49 mmol, 3,00 *equivalentes*) y **55.2** (55,03 mg, 647,00 μmol, 1,30 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=2:1) para dar **55.3** (0,1 g, 222,00 μmol, rendimiento del 44,61 %) como un sólido de color amarillo; LCMS [M + H]: 451; TR = 1,145 min.

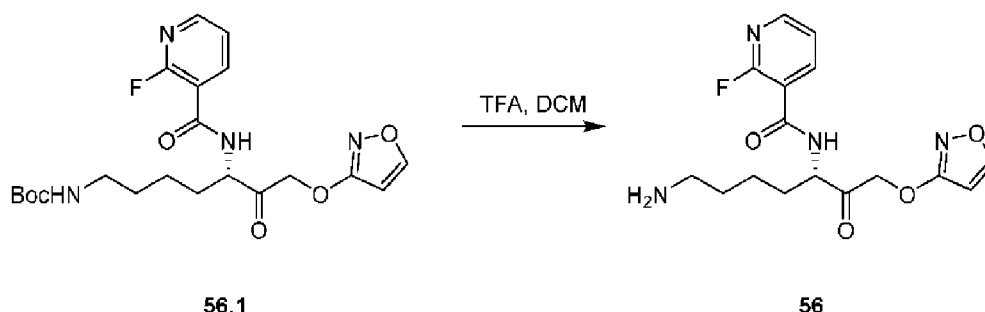


A una solución de **55.3** (0,1 g) en DCM (5 ml) se le añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición TFA) para dar el Compuesto **55** (20 mg); LCMS [M + H]: 351; TR = 0,850 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,44 - 1,66 (m, 2 H), 1,67 - 1,90 (m, 3 H), 2,00 - 2,18 (m, 1 H), 2,82 - 3,09 (m, 2 H), 4,79 (dd, *J* = 9,26, 4,85 Hz, 1 H), 5,06 - 5,22 (m, 2 H), 6,18 (d, *J* = 1,10 Hz, 1 H), 7,07 - 7,27 (m, 1 H), 8,30 - 8,47 (m, 2 H), 8,72 (d, *J* = 1,98 Hz, 1 H).

Ejemplo 52. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(isoxazol-3-iloxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-fluoronicotinamida (56)

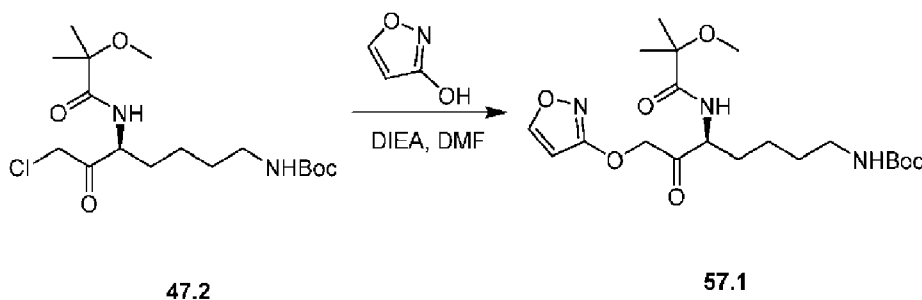


A **32.2** (1,40 g, 3,48 mmol, 1,00 *equivalente*) en DMF (15,00 ml) se añadió K_2CO_3 (1,44 g, 10,44 mmol, 3,00 *equivalentes*) e isoxazol-3-ol (**55.2**, 296,01 mg, 3,48 mmol, 1,00 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=2:1) para dar el compuesto **56.1** (300 mg); LCMS [M + H]: 453; TR = 1,379 min.

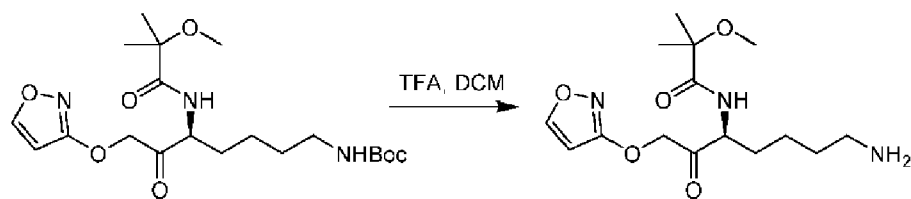


A **56.1** (0,3 g) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición TFA) para dar el Compuesto 56 (20 mg); LCMS [M + H]: 351; TR = 0,730 min. RMN 1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,45 - 1,64 (m, 2 H), 1,65 - 1,89 (m, 3 H), 1,96 - 2,18 (m, 1 H), 2,95 (t a, J = 7,50 Hz, 2 H), 4,81 (dd a, J = 9,15, 4,74 Hz, 1 H), 5,16 (s, 2 H), 6,19 (s, 1 H), 7,46 (t a, J = 6,06 Hz, 1 H), 8,14 - 8,50 (m, 3 H).

Ejemplo 53. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(isoxazol-3-iloxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (**57**)



A una solución de **47.2** (893 mg, 2,36 mmol, 1 *equivalente*) e isoxazol-3-ol (200,48 mg, 2,36 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (8 ml) se añadió DIPEA (913,83 mg, 7,07 mmol, 1,23 ml, 3 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 h. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo=10/1 a 1/1) para dar el compuesto **57.1** (130 mg); LCMS [M + H]: 428; TR = 0,649 min.

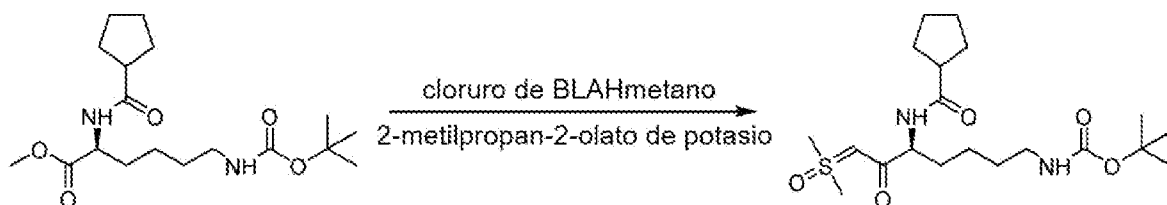


57.1

57

A un compuesto **57.1** (50 mg) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición TFA) para dar el Compuesto **57** (10 mg); LCMS [M + H]: 328; TR = 2,430 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ 1,38 (s, 7 H), 1,45 (d a, *J*=6,84 Hz, 2 H), 1,58 - 1,80 (m, 4 H), 2,01 (s a, 1 H), 2,92 (d a, *J*=7,28 Hz, 2 H), 3,31 - 3,33 (m, 3 H), 4,53 - 4,62 (m, 1 H), 4,99 - 5,14 (m, 2 H), 6,17 (s, 1 H), 8,38 (s, 1 H).

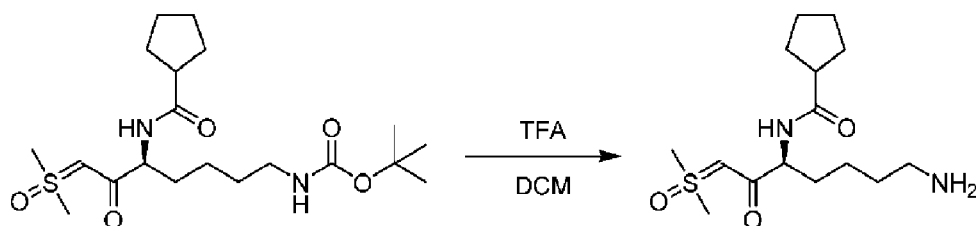
Ejemplo 54. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(dimetil(oxo)-λ6-sulfanilideno)-2-oxoheptan-3-il)ciclopentanocarboxamida (58)



58.1

58.2

2-metilpropan-2-olato de potasio (1 M, 5,87 ml, 2,99 equivalente) se añadió gota a gota en una suspensión de tolueno (17 ml) de cloruro de BLAHmetano (896,67 mg, 6,97 mmol, 3,55 equivalente) a 25 °C. La mezcla se calentó a 70 °C durante 4 horas y después se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota a 0 °C una suspensión de THF (15 ml) de **58.1** (0,7 g, 1,96 mmol, 1 equivalente), y la solución resultante se agitó durante 16 horas a 0 °C. La solución se lavó con MTBE tres veces. La torta de filtración se concentró a presión reducida para dar **58.2** (630 mg, 1,51 mmol, rendimiento del 38,51 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 417; TR = 0,910 min.

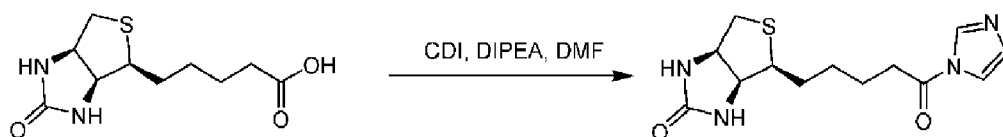


58.2

58

A una solución **58.2** (50 mg) en DCM (2 ml) se añadió TFA (0,4 ml) en una porción a 18 °C en N₂. La mezcla se agitó a 18 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **58** (50 mg) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 317; TR = 1,782 min. RMN ¹H (400 MHz, ACETONITRILLO-*d*₃) δ ppm 1,39 - 1,51 (m, 2 H), 1,56 (d a, *J*=6,60 Hz, 2 H), 1,67 (d a, *J*= 4,77 Hz, 6 H), 1,75 - 1,89 (m, 4 H), 2,70 (dt, *J* = 15,68, 7,75 Hz, 1 H), 2,94 (s a, 2 H), 3,63 (s, 8 H), 4,17 - 4,26 (m, 1 H).

Ejemplo 55. Preparación de N-((S)-7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-(15-oxo-19-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)-2,5,8,11-tetraoxa-14-azanonadecil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (59)

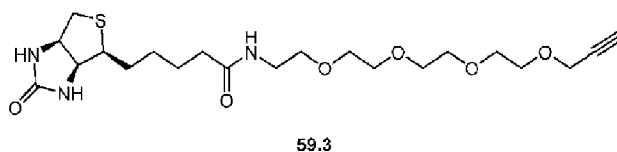
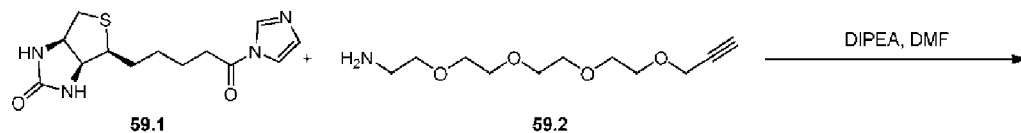


Biotin

59.1

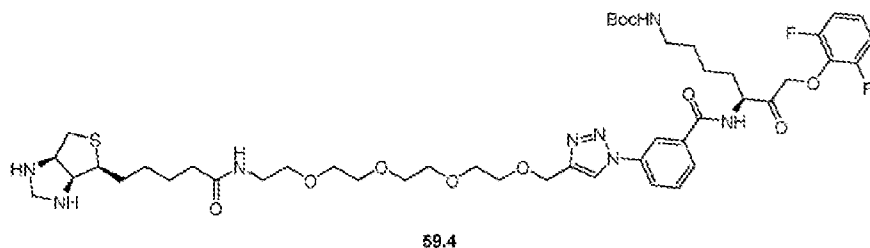
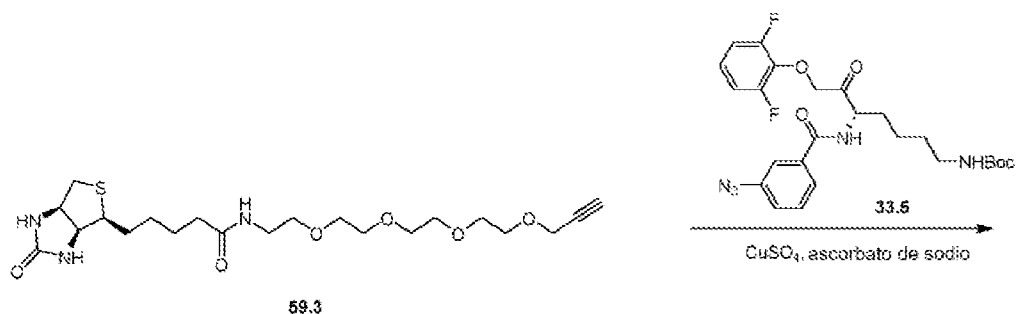
Una mezcla Biotina (159,29 mg, 982,36 μmol , 1,2 *equivalentes*) en DMF (2 ml) se agitó a 25 °C durante 12 horas. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida para dar **59.1** (200 mg, bruto) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 295; TR = 0,298 min.

5



Una mezcla de **59.1** (127,28 mg, 432,36 μmol , 1 *equivalente*), **59.2** (100 mg, 432,36 μmol , 1 *equivalente*), DIPEA (167,64 mg, 1,30 mmol, 225,93 μl , 3 *equivalente*) en DMF (3 ml) se agitó a 25 °C durante 12 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar **59.3** (100 mg, 218,54 μmol , rendimiento del 50,55 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 458; TR = 1,052 min.

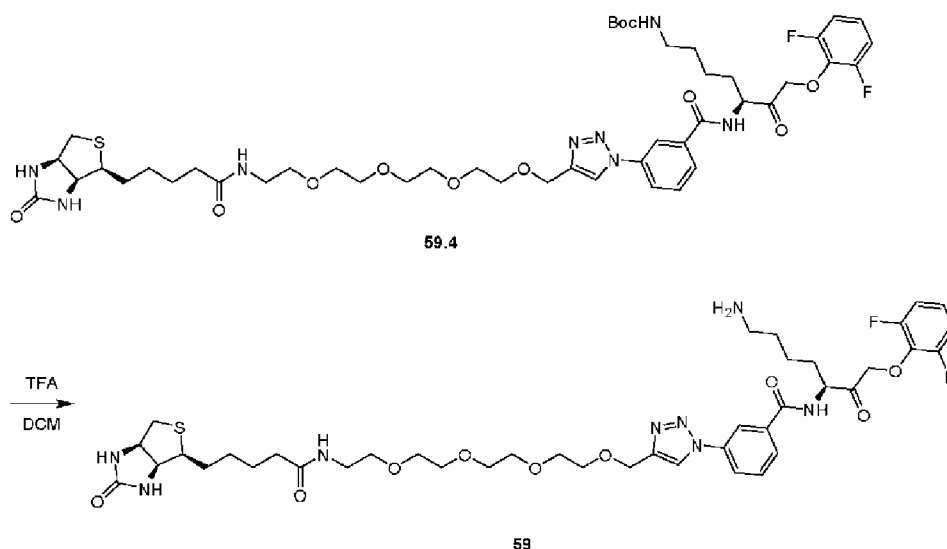
10



A una solución de **59.3** (80 mg, 174,83 μmol , 1 *equivalente*) en DMSO (2 ml) y H₂O (0,2 ml) se añadió **33.5** (90,48 mg, 174,83 μmol , 1 *equivalente*) y CuSO₄ (5,58 mg, 34,97 μmol , 5,37 μl , 0,2 *equivalentes*) y ascorbato sódico (69,27 mg, 349,66 μmol , 2 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se interrumpió mediante la adición de 10 ml de H₂O a 25 °C y se extrajo con acetato de etilo (10 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmueras saturadas (5ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un producto en bruto. El residuo se purificó mediante CCF preparatoria (SiO₂, DCM: MeOH = 10:1) para dar **59.4** (90 mg, 92,30 μmol , rendimiento del 52,79 %) se obtuvo como aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 951; TR = 1,160 min.

