

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 803**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)
C07H 13/04 (2006.01)
C07H 19/056 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2017** **PCT/GB2017/052401**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018** **WO18033719**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2017** **E 17757819 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021** **EP 3497095**

54 Título: **Compuestos quelantes de zinc para su utilización en el tratamiento de una infección bacteriana**

30 Prioridad:

15.08.2016 GB 201613946

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITETET I OSLO (100.0%)
Boks 1072 Blindern
0316 Oslo, NO

72 Inventor/es:

RONGVED, PÅL;
ÅSTRAND, OVE ALEXANDER HØGMOEN;
SAMUELSEN, ØRJAN;
SCHNAARS, CHRISTIAN y
KILDAHL-ANDERSEN, GEIR

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 893 803 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

Compuestos quelantes de zinc para su utilización en el tratamiento de una infección bacteriana

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que son reguladores de zinc biológico, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a procedimientos para su preparación. Los nuevos compuestos de la presente invención tienen la capacidad de afectar a la concentración de zinc en organismos vivos de manera controlada y segura. Por tanto, la presente invención se refiere, además, a su utilización en el tratamiento de estados patológicos asociados con niveles anormales de zinc.

De manera más específica, la presente invención se refiere a nuevos compuestos útiles como adyuvantes en formulaciones antibacterianas y que también se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el desequilibrio extracelular en la homeostasis del zinc. Los compuestos son reguladores de zinc biológico de baja toxicidad. En particular, tienen la capacidad de afectar a la concentración de zinc en microorganismos sin generar efectos tóxicos en los organismos vivos que son huéspedes de los microorganismos. Debido a su falta de efectos tóxicos, los compuestos también se pueden utilizar en el tratamiento seguro de estados patológicos asociados con niveles de zinc extracelulares anormales, tales como accidente cerebrovascular, edema, epilepsia y enfermedad de Alzheimer.

Estado de la técnica anterior

En una serie de estados patológicos, el zinc biológico está presente en concentraciones fuera del intervalo normal para que las células tengan una función saludable. El estado patológico puede verse afectado por factores biológicos, tales como las enzimas dependientes del zinc, por ejemplo, tal como se ha descrito en Prasad et al, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2014), 28 (4), 357-363 o en Shai et al, *ChemMedChem* (2015), 10 (3), 441-450. En el presente documento, el grupo de enfermedades que pueden verse afectadas o reguladas mediante la alteración selectiva y segura de la homeostasis del zinc se denomina "enfermedad".

Un elemento clave necesario para la vida normal de una célula es la homeostasis del zinc. El zinc es el segundo metal de transición más abundante en el cuerpo humano y es responsable de la función catalítica y la estabilidad estructural de más de 6.000 enzimas y proteínas (Bertini et al, *Journal of Inorganic Biochemistry* (2012), 111, 150-156). El intervalo de concentración biológica de zinc que mantiene las células sanas es estrecho y está bien descrito, por ejemplo, por Maret en *Biometals* (2011) 24: 411-418. Se ha observado que la manipulación del zinc disponible de manera libre dentro de una célula afecta a una gran variedad de enfermedades y afecciones (Que et al, *Chem. Rev.* (2008), 108, 1517-1549; Peterson, et al *Mol. Biol.* (2009)), 388, 144-158; BarKalifa et al, *Eur. J. Pharmacol.* (2009), 618, 15-2; Maret et al, *Mol. Med.* (2007), 13, 371-375).

La concentración de zinc libre varía en los tejidos biológicos, dependiendo de la capacidad tamponadora del zinc. En las líneas celulares PC12, HeLa y HT-29, así como en cultivos primarios de miocitos cardíacos y neuronas *in vitro*, se ha determinado que la concentración de zinc libre es de aproximadamente 5 nM (Bozym et al, *Exp. Biol. Med.* (2010), 235, 741-750). El zinc es un metal blando que se encuentra principalmente en la naturaleza como salferita o sulfito de zinc, con un estado de oxidación +2 (Emsley, J. "Zinc". *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements.*; Oxford University Press: Nueva York, 2001). A efectos de quelar zinc de forma selectiva y segura y con alta eficacia, es necesaria la utilización de ligandos básicos blandos.

Entre los ejemplos no limitantes de estados patológicos relacionados con un desequilibrio en la homeostasis del zinc se encuentran cáncer, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, edema, diabetes e intoxicaciones por metales pesados como el cadmio.

En Khan et al, *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* (2014), 13, 16/1-16/6, 6 págs., el desequilibrio en la homeostasis del zinc se describe como un factor en el desarrollo de la diabetes.

En los trastornos neurológicos, está bien documentado que, en estados de edema y accidente cerebrovascular, existe una sobrecarga de zinc extracelular en el SNC que afecta a la gravedad de la enfermedad, por ejemplo, tal como se ha descrito por Liao et al en *Toxicology Letters* (2011), 204, 108-117. Al mismo tiempo, los quelantes de zinc pueden tener un papel neuroprotector, por ejemplo, tal como se ha descrito por Cho et al. en *Neurotox. Res.* (2010) 17: 156-166. Recientemente, se demostró que los quelantes de zinc pueden tener un efecto neuroprotector si no penetran en las membranas celulares del pez cebra, tal como se ha descrito por Yu et al. en *Zebrafish* (2013), 10 (1), 30-35. Esto es posible porque concentraciones de zinc demasiado altas o demasiado bajas, fuera del intervalo normal de concentraciones, pueden ser tóxicas para las células.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por un depósito extracelular de fibrillas de b-amiloide (Ab) acompañado de una pérdida progresiva de neuritas. En estas enfermedades, a menudo se describe una concentración más elevada de zinc, por ejemplo, en Huang, *RSC Advances* (2014), 4(94), 52088-

52099. En *Neuropharmacology* (2015), 92, 146-157, Chang *et al.* muestran cómo un quelante de metales puede revertir el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los quelantes utilizados en la técnica anterior no son selectivos de zinc y el logP (que es una medida de hidrofilia) es lo suficientemente elevado para proporcionar la penetración celular de los quelantes en todas las células. Un ejemplo de un quelante de zinc que se ha utilizado clínicamente para regular el zinc extracelular es el agente quelante DP-b99. Un estudio en fase II desarrollado por Diener *et al.* en *Stroke* (2008), 39(6), 1774-1778 describió resultados positivos con DP-b99 en accidente cerebrovascular isquémico. Sin embargo, el DP-b99 es un agente quelante con un logP > 5 y una penetración significativa de membrana que se esperaría que resultara tóxica. Por tanto, existe una necesidad médica de un quelante de zinc selectivo con problemas insignificantes relacionados con la toxicidad.

Además, en una variedad de formas de cáncer, las concentraciones de zinc fuera del intervalo normal juegan un papel vital. Por ejemplo, en el cáncer de próstata, se ha utilizado terapéuticamente acetato de zinc, tal como se ha descrito por Shah *et al.* en *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2009), 28: 84, págs. 1-10. Sin embargo, el acetato de zinc proporciona una formulación muy soluble en agua con baja capacidad para transportar zinc a través de membranas biológicas.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son un grupo de enzimas extracelulares dependientes de zinc vitales para el crecimiento de las células cancerosas y tejido canceroso, en general. Se ha demostrado que los quelantes de metales generales afectan a las MMP en el espacio extracelular y, por tanto, al desarrollo de cáncer, por ejemplo, tal como se ha descrito por Rouffet *et al.* en *JACS* (2010), 132, 8232-8233.

Además, en los estados hipóxicos relacionados con el cáncer, el equilibrio del zinc juega un papel, por ejemplo, el zinc induce la acumulación de factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α , tal como se ha descrito por Chun *et al.* en *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000), 268, 652-656. Los quelantes de zinc pueden tener un efecto documentado y significativo sobre la muerte de las células cancerosas, tal como se ha descrito por Ding *et al.*, *Cancer Letters* (2008), 271, 251-259, por Lee *et al.* en *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007), 362, 766-772 y por Zuo en *Journal of Cellular Biochemistry* (2012), 113, 2567-2575. En la última referencia, los derivados de N,N-bis(2-piridil-metil)-amina, que incluyen los quelantes de zinc bien descritos TPEN (N,N,N',N'-tetra(2-piridil-metil)-etilendiamina), inducen fuertemente la muerte de células cancerosas relacionada con el agotamiento de zinc celular y la desestabilización del inhibidor unido a X de la proteína de apoptosis (XIAP).

Sin embargo, estos agentes quelantes pueden no ser utilizados como agentes terapéuticos clínicamente debido a su lipofilia elevada (log P) y capacidad elevada para penetrar también células normales, induciendo una toxicidad general inaceptable. Estos agentes no tienen características estructurales o moleculares que proporcionen selectividad biológica para el órgano o área enferma diana.

Un área enferma especialmente importante es resistente a microbios. Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representan más de 13 millones de muertes al año, que incluyen casi dos tercios de toda la mortalidad infantil antes de los 5 años de edad. Existe una gran preocupación con respecto a enfermedades infecciosas nuevas y reemergentes, en las que faltan terapias eficaces (informes de la Organización Mundial de la Salud 1999, 2012 y 2014).

La resistencia antimicrobiana está aumentando y afecta a una gama muy amplia de enfermedades humanas, que incluyen la tuberculosis, el cólera, la malaria y el SIDA. Es particularmente preocupante el número de patógenos humanos que desarrollan resistencia a múltiples fármacos para los antibióticos convencionales y se estima que la carga de resistencia superará, por ejemplo, la del cáncer de cuello uterino (de Kraker MEA. *et al.*, *PLoSMed.* (2011), e1001104, y el cáncer en su conjunto para el 2050 (O'Neill J. *Tackling Drug-Resistant Infections. Final report and recommendations*).

La introducción de nuevos derivados más potentes de antibióticos existentes proporciona solo soluciones temporales, ya que los mecanismos de resistencia existentes se adaptan rápidamente para acomodar los nuevos derivados (Theuretzbacher U. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2011), 11, 433-438). Aunque las bacterias gram-positivas resistentes representan una amenaza significativa, la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) de patógenos gram-negativos habituales, tales como *Escherichia coli*, es motivo de especial preocupación. La panresistencia o resistencia extrema a los fármacos son ahora términos utilizados habitualmente para describir aislados clínicamente importantes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae* que son resistentes a prácticamente todos los antibióticos (Patel *et al.*, *Front. Microbiol.* (2013), 4, 48). Desafortunadamente, hay pocos agentes antimicrobianos, si es que hay alguno, eficaces contra bacterias gram-negativas en ensayos clínicos en fase 1 o que entren en los mismos que aborden esta necesidad crítica (Butler MS. *Et al.*, *J. Antibiotics* (2013), 66, 571-591).

Una característica importante de las bacterias, especialmente las bacterias gram negativas, es que tienen dos membranas celulares, una membrana más permeable externa y una membrana celular interna. Un grupo importante de enzimas implicadas en la resistencia a antimicrobianos son las β -lactamasas (Bush K. *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* (2011), 65, 455-478). Se excretan en el volumen entre estas membranas, el espacio periplásmico, de este modo, este espacio es más accesible, por ejemplo, para los fármacos.

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos que comprometen la eficacia de las β -lactamas, nuestro grupo más grande y pilar de la quimioterapia antimicrobiana durante más de 70 años. Claramente, existe la necesidad de inhibidores dirigidos contra estas clases de enzimas que restaurarán la actividad de sus sustratos: antibióticos que sean baratos, no tóxicos y normalmente eficaces. Los inhibidores de serina β -lactamasa (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) han sido un éxito fenomenal en la prolongación de la vida terapéutica de los antibióticos β -lactámicos y también se utilizan como herramientas de diagnóstico en laboratorios clínicos microbiológicos de todo el mundo. Por el contrario, no hay ningún inhibidor clínico disponible para las metalo- β -lactamasas (MBL; Drawz et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2014), 58, 1835-1846). Las últimas se han convertido actualmente en una de las familias clínicamente más importantes de β -lactamasas que muestran una diseminación global.

Las β -lactamasas son el mecanismo de resistencia más prevalente y clínicamente importante que inactivan β -lactamas mediante hidrólisis. Se clasifican según criterios de secuencia (clase A, B, C y D de Ambler) y se pueden agrupar estructuralmente en dos superfamilias; las serina β -lactamasas (clases A, C y D) y MBL (clase B). A diferencia de las serina β -lactamasas, que se caracterizan por un resto de serina en el sitio activo, las MBL requieren cationes divalentes, generalmente zinc, como cofactor metálico de la actividad enzimática (Palzkill T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2013), 91-404).

Las MBL pertenecen a un gran grupo de proteínas que solo se encuentran en bacterias y, al igual que las proteínas de unión a penicilina (PBP), tienen la capacidad de interactuar con β -lactamas. Entre los ejemplos de PBP y enzimas que se unen a β -lactamas se encuentran MBL, proteína similar a serina β -lactamasa (LACTB), D,D-transferasa, D-Ala(D,D)-carboxipeptidasa, las D-Alanil-D-alanina dipeptidasas VanA, VanX, VanY y otras, tal como se ha revisado por Sauvage E. et al. en *FEMSMicrobiol. Rev.* (2008), 32, 234-258. Esta clase de proteínas solo se encuentra en biología bacteriana. Entre los ejemplos de compuestos que tienen afinidad por las PBP se encuentran los antibióticos β -lactámicos. Las β -lactamas han sido el ancla histórica de la quimioterapia antibacteriana e incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas (Bush K. et al, *Annu. Rev. Microbiol.* (2011), 65, 455-478).

Las MBL están emergiendo como una de las familias de β -lactamasas clínicamente más importantes (Patel et al., *Front. Microbiol.* (2013), 4, 48, Walsh et al, *Int. J. Antimicrob. Agents* (2010), S8-S14) por las siguientes razones: las MBL clínicamente más importantes, los grupos IMP, VIM, GIM y NDM, están ahora muy extendidas en una variedad de especies gram-negativas. En particular, las enzimas VIM y NDM han surgido como las MBL dominantes. La diseminación mundial sin precedentes de NDM destaca la enormidad del problema. Desde el primer informe en 2008, la NDM se ha identificado en Australia, África, América del Norte, Asia y muchos países europeos (Johnson AP. et al, *J. Med. Microbiol.* (2013), 62, 499-513). Es preocupante que la NDM se encuentre en numerosas especies gram-negativas y en el medio ambiente (Walsh TR. et al, *Lancet Infect. Dis.* (2011), 11, 355-362).

Los inhibidores de éxito de las serina β -lactamasas de clase A están clínicamente disponibles, pero carecen de actividad inhibidora contra MBL (Drawz SM. et al., *Clin. Microbiol. Rev.* (2010), 23, 160-201). Inspirados por el éxito comercial del paradigma de la Augmentina (ácido clavulánico, un sustrato suicida para serina β -lactamasas, y amoxicilina), varios grupos de investigación se han centrado en enfoques similares para desarrollar inhibidores, pero aún no hay moléculas que combinen potencia con actividad contra múltiples dianas de MBL que hayan alcanzado los ensayos clínicos (Drawz SM. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014).

Para las tres MBL clínicamente más amenazantes, los grupos IMP, NDM y VIM, se ha descrito la mayoría de los inhibidores para IMP-1, mientras que se encuentran pocos inhibidores para VIM-2 y NDM. Para NDM, se ha identificado un producto natural fúngico, la aspergilomarasmina A, como inhibidor de MBL y ha mostrado actividad *in vivo* en modelos en ratón (King AM. et al. *Nature* (2014), 510, 503-506). Sin embargo, se requieren dosis relativamente elevadas de aspergilomarasmina A para revertir la resistencia a carbapenemas. Otras opciones terapéuticas (Martínez, *Future Med. Chem.* (2012), 4 (3), 347-59) incluyen la utilización de terapia con tri- β -lactama que incorpora una monobactama; sin embargo, las MIC no son impresionantes y su actividad *in vivo* se ve seriamente comprometida por el inóculo bacteriano (Page et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2011), 66, 867-73). Por tanto, existe una gran necesidad clínica de un inhibidor de MBL.

Los antibióticos β -lactámicos importantes son las clases de penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Se ha descrito que muchos compuestos tienen actividades inhibitorias de MBL. En las Patentes WO 98/117639, WO 97/30027, WO 98/40056, WO 98/39311 y WO 97/110225, se ha descrito una clase de derivados de β -tiopropionil-aminoácidos como inhibidores contra las MBL.

Otras clases de compuestos que pueden actuar como inhibidores de MBL son tioésteres (*Biol. Pharm. Bull.* (1997), 20, 1136; *FEMS Microbiology Letters* (1997), 157, 171; *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997), 41, 135; *Chem. Commun.* (1998), 1609; *Biochem.* (1998), 1, 331, 703; Patente WO 00/076962) y derivados del ácido succínico (Patentes WO 01/030148 y WO 01/030149).

En las bacterias, se lleva a cabo la detección de zinc por los reguladores de diferentes familias, que incluyen SmtB/ArsR, MerR, TetR, MarR, y la familia Fur (Napolitano et al., Journal of Bacteriology (2012), 2426-2436). En algunos casos, los inhibidores de MBL contienen un grupo de unión a Zn^{2+} que puede interactuar fuertemente con el ion o iones metálicos centrales. Por tanto, en la técnica anterior, se ha demostrado que los compuestos que se unen a iones metálicos, los denominados “quelantes” metálicos, afectan a los mecanismos biológicos bacterianos. El término “quelante” se refiere al término griego “chelos” que indica una pinza de cangrejo que se une un objeto a través, como mínimo, de dos puntos de contacto. El experto en la materia entenderá la variedad de sustancias descritas en la técnica anterior capaces de quelar iones metálicos y seleccionará un quelante apropiado para diferentes propósitos. Entre los ejemplos se encuentran quelantes que comprenden variaciones de grupos amino y grupos hidroxilo, por ejemplo, 1,10-fenantrolina, clioquinol, 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinona (DMHP), 1,2-dietil-3-hidroxi-4-piridinona (DEHP), deferasirox. En la técnica anterior, se han descrito quelantes de zinc como inhibidores de múltiples enfermedades de manera simultánea, por ejemplo, en las Patentes WO 2006/177660, WO 2001/60349, US 6,410,570 y WO 2009/140215.

Los quelantes de zinc también se han sugerido como inhibidores de la formación de biopelículas, por ejemplo, en las Patentes WO 2011/63394 y WO 2009/155088, o como agentes antivirales, por ejemplo, en las Patentes WO 2004/71425 y WO 2006/43153. Se sabe en la técnica anterior que las dianas bacterianas dependientes de zinc atractivas implicadas en los mecanismos de resistencia son inhibidas por agentes quelantes de zinc. Tres ejemplos son el sistema de captación de zinc bacteriano estrictamente regulado Zur (Ellison et al. en PLOS ONE (2013), 8, e75389), biopelículas (Conrady et al., PNAS (2008), 105 (49), 19456-19461) y la peptidasa HmrA en MRSA. Todas estas dianas son inhibidas por quelantes de zinc tóxicos no selectivos del estado de la técnica como TPEN, EDTA o las fenantrolinas.

La formación de biopelículas es un importante mecanismo de resistencia bacteriana que contribuye a la creciente preocupación terapéutica a nivel mundial. Las biopelículas consisten en sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Son polímeros de carbohidratos hidrófilos naturales de alto peso molecular secretados por microorganismos a su entorno y determinan las propiedades fisicoquímicas de una biopelícula. La formación de biopelículas con las infecciones nosocomiales producidas por especies gram-negativas resistentes a múltiples fármacos que producen metalo-p-lactamasas, por ejemplo, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, es problemática, ya que afectan a todas las actividades habituales en los hospitales, como la cirugía y la cicatrización de heridas. De particular interés es *Acinetobacter baumannii* productor de MBL, tal como se ha descrito por Peymani et al., Jpn. J. Infect. Dis. (2011), 64, 69-71. También se descubrió que la producción de MBL era significativamente más elevada en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* positivos en biopelículas, tal como se ha descrito por Heydari et al., Jundishapur J Microbiol. (2015), 8 (3), e15514. Por tanto, existe una necesidad médica de nuevos fármacos con una toxicidad y selectividad aceptables que sean activos contra bacterias gram-negativas que alberguen MBL.

Otro ejemplo de los mecanismos vitales dependientes de zinc es la utilización bacteriana de las bombas de flujo de salida (Nikaido, et al., FEMS Microbiology Reviews (2012), 36, 340-363), que adaptan casi todos los antibióticos modernos como sustratos, excretándolos de la célula bacteriana.

Otro ejemplo es la desacetilasa dependiente de cinc LpxC (Liang et al., J. Med. Chem. (2013), 56, 6954-6966). Otro ejemplo es la función ribosómica bacteriana altamente dependiente de zinc (Graham et al., J. Biol. Chem. (2009), 284, 18377-18389). Este último utiliza 8 átomos de zinc en la unidad ribosómica 70S. La administración de zinc también se ha utilizado como terapia contra infecciones bacterianas, por ejemplo, como diferentes formulaciones de óxido de zinc, ZnO, a menudo como material particulado, por ejemplo, tal como se ha descrito por Shi et al., Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment (2014), 31 (2), 173-186. Sin embargo, cuando existe la necesidad de proporcionar zinc a los compartimentos protegidos por membranas biológicas, el ZnO en partículas tiene una baja penetración sobre dichas membranas.

Los grupos de quelantes de metales más ampliamente utilizados son los denominados aminopolicarboxilatos, denominados en lo sucesivo quelantes de APC, que comprenden variaciones de grupos amino alifáticos, grupos hidroxialquilo y grupos carboxialquilo. Entre los ejemplos habituales se encuentran ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido etilendiamino-*N,N'*-diacético-*N,N'*-di- β -propiónico (EDPA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido trans-1,2-ciclohexano-diamino-*N,N,N',N'*-tetraacético (CyDTA), carnosina, dihidroxietilglicina (DHEG), ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-*N,N,N',N'*-tetraacético (DTPA-OH), ácido etilendiamino-*N,N'*-diacético (EDDA), ácido etilendiamino-*N,N'*-dipropiónico (EDDP), ácido *N*-hidroxi-etilendiamino-*N,N',N'*-triacético (EDTA-OH), ácido *N,N'*-bis(2-hidroxibencil)etilendiamino-*N,N'*-diacético (HBED), ácido hexametileno-1,6-diaminotetraacético (HDTA), ácido hidroxietiliminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), metil-EDTA, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido nitrilotripropiónico (NTP), ácido trietilentetraaminohexaacético (TTHA), etilendiaminodi(ácido *O*-hidroxifenilacético) (EDDHA), ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), ácido trans-1,2-ciclohexanodiaminotetraacético (CDTA), ácido *N*-(2-hidroxietil)etilendinitrilotriacético (HEDTA), ácido *N*-(2-hidroxietil)iminodiacético (HEIDA), ácido cítrico, 7,19,30-trioxa-1,4,10,13 1,11,11] pentatriacontano (*O*-Bistren), penicilamina, quelantes que también comprenden azufre o fósforo, por ejemplo, dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), etilmaltol (EM), sal potásica del ácido 4-(6-metoxi-8-quinolil)-aminosulfonil)benzoico (TFLZn), ditionozona, *N*-(6-metoxi-8-quinolil)-para-toluenosulfonamida (TSQ), ácido

etilendiamino-N,N'-bis(metilfosfónico) (EDDPO), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTPO), ácido nitrilotrimetilenfosfónico (NTPO), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), derivados carboximetílicos de 1,4,7-triazaciclonoanano o 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano como DOTA, DO3A o NOTA, deferoxamina, dimercaprol, ácido dimercaptosuccínico y ácido etidróico.

Los quelantes de APC son bien conocidos en la técnica anterior, por ejemplo, en Smith, R. M.; Martell, A. E. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, versión 2.0; Departamento de Comercio de EE. UU.: Gaithersburg, MD, 1995. Son agentes quelantes no selectivos y, a menudo, fuertes sin restos de reconocimiento molecular que afecten a su afinidad por las dianas biológicas deseadas relevantes para la enfermedad. Por tanto, normalmente, también tienen un efecto antibacteriano que está bien descrito en la técnica anterior, por ejemplo, la utilización de quelantes de metales contra virus o bacterias en las Patentes WO 2011/63394, WO 2004/71425, WO 2006/109069, WO 2001/60349, US 6,410,570, US 2003/0225155, WO 2006/43153 y WO 2006/43153. También se han sugerido quelantes de zinc como agentes antibacterianos, por ejemplo, en la Patente WO 2009/140215, como inhibidores de la formación de biopelículas, por ejemplo, en las Patentes WO 2011/63394 y WO 2009/155088, o como agentes antivirales, por ejemplo, en las Patentes WO 2004/71425 y WO 2006/43153, pero en estos casos, los compuestos reivindicados carecen de selectividad biológica o quelante de metales o tienen una solubilidad elevada en grasas, un logP elevado y, por lo tanto, son, a menudo, tóxicos para las células eucariotas.

Esta falta de selectividad puede conducir a una toxicidad no deseada y a otros efectos biológicos cuando se tratan infecciones específicas por un organismo diana en un organismo huésped, por ejemplo, cuando es deseable afectar sólo a microorganismos específicos, a la vez que se desea un efecto toxicológico bajo en el organismo huésped u otras especies (que no son una diana para el tratamiento en cuestión). Un acontecimiento adverso particularmente grave ejercido por agentes quelantes no selectivos como los agentes quelantes APC son los efectos hemolíticos, incluso a bajas concentraciones. Un informe final sobre la evaluación de seguridad de EDTA, EDTA cálcico disódico, EDTA diamónico, EDTA dipotásico, EDTA disódico, TEA-EDTA, EDTA tetrasódico, EDTA tripotásico, EDTA trisódico, HEDTA y HEDTA trisódico, ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, confirma que estos tienen un efecto de hinchamiento en los eritrocitos después de concentraciones de inyecciones intravenosas por debajo de 4 μ M, lo que finalmente conduce a hemólisis. Esto está bien descrito en la técnica anterior, por ejemplo, por Witeska et al., en Turk. J. Vet. Anim. Sci. (2011), 35 (2), 99-104, o por Igbokwe et al., Journal of basic and clinical physiology and pharmacology (2015), 26 (2), 171-9.

El EDTA también es un potente anticoagulante debido a su quelación no selectiva de metales, lo que da lugar a la quelación, por ejemplo, de Ca^{2+} . Sin embargo, esta capacidad de unirse al calcio puede provocar hipocalcemia, una afección mortal que hizo que la US Food and Drug Administration (FDA) retirara la aprobación comercial del EDTA disódico debido a la muerte de tres pacientes relacionados con la hipocalcemia, tal como se ha descrito por P.M. Wax, J. Med. Toxicol. (2013) 9: 303-307. Un informe de R.S. Lanigan y T. Yamarik en International Journal of Toxicology, (2002), 21 (Supl. 2), 95-142, concluyó que el EDTA, al ser un agente quelante más débil que otros PAC, por ejemplo, DTPA o DOTA, es un compuesto con efectos biológicos incompatibles con las demandas de agentes seguros utilizados clínicamente, en especial para inyección intravenosa.

Recientemente se ha utilizado el EDTA como un adyuvante en una formulación denominada Elore o Sulbactamax que comprende el antibiótico β -lactámico ceftriaxona. La sulbactama y el EDTA administrados por vía intravenosa tienen un buen efecto antibacteriano, por ejemplo, tal como se ha descrito por Attili et al. en International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (2015), 6 (6), 2569-2578. Sin embargo, no se menciona ninguna descripción de estudios de los efectos hemolíticos o anticoagulantes de la formulación.