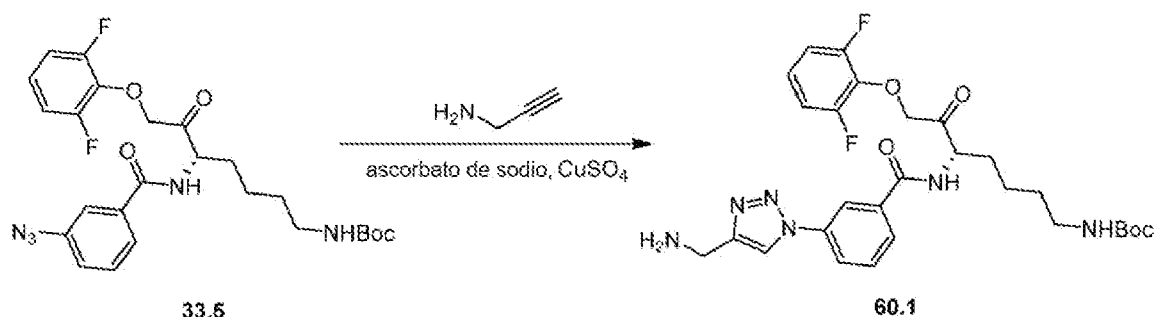
15

20

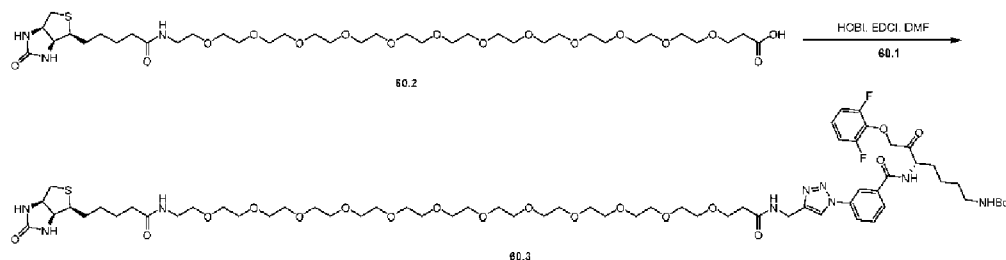


59.4 (90 mg, 92,30 μmol) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó a 25 °C durante 12 horas en atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar el compuesto **59** (20 mg, 22,86 μmol) como sólido de color blanco; LCMS $[\text{M} + \text{H}]$: 875; TR = 0,870 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,25 - 1,46 (m, 2 H), 1,47 - 1,95 (m, 9 H), 2,02 - 2,29 (m, 3 H), 2,68 (d, $J = 12,57$ Hz, 1 H), 2,82 - 3,04 (m, 3 H), 3,07 - 3,22 (m, 1 H), 3,31 - 3,35 (m, 2 H), 3,43 - 3,54 (m, 2 H), 3,54 - 3,66 (m, 8 H), 3,67 - 3,78 (m, 4 H), 4,18 - 4,35 (m, 1 H), 4,47 (dd, $J = 7,72, 4,85$ Hz, 1 H), 4,75 (s, 2 H), 4,92 - 5,17 (m, 3 H), 6,88 - 7,18 (m, 2 H), 7,72 (t, $J = 7,94$ Hz, 1 H), 7,89 - 8,13 (m, 2 H), 8,30 - 8,43 (m, 1 H), 8,62 (s, 1 H).

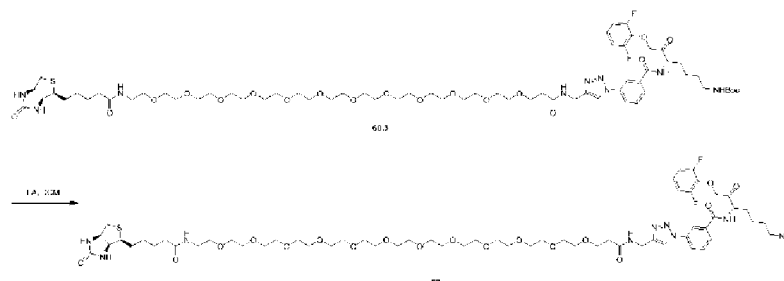
Ejemplo 56. Preparación de N-((S)-7-amino-1-(2,6-difluorofenoxi)-2-oxoheptan-3-il)-3-(4-(3,43-dioxo-47-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-il)-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-dodecaoxa-2,42-diazaheptatetracontil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzamida (60**)**



A una solución de prop-2-in-1-amina (21,29 mg, 386,46 μmol , 24,75 μl , 1 *equivalente*) y **33.5** (200 mg, 386,46 μmol , 1 *equivalente*) en DMSO (2 ml) se añadió CuSO_4 (362,30 μg , 2,27 μmol , 3,48 μl , 0,2 *equivalentes*) en H_2O (0,1 ml) y ascorbato de sodio (153,12 mg, 772,91 μmol , 2 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 min. La mezcla de reacción se interrumpió mediante la adición de 10 ml de H_2O a 25 °C y se extrajo con acetato de etilo (10 ml \times 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmueras saturadas (5ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un producto en bruto. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , DCM: MeOH = 0:1) para dar **60.1** (140 mg, 244,50 μmol , rendimiento del 63,27 %) como un sólido de color amarillo; LCMS $[\text{M} + \text{H}]$: 573; TR = 0,991 min.

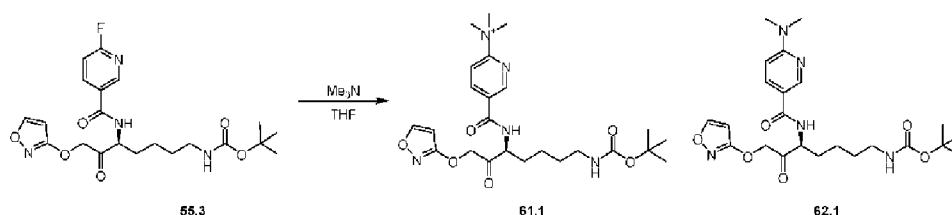


- 5 A una solución de **60.2** (200 mg, 236,96 μmol , 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió HOBt (35,22 mg, 260,66 μmol , 1,1 *equivalentes*) y EDCI (49,97 mg, 260,66 μmol , 1,1 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. A continuación, a la mezcla se añadió **60.1** (135,69 mg, 236,96 μmol , 1 *equivalente*) y DIPEA (122,50 mg, 947,85 μmol , 165,10 μl , 4 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 11 horas. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar **60.3** (55 mg, 39,32 μmol , rendimiento del 16,60 %) como un sólido de color amarillo; LCMS [M + H]: 700; TR = 1,225 min.

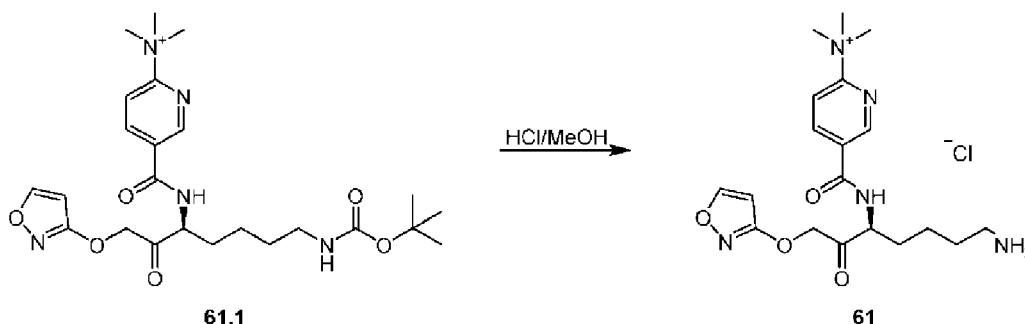


- 10 Una mezcla de **60.3** (50 mg, 35,75 μmol) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml), la mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. La mezcla se concentró al vacío para dar un producto en bruto. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de TFA) para dar el compuesto **60** (15 mg, 11,55 μmol) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H]: 1299; TR = 1,06 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,32 - 1,93 (m, 12 H), 2,06 - 2,27 (m, 3 H), 2,52 (t, J = 5,95 Hz, 2 H), 2,70 (d, J = 12,79 Hz, 1 H), 2,86 - 3,05 (m, 3 H), 3,14 - 3,24 (m, 1 H), 3,32 - 3,38 (m, 2 H), 3,45 - 3,68 (m, 49 H), 3,77 (t, J = 5,84 Hz, 2 H), 4,30 (dd, J = 7,83, 4,52 Hz, 1 H), 4,49 (dd, J = 7,72, 4,63 Hz, 1 H), 4,56 (s, 2 H), 4,96 - 5,13 (m, 2 H), 6,94 - 7,14 (m, 3 H), 7,64 - 7,77 (m, 1 H), 7,91 - 8,10 (m, 2 H), 8,28 - 8,39 (m, 1 H), 8,44 - 8,52 (m, 1 H).

- 20 **Ejemplo 57. Preparación de cloruro de (S)-5-((7-amino-1-(isoxazol-3-iloxi)-2-oxoheptano-3-il)carbamoil)-N,N,N-trimetilpiridin-2-aminio (61)**

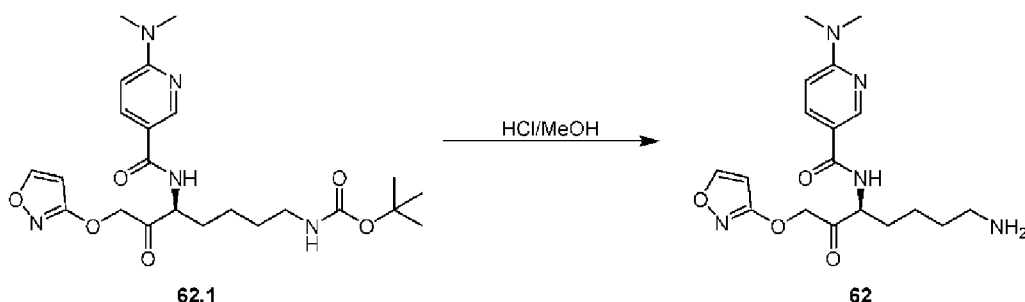


- 25 Una solución de N,N-dimetilmetanamina (2 M, 4,44 ml, 20 *equivalentes*) en THF (0,5 ml) se añadió **55.3** (0,2 g, 443,99 μmol , 1 *equivalente*) en una porción a 18 °C. La mezcla se agitó a 18 °C durante 10 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (condición de HCl) para dar **61.1** (20 mg, 40,77 μmol , rendimiento del 9,18 %) y **62.1** (20 mg, 42,06 μmol , rendimiento del 9,47 %) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H] para $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_6^+$; TR = 1,136min.



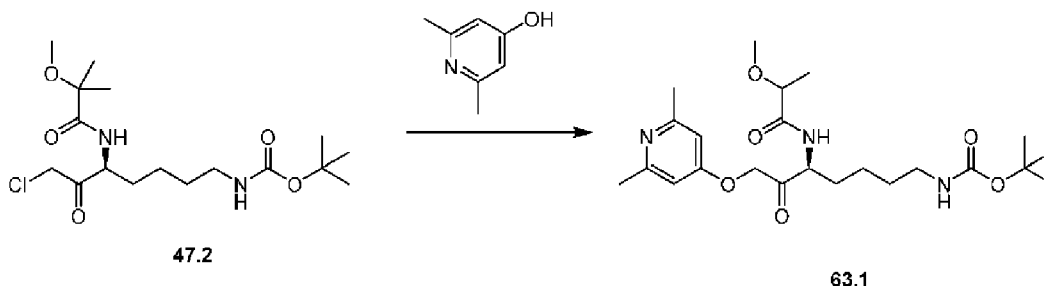
- 30 **61.1** (20 mg) se disolvió en HCl/MeOH (2 ml), y la mezcla se agitó a 25 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **61** (15 mg) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H] para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 391; TR = 0,149 min. RMN ^1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,47 - 1,66 (m, 2 H), 1,68 - 1,82 (m, 2 H), 1,84 - 1,97 (m, 1 H), 2,01 - 2,16 (m, 1 H), 2,97 (t a, J = 7,45 Hz, 2 H), 3,67 - 3,74 (m, 9 H), 4,81 (dd, J = 9,43, 4,60 Hz, 1 H), 5,15 - 5,21 (m, 2 H), 6,17 - 6,23 (m, 1 H), 8,10 - 8,19 (m, 1H), 8,39 (d, J = 1,75 Hz, 1 H), 8,64 (dd, J = 8,77, 2,19 Hz, 1 H), 9,11 (d, J = 1,75 Hz, 1 H).

- 40 **Ejemplo 58. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-(isoxazol-3-iloxi)-2-oxoheptan-3-il)-6-(dimetilamino)nicotinamida (62)**

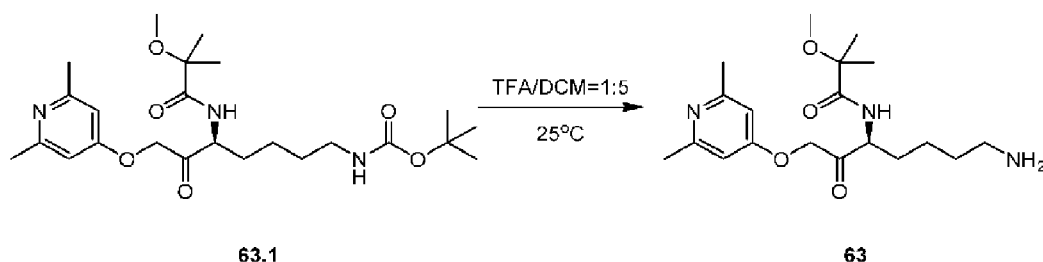


62.1 (20 mg) se disolvió en HCl/MeOH (2 ml), y la mezcla se agitó a 25 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **62** (15 mg) como un aceite de color amarillo; LCMS [M + H] para C₁₈H₂₆N₅O₄: 376; TR = 2,077min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,46 - 1,67 (m, 2 H), 1,75 (d, *J*=7,02 Hz, 2 H), 1,87 (dtd, *J*=14,25, 9,65, 9,65, 4,60 Hz, 1 H), 2,00 - 2,11 (m, 1 H), 2,97 (t, *J* = 7,45 Hz, 2 H), 3,34 - 3,41 (m, 6 H), 4,74 (dd, *J* = 9,21, 4,82 Hz, 1 H), 5,16 (d, *J* = 1,75 Hz, 2 H), 6,19 (d, *J* = 1,75 Hz, 1 H), 7,33 (d, *J* = 9,65 Hz, 1 H), 8,39 (d, *J* = 1,75 Hz, 1 H), 8,43 (dd, *J* = 9,65, 1,75 Hz, 1 H), 8,52 (d, *J* = 1,75 Hz, 1 H).

Ejemplo 59. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((2,6-dimetilpiridin-4-il)oxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (63)

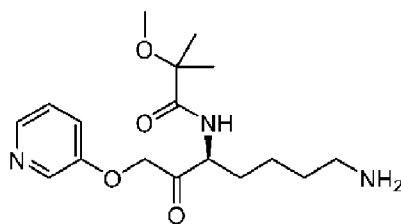


A **47.2** (423 mg, 1,12 mmol, 1 equivalente) y 2,6-dimetil-4-hidroxipiridina (137,49 mg, 1,12 mmol, 1 equivalente) en DMF (9 ml) se añadieron K₂CO₃ (462,89 mg, 3,35 mmol, 3 equivalente) y KI (185,33 mg, 1,12 mmol, 1 equivalente) en una porción a 25 °C en N₂. A continuación, la mezcla se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (20 ml) y después se diluyó con EtOAc (20 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 ml × 3), se secaron, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=3:1) para dar **63.1** (85 mg, 182,57 μmol) como un sólido de color blanco; LCMS [M + H]: 466; TR = 1,155min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,38 (d, *J*=5,51 Hz, 8 H), 1,43 (s, 11 H), 1,50 (dt, *J*=13,67, 6,84 Hz, 3 H), 1,64 - 1,77 (m, 2 H), 1,88 - 1,99 (m, 2 H), 2,41 - 2,46 (m, 6 H), 2,99 - 3,09 (m, 3 H), 3,31 - 3,32 (m, 3 H), 4,55 - 4,62 (m, 2 H), 4.92 - 5.04 (m, 3 H), 6.66 (s, 2 H).



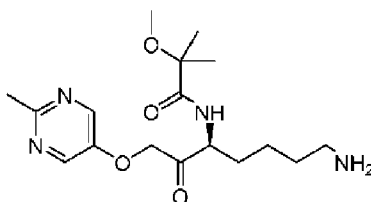
63.1 (85 mg) en DCM (5 ml) y TFA (1 ml) se agitó durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=2:1) para dar el compuesto **63** (50 mg); LCMS [M + H]: 366; TR = 1,517 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,25 - 1,40 (m, 6 H), 1,46 - 1,59 (m, 2 H), 1,67 - 1,80 (m, 3 H), 1,94 - 2,05 (m, 1 H), 2,61 - 2,66 (m, 6 H), 2,93 (t, *J*=7,58 Hz, 2 H), 3,30 - 3,32 (m, 3 H), 4,47 (dd, *J*=9,66, 4,40 Hz, 1 H), 5,22 - 5,40 (m, 2 H), 7,13 - 7,22 (m, 2 H).

Ejemplo 60. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(piridin-3-iloxi)heptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (64)

**64**

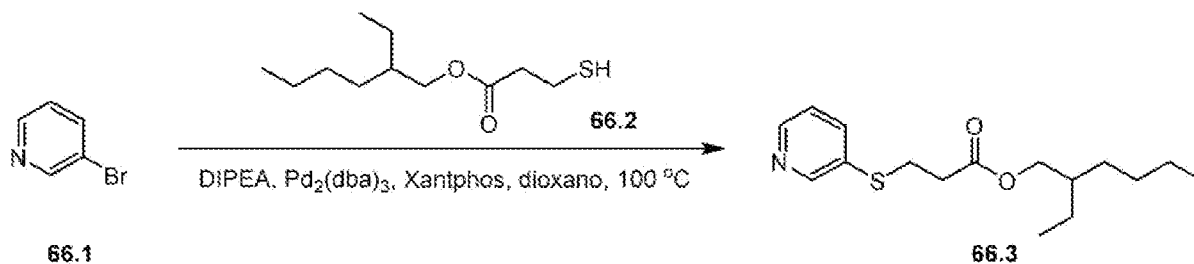
El compuesto **64** se preparó por los mismos métodos usados para el compuesto 63 con 3-hidrozipiridina usada en lugar de 2,6-dimetil-4-hidroxipiridina; LCMS [M + H]: 338; TR = 4,585 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,21 - 1,40 (m, 6 H), 1,42 - 1,58 (m, 2 H), 1,64 - 1,80 (m, 3 H), 1,95 - 2,05 (m, 1 H), 2,93 (t a, *J*=7,64 Hz, 2 H), 3,30 - 3,32 (m, 3 H), 4,51 (dd, *J*=9,66, 4,40 Hz, 1 H), 5,14 - 5,29 (m, 2 H), 7,86 (dd, *J*=8,80, 5,38 Hz, 1 H), 7,98 - 8,03 (m, 1 H), 8,41 (d a, *J*=5,14 Hz, 1 H), 8,51 (d a, *J*= 2,08 Hz, 1 H).

Ejemplo 61. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((2-metilpirimidin-5-il)oxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (65)

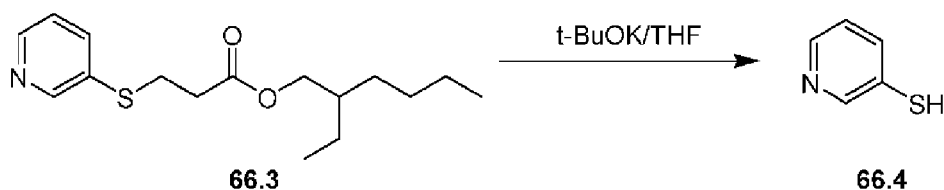
**65**

El compuesto **65** se preparó por los mismos métodos usados para el compuesto 63 con 5-hidroxipirimidina usada en lugar de 2,6-dimetil-4-hidroxipiridina; LCMS [M + H]: 353; TR = 1,98 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,24 (br s, 1 H), 1,31 (s, 7 H), 1,34 (s a, 1 H), 1,45 - 1,58 (m, 2 H), 1,65 (dtd, *J*=14,00, 9,48, 9,48, 4,71 Hz, 1 H), 1,78 - 1,89 (m, 1 H), 2,55 (s, 3 H), 2,72 - 2,85 (m, 2 H), 3,20 (s, 3 H), 4,19 - 4,61 (m, 1 H), 5,18 (s a, 2 H), 7,68 (s a, 2 H), 8,21 (d, *J*= 7,70 Hz, 1 H), 8,36 (s, 2 H).

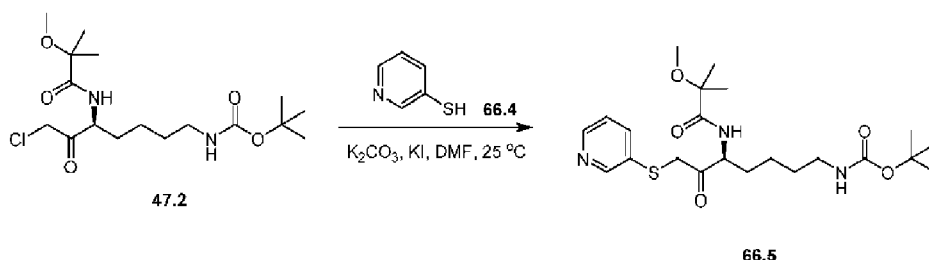
Ejemplo 62. Preparación de (S)-N-(7-amino-2-oxo-1-(piridin-3-iltio)heptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (66)



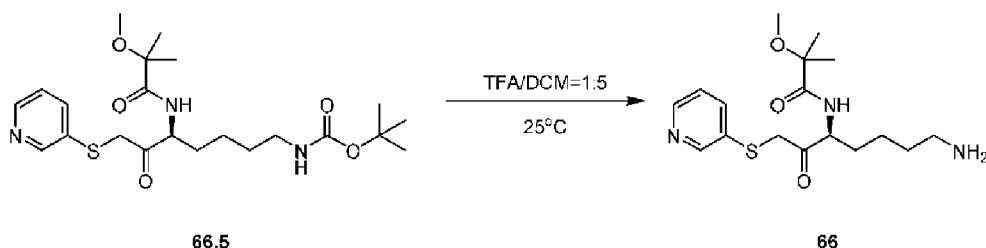
A **66.1** (2 g, 12,66 mmol, 1,22 ml, 1 *equivalente*) en dioxano (20 ml) se añadió **66.2** (2,90 g, 13,29 mmol, 1,05 *equivalentes*), DIPEA (3,27 g, 25,32 mmol, 4,41 ml, 2 *equivalentes*) y Xantphos (732,45 mg, 1,27 mmol, 0,1 *equivalentes*), Pd₂(dba)₃ (579,58 mg, 632,93 μmol, 0,05 equivalentes). La mezcla se agitó a 100 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se interrumpió mediante adición de H₂O (20 ml), y se extrajo con EtOAc (20 ml × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante MPLC (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 a 1:1) para dar **66.3** (3,6 g, 12,19 mmol, rendimiento del 96,26 %) como un aceite amarillo.



A **66.3** (800 mg, 2,71 mmol, 1 *equivalente*) en THF (10 ml) se añadió t-BuOK/THF (1 M, 4,06 ml, 1,5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a -78 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, dando un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, EtOAc/MeOH=10/1 a 1:1) para dar **66.4** (80 mg) como un aceite de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 8,53 (d, *J* = 1,75 Hz, 1 H), 8,31 (dd, *J* = 4,82, 1,32 Hz, 1 H), 7,83 - 7,91 (m, 1 H), 7,30 (dd, *J*=7,45, 4,82 Hz, 1 H), 3,58 (s a, 8 H) 3,38 - 3,73 (m, 1 H).

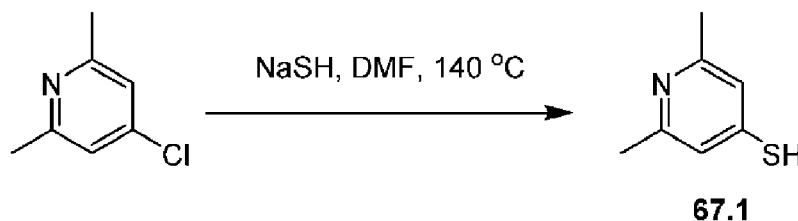


A **47.2** (500 mg, 1,32 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (5 ml) se añadió **66.4** (80 mg, 719,65 μmol, 5,45 *equivalentes*), K₂CO₃ (547,15 mg, 3,96 mmol, 3 *equivalentes*) y KI (219,06 mg, 1,32 mmol, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se filtró, y el compuesto deseado estaba en el filtrado. El filtrado se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Phenomenex Luna C18 200 × 40mm × 10 μm; fase móvil: A: agua (TFA al 0,1 %)- B: ACN; % de B: 15 %-35 %, 8 min) para dar **66.5** (40 mg, 88,18 μmol).

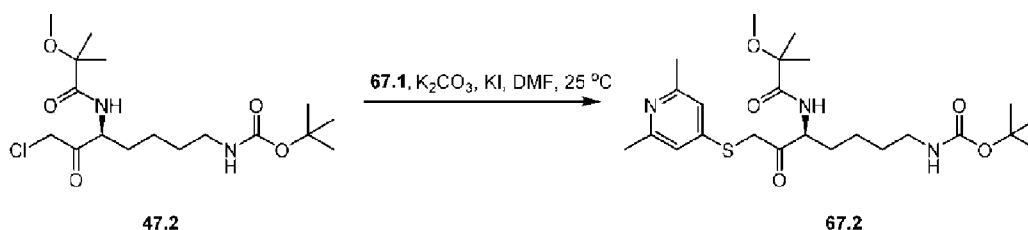


A **66.5** en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo para dar el Compuesto 66 (12 mg); LCMS [M + H]: 354; TR= 1,83 min. RMN ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 8,62 (s a, 1 H), 8,49 (s a, 1 H), 8,14 (d, *J*=8,33 Hz, 1 H), 7,62 (dd, *J*=8,33, 4,82 Hz, 1 H), 4,60 (dd, *J*=9,43, 4,17 Hz, 1 H), 4,10 - 4,21 (m, 1 H), 3,29 (s a, 3 H), 2,90 (t a, *J* = 7,45 Hz, 2 H), 1,97 (d a, *J*=10,09 Hz, 1 H), 1,62 - 1,74 (m, 3 H), 1,42 (d a, *J* = 4,39 Hz, 1 H), 1,36 (d, *J* = 4,38 Hz, 8 H), 1,27 - 1,33 (m, 1 H).

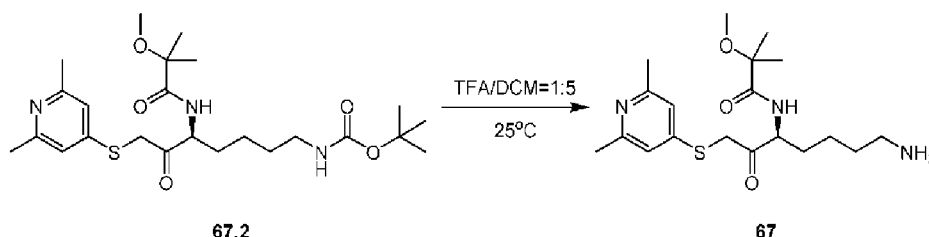
Ejemplo 63. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((2,6-dimetilpiridin-4-il)tio)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (67)



A 2,6-dimetil-4-cloropiridina (2 g, 14,12 mmol, 1 *equivalente*) en DMF (20 ml) se añadió NaSH (1,98 g, 35,31 mmol, 2,5 *equivalentes*). La mezcla se agitó a 140 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante MPLC (diclorometano: Metanol SiO₂, =10/1 a 1:1) para dar **67.1** (2,7 g) como un sólido de color amarillo.

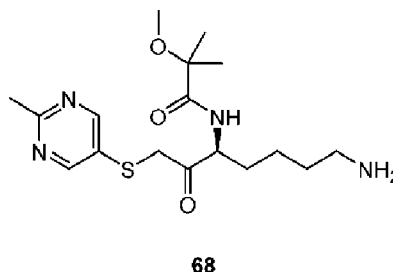


A **67.1** (367,44 mg, 2,64 mmol, 1 equivalente) en DMF (7 ml) se añadió **47.2** (1 g, 2,64 mmol, 1 equivalente), K_2CO_3 (1,09 g, 7,92 mmol, 3 *equivalentes*) y KI (438,12 mg, 2,64 mmol, 1 *equivalente*). La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró, y el compuesto deseado estaba en el filtrado. El filtrado se purificó mediante HPLC preparatoria (columna: Phenomenex Luna (2) C18, 250 × 50 × 10 μ ; fase móvil A: agua (TFA al 0,1 %) y B: ACN; gradiente B%: 10 %-40 % durante 20 min) para dar **67.2** (353 mg).



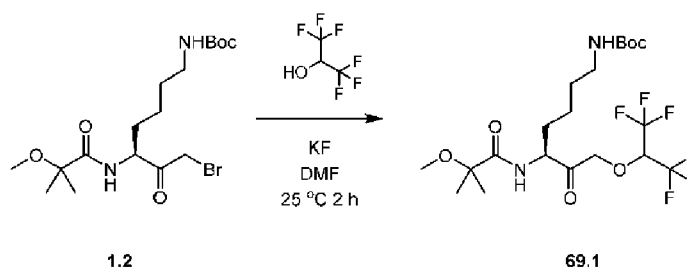
A **67.2** (353 mg) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 67 (350 mg); LCMS [M + H]: 382; TR=1,799 min. RMN 1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 7,40 - 7,52 (m, 2 H), 4,32 - 4,57 (m, 3 H), 3,32 (s a, 3 H), 2,94 (t a, J = 7,64 Hz, 2 H), 2,63 (s, 6 H), 1,95 - 2,08 (m, 1 H), 1,65 - 1,83 (m, 3 H), 1,43 - 1,57 (m, 2 H), 1,39 (d, J =5,62 Hz, 6 H).

Ejemplo 64. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((2-metilpirimidin-5-il)tio)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (68)



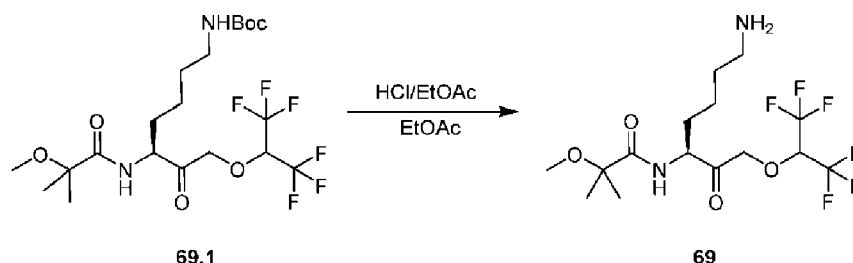
El compuesto **68** se preparó mediante los mismos métodos usados para el compuesto 66 con 2-metil-5-bromopirimidina usada en lugar de 3-bromopiridina; LCMS [M + H]: 369; TR = 2,0 min. RMN 1H (400 MHz, METANOL- d_4) δ 1,36 (s, 8 H), 1,38 - 1,48 (m, 2 H), 1,60 - 1,74 (m, 3 H), 1,90 - 2,01 (m, 1 H), 2,65 (s a, 3 H), 2,90 (t a, J = 6,80 Hz, 2 H), 3,29 (s, 3 H), 3,91 - 4,10 (m, 2 H), 4,62 (dd, J = 9,43, 4,60 Hz, 1 H), 8,68 (s, 2 H).