Las dianas bacterianas dependientes de zinc atractivas implicadas en los mecanismos de resistencia son conocidas en la técnica anterior por ser inhibidas por agentes quelantes de zinc. Un ejemplo de mecanismos vitales dependientes de zinc es la utilización bacteriana de las bombas de flujo de salida (véase Nikaido et al., FEMS Microbiology Reviews (2012), 36, 340-363), adaptando casi todos los antibióticos modernos como sustratos, excretándolos de la célula bacteriana.

Los ligandos basados en las unidades de 2-piridil-metilo (véase el esquema 1) demuestran una selectividad notablemente elevada para los elementos del grupo IIB zinc y cadmio (Xu et al., JACS, (2010), 132, 601), aunque este último no es un ion metálico natural en sistemas biológicos. También se sugiere en la técnica anterior que los agentes quelantes de zinc actúan como inhibidores de MBL. En la Patente WO 2012/088283 se sugieren tiazolidinas y compuestos análogos como inhibidores de MBL junto con β -lactamas. La utilización del grupo di-picoilamina en quelantes de zinc no se menciona en el presente documento. Además, los valores de IC_{50} están por encima del intervalo micromolar en ensayos de MBL en la Patente WO 2012/088383.

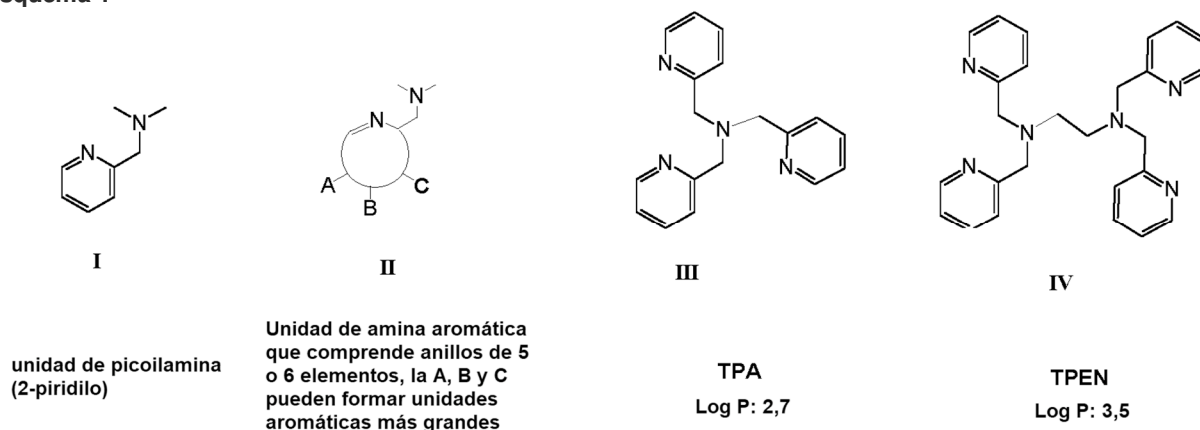
En Ganta et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2009), 19, 1618-1622, se ha descrito un grupo de compuestos que tienen un grupo hidroxamato como un resto quelante de zinc con afinidad por MBL. Sin embargo, el grupo hidroxamato es un grupo quelante no selectivo. En particular, su unión de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y también su unión de muchos otros iones metálicos hace que los ligandos de hidroxamato sean menos específicos y más propensos a la interacción con la biología humana, lo que conduce a una mayor toxicidad humana.

En las descripciones anteriores de la técnica anterior, no existe una orientación sobre cómo obtener los efectos selectivos de la terapia con quelación de zinc en el tejido diana, a la vez que la parte sana del organismo no se ve afectada por acontecimientos adversos graves. Del mismo modo, no existe una orientación sobre cómo evitar efectos tóxicos como la hemólisis por quelantes de metales, a la vez que se mantiene el efecto biológico deseado.

No solo una deficiencia de zinc puede provocar la función anormal de una célula, sino que también un exceso de zinc puede conducir a una funcionalidad celular anormal y una toxicidad inaceptable. Por tanto, existe una necesidad médica y tecnológica dentro de este sector de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico que aprovechen la toxicidad relacionada con el agotamiento incontrolado de zinc en tejidos y células sanos, a la vez que ejercen el efecto terapéutico deseado. Muchos de los estados patológicos en mamíferos relacionados con el desequilibrio de zinc son causados por una mayor concentración de zinc fuera de las células eucariotas en el espacio extracelular. A menudo, la enfermedad está relacionada con un exceso de zinc fuera de las células. Por tanto, existe una necesidad médica de nuevos agentes quelantes de zinc que tengan una baja capacidad para atravesar las membranas celulares eucariotas y que, al mismo tiempo, tengan una afinidad elevada y selectiva por zinc divalente.

Se ha descrito que quelantes de zinc lipófilos N,N,N-tris(2-piridilmetil)amina (TPA, estructura III, esquema 1) y N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN, estructura IV, esquema 1), muestran muchas actividades biológicas interesantes debido a sus propiedades quelantes de zinc, así como a su carácter lipófilo, lo que permite la capacidad de penetrar la membrana celular, por ejemplo, tal como se ha descrito por Huang et al., *Metalomics* (2013), 5, 648-655 y Donadelli et al. en *J. Cell. Biochem* (2008) 104, 202-212).

Esquema 1



En la TPA y la TPEN, la capacidad de unión a zinc se basa en la unión de todos los átomos de nitrógeno a los átomos metálicos. Se ha descrito ampliamente que tanto la TPA como la TPEN ejercen efectos citotóxicos sobre una serie de tipos de células debido a su alta lipofilia. La principal propiedad que afecta a la toxicidad de los agentes quelantes de zinc que tienen un logP relativamente elevado es la capacidad de unión al zinc, expresada como la constante de disociación, K_d , o expresada como $\log K_d$ o pK_d . Se sabe que la TPEN tiene un pK_d de aproximadamente 16, mientras que el pK_d de TPA es de aproximadamente 12.

Por tanto, la TPA y la TPEN no son adecuadas en sí mismas como fármacos potenciales, ya que son demasiado tóxicas para las células normales, tal como se ha descrito por Sheridan et al. en *In Vitro & Molecular Toxicology* (1998), 11 (2), 161-169 o por Huang et al., *Metalomics* (2013), 5, 648-655. Huang et al. describieron que los valores de EC_{50} fueron de $38 \pm 1 \mu M$ para TPA y $25 \pm 1 \mu M$ para TPEN en un ensayo de MTT en células HeLa. En las neuronas, es conocido que la TPEN es incluso más tóxica, y Canzoniero et al., *Neuropharmacology* (2003), 45, 420-428 describieron que la EC_{50} para TPEN en las neuronas fue de aproximadamente $5 \mu M$.

Por tanto, la toxicidad de los agentes quelantes selectivos de zinc es una combinación de su valor de logP elevado y su capacidad de unión al zinc, pK_d . Un valor elevado para ambos, evidentemente, da lugar a valores de EC_{50} de toxicidad inferior.

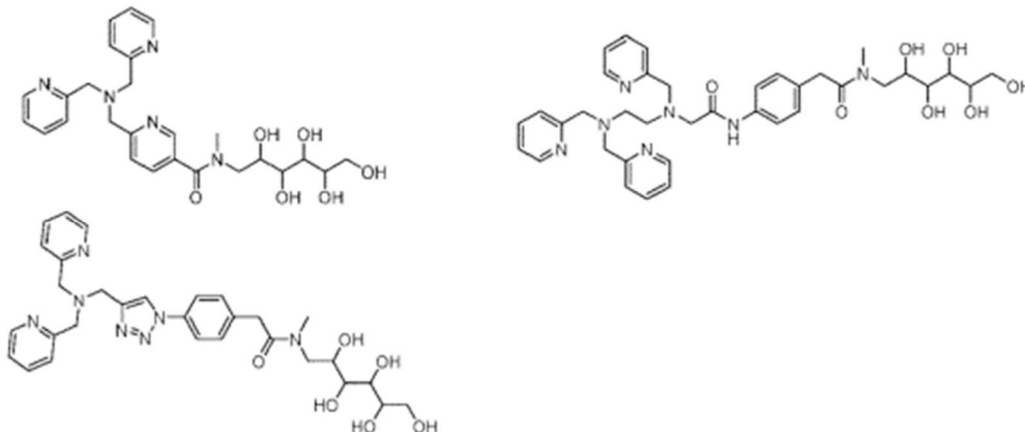
Los problemas de toxicidad se demuestran adicionalmente, por ejemplo, en Zuo en *Journal of Cellular Biochemistry*, (2012), 113, 2567-2575. La técnica anterior no enseña cómo sintetizar análogos o derivados, por ejemplo, de TPEN con menor toxicidad que la propia TPEN, según el esquema 1.

De manera sorprendente, se ha descubierto ahora que, en las enfermedades definidas anteriormente, la concentración biológica de zinc puede verse afectada, en general, utilizando de forma segura un nuevo resto de complejación con zinc unido a un resto molecular W que es un grupo hidrófilo no peptídico, tal como se define en el presente documento.

Características de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que comprenden uno o más restos quelantes de zinc lipófilos unidos de manera covalente a uno o más restos hidrófilos, en los que dichos restos quelantes de zinc son selectivos para iones Zn^{2+} y en los que dichos restos hidrófilos se seleccionan entre grupos monoméricos, oligoméricos y poliméricos hidrófilos no peptídicos. Se refiere, además, a la utilización de dichos compuestos en terapia, en particular, en el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones asociadas con un desequilibrio en la homeostasis del zinc, y como adyuvantes en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas.

- En un aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto seleccionado entre cualquiera de los siguientes, sus estereoisómeros, y sus sales aceptables farmacéuticamente:



- En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto, tal como se ha definido anteriormente, junto con uno o más portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente, y, de manera opcional, que incluye uno o más antioxidantes.

- En otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto o composición, tal como se ha definido anteriormente, para su utilización en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de dicho compuesto o composición en combinación con (de manera simultánea, por separado o de manera secuencial) un antibiótico β -lactámico.

- En otro aspecto, la presente invención da a conocer una formulación farmacéutica que comprende un compuesto, tal como se ha definido anteriormente, junto con un antibiótico β -lactámico y, de manera opcional, uno o más portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente.

- En aún otro aspecto, la presente invención da a conocer un kit que comprende:

- (i) un primer recipiente que contiene un compuesto, tal como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica, tal como se ha definido anteriormente; y
- (ii) un segundo recipiente que contiene un antibiótico β -lactámico.

En las reivindicaciones dependientes se presentan otras características ventajosas de la presente invención.

También se da a conocer en el presente documento lo siguiente:

1. Un compuesto que comprende uno o más (por ejemplo, uno o dos) restos quelantes de zinc lipófilos unidos de manera covalente a uno o más (por ejemplo, uno, dos o tres) restos hidrófilos, en el que dichos restos quelantes de zinc son selectivos para iones Zn^{2+} y en el que dichos restos hidrófilos se seleccionan entre grupos monoméricos, oligoméricos y poliméricos hidrófilos no peptídicos.

2. Un compuesto, según la realización 1, que tiene la fórmula general I:



(en la que Q representa un resto quelante de zinc lipófilo que es selectivo para iones Zn^{2+} ;

cada L, que puede ser el mismo o diferente, es un enlace covalente o un enlazador;

cada W, que puede ser el mismo o diferente, es un grupo monomérico, oligomérico o polimérico hidrófilo no peptídico, de manera preferente un grupo hidrófilo no peptídico que comprende átomos donadores de enlaces de

hidrógeno y aceptores de enlaces de hidrógeno seleccionados entre H, N, O, S y P, por ejemplo, un grupo hidrófilo no peptídico que comprende uno o más grupos funcionales seleccionados entre -OH, -SH, -CO₂H, -SO₃H, -PO₃H₂, -B(OH)₂ y grupos alifáticos o aromáticos que contienen nitrógeno; y x es un número entero de 1 a 3)

o un estereoisómero, sal aceptable farmacéuticamente, o un profármaco del mismo.

3. Un compuesto, según la realización 2, que es un compuesto de fórmula Q-L-W, en la que Q, L y W son como se definen en la realización 2.

4. Un compuesto, según la realización 1, que tiene la fórmula general II:

Q-L-W-L-Q

(en la que cada Q, que puede ser el mismo o diferente, representa un resto quelante de zinc lipófilo que es selectivo para iones Zn²⁺; cada L, que puede ser el mismo o diferente, es un enlace covalente o un enlazador; y W es un grupo monomérico, oligomérico o polimérico hidrófilo no peptídico, por ejemplo, según la realización 2)

o un estereoisómero, sal aceptable farmacéuticamente o profármaco del mismo.

5. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene un valor de logP calculado, denominado clogP, que es inferior a 2, de manera preferente, inferior a 1, de manera más preferente, negativo.

6. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la constante de disociación, denominada K_d, para el resto quelante de zinc con Zn²⁺ es inferior o igual a 10⁻¹⁰ M, de manera preferente, inferior o igual a 10⁻¹² M, por ejemplo, inferior o igual a 10⁻¹⁴ M.

7. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene una selectividad para quelar Zn²⁺ sobre iones metálicos endógenos que es superior a 10, de manera preferente, igual o superior a 11, en el que dicha selectividad para quelar Zn²⁺ sobre iones metálicos endógenos, denominada Zn_{sel}, se expresa según la siguiente ecuación:

$$Zn_{sel} = \log(K_{dZn^{2+}} / K_{dCa^{2+}}) = pK_{dZn^{2+}} - pK_{dCa^{2+}}$$

en la que K_{dZn²⁺} es la constante de disociación del compuesto con Zn²⁺

K_{dCa²⁺} es la constante de disociación del compuesto con Ca²⁺

pK_{dZn²⁺} es -logK_{dZn²⁺}

pK_{dCa²⁺} es -logK_{dCa²⁺}

8. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene una toxicidad *in vitro* en células humanas, expresada como la concentración inhibidora IC₅₀ para la función mitocondrial de células eucariotas, que es superior a 8 μM, de manera preferente, superior a 10 μM, de manera preferente, superior a 20 μM, de manera preferente, superior a 50 μM, de manera preferente, superior a 100 μM, por ejemplo, superior a 200 μM.

9. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene una puntuación terapéutica en la regulación de la homeostasis del zinc en una enfermedad seleccionada entre cáncer, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, edema, diabetes e intoxicación por un metal pesado, que es igual o superior a -0,8, de manera preferente, igual o superior a 0, de manera preferente, igual o superior a 0,5, de manera preferente, igual o superior a 1, por ejemplo, igual o superior a 1,5, en el que la puntuación terapéutica del compuesto, denominada TS_x, se expresa según la siguiente ecuación:

$$TS_x = \log(TI \times (1 + \tanh(Zn_{sel} - 8)) \times (1 - \tanh(clogP - 2)) \times (1 + \tanh((pK_d - 8))))$$

en la que TI es la proporción de índice terapéutico, que es el cociente IC₅₀/MEC, en el que MEC es la concentración mínima para que el compuesto tenga un efecto sobre la enfermedad; y Zn_{sel}, clogP y pK_d se definen en las realizaciones 5 a 7.

10. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene una actividad antibiótica adyuvante cuando se administra junto con un agente antibiótico y que tiene una puntuación antibacteriana igual o superior a -0,8, de manera preferente, igual o superior a 0, igual o superior a 0,5, por ejemplo, igual o superior a 1, o igual o superior a 1,5, en el que la puntuación antibacteriana del compuesto, denominada AS_x, se expresa según la siguiente ecuación:

$$AS_x = \log(TI \times (1 + \tanh(Zn_{sel} - 8)) \times (1 - \tanh(\text{clogP} - 2)) \times (1 + \tanh((pKd - 8))))$$

en la que TI es la proporción de índice terapéutico, que es el cociente IC_{50}/MIC , en el que MIC es la concentración del compuesto que proporciona una concentración mínima inhibidora para el agente antibiótico de 2 o menos;

y Zn_{sel} , clogP y pKd son según las realizaciones 5 a 7.

11. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 10, en el que el resto quelante de zinc (por ejemplo, Q) es un resto molecular que tiene la siguiente fórmula:



en la que m es un número entero de 2 a 10, de manera preferente, de 2 a 6, por ejemplo, 3, 4, 5 o 6;

cada grupo C es un grupo funcional que puede ser el mismo o diferente que tiene propiedades de base de Lewis y que posee, como mínimo, un heteroátomo seleccionado entre N, S, O o P, de manera preferente, N, capaz de donar electrones a un átomo de zinc;

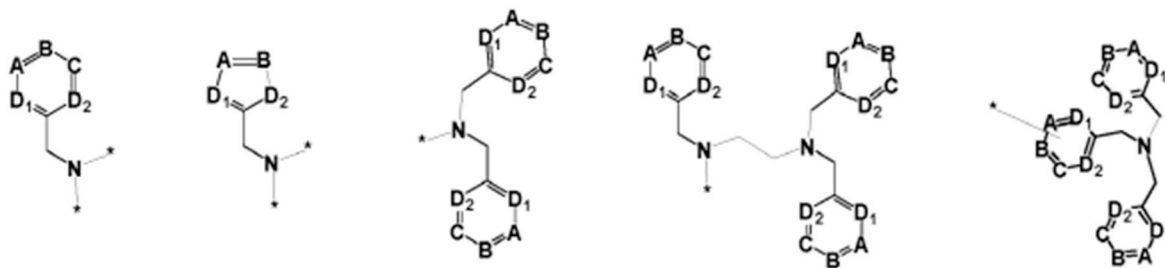
R_C es una unidad que une los grupos C que puede contener hasta 50 átomos, de manera preferente, de 2 a 10 átomos, por ejemplo, de 4 a 8 átomos, y que, de manera opcional, puede portar uno o más grupos funcionales; y R_L es un enlace covalente al resto de la molécula, por ejemplo, al enlazador, L.

12. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el resto quelante (por ejemplo, Q) comprende, como mínimo, uno, de manera preferente, dos o más (por ejemplo, 2, 3 o 4), anillos heterocíclicos insaturados, de manera opcional sustituidos, por ejemplo, anillos heterocíclicos de 5 o 6 elementos (dichos anillos incluyen, de manera preferente, como mínimo, un heteroátomo seleccionado entre N, S y O, de manera preferente N); en el que cualquiera de los sustituyentes opcionales se pueden seleccionar entre alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , halógeno, nitro, ciano, amina y amina sustituida.

13. Un compuesto, según la realización 12, en el que el resto quelante comprende uno o más grupos heteroarilo, de manera opcional sustituidos, de manera preferente, dos o más grupos heteroarilo, por ejemplo, grupos en los que cada anillo heteroarilo tiene, como mínimo, un átomo de nitrógeno en la estructura del anillo (por ejemplo, pirideno, en especial piridina no sustituida).

14. Un compuesto, según la realización 13, en el que el resto quelante deriva de ácido picolínico y sus derivados (por ejemplo, de picroilamina), de manera preferente, en el que el resto quelante comprende dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) unidades de 2-piridil-metilo.

15. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el resto quelante de zinc comprende uno o más de los siguientes grupos:



en los que en cada estructura:

D_1 y D_2 se seleccionan de manera independiente entre $-CH-$ y N, con la condición de que, como mínimo, uno de D_1 y D_2 sea N;

A, B y C son de manera independiente $-CH-$ o un heteroátomo (por ejemplo, N), de manera preferente, $-CH-$, o A, B y C pueden ser cabezas de puente que participan en anillos condensados, formando así sistemas policíclicos; y

* indica el punto (o puntos) de unión del grupo al resto de la molécula.

16. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático en el compuesto es igual o superior al 25 %, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 50 % y el porcentaje de átomos donadores de oxígeno es igual o inferior al 25 % (basándose en el número total de átomos donadores).

17. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que de los átomos donadores que están presentes, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático es igual o superior al 50 %, el porcentaje

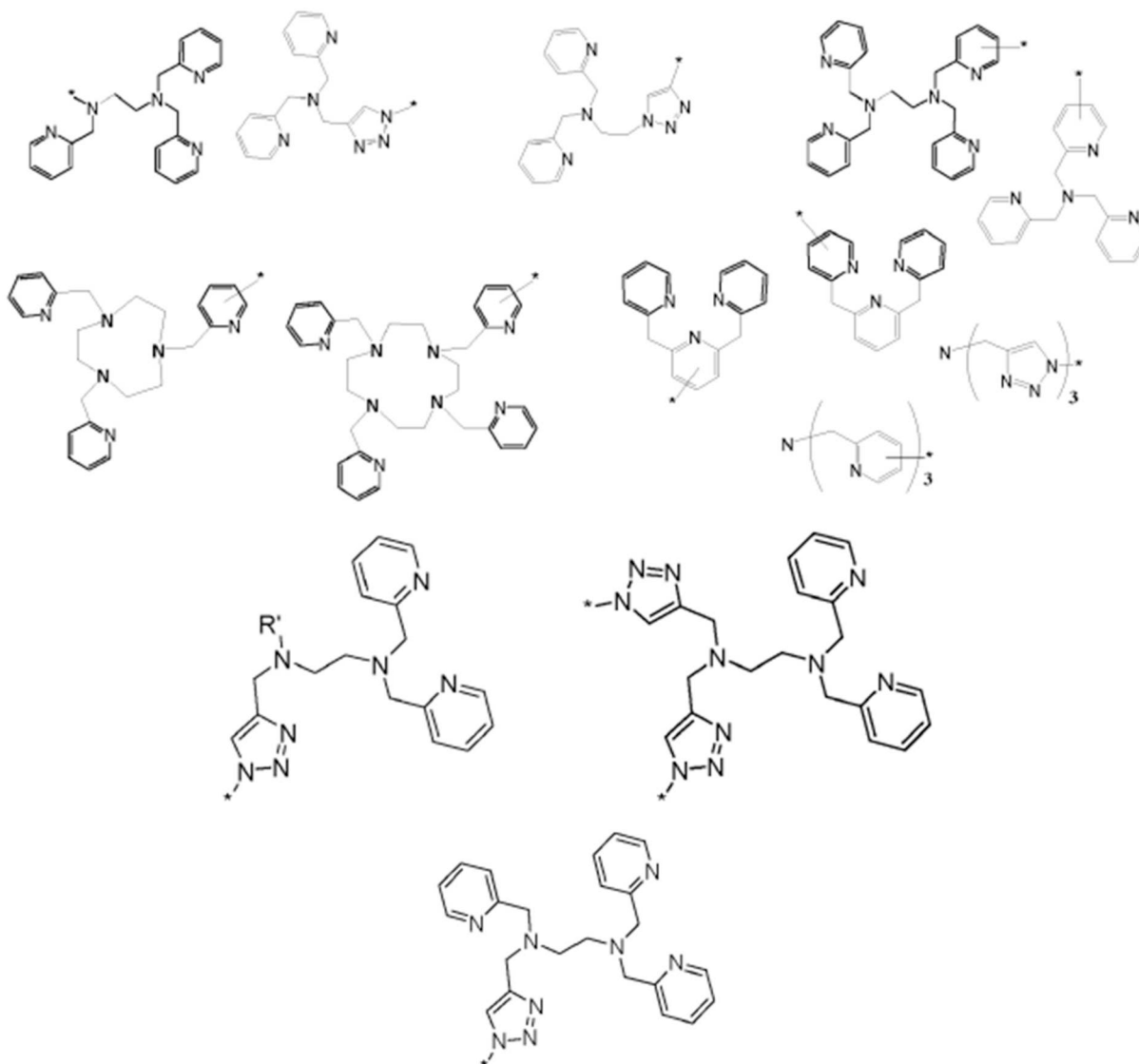
de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 25 % y el porcentaje de átomos donadores de oxígeno es igual o inferior al 25 %.

5 18. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que de los átomos donadores que están presentes, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático es igual o superior al 60 %, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 20 % y el porcentaje de átomos donadores de oxígeno es igual o inferior al 20 %.

10 19. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que de los átomos donadores que están presentes, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático es igual o superior al 66 %, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 33 % y el porcentaje de átomos donadores de oxígeno es igual al 0 %.

15 20. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que de los átomos donadores que están presentes, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático es igual o superior al 75 %, el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 25 % y el porcentaje de átomos donadores de oxígeno es igual al 0 %.

20 21. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que el resto quelante de zinc comprende uno de los siguientes grupos:



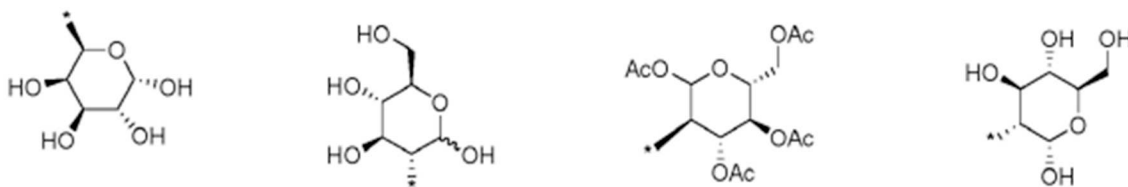
25 en los que * indica el punto (o puntos) de unión del resto quelante al resto de la molécula, por ejemplo, a un grupo enlazador L, tal como se define en el presente documento; y

30 R', cuando está presente, es H o alquilo C₁₋₆, por ejemplo, alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo.

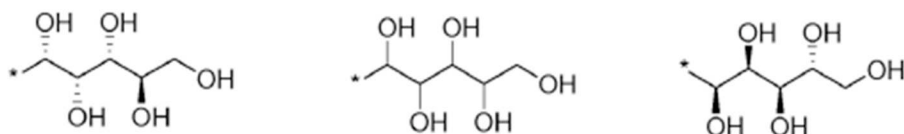
22. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 2 a 21, en el que el enlazador L comprende un enlace o una cadena de alquileo (de manera preferente, un alquileo C₁₋₈, por ejemplo, un alquileo C₁₋₆), de manera opcional sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilo C₁₋₃, -O-alquilo (C₁₋₃) y -OR' (en el que R' es H o alquilo C₁₋₆, de manera preferente, alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo); y en el que uno o más grupos -CH₂- (por ejemplo, todos los grupos -CH₂-) de la cadena de alquileo pueden estar sustituidos con un grupo seleccionado de manera independiente entre -O-, -CO-, -NR''- (en el que cada R'' es, de manera independiente, H o alquilo C₁₋₆, de manera preferente, alquilo C₁₋₃, por ejemplo metilo) y un anillo carbocíclico o heterocíclico de manera opcional sustituido (que incluye anillos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y fusionados; cualquiera de los sustituyentes opcionales se puede seleccionar entre alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, halógeno, nitro, ciano, amina y amina sustituida).
23. Un compuesto, según la realización 22, en el que dicho enlazador está interrumpido por un anillo arilo o heteroarilo de manera opcional sustituido, de manera preferente un anillo fenilo o triazol de manera opcional sustituido, por ejemplo, un anillo fenilo no sustituido.
24. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 2 a 23, en el que el enlazador L comprende uno o más átomos donadores de electrones capaces de quelarse con un átomo de zinc, por ejemplo, uno o más átomos capaces de soportar la capacidad quelante de metales del grupo Q.
25. Un compuesto, según la realización 24, en el que dichos átomos donadores de electrones son átomos de nitrógeno, por ejemplo, en el que dichos átomos se proporcionan en la cadena principal del enlazador o dentro de una o más estructuras de anillo de sustitución o interrupción.
26. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 2 a 21, en el que el enlazador L comprende un enlace o una cadena de alquileo C₁₋₈ (de manera preferente, una cadena de alquileo C₁₋₆, por ejemplo, una cadena de alquileo C₁₋₃), en el que uno o más grupos -CH₂- (por ejemplo, todos los grupos -CH₂-) de la cadena de alquileo están, de manera opcional, sustituidos con un grupo seleccionado, de manera independiente, entre -O-, -CO-, -NR''- (en el que cada R'' es, de manera independiente, H o alquilo C₁₋₆, de manera preferente, alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo) y un anillo de fenilo no sustituido.
27. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que cada resto hidrófilo es un grupo monomérico, oligomérico o polimérico no peptídico que comprende hasta 100 átomos en forma de grupos alifáticos, alicíclicos o aromáticos, lineales o ramificados, de manera opcional, sustituidos, que comprenden C, H y uno o más grupos funcionales que comprenden hidrógeno unido a un heteroátomo, que es un aceptor de enlaces de hidrógeno seleccionado entre los grupos N, O, S y P.
28. Un compuesto, según la realización 27, en el que dichos grupos funcionales se seleccionan entre -OH, -COOH, -SH, -SO₃H, -PO₃H₂, -B(OH)₂ o sales de los mismos, y grupos alifáticos que contienen nitrógeno o sales de los mismos.
29. Un compuesto, según la realización 27 o la realización 28, en el que cualquiera de los sustituyentes opcionales que pueden estar presentes se seleccionan entre alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, halógeno, nitro, ciano, amina y amina sustituida.
30. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que cada resto hidrófilo comprende uno o más de los siguientes grupos: un resto de azúcar, un ácido carboxílico o derivado del mismo (por ejemplo, un éster), un alcohol, una amina o un derivado sustituido de la misma, y un ácido borónico.
31. Un compuesto, según la realización 30, en el que el resto de azúcar puede ser un monosacárido, disacárido o polisacárido, o un amino azúcar, o un derivado del mismo (por ejemplo, un derivado acetilado).
32. Un compuesto, según la realización 31, en el que el resto de azúcar es un monosacárido cíclico o acíclico.
33. Un compuesto, según la realización 30, en el que el alcohol es un alcohol monoalcohol, dialcohol o trialcohol lineal o ramificado, por ejemplo, un alcohol lineal o ramificado de cadena corta (por ejemplo, C₁₋₆).
34. Un compuesto, según la realización 30, en el que la amina es lineal, ramificada o cíclica, de manera preferente, -NH₂, -NHR (en el que R es alquilo C₁₋₆, por ejemplo, alquilo C₁₋₃), piperazina o morfolina, de manera opcional, sustituidas (cualquier sustituyente opcional puede seleccionarse entre -OH y alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo).
35. Un compuesto, según la realización 30, en el que el ácido borónico es cíclico o acíclico.
36. Un compuesto, según la realización 35, en el que el grupo ácido borónico forma parte de un anillo de 6 elementos, de manera opcional, sustituido con uno o más grupos funcionales, por ejemplo, grupos carboxilo o derivados de los mismos.

37. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el resto hidrófilo o los restos hidrófilos (por ejemplo, W) se seleccionan entre los siguientes grupos:

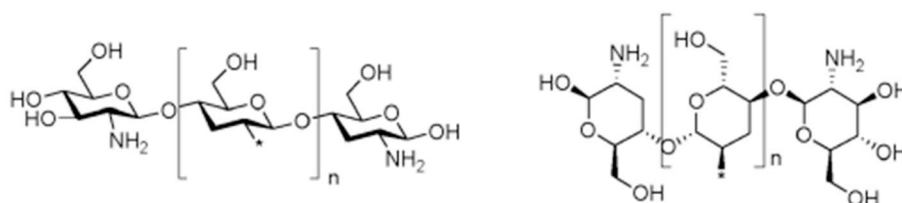
5 Azúcares (monoméricos, cíclicos):



10 Azúcares (monoméricos, acíclicos):



Azúcares (poliméricos):



15

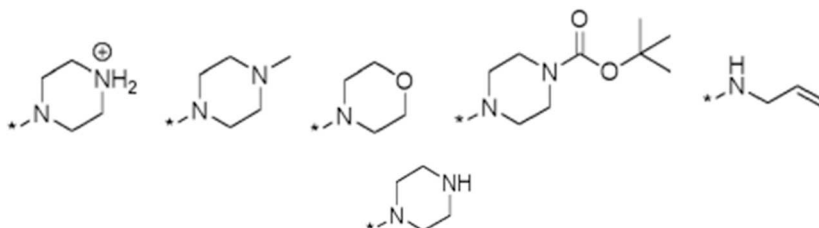
Ácidos carboxílicos y derivados:

20 $^*-\text{CO}_2\text{H}$
 $^*-\text{CO}_2^-$
 $^*-\text{CO}_2\text{X}$ (en el que X es un ion metálico monovalente, por ejemplo, Li^+ , Na^+ , K^+ o alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3})

25 Aminas y derivados:

$^*-\text{NH}_2$
 $^*-\text{NH}_3^+$
 $^*-\text{NH}_3^+\text{Y}^-$ (en el que Y es Cl^- , Br^- o I^-)
 $^*-\text{NHR}$ (en el que R es alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3} , por ejemplo metilo)

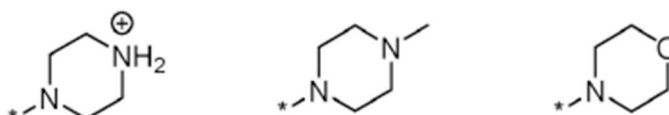
30



35 Entre los ejemplos preferentes de dichas aminas y sus derivados se incluyen:

$^*-\text{NH}_2$
 $^*-\text{NH}_3^+$
 $^*-\text{NHR}$ (en el que R es alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3} , por ejemplo metilo)

40

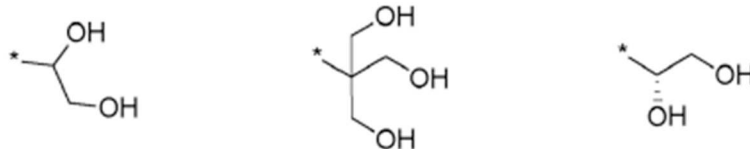


Alcoholes y derivados:

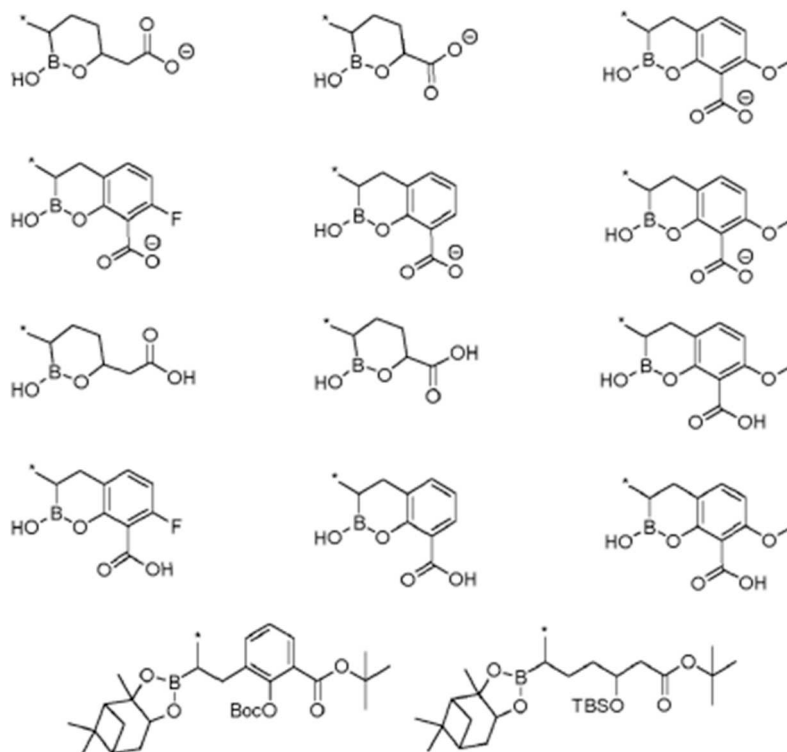
-OH

-OX (en el que X es un ión metálico monovalente, por ejemplo, Li^+ , Na^+ , K^+ o alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3})

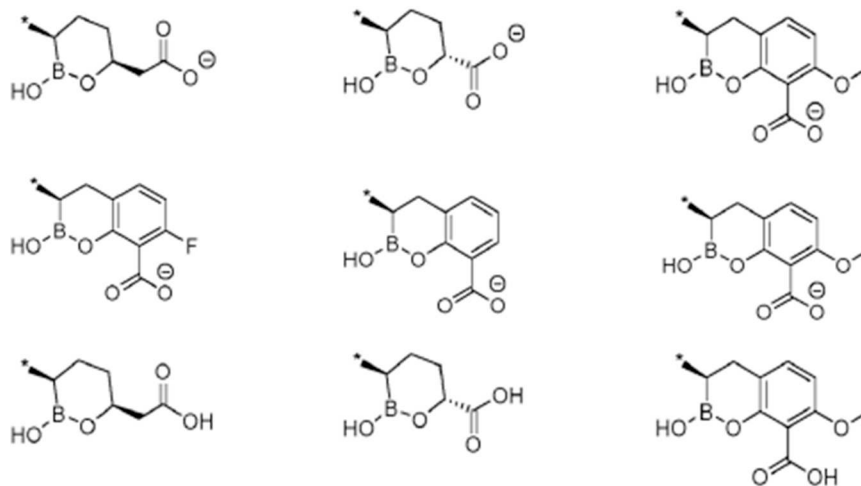
-OR (en el que R es alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3} , por ejemplo, metilo)

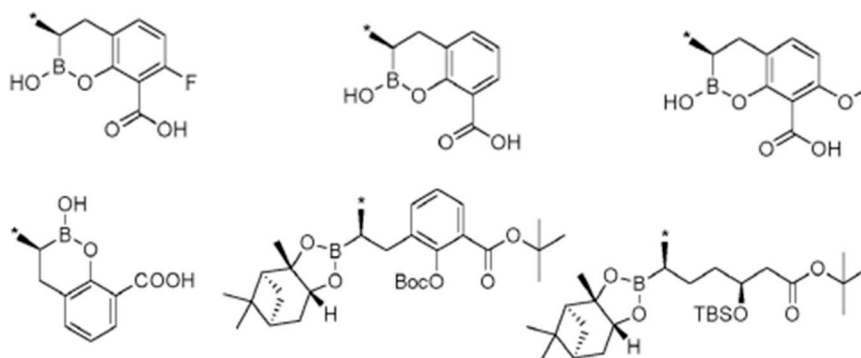


Ácidos borónicos cíclicos:

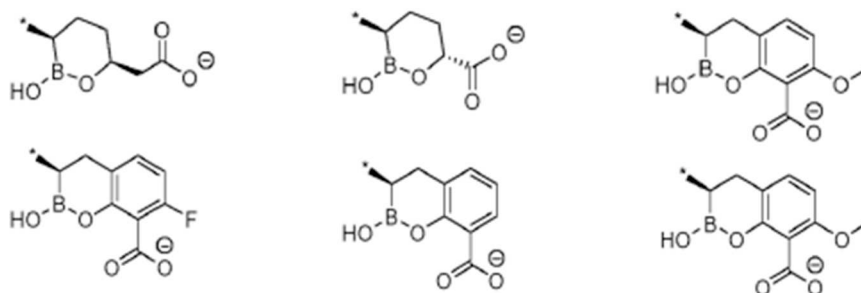


Entre los ejemplos de dichos ácidos borónicos cíclicos se incluyen los siguientes:

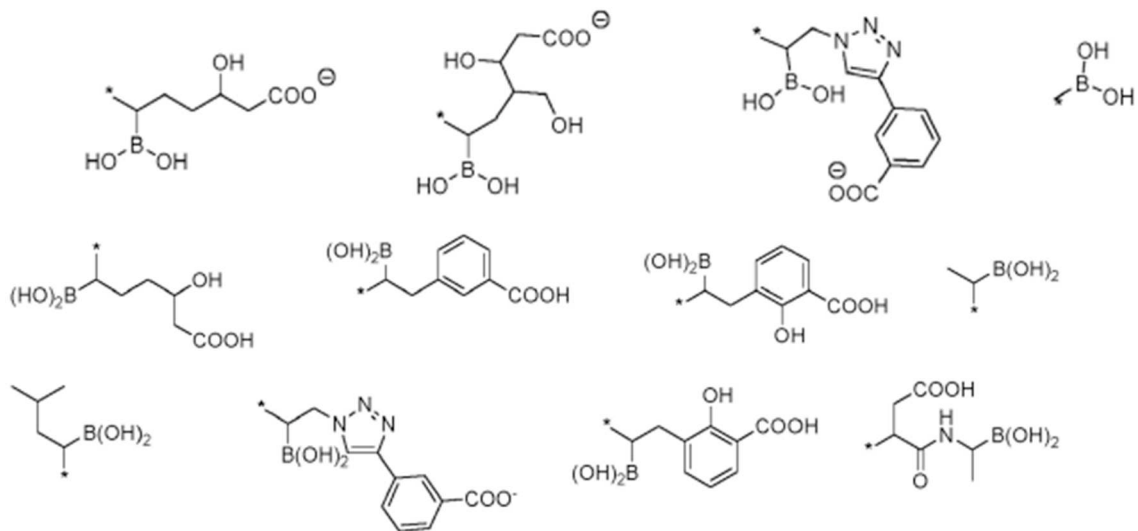




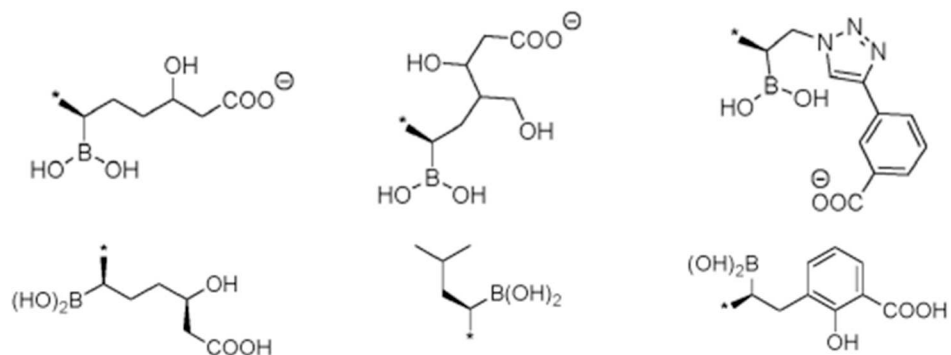
5 Entre los ejemplos preferentes de dichos ácidos borónicos cíclicos se incluyen:



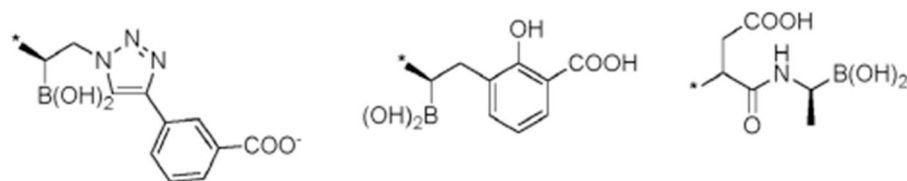
10 Ácidos borónicos acíclicos:



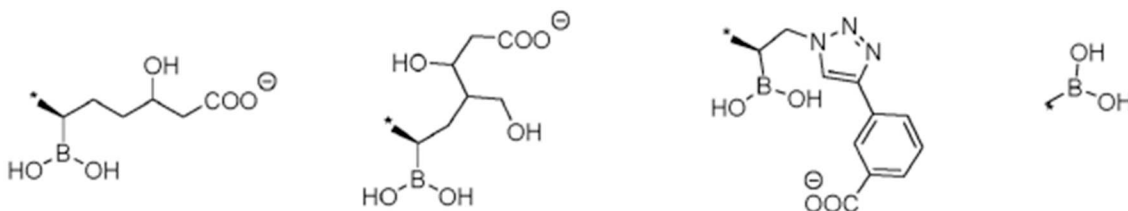
15 Entre los ejemplos de dichos ácidos borónicos acíclicos se incluyen:



20



Entre los ejemplos preferentes de dichos ácidos borónicos acíclicos se incluyen:



en los que * indica el punto de unión del grupo hidrófilo al resto del molécula, por ejemplo, a un grupo enlazador L, tal como se ha definido en el presente documento.

38. Un compuesto, según cualquiera de los ejemplos en el presente documento, o un estereoisómero, una sal aceptable farmacéuticamente o profármaco del mismo.

39. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, junto con uno o más portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente.

40. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición farmacéutica, según la realización 39, para su utilización en terapia.

41. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición farmacéutica, según la realización 39, para su utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con un desequilibrio en la homeostasis del zinc, de manera preferente, cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), un trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), accidente cerebrovascular, edema, diabetes o intoxicación por metales pesados.

42. Un procedimiento de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección asociada con un desequilibrio en la homeostasis del zinc, de manera preferente, cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), un trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), accidente cerebrovascular, edema, diabetes o intoxicación por metales pesados, en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición, según la realización 39.

43. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición farmacéutica, según la realización 39, para su utilización en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la administración de dicho compuesto o dicha composición en combinación con (de manera simultánea, por separado o de manera secuencial) un antibiótico β -lactámico.

44. Un procedimiento de tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición, según la realización 39, en combinación con (de manera simultánea, por separado o de manera secuencial) un antibiótico β -lactámico.

45. Un compuesto para su utilización, o procedimiento, según la realización 43 o 44, en el que la infección está asociada con bacterias Gram positivas o Gram negativas (de manera preferente, bacterias Gram negativas) que son resistentes a uno o más antibióticos, por ejemplo, un antibiótico β -lactámico, de manera preferente, en el que dichas bacterias comprenden metalo- β -lactamasas.

46. Un compuesto para su utilización, o procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 43 a 45, en el que la infección está asociada con bacterias gram negativas multirresistentes que albergan metalo- β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

47. Un compuesto para su utilización, o procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 43 a 46, en el que el compuesto se administra junto con un agente antibiótico carbapenémico y la infección está asociada con

bacterias gram negativas resistentes a carbapenemas que albergan metalo- β -lactamasas, o con bacterias gram negativas resistentes a carbapenemas que albergan carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*, KPC y/o metalo- β -lactamasas.

48. Un compuesto para su utilización, o un procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 43 a 47, en el que el compuesto y el antibiótico β -lactámico se proporcionan en la misma formulación.

49. Un compuesto para su utilización, o un procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 43 a 47, en el que el compuesto y el antibiótico β -lactámico se proporcionan en diferentes formulaciones.

50. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, junto con un antibiótico β -lactámico y, de manera opcional, uno o más portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente.

51. Un kit que comprende:

- (i) un primer recipiente que contiene un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición farmacéutica, según la realización 39; y
- (ii) un segundo recipiente que contiene un antibiótico β -lactámico.

52. Un compuesto para su utilización, procedimiento, formulación farmacéutica o kit, según cualquiera de las realizaciones 43 a 51, en el que dicho antibiótico β -lactámico se selecciona entre los siguientes: penamas, cefemas, monobactamas, penemas, carbapenemas y clavamas, de manera preferente, entre penamas, cefemas y carbapenemas, por ejemplo, una carbapenema.

53. Un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición farmacéutica, según la realización 39, para su utilización en un procedimiento de inhibición de la formación de biopelículas en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un desequilibrio en la homeostasis del zinc, de manera preferente, cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), un trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), accidente cerebrovascular, edema, diabetes o intoxicación por metales pesados.

54. Un procedimiento de inhibición de la formación de biopelículas en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un desequilibrio en la homeostasis del zinc, de manera preferente, cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), un trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), accidente cerebrovascular, edema, diabetes o intoxicación por metales pesados en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, o una composición, según la realización 39.

55. Un procedimiento para determinar si un microorganismo resistente a carbapenemas produce una metalo- β -lactamasa (MBL), una carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) o una cepa bacteriana productora de OXA-48 que comprende las etapas de:

- (1) aislar una cepa bacteriana de interés resistente a carbapenemas y disponerla en una placa de agar;
- (2) preparar los siguientes discos: a) disco A con meropenem solo, b) disco B con meropenem añadido a un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, c) disco C con imipenem solo, d) disco D con imipenem añadido a un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38, y e) disco E con temocilina;
- (3) añadir los discos en cinco lugares diferentes de la placa de agar o en cuatro placas diferentes;
- (4) incubar la placa de agar durante una noche a 37 °C;
- (5) leer todos los diámetros de zona de los lóbulos, en el que la ausencia o el aumento mínimo en todos los diámetros de zona indica una cepa productora de OXA-48, un aumento significativo con los discos B y D solo indica una cepa productora de MBL y un aumento significativo con el disco C solo indica una cepa productora de KPC.

56. Un kit que comprende:

- (i) un compuesto, según cualquiera de las realizaciones 1 a 38;
- (ii) meropenem
- (iii) imipenem
- (iv) temocilina
- (v) de manera opcional, instrucciones para llevar a cabo un procedimiento, tal como se define en la realización 55.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se presentan compuestos que comprenden uno o más (por ejemplo, uno o dos) restos quelantes de zinc lipófilos unidos de manera covalente a uno o más (por ejemplo, uno, dos o tres) restos hidrófilos (W), en los que dichos restos quelantes de zinc son selectivos para iones Zn^{2+} y en los que dichos restos hidrófilos se seleccionan entre grupos monoméricos, oligoméricos y poliméricos hidrófilos no peptídicos.

En los compuestos descritos en el presente documento, el resto (o cada resto) W actúa para disminuir el valor de logP para toda la molécula de interés, reduciendo así el paso general del resto complejante de zinc sobre membranas biológicas de células eucariotas. Esto último es obligatorio para una toxicidad aceptable del resto complejante de zinc que se utiliza en los compuestos de la presente invención. Las células procarióticas, en especial las bacterias gram-negativas, tienen dos membranas; la membrana externa es más penetrable que la interna, que se asemeja a una membrana celular eucariota. Tal como se documenta en los ejemplos de esta solicitud, los compuestos novedosos descritos en el presente documento están desprovistos de los efectos toxicológicos, tales como, por ejemplo, hemólisis, de los agentes quelantes mencionados anteriormente, por ejemplo, los quelantes de PAC como EDTA o DTPA.

Tal como es evidente a partir de la parte experimental en la presente solicitud, la presente invención también enseña cómo la fuerza de un quelante de zinc se puede ajustar para alcanzar el efecto tóxico o inhibitorio mínimo sobre las células o tejido en el área enferma, dejando a la vez las células o tejidos sanos relativamente no afectados, manteniendo al mismo tiempo una eficacia médica relevante en la indicación deseada.

Según la presente invención, el ajuste de la fuerza de un quelante de zinc se consigue mediante el diseño de una combinación favorable del número y la conformación de átomos donadores en el quelante y un número óptimo de átomos en el anillo entre dos átomos donadores vecinos unidos al átomo de metal. Esto se ilustra, a modo de ejemplo, en el esquema 2.

Cuanto mayor es el número de átomos donadores en el ligando, más fuerte (pK_d más elevado) es el agente quelante. Cuanto más elevado es el pK_d , potencialmente más tóxico es el ligando (cuando se utiliza sin los grupos laterales hidrófilos, según la presente invención). Por ejemplo, TPEN o TPA son tóxicas para todas las células y no pueden utilizarse como un fármaco con una toxicidad aceptable. Sin embargo, TPEN y TPA no tienen una cadena lateral hidrófila que reduzca su hidrofilia ni proporcionan ninguna cadena lateral funcional para insertar vectores para la selectividad biológica.

Tal como se ilustra mediante las fórmulas X - XII, si algunos grupos donadores (átomos donadores) en la molécula pueden unirse al átomo de metal, de tal manera que se pueden formar anillos de 5 elementos quelantes con el átomo de zinc, esto contribuirá a un pK_d más elevado. Tal como se ilustra mediante las estructuras V y VI en el esquema 2, esto es posible para conseguir una variedad de compuestos heterocíclicos, por ejemplo, imidazol, pirrol, isoxazol, piridina, pirimidina, purina, indol, quinolina o isoquinolina. Los anillos también pueden sustituirse con grupos funcionales como grupos ceto o grupos hidroxilo para ayudar a regular sus propiedades fisiológicas.

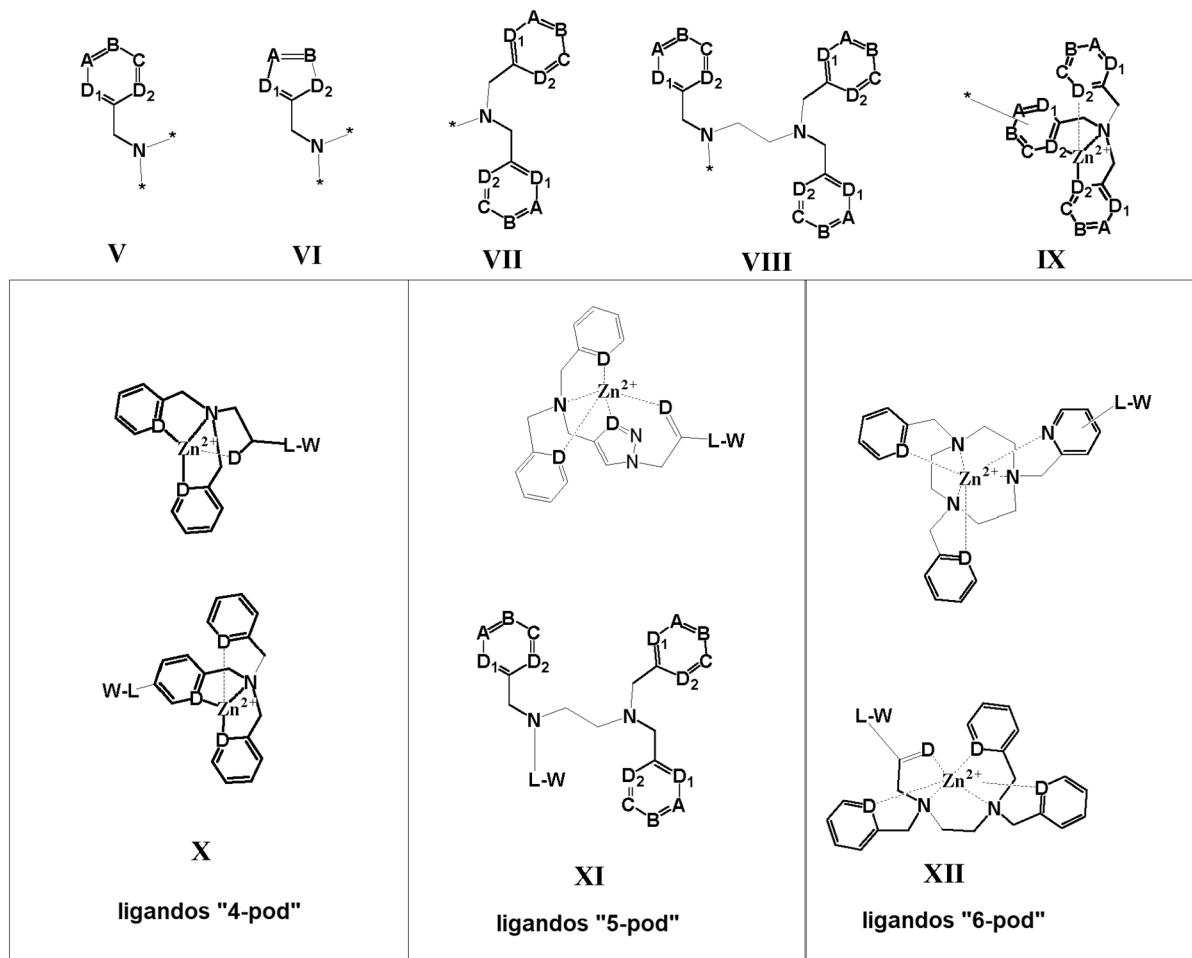
En un quelato metálico, en el que 3 grupos donadores D participan en la donación al átomo de zinc, el ligando puede denominarse ligando "3-pod", tal como se ilustra en el esquema 2. La unidad estructural VII se denomina dipicoilamina o DPA y define un bloque de construcción sintético importante en los compuestos de la presente invención.