Ejemplo 65. Preparación de (S)-N-(7-amino-1-((1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-il)oxi)-2-oxoheptan-3-il)-2-metoxi-2-metilpropanamida (69)



Una suspensión del compuesto **1.2** (1,0 g, 2,36 mmol, 1,0 *equivalente*), 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (595 mg, 3,54 mmol, 1,5 *equivalentes*), KF (411 g, 7,09 mmol, 3,0 *equivalentes*) en DMF (7 ml) se desgasificó y se purgó con N_2 3 veces, y a continuación la mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h en atmósfera de N_2 . La LCMS indicó que el compuesto **1.2** se consumió por completo. La reacción se interrumpió con agua (21 ml) lentamente y después se

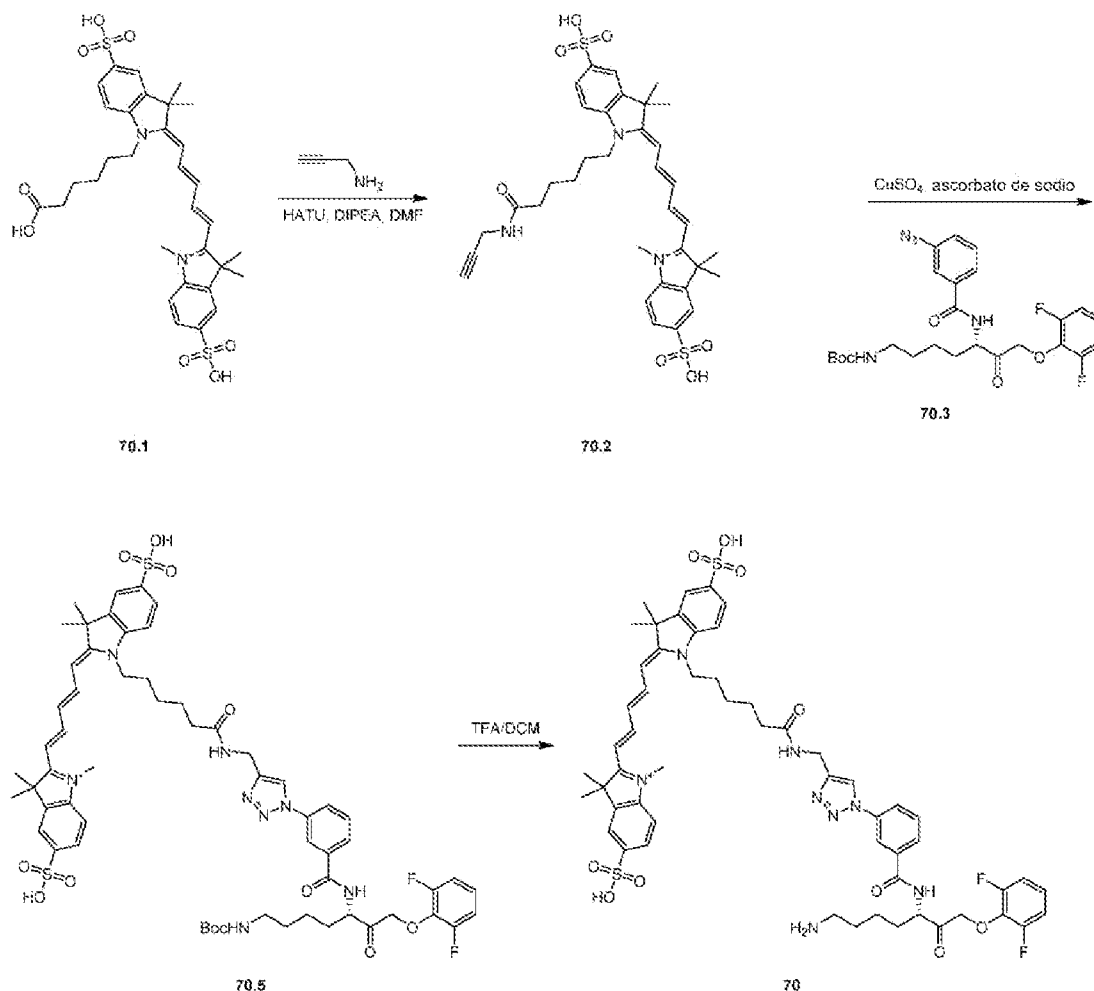
extrajo con EtOAc (20 ml \times 2). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (10 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo: Acetato de etilo = 15:1 a 3:1) para dar **69.1** (0,90 g, 1,67 mmol, rendimiento del 70 %) como una goma incolora. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,05 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,73 (s ancho, 1H), 5,42-5,50 (m, 1H), 4,65 (dd, $J = 1,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 2H), 4,26-4,32 (m, 1H), 3,15 (s, 3 H), 2,80-2,91 (m, 2H), 1,67-1,75 (m, 1H), 1,52-1,58 (m, 1H), 1,33 (s, 11H), 1,25 (s, 6H) ppm.



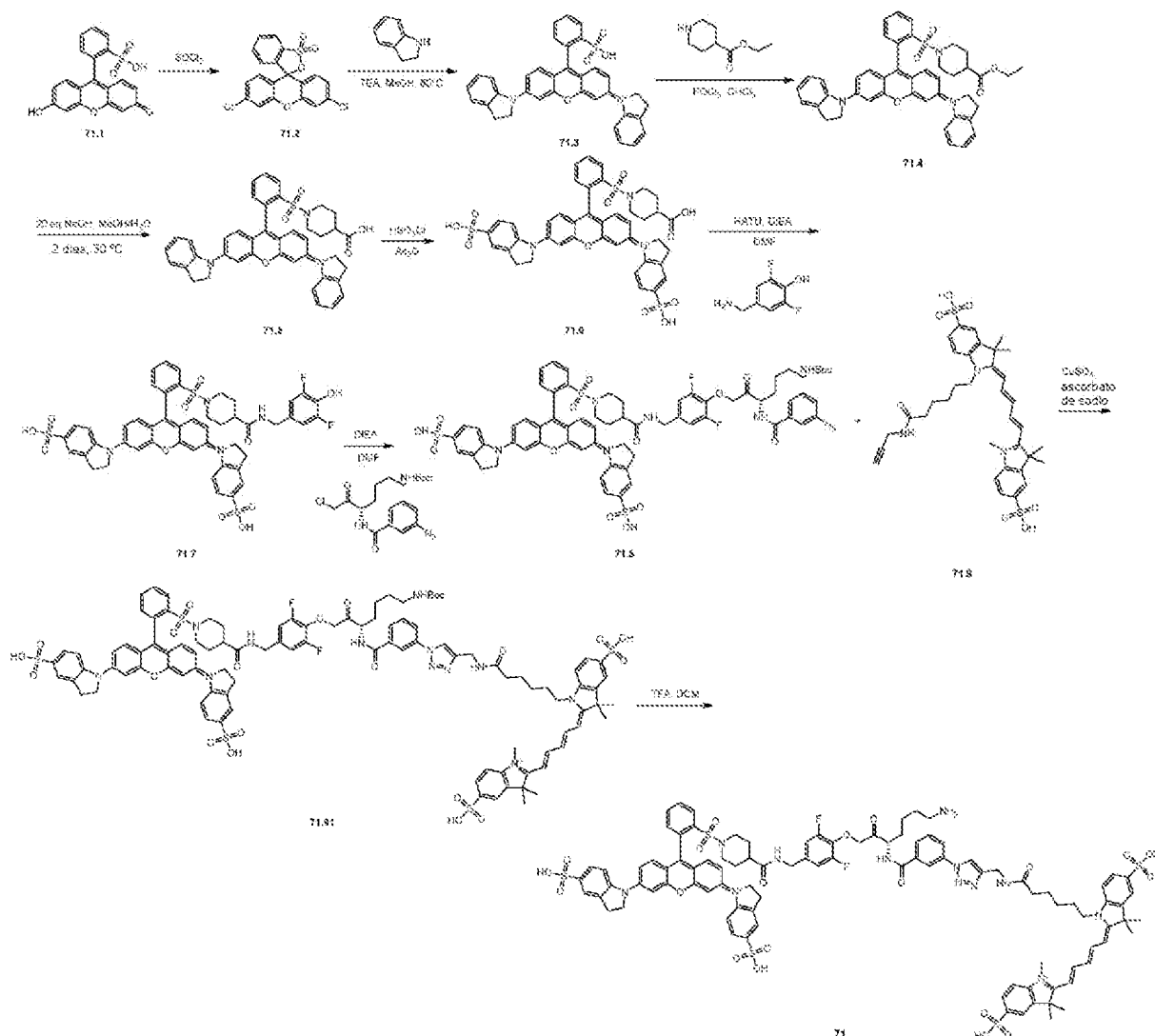
- 10 A una solución del compuesto **3** (0,90 g, 1,76 mmol, 1,0 *equivalente*) en EtOAc (10 ml) se añadió HCl/EtOAc (4 M, 10 ml, 22 *equivalentes*) a 0 °C. La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La LCMS indicó que el compuesto **69.1** se consumió por completo. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. Se secó por liofilización para obtener el compuesto **69** (0,78 g, rendimiento total: 63,7 %, sal HCl) como goma de color amarillo.
- 15 RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,09 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,91 (s a, 3H), 5,47-5,54 (m, 1H), 4,61-4,79 (m, 2H), 3,15 (s, 3 H), 2,64-2,72 (m, 2H), 1,58-1,74 (m, 1H), 1,52-1,58 (m, 3H), 1,33-1,34 (m, 2H), 1,33 (s, 6H) ppm.

Ejemplo 66. Preparación de las sondas **70** y **71** de cianina para la actividad de la gingipaina

Se preparó el compuesto **70** de sonda de acuerdo con el esquema siguiente.



Se preparó el compuesto **71** de sonda de acuerdo con el esquema siguiente.



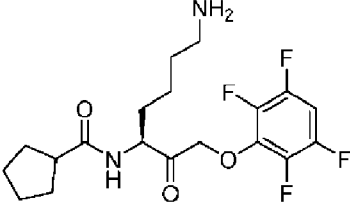
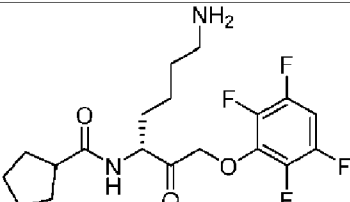
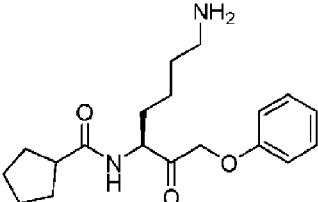
5 Ejemplo 67. Inhibición de la lisina qingipaína

Las capacidades del compuesto de la presente invención y de los compuestos de referencia seleccionados para inhibir la actividad de la lisina gingipaína se midieron en un ensayo fluorogénico similar a los descritos por Barret (Biochemical Journal. 1980, 187(3), 909). Las condiciones del ensayo específicas fueron las siguientes. Tampón: pH = 7,5, Tris-HCl 100 mM, NaCl 75 mM, CaCl₂ 2,5 mM, cisteína 10 mM, DMSO al 1 % después de todas las adiciones. Proteína: Kgp 0,1 mM, aislada de un cultivo de *Porphyromonas gingivalis*, según lo descrito por Pike *et al.* (J. Biol. Chem. 1994, 269(1), 406), y Potempa y Nguyen (Current Protocols in Protein Science. 2007, 21.20.1-21.20.27). Sustrato fluorogénico: Z-His-Glu-Lys-MCA 10 µM. Tiempo = 90 Minutos. Temperatura = 37 °C. Cada compuesto: 10 concentraciones, a partir de 100 µM o 100 nM, con concentraciones más bajas generadas por diluciones seriadas triplicadas. Probando un intervalo de concentraciones para cada compuesto, se determinó la concentración necesaria para inhibir la actividad de la lisina gingipaína en un 50 % (la "Cl₅₀"). En las condiciones de ensayo descritas, la relación señal/ruído era excelente y el factor Z era superior a 0,6. Se probaron los compuestos de la Tabla 1, así como los compuestos que figuran en la Tabla 2 a continuación.

Las capacidades del compuesto de la presente invención y compuestos de referencia seleccionados para inhibir la actividad de las catepsinas B, H, K, L y S se midieron en ensayos similares. Para el ensayo de la catepsina B se utilizó Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (20 µM) en tampón de acetato sódico (50 mM, pH 5,5) que contenía DTT (1 mM) y EDTA (2 mM). Para el ensayo de la catepsina H se utilizó L-Arg-AMC (20 µM) en tampón de acetato sódico (50 mM, pH 5,5) que contenía DTT (1 mM) y EDTA (2 mM). Para el ensayo de la catepsina K se utilizó Z-Phe-Arg-AMC (10 µM) en tampón de HEPES (50 mM, pH 7,4) que contenía DTT (2,5 mM) y EDTA (1 mM). Para el ensayo de la catepsina L se utilizó Z-Phe-Arg-AMC (20 µM) en tampón de acetato sódico (50 mM, pH 5,5) que contenía DTT (1 mM) y EDTA (2 mM). Para el ensayo de la catepsina S se utilizó Z-Leu-Arg-AMC (10 µM) en tampón de acetato sódico (25 mM, pH

4,5) que contenía DTT (2,5 mM) y NaCl (50 mM). Se midieron también las capacidades de los compuestos para inhibir la actividad de las catepsinas F, V y Z. Se probaron los compuestos de la Tabla 1, así como los compuestos de referencia que figuran en la Tabla 2.

5 **Tabla 2. Inhibidores de la lisina gingipaína comparativos (los compuestos de referencia están marcados con un "*").**

Compuesto N.º	Estructura del compuesto
73*	
74*	
75*	

10 Los valores de CI_{50} para la inhibición de Kgp y catepsinas por el compuesto de la invención y una selección de compuestos de referencia se exponen en la Tabla 3. Los resultados muestran que el compuesto de la invención y los compuestos de referencia, como el compuesto de referencia 73, son comparables con respecto a la actividad de inhibición de Kgp, con valores de CI_{50} de Kgp subnanomolares. Sorprendentemente, el compuesto de la invención exhibe una selectividad superior para Kgp.

15 La disminución de la actividad de inhibición de la catepsina del compuesto de la invención es ventajosa porque las catepsinas son proteasas lisosomales implicadas en una serie de procesos fisiológicos importantes, incluyendo la presentación de antígenos mediada por MHC-II, remodelación ósea, diferenciación de queratinocitos y activación prohormonal. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede utilizarse para inhibir selectivamente Kgp en un sujeto, como consecuencia de la invasión por *P. gingivalis*, sin perturbar la actividad endógena de la catepsina en el sujeto.

20 **Tabla 3. Inhibición de lisina gingipaína y Catepsinas por el compuesto de la invención y compuestos de referencia seleccionados (Los compuestos de referencia están marcados con un "*").**

Compuesto N.º	CI_{50} (nM)					
	Kgp	CatB	CatS	CatK	CatL	CatH
1a - no racémico	$\leq 0,05$	380	29.470	170	4680	560
1a - racémico	$\leq 0,05$					
2a*	$\leq 0,05$	$> 10^4$	$> 10^5$	2290	$> 10^5$	1550
2a*	0,11					
3a*	0,64	52181	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	
4a*	0,07	2645	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	
5a*	0,15	21517	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	
6a*	0,19	20337	42763	$> 10^5$	$> 10^5$	
7a*	1,3	49578	24054	20239	5526	

(continuación)

Compuesto N.º	CI ₅₀ (nM)					
	Kgp	CatB	CatS	CatK	CatL	CatH
8a*	0,34	68264	> 10 ⁵	> 10 ⁵	> 10 ⁵	
9a*	0,08					
10a*	0,12					
11a*	3,39					
12a*	0,08					
13a*	2,56					
14a*	6,42					
15a*	3,89					
16a*	>100					
17a*	>100					
18a*	0,50					
19a*	>100					
20a*	>100					
73*	≤0,05	485	9980	20	700	110
74*	≤0,05					
75*	2,29					

Ejemplo 68. Efectos neuroprotectores del compuesto de la invención

- 5 Se inocularon células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en trece pases y se cultivaron en medio completo, DMEM/F12 (Invitrogen 11330-032) suplementado con 2 mM de L-glutamina (Invitrogen 25030164), suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Invitrogen-10099141), y penicilina-estreptomicina al 1 % (Pen/Strep; Invitrogen-15140122) en una incubadora de CO₂ al 5 % (Thermal Fisher 371). Las células se sembraron a una densidad de 2-4 × 10⁴ células/pocillo (200 µl de 1-2 × 10⁵ células/ml) en placas de 96 pocillos de fondo negro/plano (Greiner-655090) recubiertas manualmente con colágeno de tipo I. Las placas se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37 °C.

15 Cuando el cultivo celular en los pocillos alcanzó una confluencia del 70-80 % (~ 6×10⁴ células/pocillo), se expuso a *P. gingivalis* en presencia de compuestos de prueba a varias concentraciones, o en ausencia de compuestos de prueba. Las soluciones madre de los compuestos se prepararon mediante dilución en serie con DMSO en una placa estéril de 96 pocillos con fondo en V (2,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 y 0 mg/ml). A continuación, las soluciones madre (6 µl) se transfirieron a una placa de 96 pocillos llenos con 594 µl de medio completo-Pen/Strep para obtener soluciones de trabajo para pruebas posteriores (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0 µg/ml).