Sin embargo, los ligandos 3-pod pueden no tener suficiente fuerza quelante para ser eficientes como adyuvantes. La Patente EP 1724263 se refiere a compuestos quelantes. Estos están destinados a su utilización contra el VIH, el reumatismo y la metástasis del cáncer, pero no como adyuvantes antibacterianos o en relación con algún trastorno neurológico. Los quelantes de metales formados por los dos anillos de imidazol y el nitrógeno terciario solo tienen 3 átomos donadores que proporcionan una capacidad insuficiente de unión a metales para una capacidad adyuvante relevante, según datos experimentales de la presente solicitud.

Otro ejemplo de quelantes 3-pod se ha descrito por Wei, L. et al. en Inorganic Chemistry, volumen 44, No. 7, 2005. El documento se refiere exclusivamente al trabajo cristalográfico y analítico sobre quelatos de renio. En el texto, se menciona el uso potencial contra el cáncer, pero no se proporcionan datos. No se sugiere la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas o cualquier otra indicación para la que se puedan utilizar los compuestos de la presente invención. No hay cadenas laterales hidrófilas más grandes, sino solo una base de ADN.

Por tanto, en una realización, el resto quelante puede comprender, de manera preferente, más de tres átomos donadores, D. Si 4 grupos donadores D participan en la donación al átomo de zinc, el ligando puede denominarse ligando "4-pod" (esquema 2, X). Si aumenta el número de átomos donadores D, los ligandos pueden denominarse, de forma correspondiente, "5-pod" o "6-pod" (estructuras generales XI y XII en el esquema 2), que contribuyen a agentes quelantes más fuertes (a menos que las restricciones estéricas contribuyan a conformaciones de ligando menos favorables).

Esquema 2



5

En el esquema 2:

D es un heteroátomo, de manera preferente, nitrógeno u oxígeno (cuando está presente en una estructura de anillo, D es, de manera preferente, nitrógeno);

10 D₁ y D₂ son los mismos o diferentes y pueden ser -CH- o un heteroátomo, de manera preferente, nitrógeno, en los que, como mínimo, uno de D₁ y D₂ es un heteroátomo, de manera preferente nitrógeno;

A, B y C pueden ser -CH- o un heteroátomo, de manera preferente nitrógeno;

A, B y C también pueden ser cabezas de puente que participan en anillos condensados, es decir, que forman sistemas policíclicos;

15 L es un enlace covalente o un enlazador, tal como se define en el presente documento;

W es un grupo hidrófilo, tal como se define en el presente documento;

* indica el punto (o puntos) de unión del resto quelante al resto de la molécula.

20 En el esquema 2, el enlazador L puede comprender o consistir en un grupo funcional -(C=X)-Y-, en el que X indica O o S; e Y indica O o NR (en el que R es H o alquilo C₁₋₆, de manera preferente, alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo).

El catión divalente Zn^{2+} es normalmente de hexacoordinado, por lo que los ligandos con un número superior a 6 grupos donadores no aumentan el pK_d para el zinc. Según esta definición, la TPEN es un ligando 6-pod, ya que la TPEN tiene cuatro unidades de 2-piridil-metilo, lo que hace que la capacidad quelante del zinc sea más fuerte. La TPEN, tal como se ha indicado anteriormente, se ha utilizado ampliamente en muchas aplicaciones biológicas académicas en la técnica anterior.

25

En la presente invención, el resto quelante de zinc es cualquier grupo quelante de Zn^{2+} selectivo que comprende, de manera preferente, como mínimo, dos átomos de nitrógeno aromáticos.

30 En el presente documento se dan a conocer compuestos representados por la fórmula general I, o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos:

Q[L-W]_x (I)

en la que Q representa un resto quelante de zinc lipófilo que es selectivo para iones Zn²⁺; cada L, que puede ser el mismo o diferente, es un enlace covalente o un enlazador;

5 cada W, que puede ser el mismo o diferente, es un grupo monomérico, oligomérico o polimérico hidrófilo no peptídico, de manera preferente, un grupo hidrófilo no peptídico que comprende átomos donadores de enlaces de hidrógeno y aceptores de enlaces de hidrógeno seleccionados entre H, N, O, S y P, por ejemplo, un grupo hidrófilo no peptídico que comprende uno o más grupos funcionales seleccionados entre -OH, -SH, -CO₂H, -SO₃H, -PO₃H₂, -B(OH)₂ y grupos alifáticos o aromáticos que contienen nitrógeno; y

10 x es un número entero de 1 a 3, de manera preferente, 1.

También se dan a conocer en el presente documento compuestos representados por la fórmula general II, o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos:

15 Q-L-W-L-Q (II)

en el que cada Q, que puede ser el mismo o diferente, representa un resto quelante de zinc lipófilo que es selectivo para iones Zn²⁺;

cada L, que puede ser el mismo o diferente, es un enlace covalente o un enlazador; y

20 W es un grupo monomérico, oligomérico o polimérico hidrófilo no peptídico, tal como se ha definido en el presente documento, por ejemplo, tal como se ha definido anteriormente, con respecto a la fórmula (I).

Los compuestos, según la presente invención, son útiles como potenciales nuevos fármacos. Su utilización como fármacos está relacionada con un conjunto de parámetros que necesitan tener un cierto valor numérico para que los compuestos tengan un efecto terapéutico deseado sin ejercer signos tóxicos inaceptables en el mamífero que padece una enfermedad o en el organismo huésped para una invasión de microorganismos o parásitos. De manera sorprendente, se ha descubierto que estos parámetros se pueden utilizar para calcular una determinada puntuación terapéutica, en el presente documento denominada TS_x, en la que x indica el compuesto particular. La puntuación terapéutica de los compuestos de la presente invención difiere de la puntuación terapéutica de los compuestos conocidos de la técnica anterior. El parámetro se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$TS_x = f_1(MEC) + f_2(IC_{50}) + f_3(\log D) + f_4(pKd_{Zn}) + f_5(TI) + f_6(Zn_{sel}) \quad (1)$$

en la que f₁ - f₆ son funciones del parámetro relativo, MEC expresa la concentración mínima eficaz del compuesto X para conseguir un efecto terapéutico de una enzima o un efecto fisiológico no deseado para un microorganismo. IC₅₀ expresa la toxicidad en una célula de mamífero, útil para indicar la toxicidad general del compuesto X. El parámetro logD se define como el logaritmo del coeficiente de partición del compuesto X entre *n*-octanol y agua a pH fisiológico, TI es la proporción del índice terapéutico del compuesto X, que es el cociente de IC₅₀/MEC. Una fuerza quelante determinada, pKd_{Zn}, es uno de los parámetros más importantes para que los compuestos consigan efectos terapéuticos elevados y un bajo nivel de efecto tóxico, según la presente invención. pKd_{Zn} se define como el logaritmo negativo de la constante de disociación para el quelato de zinc y Zn_{sel} es la selectividad de un compuesto X para quelar Zn²⁺ en competencia con otros metales, en especial iones metálicos importantes fisiológicamente como Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu⁺, Cu²⁺, Cr³⁺, o los metales pesados considerados, en general, como contaminantes, por ejemplo, Cd²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, o incluso elementos más pesados.

En general, los ligandos más comunes en la técnica anterior, es decir, los ligandos de PAC descritos anteriormente, por ejemplo, EDTA, DTPA y DOTA, presentan una afinidad elevada por los iones metálicos que tienen un radio iónico mayor, un número elevado de electrones de la capa d no apareados y un número de coordinación más elevado que el zinc. Estos iones metálicos son en especial Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺ y Cr³⁺ o los metales pesados considerados, en general, como contaminantes, por ejemplo, Cd²⁺, Hg²⁺, Co²⁺ y Pb²⁺. Estos principios están bien descritos en la técnica anterior, por ejemplo, por Smith, R. M.; Martell, A. E. en NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, versión 2.0; Departamento de Comercio de Estados Unidos: Gaithersburg, MD, 1995. Por tanto, los ligandos de PAC se unen mal al zinc en relación con los iones mencionados anteriormente. Es particularmente preocupante que los ligandos de PAC también se unan a Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ y, hasta cierto punto, también afectan a Na⁺ y K⁺ debido a su alta carga negativa a pH fisiológico. Todos estos son iones metálicos vitales en la regulación de numerosos procesos biológicos en mamíferos. Por tanto, esta falta de especificidad es la razón principal de la mayor toxicidad general observada en la técnica anterior para los ligandos de PAC.

Una característica importante de los ligandos que se utilizan en la presente invención, que afecta a su selectividad para unirse al zinc, es la teoría de ácidos y bases duros y blandos, el principio de HSAB que está bien descrito en el sector de la química inorgánica y en numerosos artículos, por ejemplo, por R.D. Hancock y A.E. Martell en Chem. Rev. (1989), 89, 1875-1914. En la presente invención, un contenido elevado de átomos donadores de nitrógeno aromático, un contenido medio de donadores de nitrógeno alifático y un contenido bajo de átomos donadores de oxígeno favorecen la unión de los elementos del grupo IIB de la tabla periódica como el zinc y el cadmio; los ligandos típicos de PAC, DTPA, EDTA y DOTA, tienen la tendencia opuesta, con un contenido elevado

de donadores de oxígeno, un contenido inferior de nitrógeno alifático y sin donadores de nitrógeno aromático, se favorece la unión de elementos de transición más grandes con un número elevado de electrones de la capa d no apareados, por ejemplo, los elementos de los grupos VIB, VIIB y VIII, tales como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} y Cr^{3+} , y también los elementos del grupo IIA, tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Como consecuencia, en el resto quelante de zinc descrito en el presente documento, un porcentaje preferente de átomos donadores de nitrógeno aromático es igual o superior al 50 %, mientras que el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 25 %, manteniendo a la vez el porcentaje de átomos donadores de oxígeno igual o inferior al 25 %. Incluso más preferente es un porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático igual o superior al 60 %, mientras que el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 20 %, manteniendo a la vez el porcentaje de átomos donadores de oxígeno igual o inferior al 20 %. Es incluso más preferente un porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático igual o superior al 66 %, mientras que el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 33 %, manteniendo a la vez el porcentaje de átomos donadores de oxígeno igual a cero. Es especialmente preferente un porcentaje de átomos donadores de nitrógeno aromático igual o superior al 75 %, mientras que el porcentaje de átomos donadores de nitrógeno alifático es igual o superior al 25 %, manteniendo a la vez el porcentaje de átomos donadores de oxígeno igual a cero.

Tal como se ha destacado, el parámetro Zn_{sel} es el parámetro más importante para mantener el efecto terapéutico manteniendo a la vez el nivel bajo de efectos adversos hacia las células eucariotas y en animales vivos. Dicha selectividad puede demostrarse mediante estudios de competencia cuando todos los metales mencionados están presentes en una mezcla, tal como se ha descrito en muchos documentos de la técnica anterior, por ejemplo, en Åstrand et al., Tetrahedron 69, (2013), 8645-8654. En la técnica anterior, por ejemplo, utilizando la fórmula 6 en R.D. Hancock y A.E. Martell, los cocientes de selectividad para ligandos a base de amina pueden calcularse a partir de las constantes de disociación para Zn^{2+} frente a Ca^{2+} . En el presente documento, Zn_{sel} es un indicador aceptado de selectividad que se puede expresar según la siguiente ecuación:

$$\text{Zn}_{\text{sel}} = \log(K_1(\text{Zn}^{2+}) / K_1(\text{Ca}^{2+})) \quad (2)$$

La utilización de la selectividad hacia la quelación del calcio en la fórmula es necesaria y relevante debido a las graves consecuencias para la toxicidad en sistemas biológicos eucariotas cuando se quela este elemento del grupo II. Tal como se indicó anteriormente, el EDTA es un potente anticoagulante debido a su quelación de metales no selectiva, lo que da lugar a la quelación, por ejemplo, de Ca^{2+} . Como consecuencia, esta capacidad de unirse al calcio puede provocar hipocalcemia. Dado que el EDTA es un agente quelante más débil que los otros PAC, por ejemplo, DTPA o DOTA, el mismo problema de toxicidad se aplica a todos los PAC como clase de compuestos.

Los parámetros de la ecuación (1) se pueden ponderar según datos empíricos y medidos conocidos para diferenciar la importancia de los diferentes parámetros, tal como se observa en los datos experimentales empíricos a continuación, en una expresión general para TS_x en la ecuación (1).

Otros parámetros que caracterizan los compuestos más eficaces, según la presente invención, son el índice terapéutico, TI y la lipofilia, logP.

El núcleo de la presente invención y el hallazgo más sorprendente documentado en el presente documento es la alta eficacia de los compuestos en indicaciones médicas importantes, a pesar de la alta solubilidad en agua y los valores de logP bajos de los compuestos. En la técnica anterior, a menudo, se requiere que las sustancias terapéuticas tengan un valor de logP suficientemente elevado para atravesar las membranas de células eucariotas, normalmente superior a de 2 a 2,5, para tener un efecto terapéutico. Sin embargo, a menudo, también muestran signos toxicológicos. Esto se ilustrará adicionalmente en lo siguiente:

Como ejemplo representativo, los compuestos, según la presente invención, tienen un fuerte efecto supresor sobre la resistencia mediada por MBL en bacterias multirresistentes, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* o *Escherichia coli*.

La optimización del comportamiento deseado a nivel mundial para los compuestos, según la presente invención, se puede modelizar matemáticamente, por ejemplo, para su utilización como una herramienta para identificar nuevos compuestos útiles en la presente invención. El modelo se basa en observaciones de datos experimentales biológicos proporcionados en la parte experimental de la presente solicitud y en datos de la bibliografía. En el caso de un agente antibiótico, se puede optimizar un parámetro general, la puntuación antibacteriana (indicada como AS_x), en la que X es el compuesto representativo de la presente invención. Por tanto, AS_x se puede expresar en función de los parámetros clave en la ecuación (3):

$$\text{AS}_x = \log(\text{TI} \times (1 + \tanh(\text{Zn}_{\text{sel}} - 8)) \times (1 - \tanh(\text{clogP} - 2)) \times (1 + \tanh((\text{pK}_a - 8))) \quad (3)$$

en la que TI es la proporción del índice terapéutico, que es el cociente $\text{IC}_{50\text{h}}/\text{MIC}_x$, en el que MIC_x se define como la concentración más baja del compuesto X respectivo de la presente invención que da lugar a un valor de MIC de ≤ 2

mg/l para antibióticos carbapenémicos. El valor de IC_{50} para la tolerancia de los compuestos X en los ensayos de células hepG2 humanas es un estándar de toxicidad *in vitro* habitual comparable con otros ensayos de células eucariotas. Este cociente define la superioridad de los compuestos de la presente invención en comparación con los de la técnica anterior. Por ejemplo, en la Patente WO 2015/049546 de Rongved et al., se dan a conocer quelantes de zinc que mejoran la actividad de las carbapenemas contra bacterias gram-negativas resistentes que albergan metalo- β -lactamasas (MBL). Sin embargo, la Patente WO 2015/049546 no enseña cómo ajustar la fuerza del quelante de zinc para conseguir una eficacia suficientemente alta o una actividad MIC_x aceptable a concentraciones suficientemente bajas, a la vez que de manera simultánea se asegura un perfil toxicológico aceptable en células eucariotas. Con respecto a los compuestos adyuvantes descritos en la Patente WO 2015/049546, también existe la necesidad de mejorar aún más los valores de MIC para los antibióticos carbapenémicos, por ejemplo, para proporcionar compuestos que tengan un valor de $MIC \leq 2$ mg/l para los antibióticos carbapenémicos a concentraciones adyuvantes inferiores a 100 μ M. Esto da lugar a valores del cociente IC_{50h}/MIC_x más elevados y números de AS_x más elevados.

De manera sorprendente, tal como se pone en evidencia por los resultados presentados en el presente documento, los compuestos definidos por el alcance de los compuestos dados a conocer en este documento demuestran un comportamiento de MIC_x significativamente mejorado sobre los que se dan a conocer en la Patente WO 2015/049546, con $MIC \leq 2$ mg/l para antibióticos carbapenémicos a concentraciones de adyuvantes de hasta, como mínimo, de 15,6 a 31 μ M, manteniendo a la vez un perfil toxicológico aceptable en células hepG2 humanas. Esto se describe en detalle a continuación y en la parte experimental de la presente memoria descriptiva. El ejemplo 101 de la presente solicitud, por ejemplo, se basa en la combinación estructural de una unidad de DPA combinada con un anillo de triazol para formar un ligando 4-pod unido a un enlazador carbohidrato. El ejemplo 194 es el mismo agente quelante unido a un péptido. Este es el quelante más fuerte indicado como ejemplo en la Patente WO 2015/049546. En el presente documento se da a conocer que la MIC del ejemplo 101 se investiga en el ejemplo 197 y en la tabla 4 es evidente que el ejemplo 101 no es tan eficaz a una concentración de 50 μ M como los mejores ejemplos investigados en las tablas 3-5. Sin embargo, los ejemplos 101 y 194 son eficaces a intervalos de concentración de 100-150 μ M y con la toxicidad favorable descrita para estos ligandos, son útiles como adyuvantes. No obstante, estos ejemplos demuestran que, con respecto al comportamiento general, la presente invención se refiere a compuestos que son superiores a los descritos en la Patente WO 2015/049546.

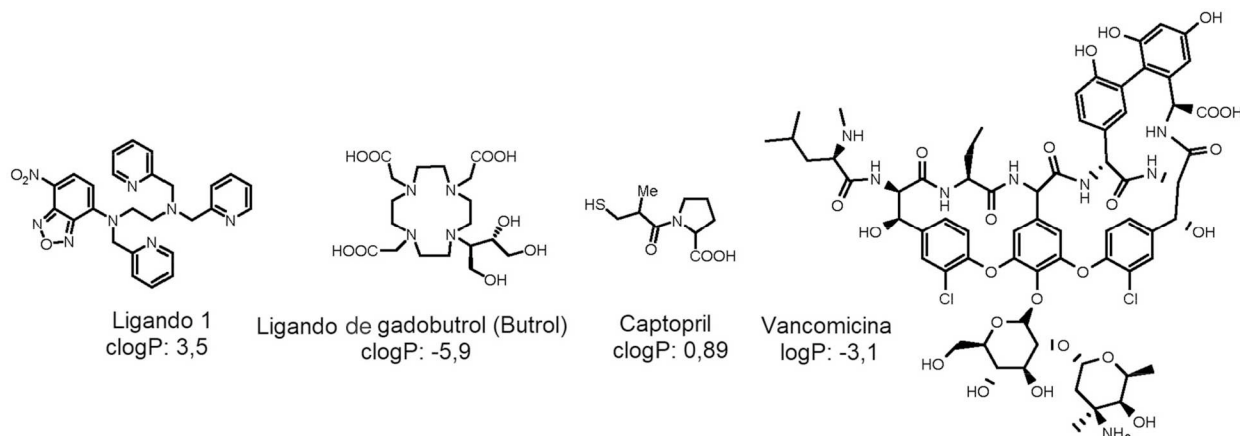
En la ecuación (3), el factor $1+\tanh(Zn_{sel}-8)$ expresa el descubrimiento experimental de que el aumento de Zn_{sel} aumenta AS_x y que un Zn_{sel} inferior a 8 conduce a valores de AS_x bajos. Los valores numéricos utilizados en los cálculos de Zn_{sel} , tal como se indican en la tabla 1 a continuación, se basan en cálculos que utilizan la fórmula 6 en R.D. Hancock y A.E. Martell en Chem. Rev. (1989), 89, 1875-1914. El factor Zn_{sel} también enfatiza que valores bajos de Zn_{sel} representan quelantes de metales con una quelación de metales inespecíficos, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente para los quelantes APC. Un Zn_{sel} bajo puede conducir a efectos biológicos no deseados.

En la ecuación (3), el factor $1-\tanh(\log P-2)$ expresa que disminuyendo $\log P$, que significa aumento de la solubilidad en agua, aumenta AS_x , y que valores de $\log P$ inferiores a 2, según la técnica anterior, minimizan la penetración de membrana en células eucariotas y, por lo tanto, minimizan la toxicidad inespecífica. El $\log P$ (es decir, el $\log P$ calculado) se puede calcular utilizando ChemBiodraw Ultra versión 13.0.2.3021.

En la ecuación (3), el factor $1+\tanh(pK_d-8)$ expresa que disminuyendo pK_d se reduce AS_x , según datos experimentales en la presente solicitud. Un pK_d inferior a 8 no es útil en la presente invención, ya que da lugar a valores de MIC_x más elevados o a ningún valor de MIC_x en absoluto. Los valores de pK_d de los compuestos de la presente invención se han estimado utilizando procedimientos de la bibliografía, por ejemplo, tal como se han descrito por G. Anderegg et al., Helv. Chim. Acta, (1977), 60, 123-140 y J. T. Simmons et al, Inorg. Chem., (2013), 52, 5838-5850, y las colecciones de constantes de estabilidad de A.E. Martell.

Para ilustrar la utilidad de la ecuación (3) en la presente invención, se utilizan como ejemplos seis ligandos quelantes de zinc de la técnica anterior; cuatro de ellos se ilustran en el esquema 3. TPEN y EDTA ya se describen en la presente memoria descriptiva. El ligando de gadobutrol Butrol es el ligando que une metales lantánidos en el gadolinio, que se utiliza como agente de contraste de RM, tal como se ha descrito por Cheng, K.T. en Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD), Bethesda, National Center for Biotechnology Information (EE. UU.); 2006. Los parámetros utilizados en la tabla 1 para Butrol se han estimado según E. Toth et al, Inorg. Chim. Acta (1996), 249, 191-199. El ligando 1 es un compuesto de la bibliografía lipófilo muy selectivo de Zn para mediciones fluorescentes radiométricas de la concentración de zinc descrito por Xu et al., Tetrahedron 65 (2009) 2307-2312. El captopril es un fármaco en el mercado utilizado como inhibidor de ECA y es un quelante de zinc, tal como se ha descrito por Ng K.K.F. y Vane J.R. en Nature (1967), 216, 762-766. Los parámetros utilizados en la tabla 1 para captopril se han estimado según K.S. Siddiq et al., Chin. J. Chem., (2009), 27, 1755-1761. La vancomicina es un agente antibiótico en el mercado, descrito como un quelante de cobre y zinc en la técnica anterior, por ejemplo, en Kucharczyk et al., Inorganic Biochemistry 102 (2008) 936-942. Los parámetros utilizados en la tabla 1 para la vancomicina se han estimado según A. Zarkan et al., Sci. Rep., (2016), 6, 19602.

Esquema 3



- 5 La tabla 1 resume la bibliografía experimental y los parámetros estimados para los ligandos, según la técnica anterior, junto con ligandos representativos para la presente invención. La columna 1 indica qué compuestos están incluidos y proporciona números de ejemplo para los compuestos de la presente invención para los que se calcula AS_x . Tal como es evidente a partir de la columna 8, un valor negativo para el parámetro AS_x indica una falta de comportamiento en uno o más de los parámetros vitales, es decir, MIC_x , IC_{50h} , Zn_{sel} , clogP o pK_d y define qué
- 10 compuestos pueden ser útiles en la presente invención.

Además, una característica importante de la presente invención es el procedimiento que utiliza los parámetros independientes de la ecuación (3) en la modelización estadística para optimizar AS_x como componente principal. Este procedimiento forma parte de la presente invención y puede utilizarse para seleccionar nuevos

15 compuestos que tendrán el comportamiento deseado como fármacos potenciales con eficacia y toxicidad aceptables.

Tal como es evidente a partir de estos datos, no es suficiente que un compuesto tenga un $\log P$ bajo, tal como, por ejemplo, captopril, si el pK_d con zinc es demasiado bajo (en este caso un valor de 6). Asimismo, no es suficiente utilizar un quelante de zinc muy selectivo como el Ligando 1, si el clogP es lo suficientemente elevado para permitir la penetración en células eucariotas. Asimismo, incluso si el EDTA tiene una mayor afinidad de unión por el hierro y el cobre que por el zinc, y también se une al calcio (es decir, el EDTA tiene un pK_d con el zinc de 16), la falta de selectividad hace que el EDTA sea un compuesto relativamente tóxico para inyecciones intravenosas en mamíferos.

20

25

Tabla 1							
Ligando X	MIC_x^a (μM)	IC_{50h} (μM)	clogP	pK_d	$TI = IC_{50h}/MIC_x$	Zn_{sel}	AS_x
TPEN ^b	15	7	3,5	15,6	0,5	16,5	-0,75
Butrol	15 ^c	60 ^c	-5,9	19	1,2	4,7	-1,36
Ligando 1 ^b	15 ^c	7 ^c	3,5	15	0,5	13,7	-0,75
Captopril ^b	1.000 ^d	33	0,9	6	0,033	0,22	-9,14
EDTA	15	30 ^c	-2	16	2	4	-2,27
Vancomicina ^b	1.000 ^d	20	-3,1	2,9	0,02	5	-7,83
Ejemplo 12 ^b	31	16,45	1	11	0,5	11	0,57
Ejemplo 14 ^b	31	12,4	0,3	11	0,4	11	0,49
Ejemplo 24	31	60	1,6	15	1,9	13,7	1,18
Ejemplo 25	31	113,3	0,7	15	3,7	13,7	1,43
Ejemplo 26	31	116	-0,9	11	3,7	11	1,48
Ejemplo 84 ^b	125	116	-2,4	9	0,5	11	0,82
Ejemplo 91	31	165,2	-1,7	15	5,3	16,5	1,63
Ejemplo 96 ^b	125	118	0,13	9	0,9	11	0,81
Ejemplo 98	125	259	1	9	2,1	11	1,11
Ejemplo 99	31	217,3	0,34	11	7	11	1,74
Ejemplo 100	31	118	1,2	11	3,8	11	1,44
Ejemplo 103	31	67,6	0,3	11	2,2	11	1,23
Ejemplo 105	31	100 ^c	0,25	11	3,2	11	1,40
Ejemplo 163	31 ^c	100 ^c	1 ^c	11	3,2	11	1,35

^a MIC_x se define como la concentración más baja del compuesto X respectivo de la presente invención que da lugar a un valor de MIC de ≤ 2 mg/l para antibióticos carbapenémicos.

^b Los compuestos que muestran una IC_{50h} < MIC_x no serían aplicables como potenciales fármacos clínicos contra bacterias gram-negativas resistentes a base de MBL.

^c Valores estimados.

^d Los valores de MIC medidos > 1.000 μ M se fijan en ese valor.

^e Los valores de IC_{50h} medidos no se pudieron determinar debido a que las curvas no sigmoideas disminuyeron mínimamente por encima del 50 % de reducción de la fluorescencia y se fijan en 116.

Un requisito para que los compuestos sean útiles, según la presente invención, es que estos no tengan problemas de toxicidad a la concentración efectiva. Por tanto, con la condición de que TI sea > 1, los valores preferentes de la puntuación de antibiótico, según la presente invención, son valores de AS_x iguales o superiores a -0,8, de manera preferente, iguales o superiores a 0, iguales o superiores a 0,5, por ejemplo, iguales o superiores a 1, o iguales o superiores a 1,5.