20 La cepa ATCC BAA-308 de *P. gingivalis* se sembró a partir de una reserva a -80 °C en agar de infusión de cerebro y corazón (BHA) (BD-211065). La placa se incubó durante 72 h a 37 °C en una estación de trabajo anaeróbica (Shanghaiyuejin, YQX-II). La atmósfera se mantuvo al 80 % de N₂, 10 % de CO₂ y 10 % de H₂. En el momento de la prueba, las placas se sacaron de la estación de trabajo anaeróbica y se procesaron en atmósfera ambiente. Las bacterias se recogieron y se suspendieron en medio completo-Pen/Strep (sin Pen/Strep). La turbidez de la suspensión se ajustó a 0,5 mediante el turbidímetro Siemens MicroScan® (Siemens), lo que equivale a 6×10⁸ ufc/ml. La suspensión bacteriana se diluyó en medio completo-Pen/Strep hasta alcanzar una densidad bacteriana final de 6×10⁸ ufc/ml (para MOI 1:1000), incluyendo un pocillo sin bacterias como control negativo.

30 Las células de la placa de ensayo se lavaron una vez con 200 µl de medio completo-Pen/Strep. A continuación, se añadieron 100 µl de solución de trabajo. Inmediatamente después de esta etapa, se añadieron 100 µl de suspensión bacteriana. Las concentraciones finales de los compuestos de ensayo fueron 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,025 y 0 µg/ml con DMSO al 1 %. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C en una incubadora con el 5 % de CO₂ durante 24 horas.

35 La viabilidad celular se determinó utilizando AlamarBlue (Invitrogen-527026). Las células de las placas de ensayo se lavaron dos veces con medio completo-Pen/Strep para eliminar las bacterias de la suspensión. Inmediatamente después de esto, se añadieron 220 µl de mezcla AlamarBlue/medio (consistente en 200 µl de medio completo-

Pen/Strep y 20 µl de AlamarBlue) a cada pocillo de las placas de ensayo utilizando una multipipeta. A continuación, las placas de ensayo se incubaron en una incubadora con CO₂ a 37 °C para que se desarrollara el Azul-Alamar reducido fluorescente, que era legible tras 5-6 horas de desarrollo utilizando un lector de placas SpectraMax M2e (Molecular Devices) sin saturación. Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron en 530 nm y 590 nm, respectivamente, según el manual del proveedor (Invitrogen).

Los inhibidores de Kgp, incluyendo el compuesto de la invención, protegieron a las células de neuroblastoma SH-SY5Y de la muerte celular inducida por *P. gingivalis*, como se muestra en la FIG. 1.

10 Ejemplo 69. Prevención de la adquisición de hierro por *P. gingivalis*

Tres días antes del día de la prueba, las cepas bacterianas se filtraron a partir de una reserva de glicerol a -80 °C en placas de agar de infusión de cerebro y corazón (BHA) (BD-211065) y se incubaron a 37 °C durante 72 h en una estación de trabajo anaeróbica YQX-II. Las colonias individuales se recogieron con un asa de inoculación (Greiner-731175) y se suspendieron en 5 ml de solución salina estéril. La turbidez de la suspensión se ajustó a 0,2 (turbidímetro Siemens MicroScan), igual a $\sim 2 \times 10^8$ ufc/ml. A continuación, la suspensión bacteriana se diluyó 100 veces en medios de ensayo. Esto se utilizó para inocular las placas hijas.

Se inoculó una alícuota de 100 µl de la suspensión bacteriana en cada pocillo de las placas hijas. Cada pocillo contenía $\sim 1,0 \times 10^6$ ufc/ml de bacterias, DMSO al 1 %, y compuestos diluidos en serie en 200 µl de caldo Brucella (BRU). Las placas se incubaron durante 6 días a 37 °C en una estación de trabajo anaerobia YQX-II. Los resultados de la adquisición de hierro se leyeron visualizando la conversión del color de las bacterias a negro.

La FIG. 2 muestra que una selección de inhibidores de Kgp, incluyendo el compuesto de la presente invención, son aproximadamente el doble de eficaces para prevenir la descomposición de la hemoglobina y la adquisición de hierro, un mecanismo clave de supervivencia de *P. gingivalis*, en comparación con el compuesto **73** de referencia.

30 Ejemplo 70. Mejora de las propiedades farmacocinéticas de los inhibidores de Kgp

Ratones Balb/C machos adultos (20-25 gramos, Harlan Laboratories, EE.UU.) se anestesiaron con isoflurano (2 %, 800 ml/min de O₂). Se utilizó bupivacaína/epinefrina para la analgesia local y carprofeno para la analgesia peri/postoperatoria. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico (Kopf instruments, EE.UU.). Se insertaron sondas de microdialísis MetaQuant (MQ) (membrana de celulosa regenerada, 3 mm de superficie expuesta, BrainLink, Países Bajos) en el hipocampo y una cánula en la vena yugular. Las coordenadas de las puntas de las sondas del hipocampo fueron: anteroposterior (AP) = -3,1 mm desde el bregma, lateral (L) = -2,8 mm desde la línea media y ventral (V) = -4,1 mm desde la duramadre, la barra dentada ajustada a 0 mm. Después de la cirugía, los animales se alojaron individualmente en jaulas y se les proporcionó comida y agua *ad libitum*.

El compuesto **1** y el compuesto **73** de referencia se prepararon en fresco en DMSO al 2 % y solución salina al 98 % a 2 mg/ml y se dosificaron p.o. a 5 ml/kg resultando una concentración de dosificación final de 10 mg/kg.

El muestreo de microdialísis se inició un día después de la cirugía. El día del experimento, las sondas se conectaron con tubos flexibles de PEEK a una bomba de microperfusión (bomba de jeringa Harvard PHD 2000, Holliston, MA o similar). Las sondas de microdialísis se perfundieron con aCSF que contenía 147 mM de NaCl, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM y BSA al 0,15 %, a un flujo lento de 0,15 µl/min y un flujo portador (agua UP, ácido ascórbico al 0,04 % y BSA al 0,15 %) a una velocidad de 0,8 µl/min. Las muestras de microdialísis se recogieron durante periodos de 15 o 30 minutos mediante un colector de fracciones automatizado (820 Microsampler, Univentor, Malta) en 300 µl. Después de la estabilización, se recogió una muestra de referencia y se utilizó el compuesto de referencia **73** (10 mg/kg; PO) se administró a todos los animales. Se recogieron muestras durante 8 horas más. También se recogió plasma a través de la vena caudal a los 15, 30, 60, 120, 240 360, 480 y 720 minutos tras la administración del compuesto **73** de referencia. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C a la espera de ser analizadas por Brains On-Line. Después de finalizar el experimento, se sacrificaron los ratones, se recogieron cerebros para la verificación de la sonda.

Las concentraciones del fármaco en el dializado y el plasma se determinaron mediante HPLC con detección de masas en tándem (MS/MS). Las muestras de microdialísis se inyectaron sin ningún tratamiento previo en el sistema de LC (LC20XR, Shimadzu, Japón) mediante un inyector de muestras automatizado (Sil20ACHT, Shimadzu, Japón). Las muestras de plasma se precipitaron con una mezcla que contenía un ACN al 80 %. Las muestras se diluyeron de nuevo con agua que contenía ácido fórmico al 0,1 %.

La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase inversa (2,1 × 50 mm, tamaño de partícula: 2,5 µm, XBridge C8, Waters, EE.UU.). Los componentes se separaron utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1 % en H₂O ultrapurificado que contenía ácido fórmico al 0,1 % (caudal de 0,2 ml/min).

Los análisis de MS se realizaron con un sistema API 4000 de triple cuádrupolo compuesto por un detector API 4000 de triple cuádrupolo y una interfaz Turbo Ion Spray (ambos de Applied Biosystems, EE.UU.). Las adquisiciones se

realizaron en modo de ionización positiva, con ajustes optimizados para los analitos. El instrumento funcionó en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) utilizando una transición de masas de 405,2 a 221,3. Los datos se calibraron y cuantificaron mediante el sistema de datos Analyst™ (Applied Biosystem) utilizando la respuesta del analito frente a la concentración.

5 El compuesto de la invención proporciona concentraciones plasmáticas aumentadas y concentraciones cerebrales libres en ratones como se muestra en las FIG. 3 y FIG. 4, respectivamente.

10 Ejemplo 71. Inhibición de la lisina gingipaína

Se llevaron a cabo ensayos adicionales para medir la actividad inhibitoria del compuesto de la presente invención y compuestos de referencia seleccionados frente a Kgp y catepsinas B, H, K, L, y S se como se describe en el Ejemplo 66. Se midieron las capacidades de los compuestos para inhibir la actividad de las catepsinas F, V y Z. Tomados en conjunto, los resultados del Ejemplo 66 y del Ejemplo 70 muestran que el compuesto de la presente invención es un inhibidor muy eficaz de Kgp que exhibe valores nanomolares y picomolares de CI_{50} . De manera adicional, como se muestra en la Tabla 4, una serie de compuestos -incluido el compuesto 1 de la presente invención y los compuestos 2, 7, y 50 de referencia- muestran una mayor selectividad por Kgp frente a la catepsina endógena en comparación con el compuesto 73 de referencia.

20 El compuesto de la presente invención también presenta otras ventajas importantes. Por ejemplo, el compuesto 1 de la presente invención mostró una mejor disponibilidad oral y un aumento de las concentraciones plasmáticas tras su administración a ratones CD-1 macho (dosificados p.o. a 10 mg/kg) en comparación con el compuesto 73 de referencia.

25 **Tabla 4. Inhibición de lisina gingipaína y Catepsinas por el compuesto de la invención y compuestos de referencia seleccionados (Los compuestos de referencia están marcados con un "*").**

Comp. N.º	CI_{50} (nM)								
	Kgp	CatK	CatH	CatB	CatF	CatL	CatV	CatS	CatZ
73*	<0,05	20	110	485	500	700	5720	>10 ⁴	>10 ⁴
1 97 % enantiómero S	<0,05	117	560	380	6100	4680	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
21*	0,09								
2a*	<0,05	2290	1550	>10 ⁴		>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	
7a*	1,3	>10 ⁴		>10 ⁴		>10 ⁴		>10 ⁴	
18a*	0,5	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	
47a*	0,06	9000	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	
50a*	0,09	1000	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	
55a*	0,12	1000	>10 ⁴	>10 ⁴		6.380	>10 ⁴	>10 ⁴	
69a	0,21	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴		>10 ⁴	>10 ⁴
48a*	0,07								
49a*	0,23								
57a*	0,09								
26a*	0,09								
27a*	0,27								
28a*	0,34								
29a*	0,31								
30a*	0,21								
31a*	0,15								
32a*	0,08								

(continuación)

Comp. N.º	Cl ₅₀ (nM)								
	Kgp	CatK	CatH	CatB	CatF	CatL	CatV	CatS	CatZ
33a*	0,08								
34a*	0,13								
35a*	0,10								
36a*	71,36								
37a*	>100								
38a*	12,09								
39a*	>100								
40a*	30,3								
41a*	>100								
42a*	0,06								
43a*	0,09								
44a*	3,04								
45a*	54,16								
46a*	13,12								
51a*	0,44								
52a*	0,06								
53a*	71,25								
54a*	49,02								
56a*	0,10								
58a*	4,66								
59a*	1,94								
60a*	4,41								
61a*	0,43								
62a*	0,14								
63a*	0,09								
64a*	0,40								
65a*	0,16								
66a*	359,6								
67a*	531,2								
68a*	258,4								

Ejemplo 72. Medición de la actividad de inhibición de Kgp mediante compuestos de referencia de sonda.

- 5 Las capacidades de los compuestos de referencia seleccionados para inhibir la actividad de la lisina gingipaína (Kgp) se midieron en un ensayo fluorogénico similar a los descritos por Barret (Biochemical Journal. 1980, 187(3), 909) utilizando 10 µM Z-His-Glu-Lys-MCA como sustrato fluorogénico a 37 °C. Probando un intervalo de concentraciones para cada compuesto, se determinó la concentración necesaria para inhibir la actividad de la lisina gingipaína en un 50 % (la "Cl₅₀"), como se expone en la Tabla 5.

Tabla 5. Inhibidores de la lisina gingipaína comparativos (los compuestos de referencia están marcados con un "**").**

Compuesto	Cl ₅₀ de Kgp (nM)
15a*	4
38a*	12
44a*	3
45a*	54
46a*	13
51a*	0,4
73*	<0,05

Ejemplo 73. Análisis de frotis bacterianos mediante sondas de referencia de la actividad de la gingipaína.

Las bacterias W83 o una cepa de bacterias W83 Kgp inactivadas se incubaron con 1 μ M de sonda de actividad **15a** o sonda de actividad **38a** durante 1 h a 37 °C. A continuación, las bacterias se precipitaron y se resuspendieron en 20 μ l de PBS, que se dejó caer sobre un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina y se mantuvo en una caja oscura a temperatura ambiente durante unas 2 horas para que la gota se secase. A continuación, el portaobjetos se lavó 3 veces en PBS. Los portaobjetos se montaron con un medio de montaje que contenía tinción DAPI para el ADN bacteriano y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. Las bacterias W83 son fluorescentes tras la exposición a la sonda de actividad **15a** o a la sonda de actividad **38a** en función de la expresión de Kgp activa. Las bacterias inactivadas Kgp y las bacterias sin exposición a sondas de actividad muestran únicamente fluorescencia azul DAPI, confirmando la presencia de los núcleos bacterianos (FIG. 5A). Este ejemplo demuestra que las sondas de actividad tiñen las bacterias, permitiendo su detección, por reacción covalente específica con Kgp.

Ejemplo 74. Análisis de muestras de tejido gingival mediante sondas de actividad de gingipaína de referencia.

Se extrajeron portaobjetos de tejido gingival fresco congelado (5 micrómetros de espesor) de un congelador a -80 °C y se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, los tejidos se sumergieron inmediatamente con la sonda de actividad **15a** (1 μ M en PBS) en una cámara humidificada, y la cámara se cubrió de la luz y se incubó a 37 °C durante 1 h. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS, 5 min cada uno, después se fijó en PFA al 4 % fresco durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se lavó de nuevo tres veces en PBS. A continuación, los portaobjetos se incubaron con una solución Trueblack de trabajo 1X (Biotium) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces en PBS y se montaron con un medio de montaje antidesvanecimiento que contenía DAPI (FIG. 5B). Las micrografías resultantes demostraron que las sondas de actividad pueden utilizarse para visualizar la presencia de Kgp activa en muestras de tejido humano.

Ejemplo 75. Análisis de células infectadas mediante sondas de actividad de gingipaína de referencia.

Células Jurkat humanas, con y sin infección por W83 de *P. gingivalis* o la cepa W83 Kgp inactivada, se expusieron a la sonda de actividad **15a**. Algunas células infectadas se preincubaron con un inhibidor no fluorescente del sitio activo de Kgp **73** (*N*-[7-amino-2-oxo-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)heptan-3-il]ciclopentanocarboxamida) durante 1 hora antes de la exposición a la sonda de actividad **15a**. Como se muestra en la FIG. 6A, la sonda **15a** se une irreversiblemente a Kgp purificada y a una proteína de células infectadas correspondiente al tamaño de Kgp. La identidad de esta proteína marcada en las células infectadas por *P. gingivalis* se confirmó que era Kgp mediante transferencia de Western. Además, la preincubación del compuesto **70** (*N*-[7-amino-2-oxo-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)heptan-3-il]ciclopentanocarboxamida) con las células infectadas antes de la adición de la sonda de actividad **15a** bloqueó la unión de la sonda **15a** a Kgp, confirmando que la sonda es específica para Kgp.

Una valoración de las bacterias en el crecimiento de células Jurkat permitió determinar cuantitativamente los niveles de Kgp en las células infectadas (FIG. 6B). Este ejemplo demuestra que Kgp se puede detectar cuantitativamente en las bacterias y en las células infectadas por bacterias y que también se puede utilizar para medir el compromiso de la diana de un inhibidor.

Ejemplo 76. Análisis de muestras de células bucales mediante sondas de actividad de gingipaína de referencia.

Las células bucales recogidas de varios donantes humanos con un asa estéril se suspendieron en una solución de sonda de actividad **15a** (1 μ M en PBS). Las células se incubaron durante 1 h a 37 °C y se precipitaron. Las células se resuspendieron en 20 μ l de PBS y se colocaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina, se lavaron y se secaron. Los portaobjetos se montaron con medio de montaje antidesvanecimiento que contenía DAPI y se visualizaron al

microscopio de fluorescencia. Algunas células bucales incubadas con la sonda de actividad **15a** mostraron una tinción pronunciada, mientras que otras no (FIG. 7), lo que indica la presencia de Kgp en algunas células. Este ejemplo demuestra que *P. gingivalis* y la presencia de Kgp podían detectarse en muestras de células bucales humanas.

5 **Ejemplo 77. Utilización de sondas de actividad biotiniladas de referencia para el aislamiento y análisis de gingipaínas.**

10 W83 de *P. gingivalis* se lisó con tampón B-Per durante 15 min a 4 °C. Al sobrenadante resultante se le añadió una sonda de actividad Kgp de biotina **51a**, 2 mM, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se incubaron 5 mg de perlas de estreptavidina con todas las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma inversora. Las perlas se recogieron al cabo de 1 hora y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos con SDS al 0,1 % para interrumpir la unión biotina-estreptavidina. Los sobrenadantes resultantes se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia de Western para la detección específica de Kgp con CAB 102 (FIG. 8). Este ejemplo demuestra que se puede utilizar una sonda de biotina para la extracción y la cuantificación de Kgp activa.

15 **Ejemplo 78. Detección de Kgp utilizando una sonda de referencia Cy5 basada en la actividad.**

20 Este ejemplo demuestra la detección de Kgp activa utilizando el compuesto 71 de sonda, una sonda basada en la actividad y conjugada con Cy5 que se une irreversiblemente a Kgp. Tiene una carga útil que se une al sitio activo de Kgp, un núcleo basado en péptidos, y un fluoróforo Cy5 para la detección. Las proteínas diana marcadas pueden visualizarse mediante la separación bioquímica de una muestra con fraccionamiento por electroforesis en gel 2-D y detección de señales fluorescentes de Cy5 a la longitud de onda de excitación y emisión adecuada. La incubación de una concentración fija de la sonda tras la unión de Kgp a un compuesto de prueba (por ejemplo, un inhibidor candidato de Kgp) produce la unión de la sonda de actividad a los sitios activos de Kgp que aún no están unidos por el compuesto de prueba.

25 **Preparación del lisado de *P. gingivalis*.** Se recogieron 10⁸ bacterias, se centrifugaron a 5000 g durante 10 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El sedimento de células bacterianas se lisó con 1 ml de tampón de lisis B-Per (Thermo Fischer) en hielo durante 10 minutos, a continuación se centrifugó durante 10 min a 14000 g, 4 °C. Se recogió el lisado proteico que contenía sobrenadante. Las muestras biológicas se lisaron con tampón de lisis B-Per durante 10 min a 4 °C.

30 **Marcado directo con Cy5 de Kgp.** Las muestras biológicas, el lisado de *P. gingivalis* o la Kgp purificada se incubaron con el compuesto **71** de sonda Cy5 extinguido (1 µM) durante 1 h a 37 °C con agitación. Después, las muestras se desnaturalizaron con tampón de muestras NUPAGE LDS (Thermo Fisher) que contenía 50 mM de DTT a 95 °C durante 10 minutos y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE utilizando un gel prefabricado Criterion al 4-15 % (Bio-Rad) y tampón de funcionamiento Tris/Glicina/SDS (Bio-Rad). El gel se ejecutó a 75 V durante 10 minutos y luego a 125 V durante 1,5 h. A continuación, el gel se extrajo del casete de plástico y se sometió a visualización con Cy5 con un sistema de imágenes ChemiDoc (Bio-Rad).

40 **Inmunoprecipitación de Kgp marcada con sonda Cy5.** Las muestras se marcaron con el compuesto **71** de sonda Cy5 extinguido (1 µM) durante 1 h a 37 °C con agitación. Para la inmunoprecipitación de Kgp marcada con Cy5, las muestras se incubaron a continuación con 10 µg de anticuerpo policlonal de conejo CAB102 con rotación durante toda la noche a 4 °C. A continuación, las muestras se incubaron con perlas Dynabead Protein G prelavadas con rotación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 4 veces con 200 µl de tampón de lavado, utilizando un soporte magnético. Las perlas se suspendieron en 20 µl de tampón de elución y 10 µl de tampón de muestra NUPAGE LDS, DTT 50 mM, se calentaron a 70 °C durante 10 min. A continuación, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron de las perlas magnéticas utilizando un soporte magnético. A continuación, las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y la señal Cy5 se visualizó con un sistema de imagen ChemiDoc (Bio-Rad).

50 **Análisis por transferencia de Western de muestras marcadas con Cy5.** Tras la obtención de imágenes con detección de Cy5, el gel SDS-PAGE se sometió a análisis por transferencia de Western utilizando un sistema de transferencia Trans-blot Turbo (Bio-Rad) para transferir las proteínas a una membrana de PVDF. A continuación, se lavó la membrana con TBS durante 5 minutos y se bloqueó con BSA al 3 % en tampón TBST durante 1 hora o más. A continuación, la transferencia se incubó con el anticuerpo primario CAB 102 1:1000 durante 2 h a TA o durante toda la noche a 4 °C en tampón de bloqueo. A continuación, la transferencia se lavó 3 veces con tampón TBST, 5 min cada uno, después se incubó con anticuerpo IgG de cabra anti-conejo absorbido conjugado con HRP 1:50.000 (Thermo Fisher, #31462) en TBST durante 45 min, TA. A continuación, la transferencia se lavó 4 veces con TBST y se sometió a un proceso de imagen quimioluminiscente utilizando el sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto (Thermo Fisher) y un sistema de imagen ChemiDoc.

65 **Resultados.** La detección de Kgp utilizando el compuesto **71** de sonda fue sensible, con un límite de detección aparente de 500 UFC. La detección fue específica para Kgp, como se demostró en tres experimentos. En primer lugar, como se muestra en la FIG. 9A, se detectó específicamente una única banda de proteína Kgp (50 kDa de peso molecular) en muestras de cultivos bacterianos W83 de *P. gingivalis* de tipo silvestre y no se detectó en muestras de

una cepa Kgp inactivada de *P. gingivalis*.

En segundo lugar, el marcaje de Kgp por el compuesto **71** de sonda se redujo específicamente mediante preincubación e inmunodepleción con CAB 102, un anticuerpo policlonal específico de Kgp. El carril 1 de la Fig. 9B muestra el marcaje de *P. gingivalis* de tipo silvestre con el compuesto **71** de sonda, mientras que el carril 2 de la FIG. 9B muestra el análisis de la muestra después de la inmunodepleción de Kgp marcada con perlas conjugadas con el anticuerpo policlonal de conejo CAB102. Los carriles 1 y 2 se cargaron por igual con una décima parte del volumen total de la muestra. El carril 3 de la FIG. 9B muestra la elución de Kgp marcada a partir de perlas conjugadas con CAB102. Dos tercios del volumen total de elución se cargaron en el carril 3.

Finalmente, la detección se completa con la preincubación con el compuesto **1** (100 nM), una concentración que es selectiva para Kgp y no inhibe la gingipaina de arginina homóloga, Rgp. La FIG. 9C muestra el marcado y la detección de *P. gingivalis* de tipo silvestre a diferentes concentraciones para determinar el límite de detección del ensayo de marcaje. La muestra con mayor UFC (unidad formadora de colonias) también se incubó con el compuesto **1** a 100 nM. Las muestras se detectaron mediante transferencia de Western con el anticuerpo CAB 102, así como visualizando la señal Cy5. Este último estudio demuestra que el compuesto **1** compite por la unión al sitio activo con el compuesto **71** de sonda, permitiendo la detección del nivel de compromiso de la diana Kgp por un inhibidor de molécula pequeña de Kgp tal como el compuesto **1**. Estos datos establecen el marcaje de la proteína Kgp en cultivos bacterianos intactos y proteína purificada por el compuesto **71** de sonda y establecen un método para evaluar la participación de la diana en muestras tratadas con el compuesto.

Ejemplo 79. Múltiples aspectos de la infección por *P. gingivalis* se tratan inhibiendo Kgp.

Se ha utilizado *P. gingivalis* aplicada durante varias semanas directamente en la encía de ratones como modelo de periodontitis. La reabsorción ósea alveolar, un sello distintivo de la progresión de la periodontitis, suele observarse cuando se emplea este modelo. Más recientemente, el uso del modelo también ha permitido descubrir una cantidad significativa de *P. gingivalis* en el cerebro, que se acumula concomitantemente con la colonización oral y que posteriormente provoca efectos perjudiciales como la inflamación y la pérdida de neuronas del hipocampo. Como se describe a continuación, el compuesto **1** y otros compuestos divulgados en el presente documento pueden prevenir estos efectos cuando se usan para tratar sujetos infectados con *P. gingivalis*.

Al comienzo del estudio, ratones hembra BALB/C de ocho semanas de edad recibieron antibiótico en el agua de bebida (sulfametoxazolom 0,87mg/ml, trimetoprimum 0,17 mg/ml) durante 10 días para reducir la protección del microbioma frente a la infección del experimento. La periodontitis experimental se indujo mediante la colocación de ligaduras seguida de múltiples exposiciones a *P. gingivalis*. Durante el procedimiento de ligadura se anestesió a los ratones con una inyección intraperitoneal de ketamina (200 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), y se lubricaron los ojos con una pomada (Puralube Vet; Pharmaderm, Melville, NY). Seguidamente, una ligadura de seda 5-0 (Roboz Surgical Instrument Co.,) se ató alrededor del segundo molar superior maxilar izquierdo y derecho. Se aplicaron suturas y se ataron suavemente para evitar dañar el tejido periodontal. La ligadura se dejó en posición durante todo el periodo experimental para que la inflamación pudiera ser inducida constantemente por la colonización de bacterias en su interior.

Los ratones (n=8-10/brazo) se infectaron durante 6 semanas en días alternos. Para la infección, se aplicaron 100 µl de solución bacteriana por vía tópica en la superficie bucal de los maxilares. Para la preparación de las bacterias, W83 de *P. gingivalis* (ATCC, Rockville, MD) se sembraron en placas de agar Tryptic Soy Broth (TSB) (5% de sangre de oveja, suplementada con 0,5 mg/ml de L-cisteína, 5 µg/ml de hemina y 0,5 µg/ml de vitamina K) y se cultivaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 5-7 días. A continuación, las muestras se inocularon en TSB con hemina, vitamina K y L-cisteína (TSB-HKC) hasta la mitad de la fase logarítmica ($DO_{600} = 0,5-0,7$). Las bacterias se lavaron en PBS y se prepararon a una concentración final de 1×10^{10} células/ml en PBS + metilcelulosa al 2 % (CMC).

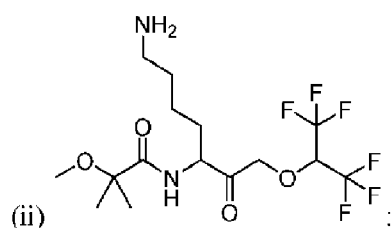
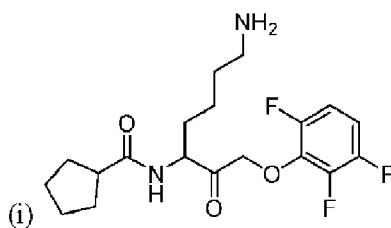
Los ratones recibieron vehículo o el compuesto **1** durante 5 semanas (día 36-70). El compuesto **1** se administró por vía oral b.i.d. en PBS a 3, 10 o 30 mg/kg en la cavidad oral. Los animales tratados con vehículo recibieron únicamente PBS. A las 5 semanas, se practicó la eutanasia a un subgrupo de animales (n=16) para obtener mediciones de referencia antes del inicio del tratamiento. Después de 10 semanas, los ratones fueron eutanasiados y el cerebro, suero, y los tejidos maxilares se recogieron y congelaron en nitrógeno líquido.

La pérdida ósea en los maxilares se midió *ex vivo* con enmascaramiento utilizando el software OsiriX MD (PixmeoSARL, Bernex, Suiza). Los puntos de medición se obtuvieron utilizando una vista 3D de reconstrucción multiplanar (MPR) en la que los maxilares se cortaron en línea recta a lo largo de las raíces superficiales del segundo molar y la raíz posterior del primer molar, con una tangente de la raíz anterior del primer molar. La distancia entre la unión cemento-esmalte y la cresta ósea alveolar se midió desde la unión cemento-esmalte hasta una línea de referencia en la cresta ósea alveolar situada perpendicularmente a la raíz superficial a cada lado del segundo molar. La FIG. 10 muestra la pérdida ósea alveolar inducida por la infección a las 10 semanas en ratones tratados con vehículo o con el Compuesto **1** (### $p < 0,0001$). La pérdida ósea mejoró con el tratamiento con el Compuesto **1** (30 mg/kg o 10 mg/kg) durante la semana 5-10. El tratamiento con el Compuesto **1** a 3 mg/kg tendió a la mejoría, pero no produjo una mejoría significativa con respecto a los ratones tratados con vehículo. (ANOVA: F (5, 24) = 15,71, $p < 0,0001$; prueba t con corrección de Bonferroni: ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

- El ADN se extrajo del tejido cerebral utilizando el DNeasyBLOOD & TISSUE KIT (Qiagen, Alemania) según el protocolo del fabricante. La qPCR Taqman se realizó con Kapa Probe fast qPCR Mix (Rox Low) en un termociclador Bio-Rad CFX96 Real-Time System C1000 Touch con cebadores directo e inverso (5'-AGCAACCAGCTACCG-TTTAT-3' y 5'-GTACCTGTCGGTTTACCATCTT-3', respectivamente), y una sonda de detección (6-FAM-TACCATGTTTCGCAGAAGCCCTGA-TAMRA). Los cebadores se basaron en una sola copia del gen de la cisteína-proteinasa específica de arginina de *P. gingivalis*. Las muestras duplicadas se analizaron en un volumen total de 10 µl, que contenía 100 ng de solución molde de ADN genómico cerebral, TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Kapa Biosystems, EE.UU.), y el conjunto específico de cebadores (concentración final 5 µM) y sonda (concentración final 4 µM) (GenoMed, Polonia), correspondiendo a 562,5 nM para los cebadores directo e inverso y 100 nM para el cebador sonda. Tras una primera etapa de incubación de 2 min a 50 °C y desnaturalización a 95 °C durante 20 s, se realizaron 40 ciclos de PCR (95 °C durante 20 s, 60 °C durante 30 s). El número de copias del genoma de *P. gingivalis* se calculó cotejando los valores de Cq con una curva estándar preparada a partir de diluciones seriadas de W83 (TS) de *P. gingivalis* cultivada. Como se muestra en la figura 11, se encontraron números de copias significativos del gen RgpB específico de *P. gingivalis* en el tejido cerebral tras 5 y 10 semanas de infección. El tratamiento con 30 mg/kg de Compuesto 1 entre las semanas 5 y 10 produjo una reducción del -80 % (**p<0,001) en el número de copias de ADN. El tratamiento con 10 mg/kg o 3 mg/kg produjo una reducción del -50 % (**p<0,01, ***p<0,001) en el número de copias. ANOVA: F (6, 59) = 23,31, p<0,0001; prueba t con corrección de Bonferroni.
- La cuantificación de interneuronas GAD67 positivas se realizó con CellSens 1.5. Software. El área del hilio se definió como el área entre las láminas del giro dentado conectadas por una línea recta en el lado abierto. Se contó el número de células en cada 40ª sección a través del hipocampo. Como se muestra en la figura 12, la cuantificación de interneuronas GAD67 positivas en el giro dentado reveló una pérdida del -25 % de interneuronas en ratones infectados (*p< 0,05) a las 10 semanas, en comparación con los controles simulados infectados. En cambio, las células GAD67+ de los ratones tratados con el Compuesto 1 estaban al mismo nivel que las células GAD67+ de los ratones infectados con el simulador. Los resultados se presentan en la FIG. 12 como el número de células por volumen de tejido.
- Tomados en conjunto, los resultados en este ejemplo muestran que el Compuesto 1 trata múltiples aspectos de la infección por *P. gingivalis*, incluida la pérdida ósea alveolar, niveles bacterianos en el tejido cerebral, y pérdida de neuronas del hipocampo. También se observó que el compuesto 1 reducía la inducción de abeta42 cerebral y la neuroinflamación en estudios relacionados. Al inhibir Kgp, los compuestos divulgados pueden tratar la propia infección por *P. gingivalis*, así como los efectos perjudiciales de las enfermedades neurológicas y otras afecciones asociadas a la infección.
- Aunque lo anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, un experto en la materia apreciará que pueden ponerse en prácticas determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