Los agentes quelantes descritos en la Patente EP 1724263 mencionados anteriormente harían que los valores de MIC_x fueran elevados debido a su capacidad quelante baja (3-pod). Esta tecnología tiene otra propiedad desfavorable relacionada con la lipofilia. Los valores de logP calculados (ChemBiodraw 2017) a partir de las estructuras representativas en la Patente EP 1724263 muestran que son lipófilas con valores de logP alrededor de 3. Esto probablemente da lugar a compuestos más tóxicos. En el documento no se proporcionan dosis tóxicas. Sin embargo, esta tecnología proporcionaría valores de AS_x negativos debido a valores de MIC_x demasiado elevados y un logP elevado.

Otra tecnología quelante relativa a compuestos quelantes en forma de prequelantes de éster se ha descrito por Ye, Z. et al. en Biosensors and Bioelectronics, volumen 26, No. 3, 2010. La tecnología se relaciona con ésteres de compuestos quelantes selectivos para Tb³⁺ para la detección con quimiosensores luminiscentes de resolución temporal de iones Zn²⁺ intracelulares en el segundo resto quelante. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas u otras áreas enfermas atractivas en la presente invención. Los agentes están diseñados para penetrar las membranas celulares con la ayuda de los grupos éster lipófilos y, por tanto, probablemente son más tóxicos que los compuestos descritos en el presente documento. Además, después de la hidrólisis del éster, generarían restos quelantes de amino-policarboxilato (APC), lo que conduciría a una quelación de metales inespecíficos.

Sin embargo, otra tecnología quelante, descrita por Astrand, O. et al en Bioorganic & Medicinal Chemistry, volumen 21, No. 17, 2013, se refiere a compuestos quelantes que comprenden la bien conocida unidad de dipiridilamina (DPA) en forma de un derivado de amida. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas u otras áreas enfermas atractivas en la presente invención. Los compuestos no comprenden un resto hidrófilo que disminuye el logP. Por tanto, el agente proporcionaría valores de AS_x negativos debido a la baja fuerza quelante y los valores elevados de logP.

Los agentes quelantes descritos por Wei, H. et al. en Organic Letters, volumen 9, No. 24, 2007, comprenden la bien conocida unidad de dipiridilamina (DPA) combinada con una unidad de 8-hidroxiquinolina. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas u otras áreas enfermas atractivas en la presente invención. Esta tecnología también presenta una propiedad desfavorable relacionada con la lipofilia. Los valores de logP calculados (ChemBiodraw 2017) a partir de estructuras representativas muestran que son lipófilos con valores de logP alrededor de 3. Esto probablemente da lugar a problemas de toxicidad eucariota. Esta tecnología probablemente proporcionaría valores de AS_x negativos debido a los valores elevados de logP.

Se ha descrito otra tecnología quelante por Hanaoka, K. et al en J. Am. Chem. Soc. Volumen 126, 2004. La tecnología se refiere a compuestos quelantes para detección con quimiosensores luminiscentes para la detección por luminiscencia de resolución temporal de iones Zn²⁺ intracelulares. El compuesto es un derivado del quelante de APC muy fuerte, DTPA. El DTPA es un agente quelante muy fuerte y no selectivo bien conocido en la técnica anterior por generar una toxicidad severa debido a la quelación de Ca²⁺ y Fe³⁺. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización del agente contra bacterias o enfermedades infecciosas u otras áreas enfermas atractivas en la presente invención.

Se ha descrito otra tecnología quelante por Bailey, G. A. et al en Inorganic Chemistry, volumen 51, No. 22, 2012. La utilización prevista es en la obtención de radioimágenes nucleares mediante PET y SPECT. Los quelantes son inespecíficos, quelando Ga, Cu, In y Lu, entre otros. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas u otras áreas enfermas atractivas en la presente invención. No hay presentes cadenas laterales hidrófilas más grandes. Los valores de logP calculados (ChemBiodraw 2017) a partir de estructuras representativas en Bailey *et al* muestran que son lipófilas con valores de logP superiores a 3. Es probable que esto dé lugar a compuestos tóxicos.

Tal como se ha descrito anteriormente, el parámetro más importante para mantener el efecto terapéutico, manteniendo al mismo tiempo bajo el nivel de efectos adversos hacia las células eucariotas y en animales vivos, es el parámetro Zn_{sel} . Tal como se ha descrito por R.D. Hancock y A.E. Martell en Chem. Rev. (1989), 89, 1875-1914, para conseguir un Zn_{sel} elevado, un contenido elevado de átomos donadores de nitrógeno aromático, un contenido medio de donadores de nitrógeno alifático y un contenido bajo de átomos donadores de oxígeno favorecen la unión de los elementos del grupo IIB de la tabla periódica; los ligandos típicos de PAC, DTPA, EDTA y DOTA, tienen la tendencia opuesta, con un contenido elevado de donadores de oxígeno, un contenido inferior de nitrógeno alifático y sin donadores de nitrógeno aromático, se favorece la unión de elementos de transición más grandes con un número elevado de electrones de capa d no apareados.

Tal como se ha definido anteriormente, el resto W puede ser un grupo que tiene átomos que poseen propiedades de donación de hidrógeno o de aceptación de hidrógeno, teniendo así la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con agua o fluidos biológicos, reduciendo el logP y aumentando la solubilidad en agua de la construcción completa. Esto implica una disminución de la capacidad de penetración de la membrana de la construcción, reduciendo la tendencia a inducir efectos no deseados en el organismo huésped, como signos de toxicidad. Se acepta, en general, que los compuestos de bajo peso molecular con un logP por encima de 2 a 2,6 tienen una buena capacidad de penetración celular, y si el compuesto además tiene efectos secundarios no deseados, la vida celular normal puede verse seriamente afectada. Entre los ejemplos de grupos funcionales W útiles en los compuestos dados a conocer en el presente documento se encuentran restos no peptídicos, alifáticos o alicíclicos que comprenden grupos hidroxilo, carboxilo o de ácido borónico.

En otra realización, el resto W puede comprender una unidad estructural de fármaco antibacteriano muy hidrófilo que tiene la capacidad de reducir el logP de la construcción. Entre los ejemplos de fármacos útiles en la presente invención se indican como ejemplo, pero sin limitarse a estos, los descritos en el libro "Antibacterial Agents", de R.J. Anderson et al., John Wiley & Sons, Reino Unido 2012, por ejemplo, rifamicinas o antibióticos aminoglucósidos o polimixinas. Estas clases representan clases amplias de agentes antibióticos en el mercado, y muchos bloques de construcción en su proceso sintético están disponibles en el mercado para su utilización en la construcción de la presente invención.

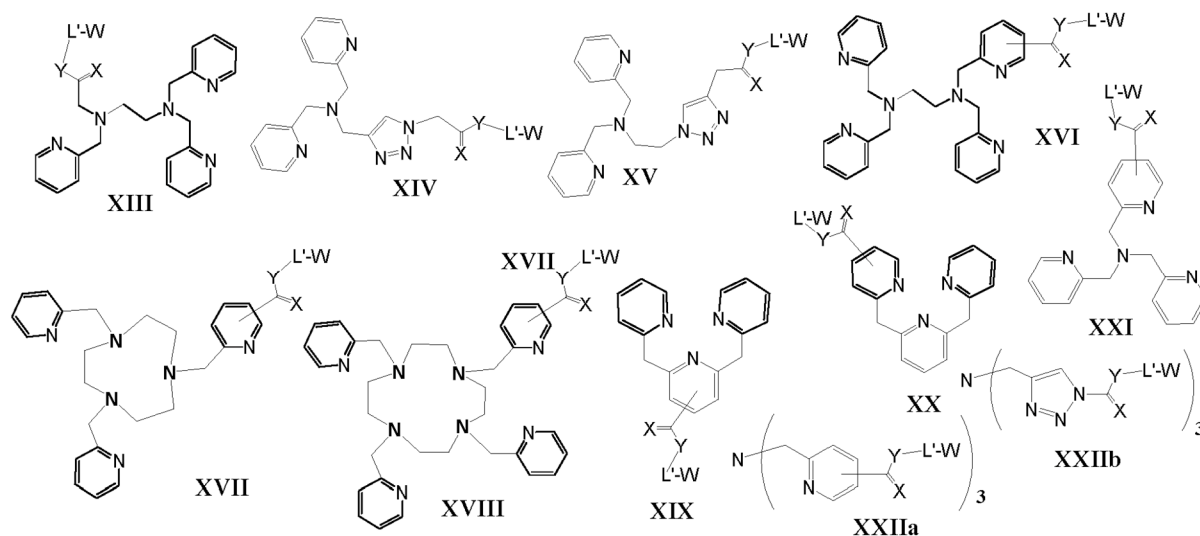
Otra clase atractiva de moléculas útiles en la presente invención para disminuir el logP son monómeros, oligómeros o polímeros de carbohidratos, tales como oligómeros de quitosano, alginato con ácido hialurónico o derivados de los mismos. Son especialmente atractivos los oligómeros de quitosano, que son oligómeros de 2-desoxi-2-amino glucosa. El quitosano tiene actividad antibacteriana en sí mismo, por ejemplo, tal como se describe por Kim et al., en Biotechnology and Bioprocess Engineering (2016), 21 (1), 183-189.

Tal como se ha representado anteriormente, la alteración de la concentración de zinc puede tener un efecto terapéutico. Las partículas de óxido de zinc se utilizan ampliamente como agentes antibacterianos. El mecanismo del efecto terapéutico se ha descrito, por ejemplo, por Manzoor Umair, M. et al., en PloS one (2016), 11 (5), e0154704. Los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar en formulaciones de nanopartículas de ZnO, tales como las descritas por Pati et al. en Nanomedicine (2014), 10 (6), 1195-1208. Además, existe una correlación documentada entre un nivel bajo de zinc y el cáncer de próstata (CaP), por ejemplo, tal como se ha descrito por Costello et al. en Prostate Cancer and Prostatic Diseases (2004) 7, 111-117.

Tal como se da a conocer en el presente documento, se ha sintetizado una variedad de combinaciones de estructuras que comprenden las unidades de 2-metil-piridilo que poseen uno o más enlazadores que se pueden unir a un grupo funcional. Mediante las estructuras generales XIII - XXII en el esquema 4 se ilustra un conjunto no limitante de bloques de construcción preferentes útiles en la divulgación. En este esquema, los grupos $-L'-Y-C(=X)-$ y $-L'-Y-C(=X)-CH_2-$ pueden indicar el enlazador, L, tal como se define en el presente documento (en los que X es un átomo donador, esta parte del "enlazador" puede considerarse de manera alternativa como parte del resto quelante); X indica O o S, e Y indica $-O-$ o $-NR-$ (en el que R es H o alquilo C_{1-6} , por ejemplo, alquilo C_{1-3}); y W puede ser cualquiera de estos grupos, tal como como se definen en el presente documento. En estas estructuras, todas las unidades quelantes de zinc tienen un porcentaje de nitrógeno aromático igual o superior al 50 %. La elección adecuada de $W-L'-Y-C(=X)-$ y $W-L'-Y-C(=X)-CH_2-$ proporciona las propiedades deseadas, por ejemplo, mayor solubilidad en agua, menor toxicidad, procedimientos para la unión de vectores de dirección, funcionalidades de profármaco, anticuerpos monoclonales o portadores macromoleculares.

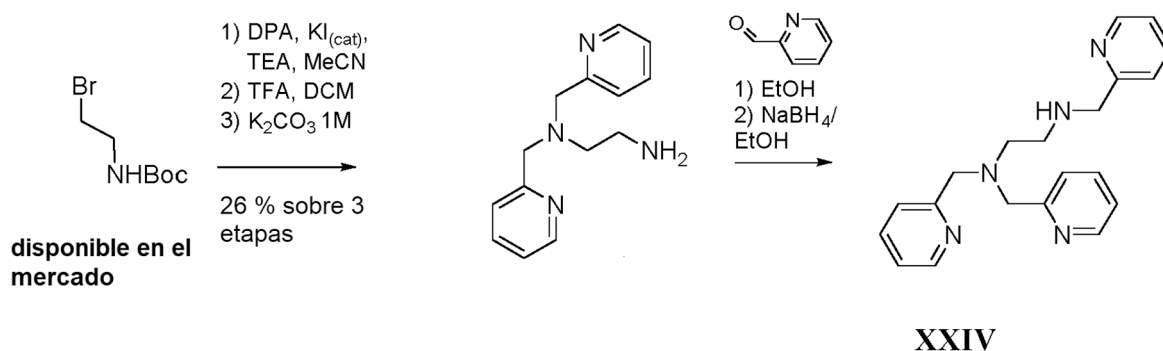
Cada uno de los siguientes esquemas se proporciona para el propósito de ilustración y descripción solamente, y no están destinados a una definición de los límites de la presente invención. Por tanto, se indican como ejemplo miembros de la biblioteca de compuestos que pueden utilizarse en la enfermedad respectiva, pero no se limitan a las estructuras generales XIII - XXII en el esquema 4 o a cualquiera de las estructuras específicas mostradas en los esquemas 9-12.

Esquema 4

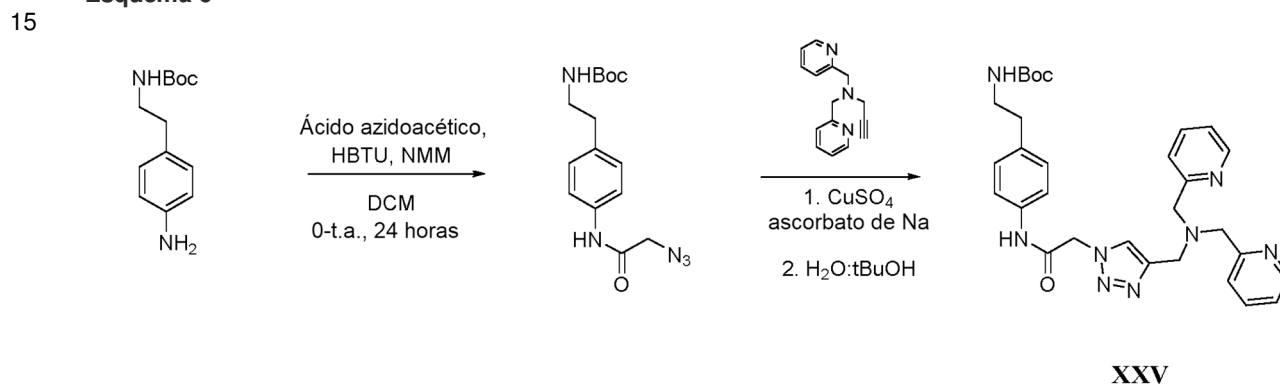


- 5 Las sustancias, según la presente invención se pueden sintetizar utilizando procedimientos bien conocidos del estado de la técnica en química orgánica. Los esquemas 5-9 indican como ejemplo bloques de construcción sintéticos útiles y que se utilizan en la síntesis de las estructuras ilustradas en los esquemas 10-18. Los compuestos resultantes son compuestos preferentes según la divulgación.