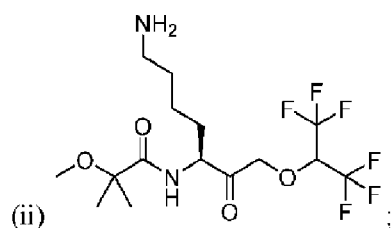
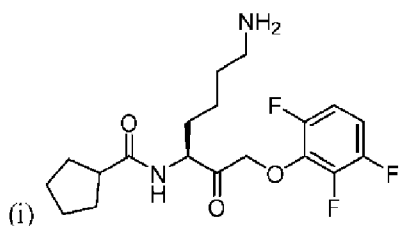
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula siguiente (i) o (ii):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso como un medicamento.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección asociada a una infección por *P. gingivalis*, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de dicho compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de dicha composición, en donde la enfermedad o afección se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un trastorno cerebral, enfermedad periodontal, diabetes, una enfermedad cardiovascular, artritis, artritis reumatoide, artrosis, artritis infecciosa, artritis psoriásica, riesgo elevado de parto prematuro, neumonía, cáncer, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, un trastorno de la retina, y glaucoma, y la enfermedad o afección es más preferentemente:

(a) un trastorno cerebral, en donde la enfermedad cerebral se selecciona preferentemente del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, epilepsia, autismo, enfermedad de Parkinson, temblor esencial,

- 5 demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, encefalopatía traumática crónica, ictus, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia de múltiples sistemas, esquizofrenia y depresión, en donde el trastorno cerebral es más preferentemente la enfermedad de Alzheimer y en donde el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer además comprende más preferentemente administrar al sujeto uno o más agentes activos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de la colinesterasa, un modulador de la serotonina, un modulador de NMDA, una terapia dirigida a A β , una terapia dirigida a la ApoE, una terapia dirigida a la microglía, una terapia dirigida a la barrera hematoencefálica, una terapia dirigida a tau, una terapia dirigida al complemento y un antiinflamatorio;
- 10 (b) enfermedad periodontal;
(c) una enfermedad hepática, en donde la enfermedad hepática es preferentemente la esteatohepatitis no alcohólica;
(d) un trastorno de la retina, en donde el trastorno de la retina es preferentemente la degeneración macular asociada a la edad;
- 15 (e) cáncer, en donde el cáncer se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas y glioblastoma multiforme;
(f) riesgo elevado de parto prematuro;
(g) artritis, en donde la artritis es preferentemente artritis reumatoide o artrosis;
- 20 (h) una enfermedad cardiovascular; o
(i) diabetes.
6. El compuesto o la composición para el uso de la reivindicación 5, en donde el compuesto o composición es para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 7. El compuesto o la composición para su uso de las reivindicaciones 5 o 6, en donde:
- (a) el compuesto se administra al sujeto durante al menos un mes, preferentemente durante al menos un año, más preferentemente durante al menos 10 años y mucho más preferentemente durante al menos 60 años;
y/o
- 30 (b) el sujeto es un ser humano, un canino, o un felino, y el sujeto es preferentemente un ser humano.