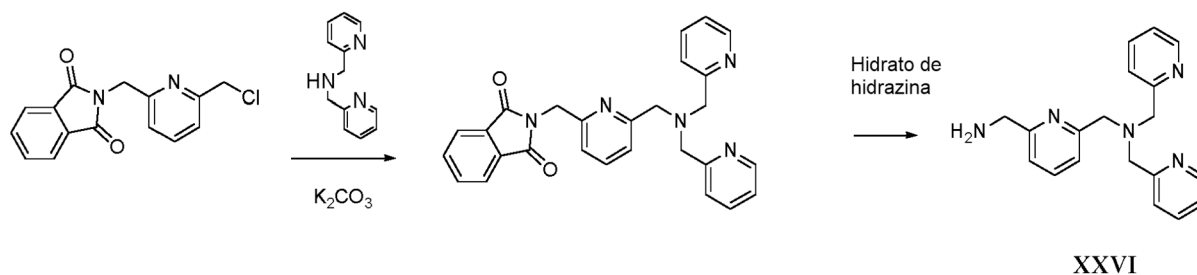
10 Esquema 5



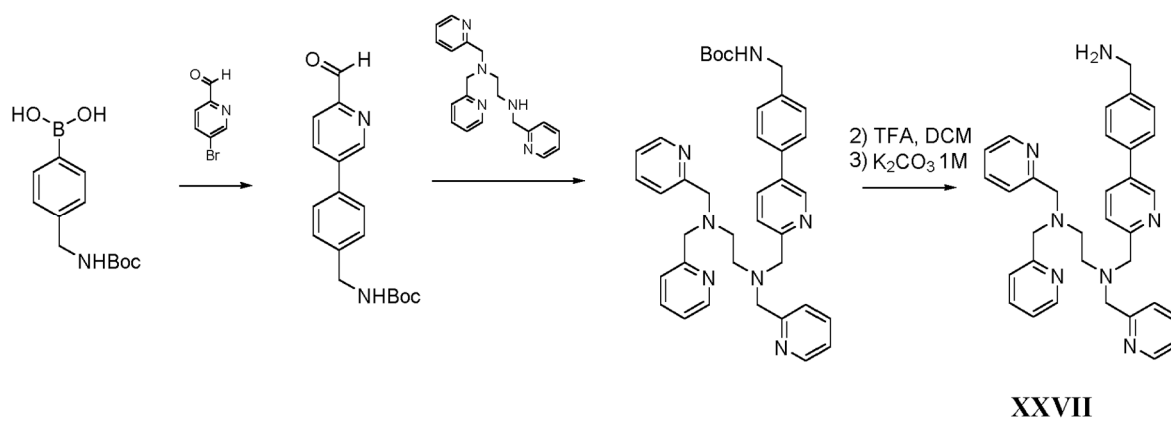
Esquema 6



Esquema 7

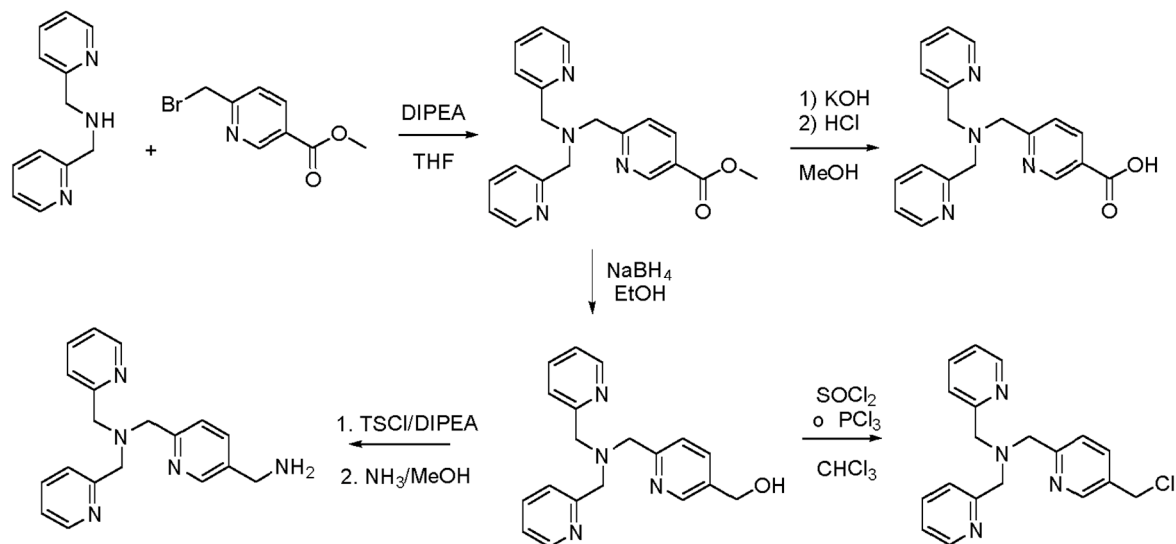


5 Esquema 8

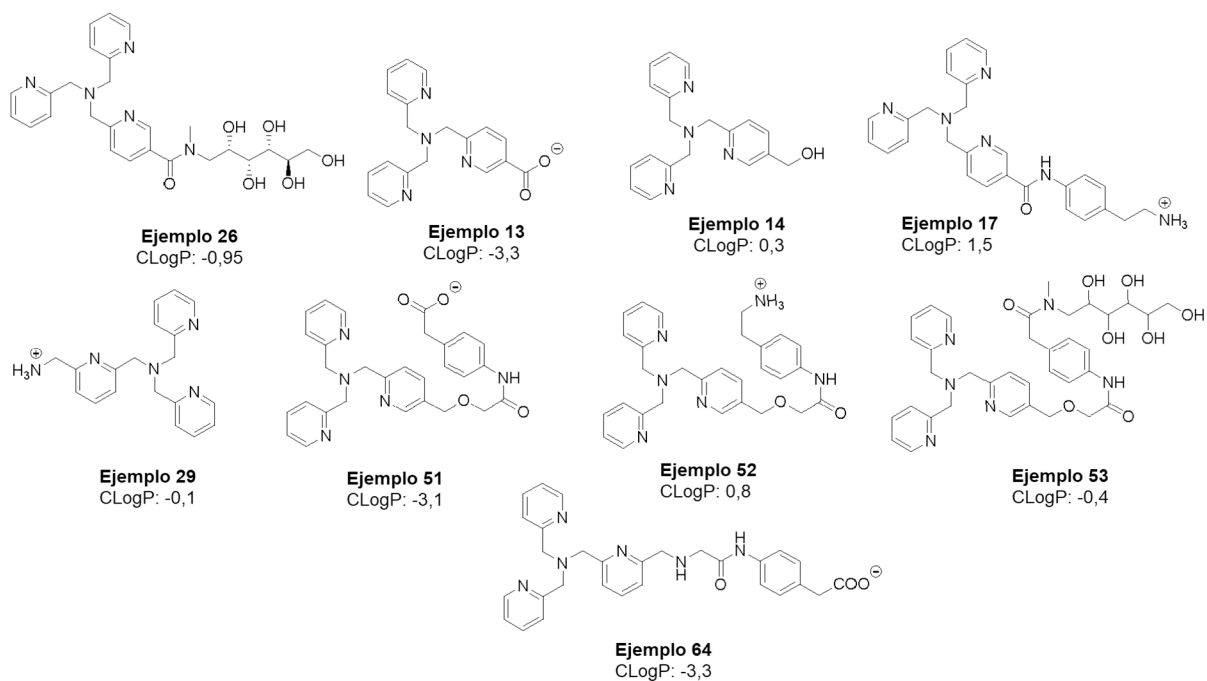


10

Esquema 9

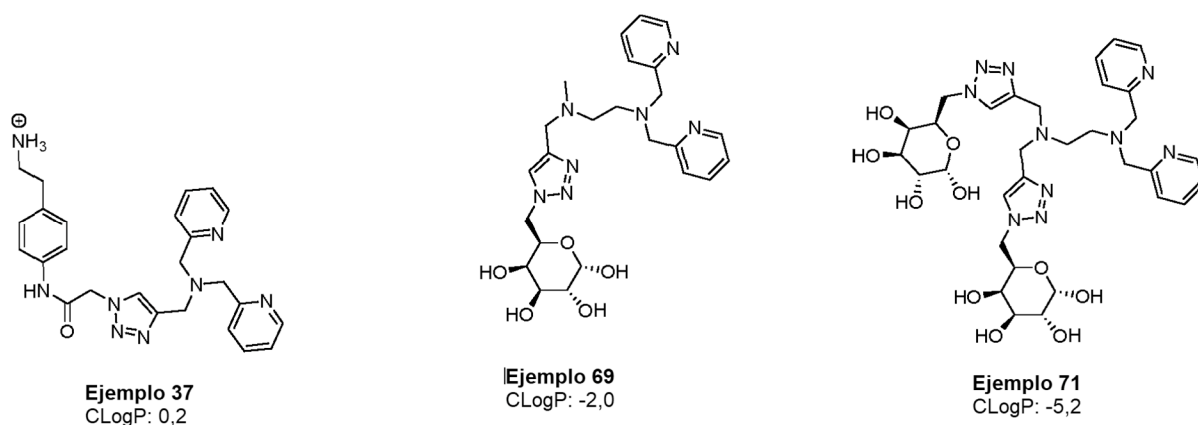


Esquema 10

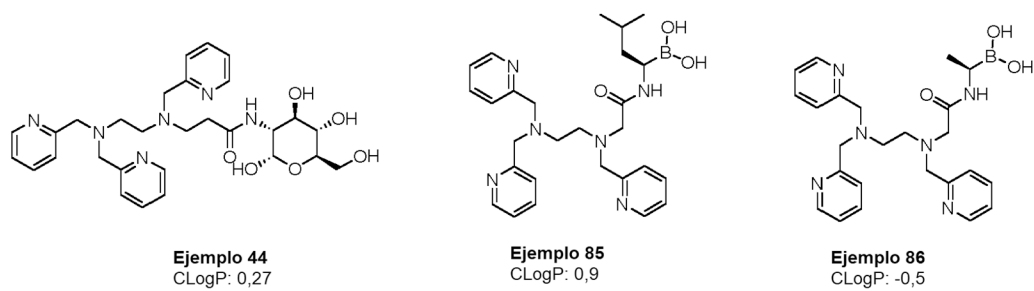


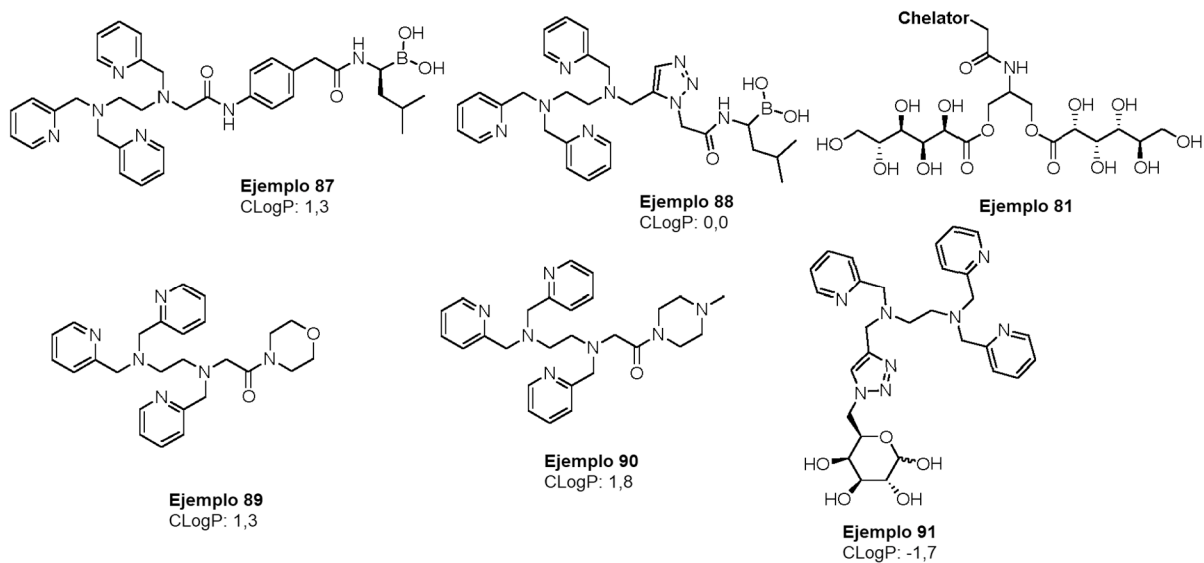
5

Esquema 11

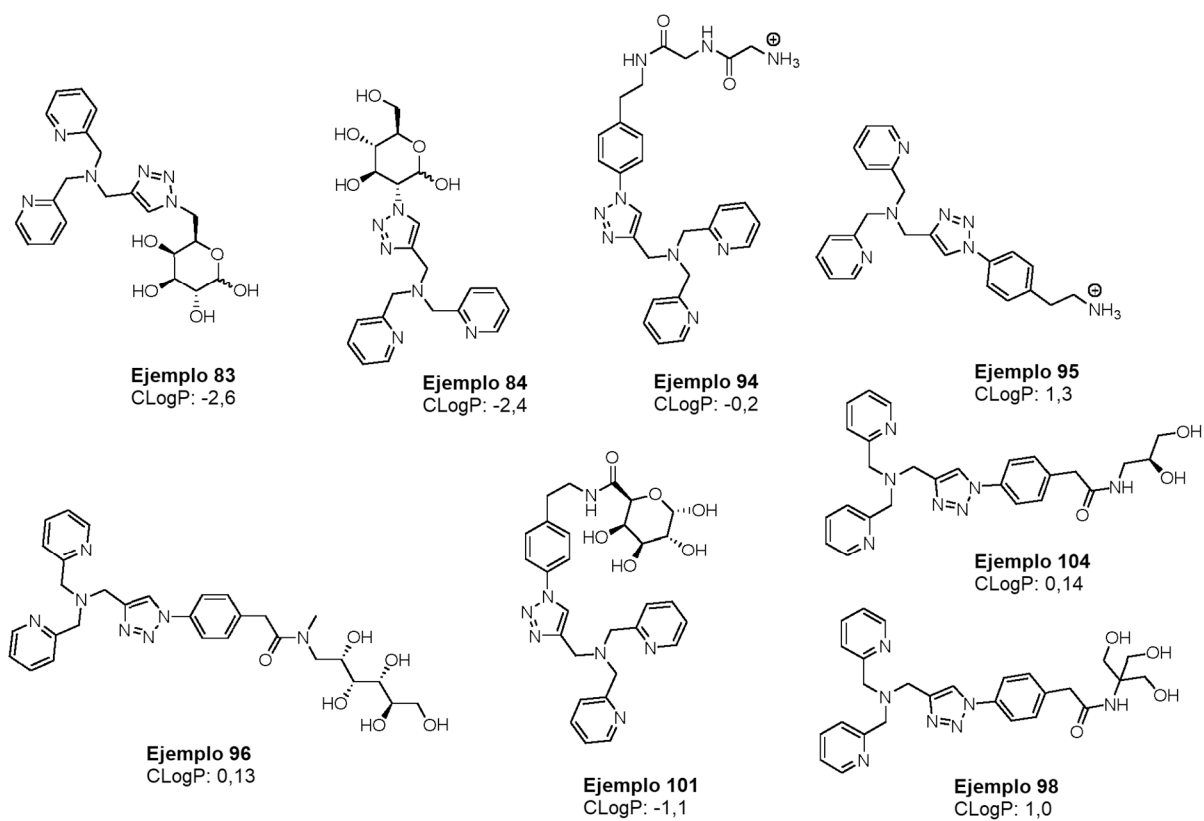


10 Esquema 12

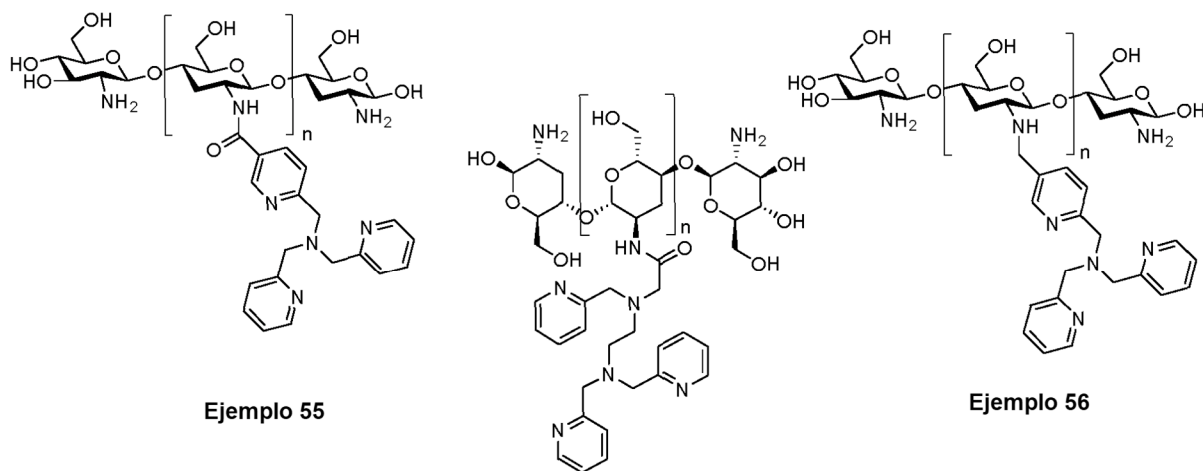




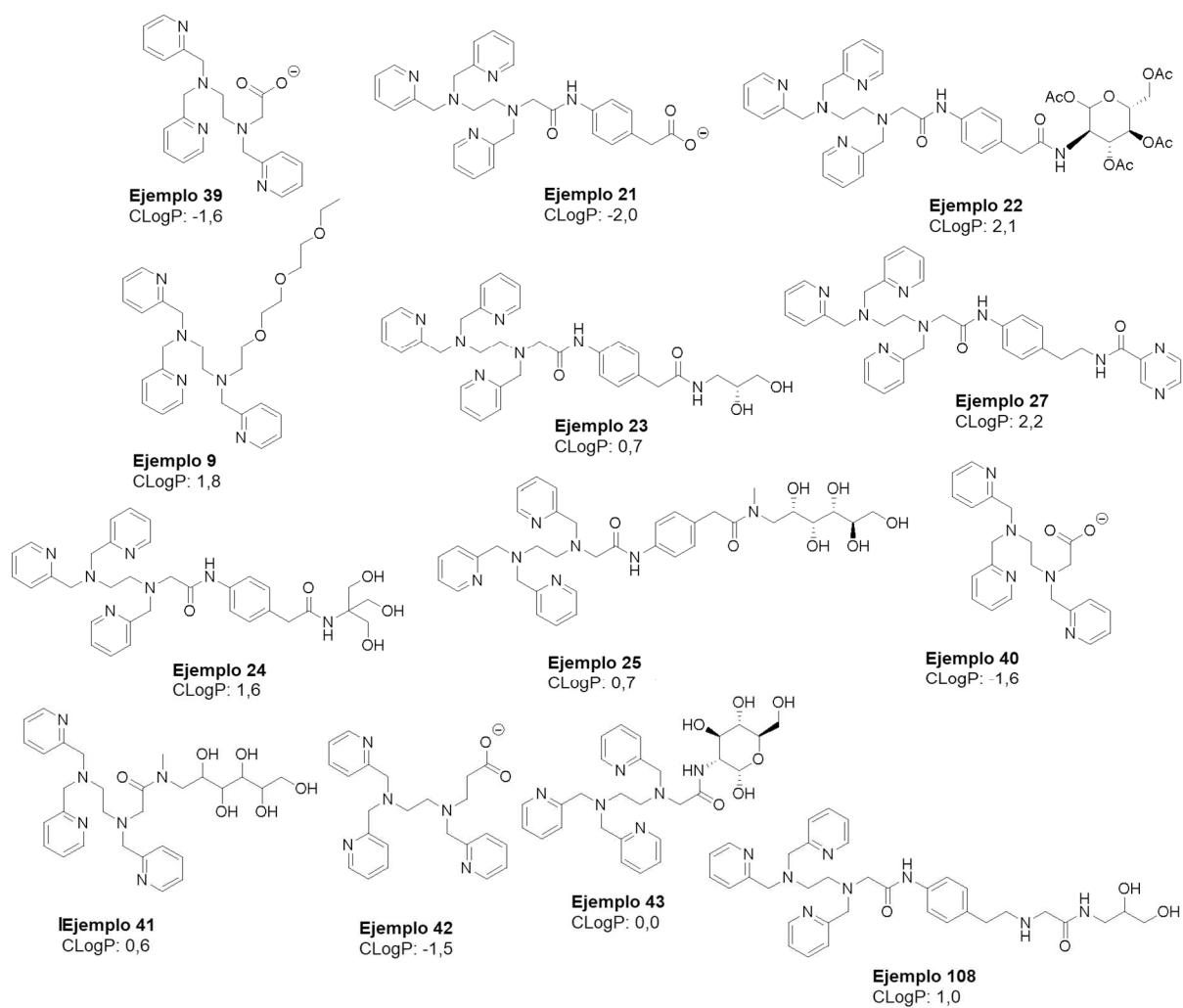
Esquema 13



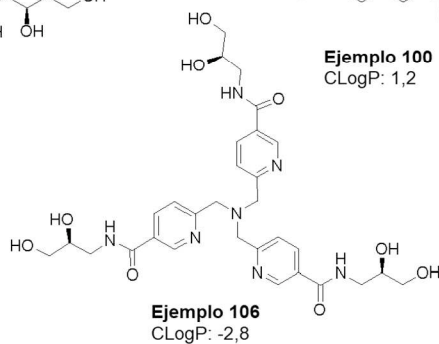
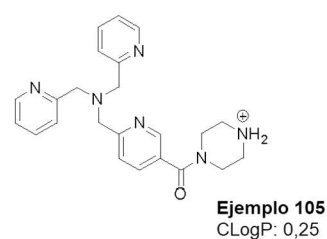
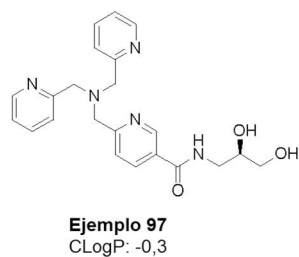
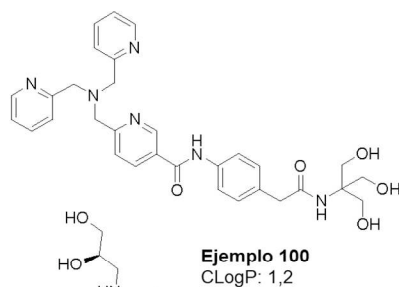
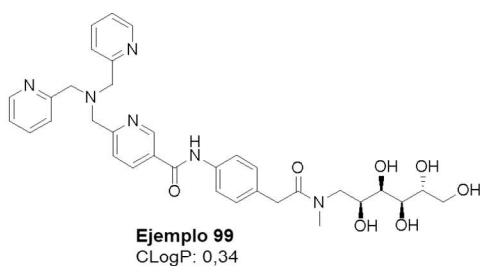
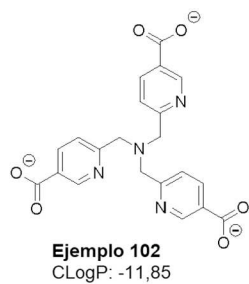
Esquema 14



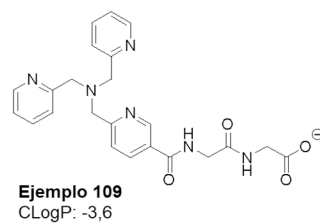
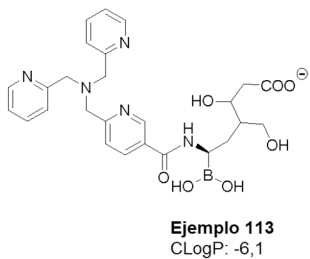
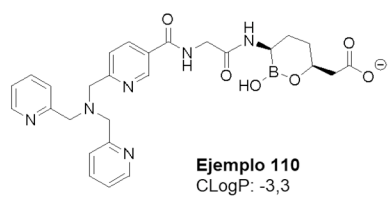
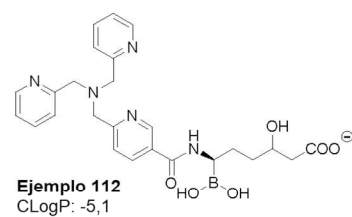
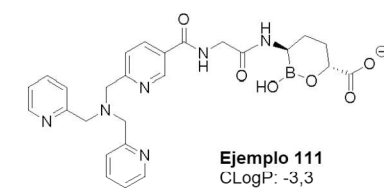
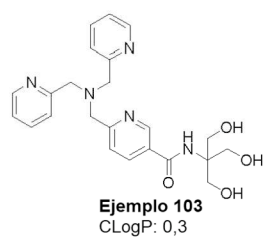
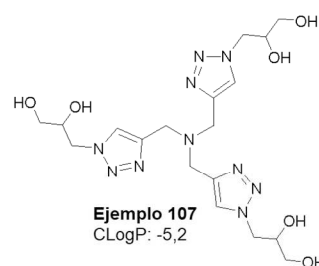
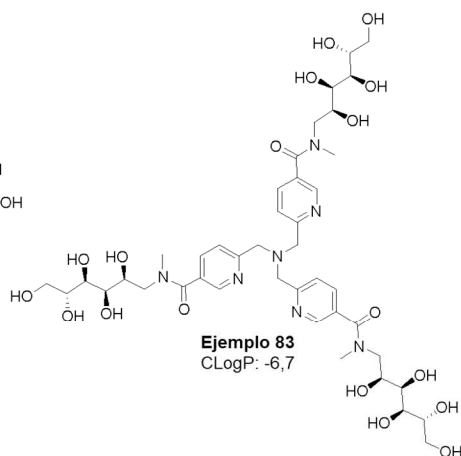
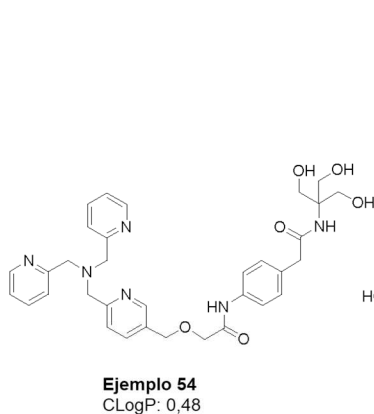
5 Esquema 15



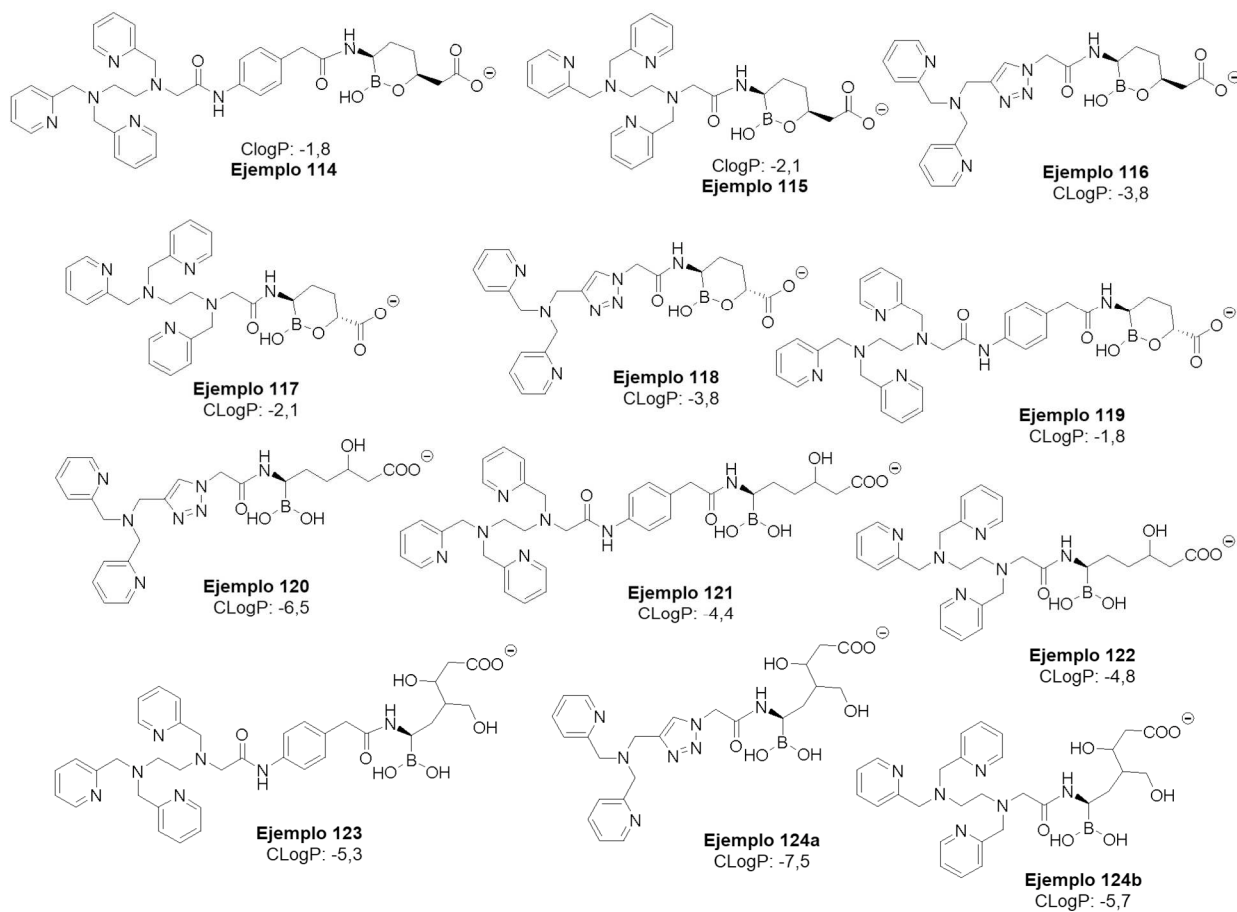
Esquema 16



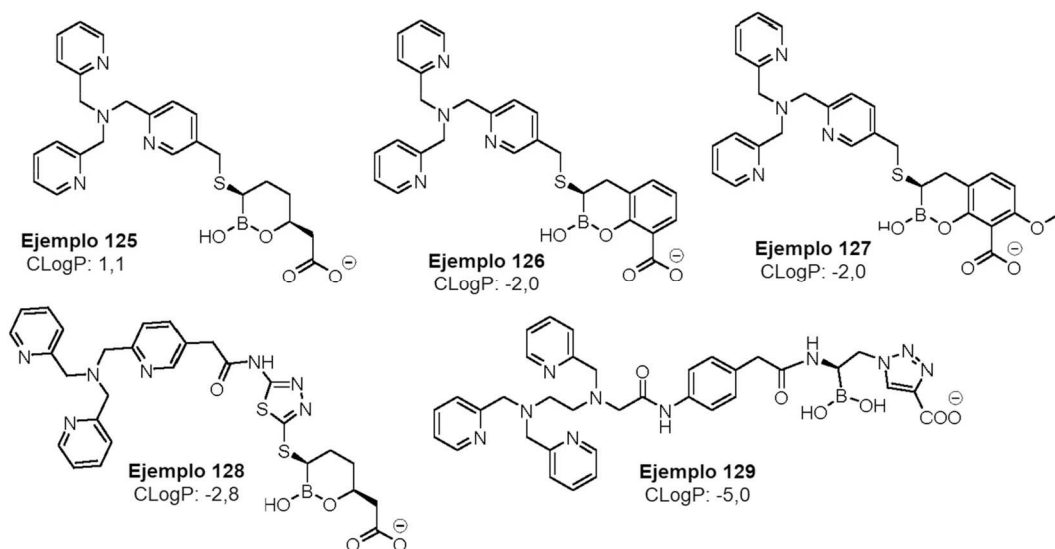
5 Esquema 17

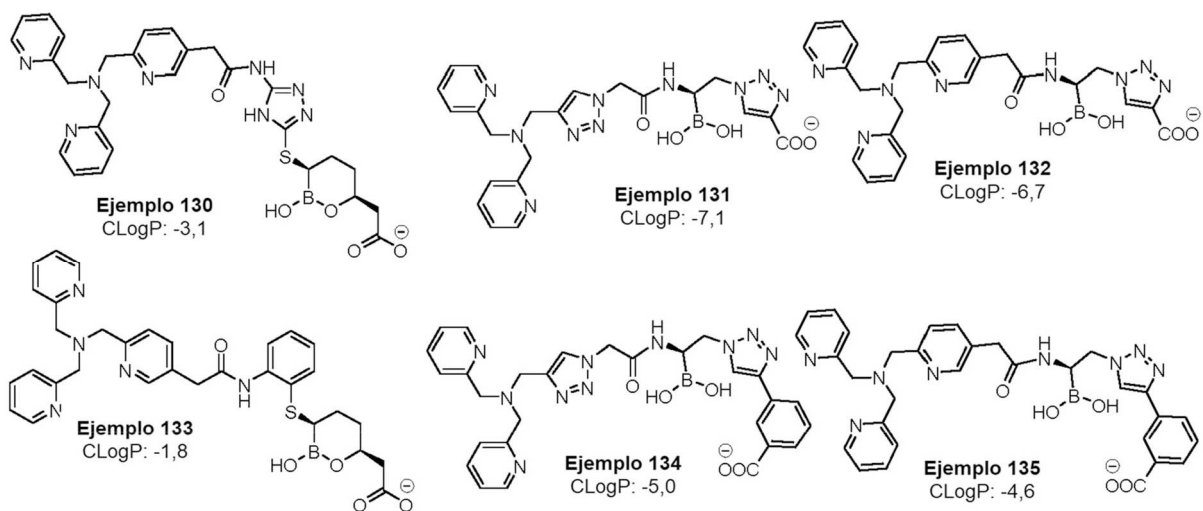


Esquema 18

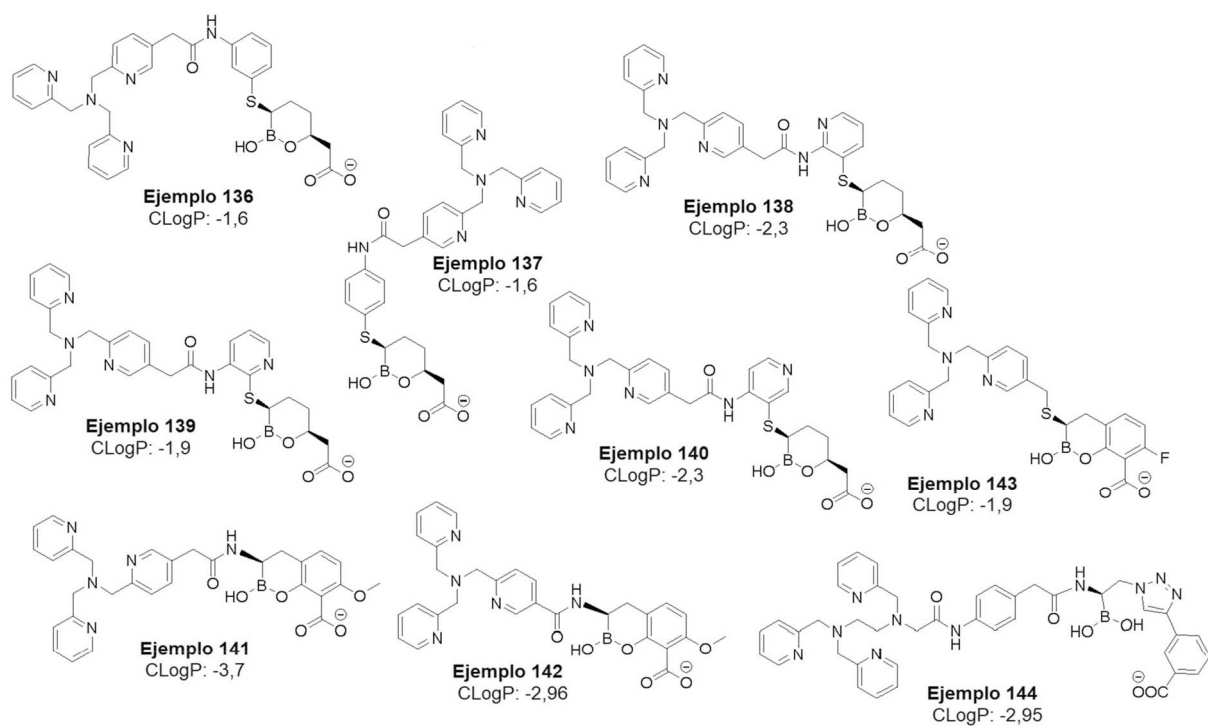


5 Esquema 19

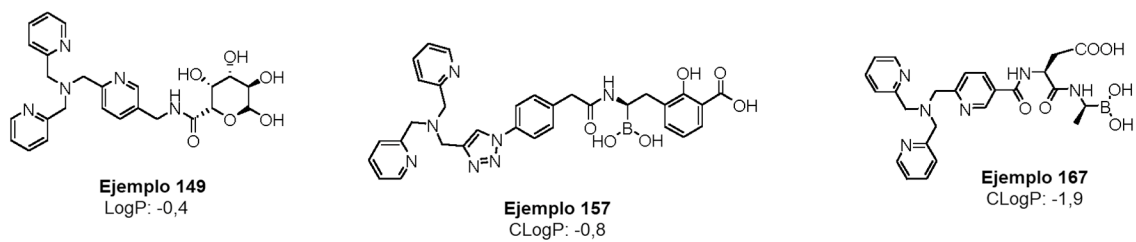


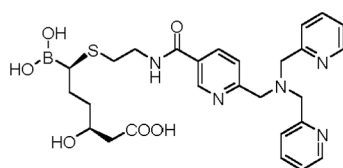


Esquema 20

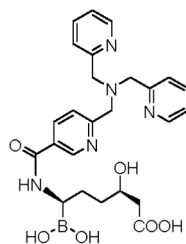


Esquema 21

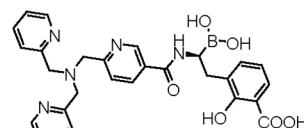




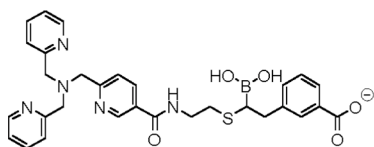
Ejemplo 160
CLogP: -1,3



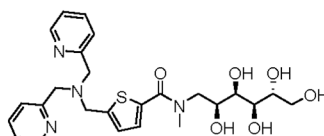
Ejemplo 163b
CLogP: -2,2



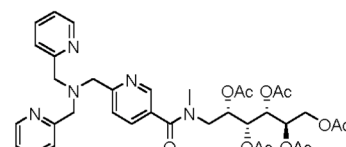
Ejemplo 165
CLogP: 0,7



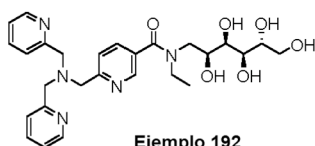
Ejemplo 174
CLogP: -2,7



Ejemplo 184
CLogP: 0



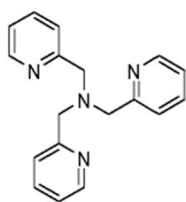
Ejemplo 191
CLogP: 0,56



Ejemplo 192
LogP: -0,25

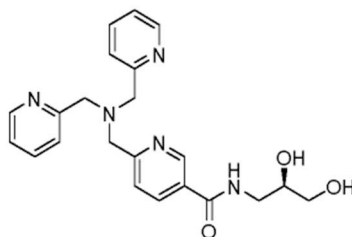
En una realización, la presente divulgación puede ilustrarse mediante los resultados experimentales para las estructuras en el esquema 21. TPA *N,N,N*-(tris(2-piridil-metil)amina) es un ligando disponible en el mercado conocido de la técnica anterior como un quelante de zinc lipófilo selectivo, análogo a TPEN. Ninguno de los dos últimos es útil como fármaco, ya que tienden a atravesar las membranas de las células eucariotas y provocan interferencia con algunas de las 6000 enzimas intracelulares dependientes del zinc. En los ejemplos 97 y 26, un grupo 2,3-dihidroxi-propil-amino-carbonilo y un grupo pentahidroxi-hexil-metilaminocarbonilo están unidos de manera covalente al ligando TPA, respectivamente. Los valores de MIC permanecen iguales, pero a lo largo de la serie de 3 compuestos, el logP disminuye hasta un valor negativo, mientras que la EC₅₀ en células hepG2 aumenta drásticamente desde 10 μM, que está muy por debajo de la concentración de MIC eficaz para TPA, hasta el compuesto no tóxico del ejemplo 26, tal como se ilustra en los ejemplos 201 y 211.

Esquema 22



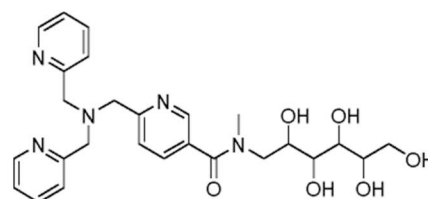
TPA

Log P: 2,7
EC₅₀ en hepG2: 10 μM
MIC*: 1/0,125 mg/ml
a 50 μM de TPA



Ejemplo 97

Log P: 0,79
EC₅₀ en hepG2: 130,6 μM
MIC*: 2/0,125 mg/ml
a 50 μM de ejemplo 97



Ejemplo 26

Log P: -0,59 (CLogP: -0,96)
EC₅₀ en hepG2: > 1.000 μM
MIC*: 1/0,125 mg/ml
a 50 μM de ejemplo 26

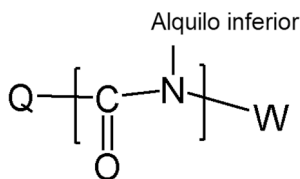
*Los números proporcionados en cada lado de la barra invertida son los valores de MIC para meropenem en las dos cepas resistentes aisladas clínicamente de *P. aeruginosa*, que alberga la MBL VIM-2, y *K. pneumoniae*, que alberga la MBL NDM-1, en presencia de inhibidor 50 μM. En ausencia de inhibidor, el valor de MIC para meropenem es 32-64 mg/l.

Otro parámetro importante de los compuestos, según la presente invención, es la estabilidad de almacenamiento. Un requisito previo para que se desarrolle un candidato a fármaco es que se pueda almacenar sin cambios en la estructura química del principio farmacéutico activo, API. Los enlazadores habituales que pueden someterse a escisión hidrolítica o enzimática son enlazadores que comprenden enlaces acetal que consisten en

En Carbohydrate Research, volumen 346, nº 1, 2011, Benoist, E. et al. describen agentes quelantes que comprenden un grupo *bis*-2-piridil-metilamino combinado con un grupo triazol, proporcionando ligandos 4-pod unidos a un grupo W soluble en agua. La utilización prevista es en la formación de radioimágenes nucleares utilizando PET y SPECT. No se proporciona ninguna sugerencia para la utilización contra bacterias o enfermedades infecciosas. Una característica estructural de L en esta tecnología es un enlazador amino-acetal que tiene una capacidad inherente para la escisión en un sistema biológico, liberando condicionalmente el quelante que puede entrar en las células eucariotas, ejerciendo efectos tóxicos, tal como se ha descrito en la técnica anterior.

Ahora se ha descubierto que, cuando un quelante de zinc se une a una cadena lateral no peptídica W, tal como se describe en el presente documento, los compuestos son más estables en solución en comparación con los compuestos peptídicos que se describen en la Patente WO 2015/049546. Esto se muestra cuando el ejemplo 195, incluido como ejemplo de comparación, se compara con el ejemplo 26 (tal como se ilustra mediante el ejemplo 110 de la presente solicitud). Sin embargo, dado que el ejemplo 195 todavía tiene valores de MIC excelentes y demuestra un valor de EC₅₀ muy elevado en la toxicidad para células eucariotas, los compuestos peptídicos todavía pueden ser útiles, por ejemplo, como productos farmacéuticos liofilizados.

Con respecto a la estabilidad, en una realización de la presente invención, los compuestos comprenden un enlace amida *N*-alquilado, representado por la siguiente fórmula:



En esta fórmula, Q y W son como se definen en el presente documento, y "alquilo inferior" es cualquier grupo alquilo C₁₋₆ de cadena lineal o ramificada, de manera preferente, un grupo alquilo C₁₋₄, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₃. Este principio es bien conocido en la técnica anterior para péptidos (por ejemplo, tal como se ha descrito por Schönauer et al, en J. Med. Chem. (2016), 59, 5695-5705, por Chatterjee et al en Nature America (2012), 7(3), 432-445, y por Ovidia et al en Molecular Pharmaceutics (2011), 8, 479-487), pero no se ha descrito en relación con agentes antibacterianos sintéticos. Cada uno de los ejemplos 25, 26, 41, 69, 185, 187, 189 y 190 de la presente invención tiene un enlace amida *N*-alquilado como característica estructural y estos representan un conjunto de compuestos preferentes.

Los compuestos, según la presente invención, se pueden utilizar solos o en combinaciones adyuvantes con fármacos que afectan a la enfermedad respectiva. En el caso de la terapia de una infección bacteriana, parasitaria o vírica en un organismo huésped, los compuestos se pueden utilizar de manera sinérgica junto con cualquier agente antibacteriano utilizado terapéuticamente. El organismo huésped puede ser cualquier organismo vivo que sufra una invasión o infección no deseada por un organismo diana. En general, la diana biológica puede, por tanto, estar presente en cualquier organismo vivo, que consista o comprenda células vivas, de manera más preferente, un animal de sangre caliente, por ejemplo, un mamífero.

Habitualmente, según la presente invención, se puede utilizar una combinación de un antibiótico β-lactámico del estado de la técnica, tal como un carbapenem, y un compuesto, tal como se describe en el presente documento. El antibiótico β-lactámico del estado de la técnica se puede combinar o reemplazar por cualquier combinación de uno o más agentes antibacterianos conocidos en la técnica anterior, por ejemplo, tetraciclinas, quinolonas, rifamicinas, sulfonamidas, trimetoprim, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, oxazolidinonas, glicopéptidos, cicloserina, isoniazida, daptomicina, ciclosporina, fenazinas o derivados de los mismos.

Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría relacionada con su mecanismo de acción, una ventaja de la presente tecnología en comparación con la técnica anterior (por ejemplo, en comparación con los agentes de APC, tales como EDTA y DTPA) es que los compuestos de la presente invención inhiben enzimas bacterianas de manera irreversible (esto está respaldado por los ejemplos 204, 207, 208 y 209). Una ventaja adicional es que la frecuencia de resistencia cuando estos se administran simultáneamente con agentes antibacterianos convencionales es

notablemente baja (esto está respaldado por el ejemplo 205). A 50 mg/l, por ejemplo, el compuesto ensayado en el ejemplo 205 muestra repetidamente cero colonias restantes cuando se utiliza en combinación con concentraciones subclínicas de meropenem. La capacidad de utilizar un agente antibacteriano convencional (por ejemplo, un antibiótico β -lactámico) a concentraciones subclínicas es particularmente ventajosa. La utilización de cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento en combinación con un agente antibacteriano a concentraciones subclínicas (por ejemplo, a una concentración inferior a 10 mg/l, inferior a 8 mg/l, inferior a 4 mg/l o inferior a 2 mg/l) representa una realización preferente de la presente invención. Habitualmente, los agentes antibacterianos, tales como el meropenem, se pueden utilizar en la clínica en concentraciones de 4-8 mg/l. El ejemplo 205A indica que la frecuencia de resistencia es cero a una concentración de meropenem de 2 mg/l. El ejemplo 205B muestra que la frecuencia de resistencia también depende de la concentración del adyuvante, a dosis, como mínimo, de menos de 10 veces las concentraciones que muestran toxicidad.

Otra forma de alterar la homeostasis del zinc en las bacterias es inducir un aumento de zinc en el espacio periplásmico de las bacterias o en otros compartimentos pertinentes. En una realización adicional, los quelatos de zinc de la presente invención pueden, por tanto, utilizarse para transferir zinc a estos compartimentos. Con este propósito, los compuestos se quelan previamente con una cantidad molar adecuada de Zn^{2+} , normalmente en una proporción 1:1 entre el quelante y el ion zinc. Dichos compuestos que portan iones zinc forman un aspecto adicional de la presente invención. Los quelatos de zinc de los compuestos de la presente invención se pueden preparar utilizando procedimientos conocidos, por ejemplo, tal como se ha descrito por Yang et al. en *Inorg. Chem.* (2000), 39, 2397-2404. Por ejemplo, los quelatos de zinc se pueden obtener mezclando una solución metanólica del compuesto de la presente invención (el ligando) con una solución metanólica de $ZnCl_2$ en una proporción molar 1:1 entre el ligando y el zinc, y recogiendo el sólido resultante. Los quelatos de zinc se pueden formular y utilizar, tal como se ha descrito en la técnica anterior, por ejemplo, por Prakash, V.; Suresh, M. S. en *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* (2013), 4 (4), 1536-1550.

En una realización adicional de la presente invención, los compuestos descritos en el presente documento también se pueden utilizar para diagnóstico *in vitro*. El creciente problema relacionado con las β -lactamasas, por ejemplo, las carbapenemasas como las MBL, en patógenos gram-negativos multirresistentes, que provocan infecciones mortales, ha generado la necesidad de procedimientos de detección rápidos y precisos para orientar en la toma de decisiones del tratamiento. Existen kits de ensayo comerciales disponibles en el mercado basados en combinaciones de agentes quelantes como dipicolamina (DPA) o EDTA, y un antibiótico β -lactámico adecuado. El kit de detección de MBL total (ROSCO) es una prueba de placas basada en inhibidores para la detección de MBL. El kit se basa en la utilización de EDTA y DPA en combinación con imipenem o meropenem. Otro ejemplo de la técnica anterior es una prueba que puede demostrar la discriminación entre bacterias productoras de MBL, KPC y OXA-48, por ejemplo, tal como se ha descrito por Teethaisong et al. en *Journal of Applied Microbiology* (2016), 121, 408-414. Esta utiliza meropenem $\pm$ EDTA o PBA (ácido fenil-borónico) para discriminar entre productores de KPC y MBL, y temocilina con un aumento en el diámetro de zona igual o menor a 10 mm en combinación con falta de sinergia con meropenem $\pm$ EDTA o PBA como una prueba positiva para OXA-48. La temocilina no es hidrolizada por las MBL, tal como se ha descrito por Pollini et al., en *Antimicrob Agents Chemother.* (2013) 57 (1), 410-6. En este ejemplo, se utilizan placas de agar fluorescentes que utilizan el colorante resazurina, tal como se ha descrito por Sener et al., *J. Clin. Microbiol.* (2011), 49, 1124-1127. La cepa productora de OXA-48 se identifica utilizando el efecto conocido de la temocilina contra estos patógenos.

Sin embargo, muchas cepas están produciendo actualmente carbapenemasas D y MBL, por ejemplo, tal como se ha descrito por Porres-Osante et al., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2014), 79 (3), 399-400. Por tanto, existe una necesidad médica de poder distinguir entre todas las clases Ambler de bacterias productoras de lactamasa.

Sin embargo, una deficiencia de los kits de ensayo de disco de la técnica anterior es que pueden mostrar baja especificidad y valores predictivos positivos falsos (PPV) para algunas de las bacterias más relevantes clínicamente, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, por ejemplo, tal como se ha descrito por F. Hansen et al., en *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2014), 79, 486-488. El EDTA es un agente quelante inespecífico que puede inducir resultados falsos; la DPA es un agente quelante muy débil con un $pK_d < 8$. Por tanto, existe la necesidad de kits de ensayo que mejoren el rendimiento de los kits comerciales.

Dado que los compuestos de la presente invención muestran un efecto inhibidor fuerte y selectivo sobre bacterias gram-negativas que albergan MBL, se pueden utilizar para verificar en pruebas de placa simples si una bacteria alberga MBL. Como ejemplo no limitante, el compuesto del ejemplo 26 tiene un fuerte efecto inhibidor selectivo como adyuvante sobre aislados clínicos resistentes de bacterias gram-negativas que albergan MBL junto con una carbapenema (por ejemplo, meropenem), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* o *E. coli*. Sin embargo, el compuesto del ejemplo 26 no muestra actividad contra cepas que producen carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). Por tanto, los discos que comprenden el compuesto del ejemplo 26 solo (disco A) y los discos que comprenden el compuesto del ejemplo 26 más un carbapenema (disco B) pueden utilizarse para decidir si las cepas son resistentes a los carbapenemas y si son positivas en MBL. El compuesto del ejemplo 115 muestra actividad contra bacterias basadas tanto en MBL como en KPC. Por tanto, el kit puede comprender, además, discos que comprenden el compuesto del ejemplo 115 solo (disco C) y discos que comprenden el

compuesto del ejemplo 115 más una carbapenema (Disco D). Tal como es bien conocido por la técnica anterior, se puede utilizar un disco que comprende temocilina para identificar a los productores de OXA-48. En el experimento (i), cuando las placas de agar que comprenden los aislados bacterianos se incuban con el disco A y a continuación, A + B, los diámetros de zona inalterados indican los aislados bacterianos sin MBL. En el experimento (ii), las placas incubadas con el mismo aislado con disco C y, a continuación, C + D, los diámetros de zona inalterados indican aislados bacterianos sin MBL o KPC. Los diámetros de zona inalterados en el experimento (i), pero el diámetro de zona aumentado en el experimento (ii), indican cepas bacterianas con KPC, sin MBL. En el experimento (iii), un aumento en el diámetro de zona igual o inferior a 10 mm combinado con diámetros de zona inalterados en los experimentos (i) y (ii) indica la presencia de un productor de OXA-48.

Las ventajas de la presente tecnología en comparación con la técnica anterior son que los compuestos de la presente invención, por ejemplo, el del ejemplo 26, son inhibidores de MBL mucho más fuertes que la DPA utilizada, por ejemplo, en el kit ROSCO, lo que permite la utilización de concentraciones mucho menores del adyuvante. Además, los compuestos de los ejemplos 110 y 115 y otros ejemplos en los esquemas 17-20 son los primeros compuestos, hasta donde se sabe, que inhiben tanto MBL como KPC como adyuvantes junto con una carbapenema.

En una realización adicional, los compuestos de la presente invención también son útiles contra la biopelícula. Las biopelículas comprenden sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que son polímeros de carbohidratos hidrófilos naturales que se forman de manera extracelular en un organismo huésped. Dado que una característica clave de los compuestos de la presente invención es su bajo logP, interactúan particularmente bien con EPS. Dado que los compuestos de la presente invención muestran una eficacia elevada contra especies gram-negativas multirresistentes que producen MBL, pueden utilizarse para reducir y/o prevenir la formación de biopelículas en infecciones causadas, por ejemplo, por *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* y otras especies productoras de MBL. Los quelantes de zinc, según la presente invención, también se pueden utilizar contra la formación de biopelículas con bacterias gram-positivas, por ejemplo, variantes de *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA). Se ha demostrado que estas especies son inhibidas por quelantes de zinc de la clase APC y TPEN, debido a sus moléculas de adhesión dependientes de zinc obligatorias para la formación de biopelículas, por ejemplo, tal como han descrito Conrady et al., PNAS (2008), 105 (49), 19456-19461. Tal como se muestra en la presente memoria descriptiva, los compuestos del presente documento muestran una selectividad quelante de metales elevada y una baja toxicidad, lo que los convierte en candidatos a fármacos prometedores.

La administración de los compuestos, según la presente invención, a un mamífero puede ser mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica médica, incluyendo la administración intravenosa, intracerebral, oral, parenteral, tópica, subcutánea o por inhalación. En el caso de adyuvantes antibacterianos, un régimen de administración especialmente atractivo para un quelante de zinc selectivo con baja toxicidad que tiene un efecto adyuvante es la administración sistémica continua del adyuvante combinada con la administración del agente antibacteriano respectivo. En el caso de sepsis causada por bacterias gram-negativas resistentes, el adyuvante se puede infundir de forma continua por vía intravenosa, mientras que un agente antibacteriano, por ejemplo, una carbapenema, por ejemplo, meropenem o imipenem, se administra según lo aprobado por las autoridades reguladoras respectivas. La infusión intravenosa continua de un compuesto, según la presente invención, también se puede utilizar de manera simultánea con otras vías de administración de agentes antibacterianos, por ejemplo, mediante inhalación de una formulación micronizada, mediante ingestión oral de un agente antibiótico en comprimidos o mediante la administración tópica del fármaco.

Cuando se utilizan como un agente antibacteriano o como un adyuvante para un agente antibacteriano o formulación que comprende los mismos, los compuestos se pueden administrar en una sola dosis para tomar a intervalos regulares, por ejemplo, una vez o dos veces al día, una vez cada 48 horas o una vez cada 72 horas. Las formulaciones sostenidas se pueden administrar a intervalos más largos, por ejemplo, 1 a 2 veces al mes o cada tres meses. La dosis precisa de los compuestos activos que se administrarán, el número de dosis diarias o mensuales y la duración del tratamiento dependerán de varios factores, que incluyen la edad del paciente y su peso, pero pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia.

Las composiciones se pueden formular según técnicas y procedimientos bien conocidos en la bibliografía y pueden comprender cualquiera de los portadores, diluyentes o excipientes conocidos. Por ejemplo, las composiciones/formulaciones que se pueden utilizar en la presente invención que son adecuadas para la administración parenteral pueden comprender de manera conveniente soluciones y/o suspensiones acuosas estériles de principios activos farmacéuticamente que, de manera preferente, se han hecho isotónicas con la sangre del receptor, en general, utilizando cloruro de sodio, glicerina, glucosa, manitol, sorbitol y similares. Además, la composición puede contener cualquiera de una serie de adyuvantes, tales como tampones, conservantes, agentes dispersantes, agentes que promueven el inicio rápido de la acción o la duración prolongada de la acción.

Las composiciones y formulaciones se pueden combinar con uno o más antioxidantes habituales, por ejemplo, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, BHA, BHT, ácido cítrico, goma de guayaco, lecitina, citrato

de lecitina, citrato de monoglicérido, citrato de onoisopropilo, galato de propilo, EDTA, ácido tartárico o cualquier combinación de los mismos.

Las composiciones/formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de polvo de stock purificado estéril, de manera preferente, cubierto por una envoltura o envolturas que pueden contener cualquiera entre una serie de adyuvantes, tales como tampones, agentes conservantes, agentes que promueven una liberación prolongada o rápida. Las composiciones/formulaciones para su utilización en la presente invención adecuadas para la administración local o tópica pueden comprender el agente terapéutico mezclado con ingredientes adecuados conocidos, tales como parafina, vaselina, cetanol, glicerol y similares, para formar pomadas o cremas adecuadas.

Tal como se entenderá, cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede proporcionarse en forma de una sal aceptable farmacéuticamente. Los compuestos, según la presente invención, se pueden convertir en una sal de los mismos, en particular, en una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos con un ácido o base inorgánico u orgánico. Entre los ácidos que pueden utilizarse para este propósito se incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido ascórbico. Entre las bases que pueden ser adecuadas para este propósito se incluyen hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o hidróxido de cesio, amoníaco y aminas orgánicas, tales como dietilamina, trietilamina, etanolamina, dietanolamina, ciclohexilamina y dicitlohexilamina. Los procedimientos para la formación de sales son convencionales en la técnica.

Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede proporcionarse en forma de un profármaco. El término "profármaco" se refiere a un derivado de un compuesto activo que experimenta una transformación en las condiciones de utilización, por ejemplo, dentro del cuerpo, para liberar un fármaco activo. Un profármaco puede ser, aunque no necesariamente, inactivo farmacológicamente hasta que se convierte en el fármaco activo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "profármaco" se extiende a cualquier compuesto que, en condiciones fisiológicas, se convierte en cualquiera de los compuestos activos descritos en el presente documento.

Entre los profármacos adecuados se incluyen compuestos que se hidrolizan en condiciones fisiológicas a la molécula deseada. Los profármacos pueden obtenerse habitualmente enmascarando uno o más grupos funcionales en la molécula original que se consideran, como mínimo, en parte, necesarios para la actividad utilizando un progrupo. Por "progrupo", tal como se utiliza en el presente documento, se entiende un grupo que se utiliza para enmascarar un grupo funcional dentro de un fármaco activo y que experimenta una transformación, tal como una escisión, en las condiciones de uso especificadas (por ejemplo, administración al cuerpo) para liberar un grupo funcional y, por tanto, proporcionar el fármaco activo. Los progrupos se unen habitualmente al grupo funcional del fármaco activo mediante un enlace o enlaces que se pueden escindir en las condiciones de utilización, por ejemplo, *in vivo*. La escisión del progrupo puede tener lugar de manera espontánea en las condiciones de uso, por ejemplo, mediante hidrólisis, o puede ser catalizada o inducida por otros medios físicos o químicos, por ejemplo, por una enzima, o mediante la exposición a un cambio en el pH, etc. Cuando la escisión es inducida por otros medios físicos o químicos, estos pueden ser endógenos a las condiciones de uso, por ejemplo, las condiciones de pH en un sitio diana, o estos se puede proporcionar de manera exógena.

En la técnica se conoce una amplia variedad de progrupos adecuados para enmascarar grupos funcionales en compuestos activos para proporcionar profármacos. Por ejemplo, un grupo funcional hidroxilo puede enmascararse como un éster, un éster de fosfato o un éster de sulfonato que pueden hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo original. Un grupo funcional amida puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo amino original. Un grupo carboxilo puede enmascararse como un éster o amida que puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo original. Otros ejemplos de progrupos adecuados serán evidentes para los expertos en la materia.

En una realización, los compuestos de la presente invención tienen un grupo funcional hidroxilo que se puede derivatizar para producir profármacos adecuados. Por ejemplo, el grupo hidroxilo se puede convertir en un éster de alquilo o arilo, un éster de fosfato, un éster de sulfonato, etc.

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más centros quirales y, por lo tanto, pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. El término "estereoisómero" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición espacial de los átomos o grupos. Entre los ejemplos de estereoisómeros se encuentran enantiómeros y diastereómeros. El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. El término "diastereoisómeros" se refiere a estereoisómeros con dos o más centros quirales que no son imágenes especulares entre sí. Se considera que la presente invención se extiende a diastereómeros y enantiómeros, así como a mezclas racémicas.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden separarse en sus enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, cuando estos contienen solo un centro quiral, estos pueden proporcionarse en forma de un racemato o mezcla racémica (una mezcla 50:50 de enantiómeros) o pueden proporcionarse como

enantiómeros puros, es decir, en forma R o S. Cualquiera de los compuestos que se presentan como racematos puede separarse en sus enantiómeros mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como separación en columna en fases quirales o mediante recristalización en un disolvente activo ópticamente. Aquellos compuestos, como mínimo, con dos átomos de carbono asimétricos pueden separarse en sus diastereómeros basándose en sus diferencias físico-químicas utilizando procedimientos conocidos *per se*, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada, y cuando estos compuestos se obtienen en forma racémica, posteriormente se pueden separar en sus enantiómeros.

También se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto, según la presente invención, junto con, como mínimo, un diluyente o portador aceptable farmacéuticamente.

Las composiciones que comprenden los inhibidores de MBL se formulan, de manera preferente, antes de la administración. Los principios activos en dichas composiciones pueden comprender del 0,05 % al 99 % en peso de la formulación. Las dosis apropiadas pueden depender del compuesto que se va a utilizar, la afección exacta que se va a tratar, la edad y el peso del paciente, etc., y se pueden determinar de manera rutinaria por el médico experto según principios bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, las dosis representativas pueden incluir de 1 a 200 o de 1 a 100 mg/kg, por ejemplo, de 5 a 70, de 5 a 50 o de 10 a 70 o de 10 a 50 mg/kg.

Por "aceptable farmacéuticamente" se entiende que los ingredientes deben ser compatibles con otros ingredientes de la composición, así como aceptables fisiológicamente para el receptor. Las composiciones farmacéuticas, según la presente invención, se pueden formular según técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica y ampliamente descritos en la bibliografía y pueden comprender cualquiera de los portadores, diluyentes o excipientes conocidos. Por supuesto, también se pueden incluir otros ingredientes, según técnicas bien conocidas en el sector, por ejemplo, estabilizantes, conservantes, etc. Las formulaciones pueden estar en forma de soluciones y/o suspensiones acuosas estériles de los principios activos farmacéuticamente, aerosoles, pomadas y similares. Las formulaciones también pueden estar en forma de liberación sostenida, por ejemplo, micropartículas, nanopartículas, emulsiones, nano-suspensiones, partículas de lípidos o aceites. Tal como se describe en el presente documento, los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar en formulaciones de nanopartículas de ZnO descritas, por ejemplo, por Pati et al. en *Nanomedicine* (2014), 10 (6), 1195-1208.

Además, un aspecto importante de la formulación de agentes antibacterianos está en forma de películas, parches o láminas que tienen el inhibidor de MBL recubriendo la superficie; estos forman un aspecto adicional de la presente invención.

Ejemplos

La presente invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra la pureza mediante HPLC del compuesto del ejemplo 26;
la figura 2 muestra la toxicidad *in vitro* de compuestos, según la presente invención, en células hepG2 humanas;
la figura 3 muestra la toxicidad *in vitro* de compuestos, según la presente invención, en células hepG2 humanas;
la figura 4 muestra los resultados de un estudio de destrucción con el tiempo del compuesto del ejemplo 26 con meropenem;
la figura 5 muestra la unión a proteínas del compuesto del ejemplo 26 a dos concentraciones diferentes;
la figura 6 muestra los resultados de un estudio de irreversibilidad del compuesto del ejemplo 26 con VIM-2 purificada. La parte izquierda de la figura muestra la configuración experimental;
la parte derecha muestra la actividad enzimática con los compuestos de los ejemplos 207a-c;
la figura 7 muestra los resultados de un estudio de restauración enzimática del compuesto del ejemplo 207c con Zn^{2+} ;
la figura 8 muestra la capacidad de restauración del zinc de la NDM VIM-2 después de la incubación *in vitro* con el compuesto del ejemplo 26 en comparación con la incubación con los patrones TPEN y EDTA;
la figura 9 muestra la interacción *in vitro* del compuesto del ejemplo 26 con enzimas humanas que contienen zinc - comparación con el quelante de APC, EDTA;
la figura 10 muestra los valores de MIC de un inhibidor a base de péptido (ejemplo 195) en comparación con un inhibidor no peptídico después del almacenamiento en solución;
la figura 11 muestra la UFC en sangre y líquido peritoneal de KP # 50752504 en función de la concentración de MEM; y
la figura 12 muestra el recuento de colonias en sangre y líquido peritoneal en ratones neutropénicos 1 y 5 horas después de la inoculación. Límite de detección 1,0 log₁₀ UFC/ml. ** p < 0,01, *** p < 0,001 frente al grupo con vehículo.

Procedimientos generales

Todos los reactivos y disolventes utilizados son de grado comercial y se utilizaron sin purificaciones adicionales antes de su utilización. Los espectros de RMN (¹H, ¹³C) se registraron en un espectrómetro Bruker AVI-600 MHz, AVII-400 MHz, un DPX-300 MHz o un DPX-200 MHz. Las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios y los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) en relación con CDCl₃ (7,26 ppm para ¹H y 77,16

ppm para ^{13}C) y $[\text{D}_6]$ DMSO (2,50 ppm para ^1H y 39,52 ppm para ^{13}C). Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro FT-IR de la serie Spectrum BX de Perkin-Elmer y solo se indican los picos seleccionados. Los espectros de masas se registraron a 70 eV en el espectrómetro Waters Prospec Q utilizando EI, ES o CI como procedimientos de ionización. Los espectros de masas de alta resolución se registraron en el espectrómetro Waters Prospec Q utilizando EI o ESI como procedimientos de ionización.