W

FIG. 1

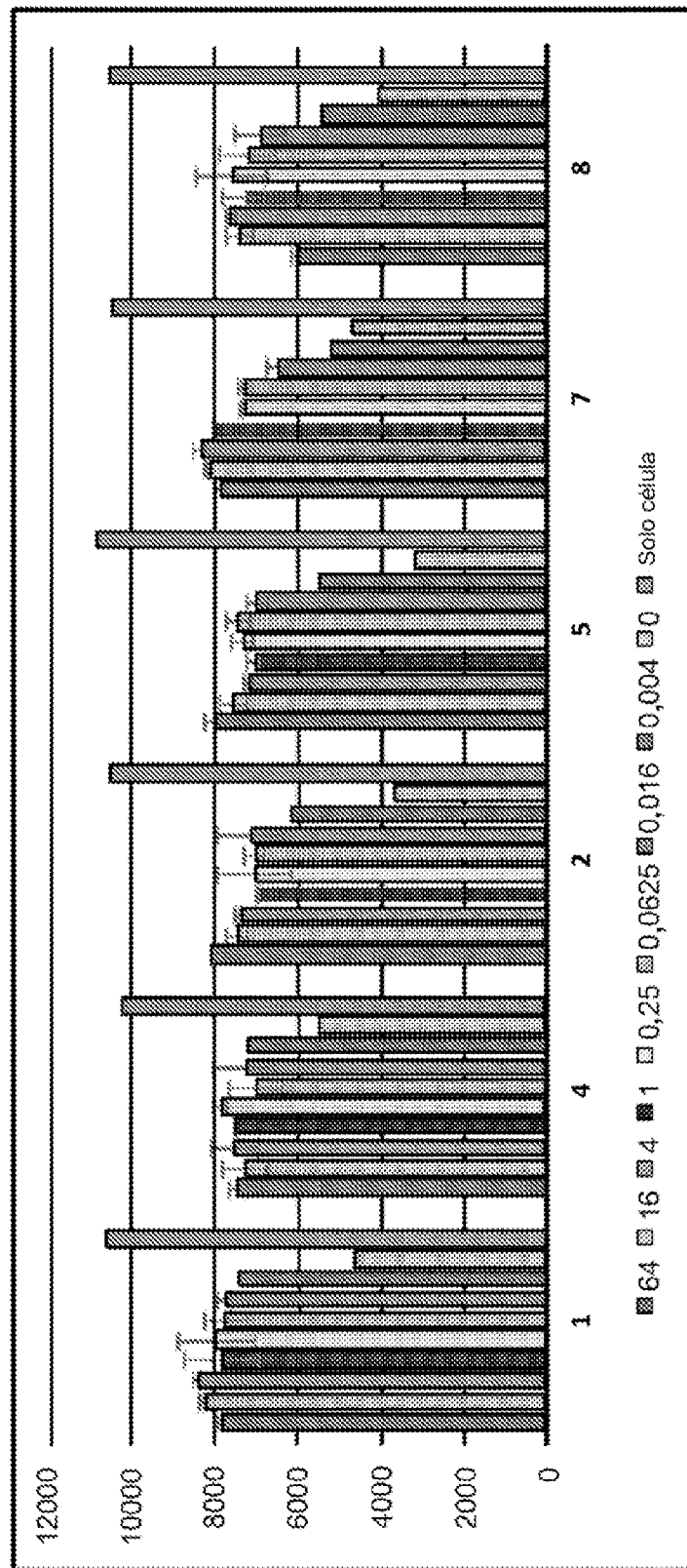


FIG. 2

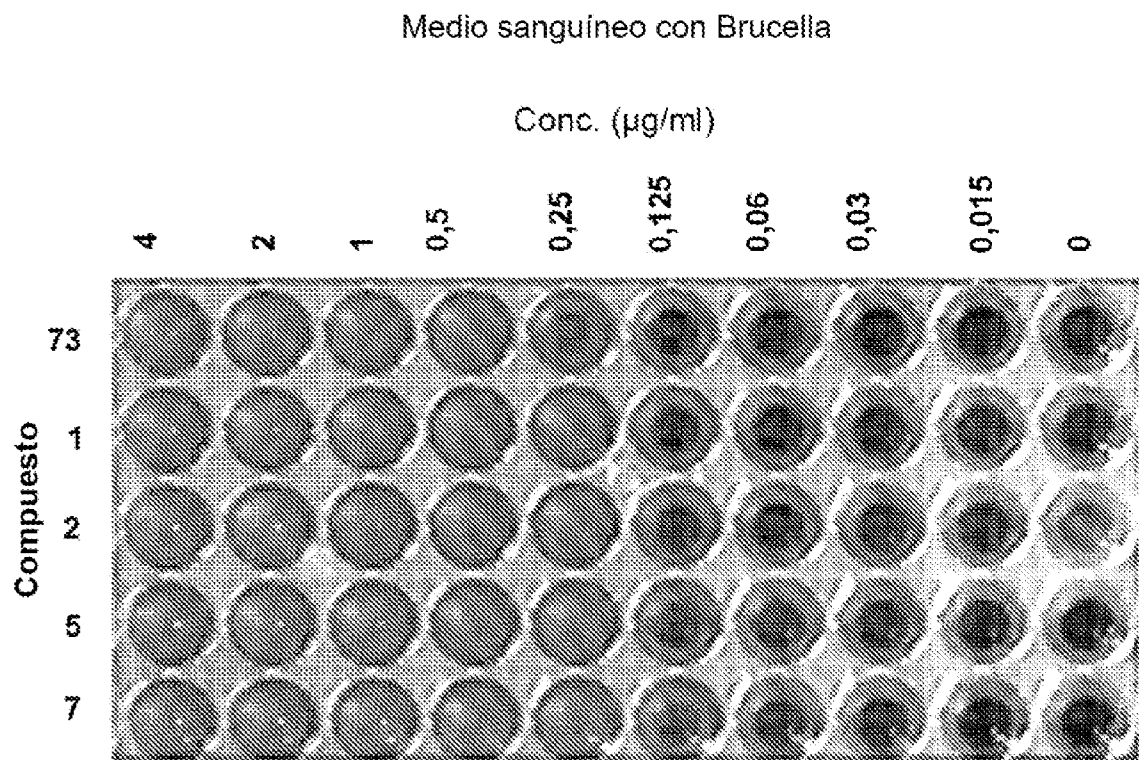


FIG. 3

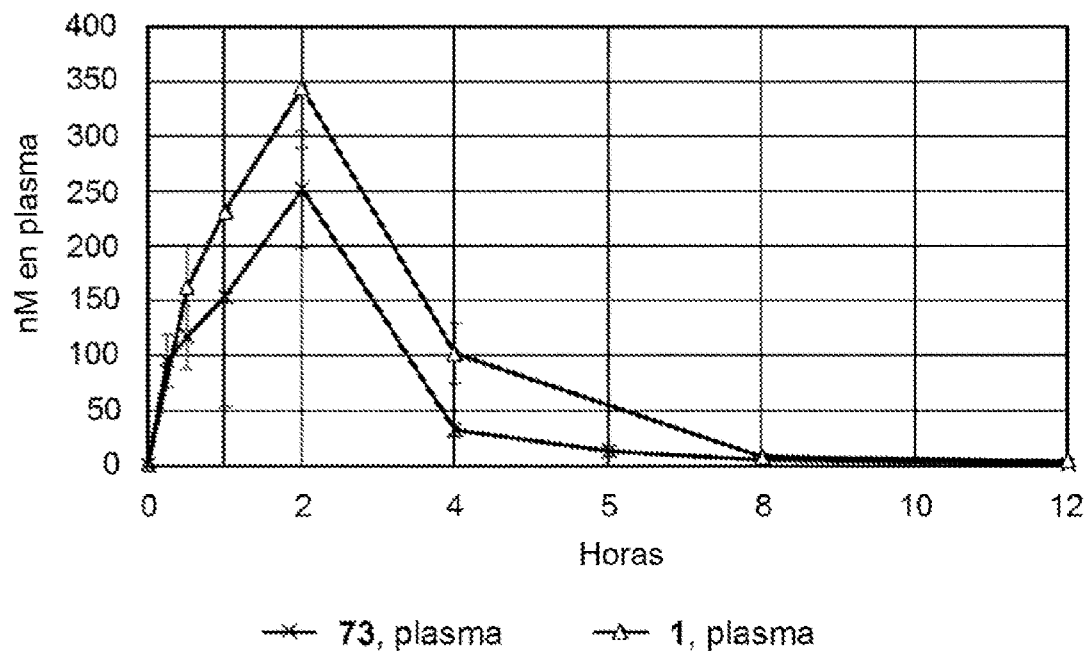


FIG. 4

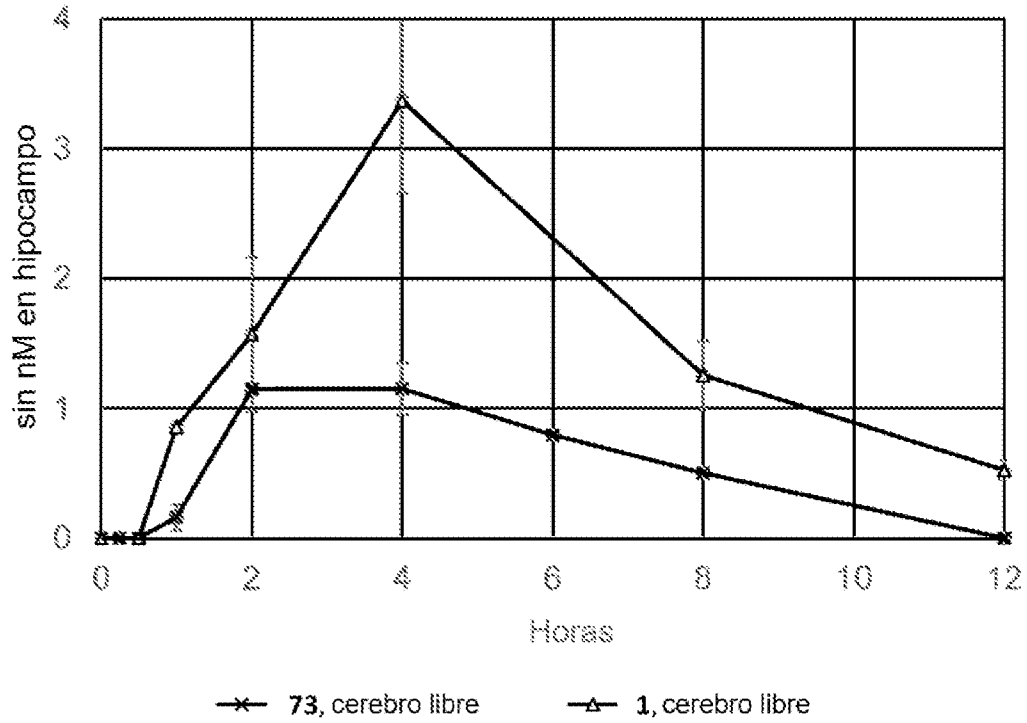


FIG. 5A

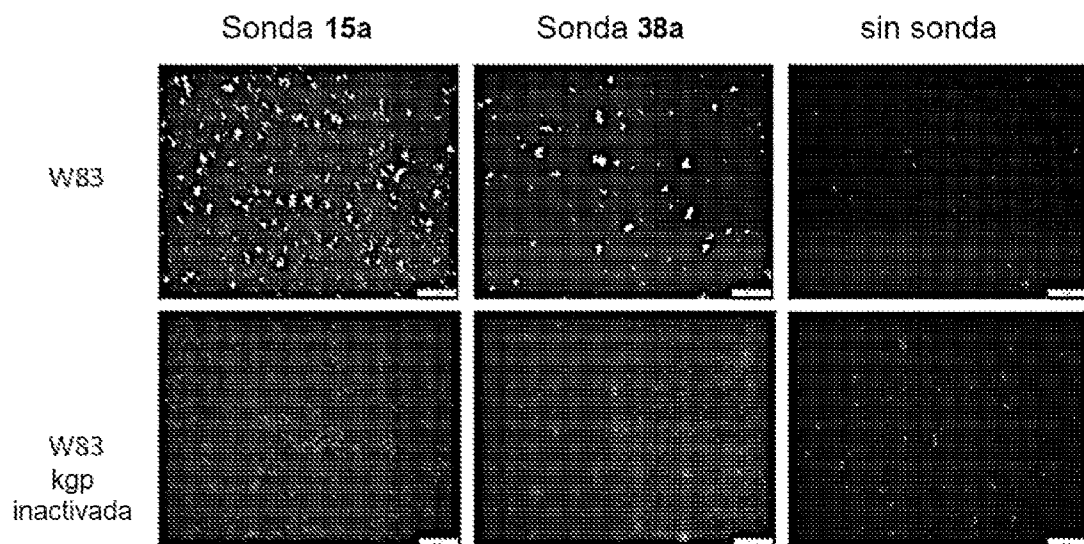


FIG. 5B

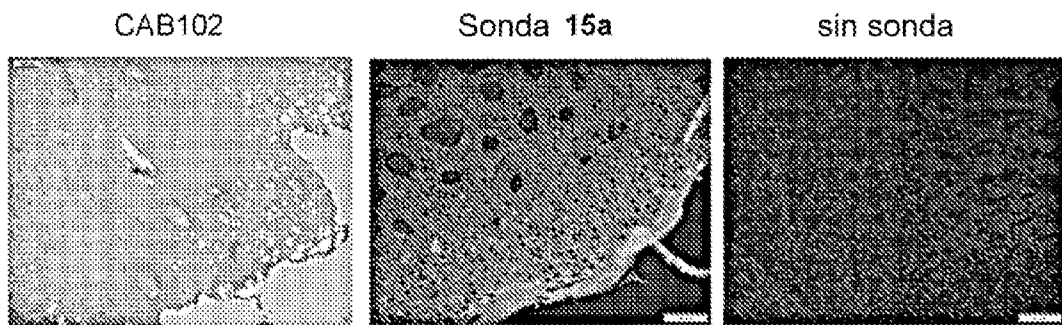


FIG. 6A

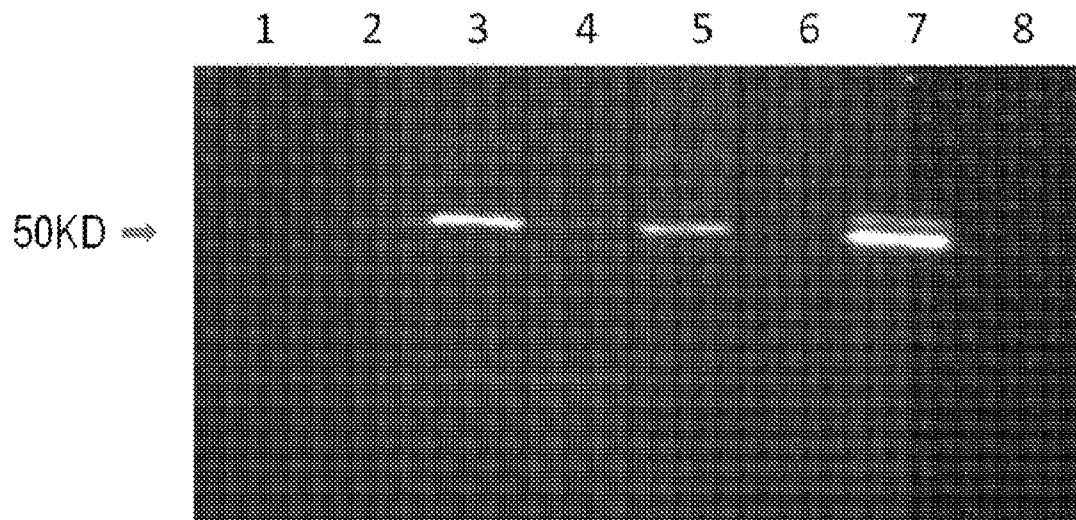


FIG. 6B

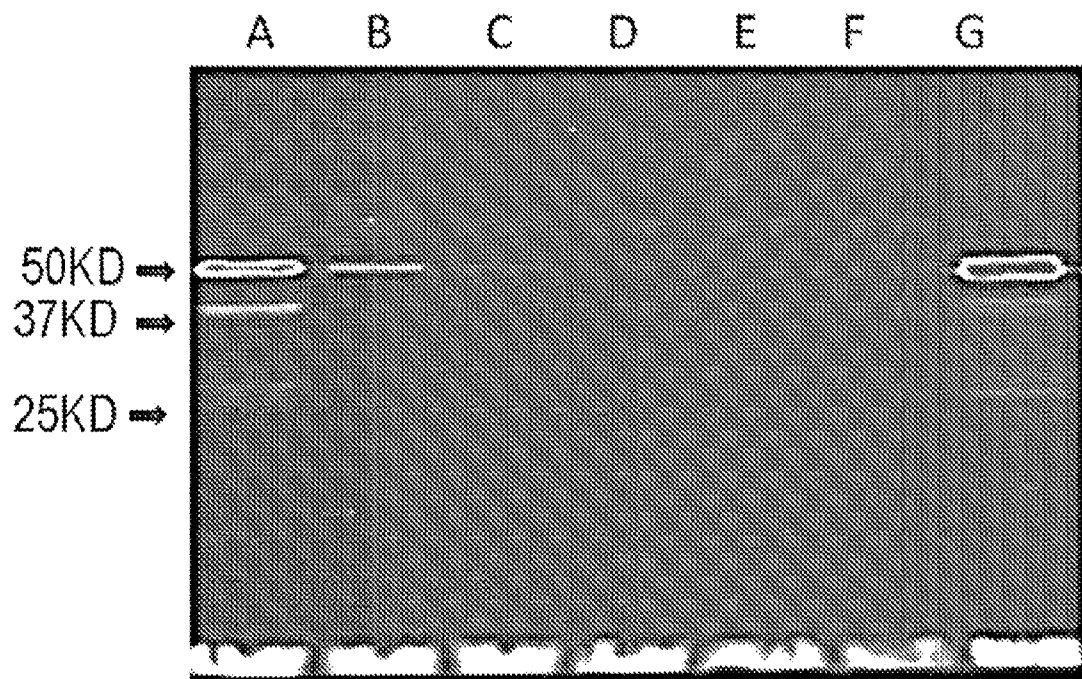


FIG. 7

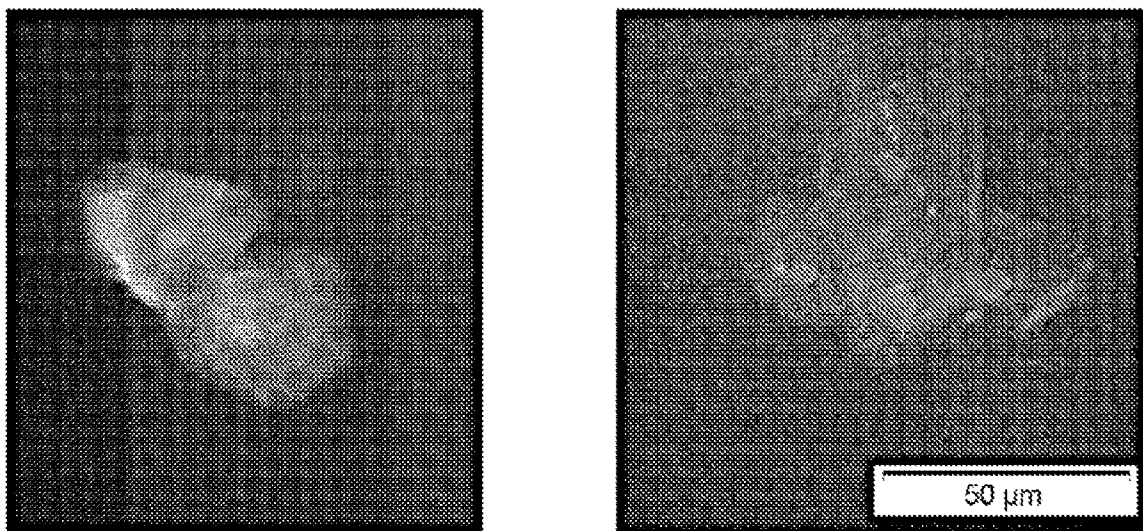


FIG. 8

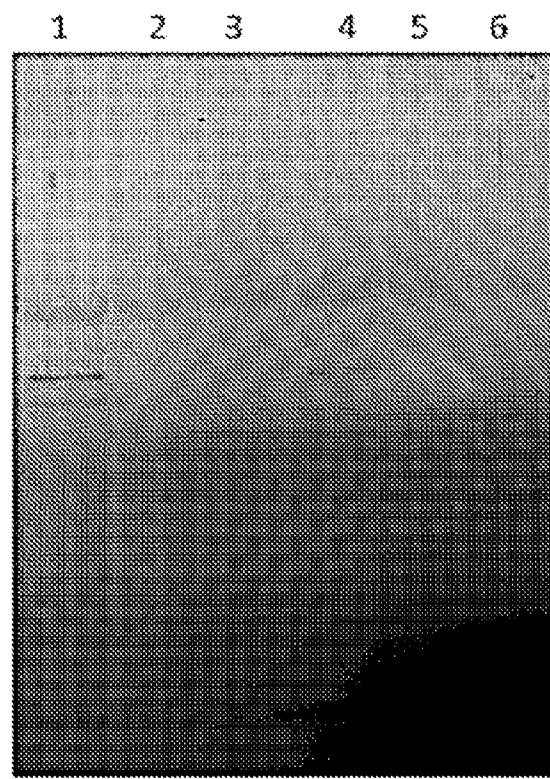


FIG. 9A

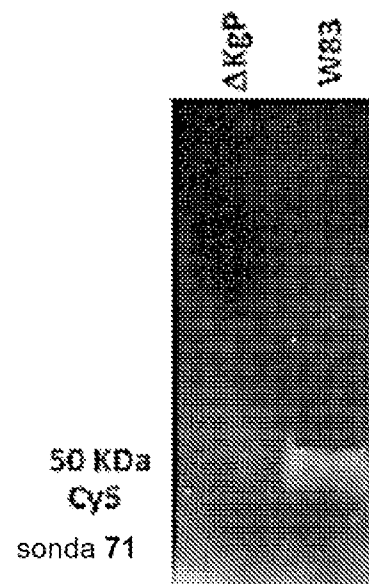


FIG. 9B

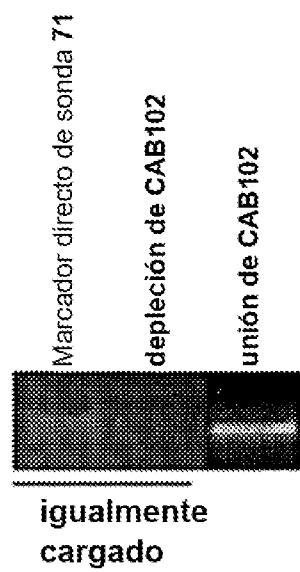


FIG. 9C

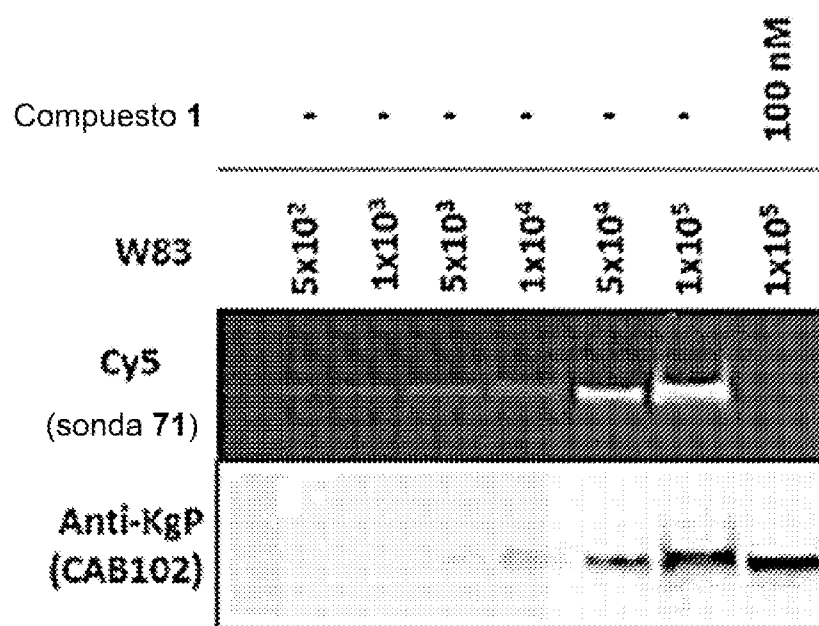


FIG. 10

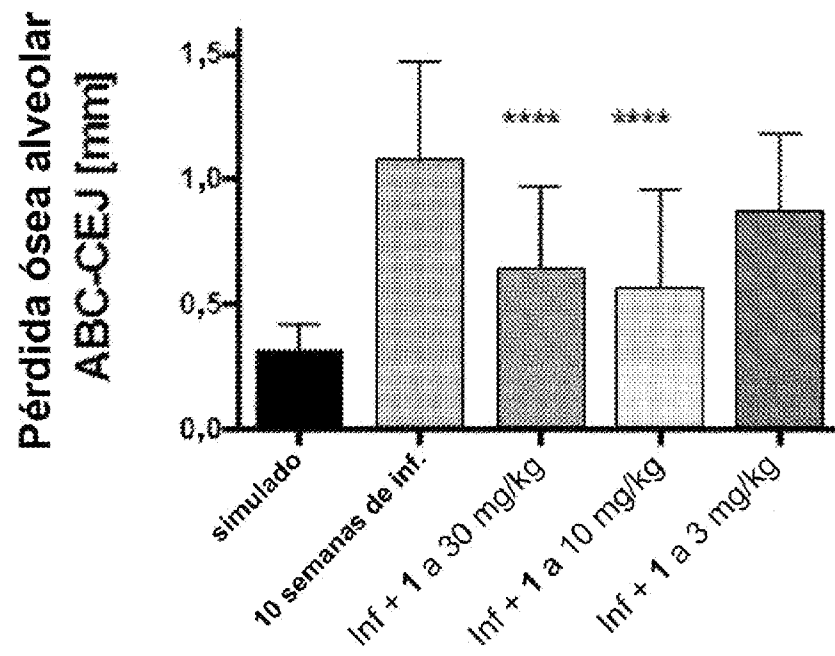


FIG. 11

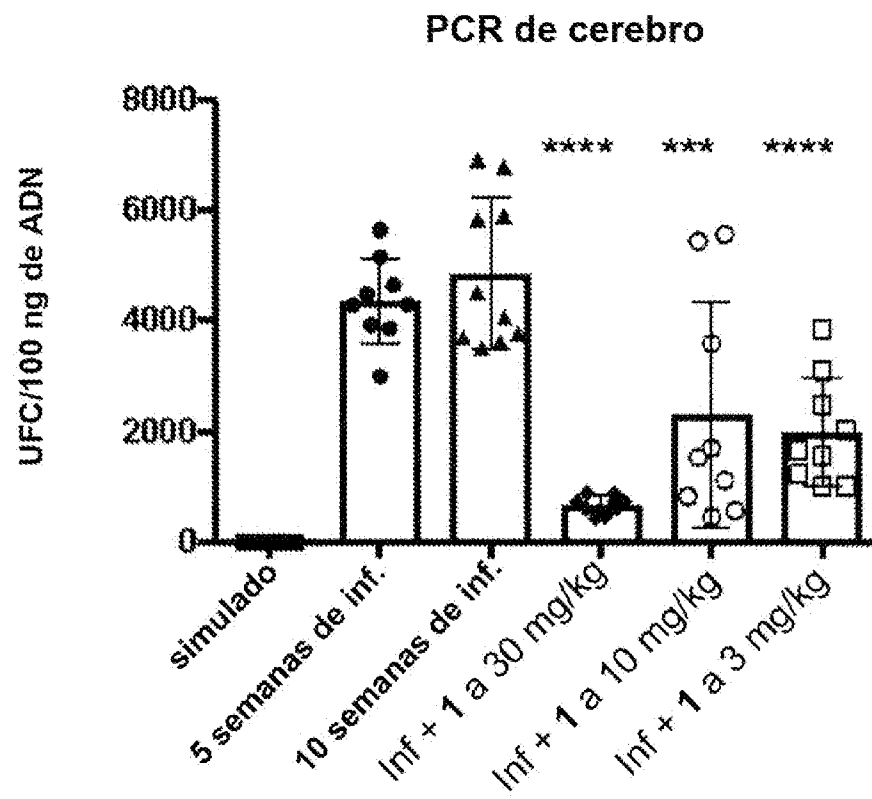


FIG. 12