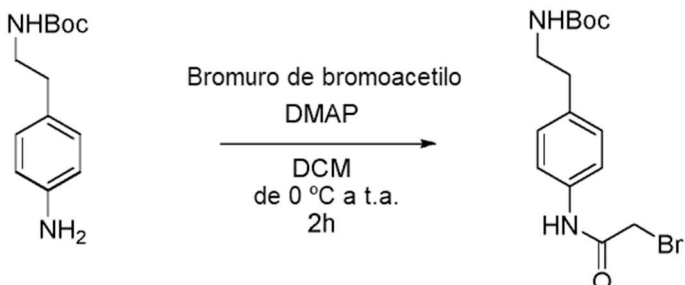
Ejemplo 1 - Síntesis de (4-(2-azidoacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).



Se disolvió (4-aminofenetil)carbamato de terc-butilo (2,33 g, 9,89 mmol, 1,0 eq.) en DCM (100 ml) y se mezcló con HBTU (3,75 g, 9,89 mmol, 1,0 eq.) y se enfrió hasta 0 °C utilizando un baño de hielo. Se añadió ácido azidoacético (1,0 g, 9,89 mmol, 1,0 eq.) a la mezcla en agitación, seguido de NMM (2,18 ml, 19,79 mmol, 2,0 eq.). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y 23 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se diluyó con NaHCO_3 0,5 M (100 ml) y la fase orgánica se separó. A continuación, la fase acuosa se extrajo dos veces con 50 ml de DCM, las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío.

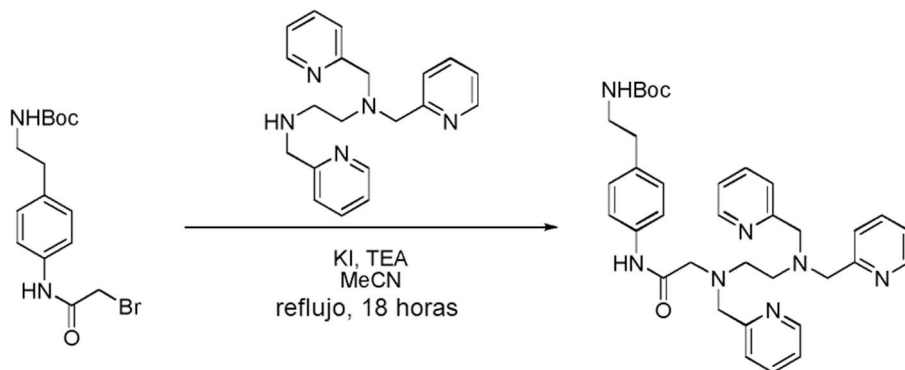
El material en bruto se purificó adicionalmente utilizando cromatografía en columna sobre SiO_2 con EtOAc al 50-100 % en heptano como eluyente. Esto produjo un sólido de color amarillo pálido.

Ejemplo 2 - Síntesis de (4-(2-bromoacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).



Se disolvió (4-aminofenetil)carbamato de terc-butilo (4,5 g, 21,83 mmol, 1,0 eq.) en DCM (150 ml) y se enfrió hasta 0 °C utilizando un baño de hielo. Se añadió DMAP (1,6 eq.) de una vez a la mezcla en agitación, seguido de la adición gota a gota de bromuro de bromoacetilo (1,2 eq.) en 50 ml de DCM. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C y, a continuación, 1,5 horas a temperatura ambiente antes de concentrarla al vacío. El material en bruto se purificó utilizando cromatografía en columna sobre SiO_2 con EtOAc al 75-100 % en heptano como eluyente. Esto produjo un sólido incoloro que se utilizó directamente en el siguiente ejemplo.

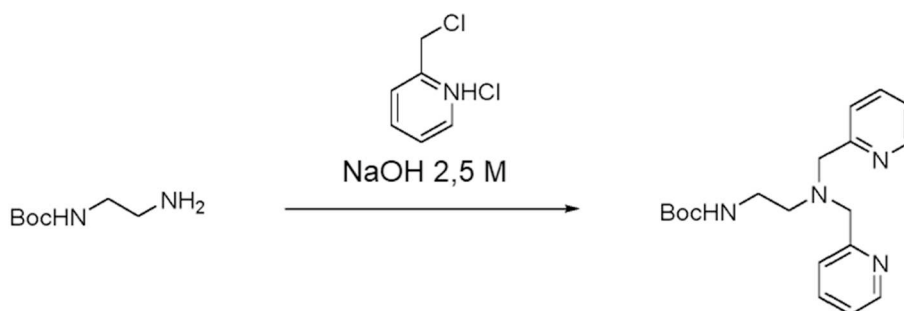
Ejemplo 3 - Síntesis de (4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).



Se disolvió el (4-(2-bromoacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo preparado en el ejemplo 2 (3,57 g, 9,99 mmol, 1,0 eq.) en acetonitrilo (350 ml). A continuación, se añadieron yoduro de potasio (1,0 g, 6 mmol, 0,6 eq.) y TEA (13,3 ml, 100 mmol, 10 eq.), seguidos de *N1,N1,N2*-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (4,0 g, 12 mmol, 1,2 eq.) disuelta en 50 ml de acetonitrilo. La mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante una noche. Después de enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente, se filtró sobre un filtro de vidrio para eliminar las sales inorgánicas. A continuación, la solución se concentró al vacío para producir un aceite de color marrón rojizo. Este aceite en bruto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre Al_2O_3 neutro con MeOH al 0-5 % en DCM como eluyente. Esto produjo el producto del título como un aceite rojo.

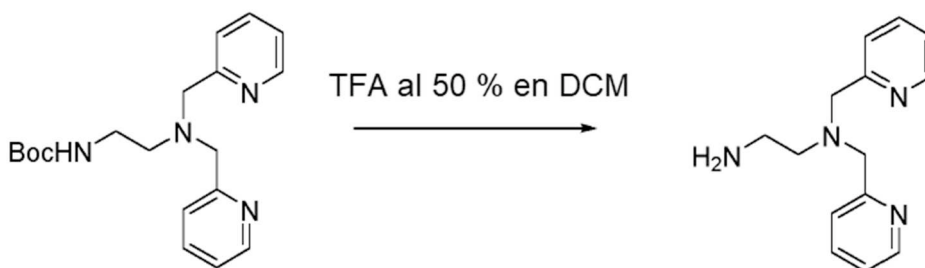
^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 10,40 (s, 1H), 8,51-8,48 (m, 1H), 8,47-8,44 (m, 2H), 7,59 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,57-7,49 (m, 3H), 7,39 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,14-7,10 (m, 4H), 7,10-7,06 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,33 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,27 (s, 2H), 2,81-2,71 (m, 4H), 2,68 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 1,40 (s, 9H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ 169,92 (s), 159,14 (s), 158,18 (s), 155,93 (s), 149,55 (s), 149,08 (s), 136,94 (s), 136,59 (s), 136,47 (s), 134,40 (s), 129,17 (s), 123,15 (s), 123,11 (s), 122,56 (s), 122,11 (s), 119,99 (s), 61,01 (s), 60,47 (s), 58,70 (s), 52,09 (s), 51,59 (s), 43,50 (s), 41,90 (s), 35,66 (s), 28,48 (s). HRMS: (TOF MS ES+): calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 610,3505, encontrado 610,3511.

Ejemplo 4 - Síntesis de (2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

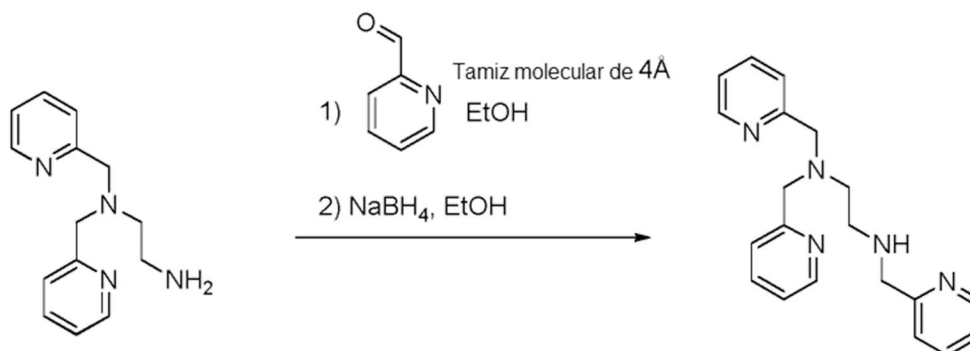


Se suspendió (2-aminoetil)carbamato de terc-butilo (75,0 g, 465,3 mmol, 1,0 eq.) en 1,5 litros de H_2O destilada. A continuación, se añadió clorhidrato de clorometil piridina (168 g 1,0 mol, 2,2 eq.) a la suspensión en agitación, seguido de NaOH 5 M (1,5 litros) enfriado en hielo. La suspensión se volvió de color rojo oscuro y ligeramente caliente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, la solución de color rojo intenso se extrajo con DCM (3 x 750 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron al vacío para producir un aceite de color rojo intenso que no necesitó purificación adicional. Las RMN fueron según los datos publicados. Véase Kikuchi et al., Inorg. Chem., 2009, 48 (16), págs. 7630-7638.

Ejemplo 5 - Síntesis de *N1,N1*-bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (intermedio).



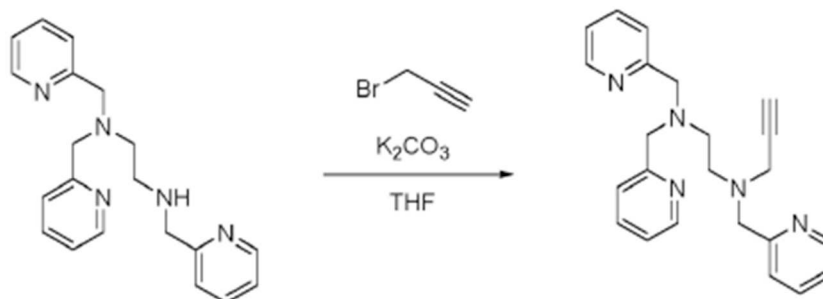
Se disolvió el (2-(bis(piridin-2-ilmetil) amino)etil)carbamato de terc-butilo preparado en el ejemplo 4 en 600 ml de DCM y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A continuación, se añadió lentamente ácido trifluoroacético (600 ml) a la mezcla en agitación a 0 °C. Una vez completada la adición, la mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas adicionales. La mezcla se concentró al vacío, se disolvió en NaOH 2 M (500 ml) y se extrajo tres veces con DCM (3 x 500 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron al vacío para producir 92 gramos (379 mmol, rendimiento del 82 % en dos etapas) como un aceite de color rojo intenso que no necesitó purificación adicional. Las RMN fueron según los datos publicados. Véase Kikuchi et al., Inorg. Chem., 2009, 48 (16), págs. 7630-7638.

Ejemplo 6 - Síntesis de *N1,N1,N2*-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (intermedio).

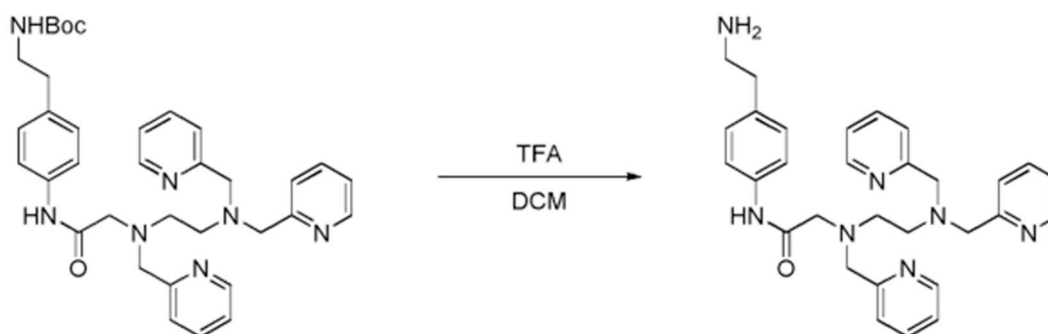
- 5 Se disolvió la *N1,N1*-bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina preparada en el ejemplo 5 (500 mg, 2,06 mmol, 1,0 eq.) en etanol absoluto (10 ml), seguido de aproximadamente 500 mg de tamices moleculares de 4Å y 2-piridincarboxaldehído (196 µl, 2,06 mmol, 1,0 eq.). La mezcla se colocó en una atmósfera de nitrógeno y se calentó a reflujo durante 90-120 minutos antes de enfriarse hasta temperatura ambiente. A continuación, se añadió NaBH4 (243 mg, 6,42 mmol) con la ayuda de etanol absoluto (4 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16
- 10 horas antes de concentrarse a presión reducida. La mezcla en bruto se suspendió en DCM (25 ml) y se lavó con NaOH 1 M (3 x 25 ml). La fase orgánica se concentró a presión reducida y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre alúmina neutra utilizando MeOH al 1-5 % en DCM como eluyente para producir el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (315 mg, 46 %).
- 15 ^1H RMN (600 MHz, DMSO) δ 8,50-8,42 (m, 3H), 7,77-7,66 (m, 3H), 7,54 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,34 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,25-7,17 (m, 3H), 3,75 (s, 4H), 3,70 (s, 2H), 2,67-2,58 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO) δ 160,84 (s), 159,88 (s), 149,16 (d, J = 3,2 Hz), 136,82 (d, J = 12,1 Hz), 123,10 (s), 122,47 (s), 122,20 (s), 122,10 (s), 60,45 (s), 54,92 (s), 54,06 (s), 46,89 (s).

Ejemplo 7 - Síntesis de *N1*-(prop-2-in-1-il)-*N1,N2,N2*-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (intermedio).

20

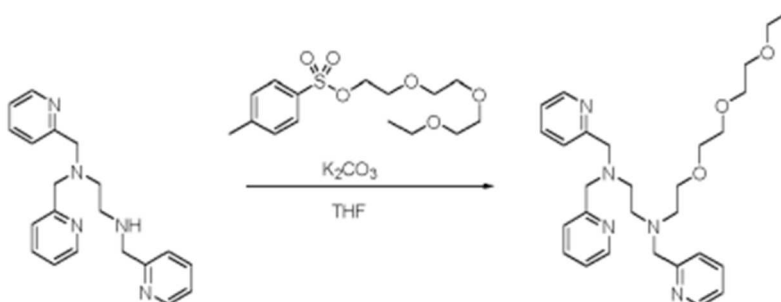


- 25 Se disolvió la *N1,N1,N2*-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina preparada en el ejemplo 6 (943 mg, 2,83 mmol, 1,0 eq.) en THF (7 ml), se mezcló con K2CO3 (1,56 g, 11,32 mmol, 4,0 eq.) y se enfrió hasta 0 °C. a continuación, se añadió una solución de bromuro de propargilo (al 80 % en tolueno) (3,15 µl, 2,83 mmol, 1,0 eq.) y el matraz se selló con un tapón de goma. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C seguido de 15 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró a través de un lecho de K2CO3 con ayuda de DCM (100 ml). El líquido se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía en columna en una columna de Al2O3 neutro utilizando DCM al 50-100 % en EtOAc como eluyente. Esto proporcionó el compuesto del título en 508 mg (48 %) como un aceite naranja.
- 30 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,66-8,27 (m, 3H), 7,87-7,58 (m, 3H), 7,49 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,34 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,28-7,15 (m, 3H), 3,75 (s, 4H), 3,68 (s, 2H), 3,32 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 3,10 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 2,82-2,55 (m, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 159,21, 158,83, 148,68, 136,39, 122,55, 122,52, 122,07, 122,01, 78,93, 75,72, 59,84, 59,45, 51,44, 50,55, 42,02.

Ejemplo 8 - Síntesis de N-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamida (intermedio).

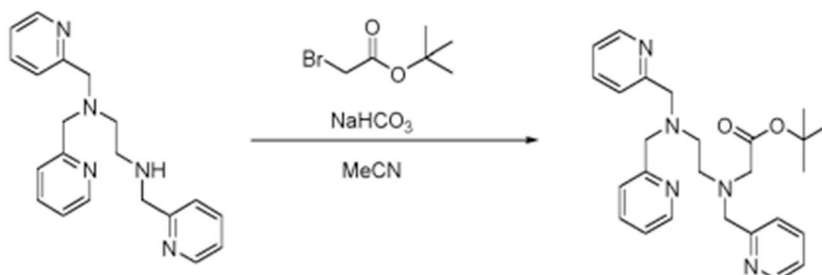
Se disolvió el carbamato preparado en el ejemplo 3 (135 mg, 0,22 mmol, 1,0 eq.) en DCM (10 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió gota a gota TFA (1,0 ml, 13,06 mmol, 59 eq.) a la solución en agitación durante 5 minutos. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y, a continuación, se agitó 2 horas adicionales a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida, se disolvió en DCM (20 ml) y se lavó con K₂CO₃ 1 M (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre K₂CO₃, se filtró y se concentró a presión reducida para producir 70 mg (62 %) del compuesto del título como un aceite verde pálido.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 10,39 (s, 1H), 8,54-8,51 (m, 1H), 8,50-8,46 (m, 2H), 7,63-7,59 (m, 2H), 7,59-7,52 (m, 3H), 7,41 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,17-7,07 (m, 6H), 3,75-3,72 (m, 6H), 3,29 (s, 2H), 2,95 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,79 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,74-2,67 (m, 4H), 2,16 (s, 2H). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ 169,94 (s), 159,27 (s), 158,31 (s), 149,66 (s), 149,18 (s), 136,82 (s), 136,66 (s), 136,54 (s), 135,34 (s), 129,29 (s), 123,23 (s), 123,17 (s), 122,62 (s), 122,18 (s), 119,99 (s), 61,09 (s), 60,59 (s), 58,80 (s), 52,20 (s), 51,68 (s), 43,77 (s), 39,68 (s). HRMS: (TOF MS ES⁺): Calculado para C₃₀H₃₅N₇O [M+H]⁺: 510,2981, encontrado: 510,2987.

Ejemplo 9 - Síntesis de N1-(2-(2-(2-etoxietoxi)etoxi)etil)-N1,N2,N2-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina

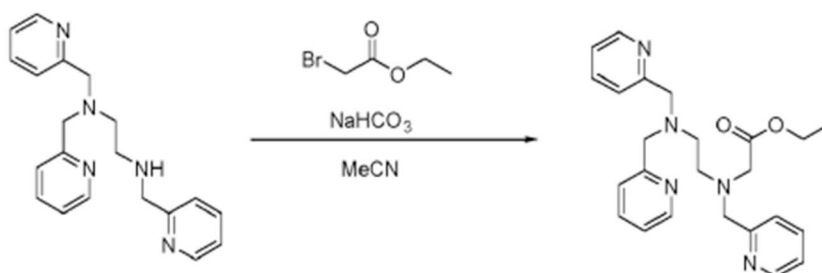
Se disolvió la amina preparada en el ejemplo 6 (568 mg, 1,70 mmol, 1,0 eq.) en THF (10 ml). Se añadió K₂CO₃ (470 mg, 3,40 mmol, 2,0 eq.) junto con el tosilato (623 mg, 1,87 mmol, 1,1 eq.). La mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante 16 horas. A continuación, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna sobre alúmina neutra utilizando MeOH al 0-5 % en DCM como eluyente para producir 468 mg (56 %) del compuesto del título como un aceite naranja pálido.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,64-8,30 (m, 3H), 7,84-7,59 (m, 3H), 7,59-7,44 (m, 2H), 7,37 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,31-7,08 (m, 3H), 3,87-3,64 (m, 6H), 3,62-3,34 (m, 12H), 2,74-2,54 (m, 6H), 1,14-0,99 (m, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 159,81, 159,40, 148,64, 148,49, 136,35, 136,17, 122,46, 121,96, 121,80, 69,81, 69,73, 69,67, 69,16, 68,95, 65,48, 60,58, 60,04, 53,49, 52,22, 51,63, 15,07. HRMS: (ES⁺): Calculado para C₂₈H₄₀N₅O₃ [M+H]⁺: 493,3126. Encontrado: 494,3127.

Ejemplo 10 - Síntesis de *N*-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)-*N*-(piridin-2-ilmetil)glicinato de terc-butilo (intermedio).

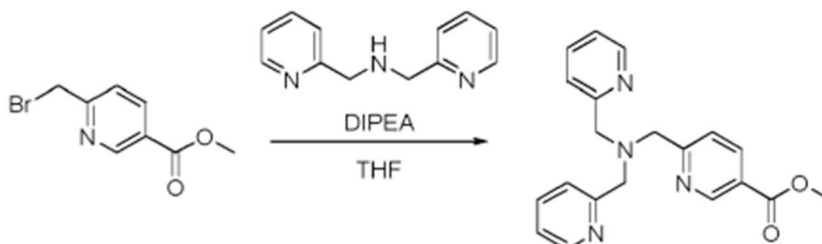
Se disolvió la amina preparada en el ejemplo 6 (1 g, 3 mmol, 1,0 eq.) en MeCN (10 ml) junto con NaHCO₃ (0,5 g, 6 mmol, 2 eq.). A continuación, se añadió bromoacetato de terc-butilo (0,5 ml, 3,4 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se mezcló con Et₂O (10 ml) y se filtró. Los sólidos restantes se lavaron con Et₂O (2 x 10 ml) y DCM (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para producir un aceite rojo oscuro. El material en bruto se purificó utilizando cromatografía en columna mediante alúmina neutra que eluye con MeOH al 1-2,5 % en DCM. Esto produjo 894 mg (67 %) del producto del título como un aceite rojo.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,55-8,43 (m, 3H), 7,60 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 2H), 7,55 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 1H), 7,49 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,44 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,16-7,05 (m, 3H), 3,89 (s, 2H), 3,80 (s, 4H), 3,28 (s, 2H), 2,88 (dd, *J* = 8,1, 5,9 Hz, 2H), 2,77-2,65 (m, 2H), 1,42 (s, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170,82, 159,98, 149,13, 136,46, 123,00, 122,95, 121,99, 80,99, 60,91, 60,83, 56,42, 52,86, 52,23, 28,35. HRMS: (ES+): Calculado para C₂₆H₃₄N₅O₂ [M+H]⁺: 448,2707. Encontrado: 448,2706.

Ejemplo 11 - Síntesis de *N*-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)-*N*-(piridin-2-ilmetil)glicinato de etilo (intermedio).

La amina preparada en el ejemplo 6 (2 g, 6 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en MeCN (20 ml) junto con NaHCO₃ (1 g, 12 mmol, 2 eq.). A continuación, se añadió bromoacetato de etilo (1 ml, 6,5 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se mezcló con Et₂O (10 ml) y se filtró. Los sólidos restantes se lavaron con Et₂O (2 x 10 ml) y DCM (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite rojo oscuro. El material en bruto se purificó utilizando cromatografía en columna con alúmina neutra eluyendo con MeOH al 1-5 % en DCM. Esto proporcionó 768 mg (31 %) del producto del título como un aceite rojo.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,65-8,30 (m, 3H), 7,84-7,58 (m, 3H), 7,46 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,36 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,28-7,12 (m, 2H), 4,03 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,71 (s, 4H), 3,35 (aprox. s, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,57 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,14 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 170,84, 159,31, 159,29, 148,69, 148,61, 136,40, 136,36, 122,56, 122,53, 122,03, 59,91, 59,70, 54,64, 51,80, 51,21, 14,11. HRMS: (APCI+): Calculado para C₂₄H₃₀N₅O₂ [M+H]⁺: 420,2394. Encontrado: 420,2393.

Ejemplo 12 - Síntesis de 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinato de metilo (intermedio).

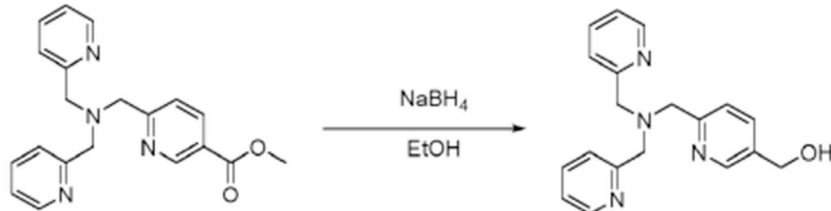
El nicotinato (1 g, 4,34 mmol, 1,0 eq.) se suspendió en THF (50 ml). Se añadieron dipicolilamina (935 μ l, 5,21 mmol, 1,2 eq.) y DIPEA (1,23 ml, 7,38 mmol, 1,7 eq.) a la mezcla rosa. Empezó a formarse un precipitado en el lateral del matraz después de aproximadamente 2 horas. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas adicionales antes de filtrar la suspensión espesa a través de un lecho de celite con la ayuda de THF. El filtrado amarillo se concentró a presión reducida para proporcionar un semisólido naranja pálido. Este se suspendió en Et₂O (50 ml) y se filtró a través de celite con la ayuda de 25 ml adicionales de Et₂O. El filtrado se concentró a presión reducida hasta aproximadamente 30 ml cuando empezó a formarse un precipitado blanco. El matraz se colocó en el congelador (-20 °C) para facilitar la precipitación adicional. Los cristales formados se separaron por filtración para proporcionar 860 mg (57 %) del compuesto del título como un polvo blanco. Las RMN de ¹H y ¹³C fueron según los datos publicados. Véase K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6009-6019.

Ejemplo 13 - Síntesis de ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (intermedio).



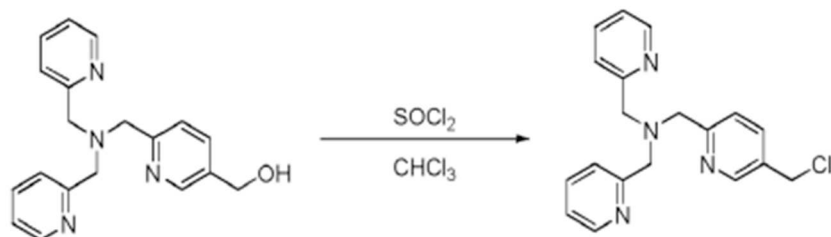
El éster preparado en el ejemplo 12 (200 mg) se disolvió en MeOH (0,65 ml) y se añadió una solución de KOH 2 M (0,45 ml). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de añadir HCl 1 M (0,97 ml) y la mezcla se concentró a presión reducida hasta un sólido pegajoso. El material en bruto se suspendió en MeOH (1,5 ml) y se filtró primero a través de un filtro de papel y, a continuación, a través de un filtro de jeringa. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar 197 mg (> 99 %) del compuesto del título como un sólido blanco espumoso. La RMN fue según los datos publicados (Natsuho Yamamoto et al, J. Med. Chem., (2012), 11013-11021).

Ejemplo 14 - Síntesis de (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metanol (intermedio).



El éster preparado en el ejemplo 12 (330 mg, 0,95 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en etanol absoluto (10 ml) y se colocó en una atmósfera de argón. Se añadieron gránulos de NaBH₄ (250 mg, 6,95 mmol, 7,0 eq.) a la mezcla en agitación y la suspensión espesa se calentó hasta 50 °C durante 48 horas. A continuación, la mezcla se inactivó mediante la adición de una solución de NH₄Cl y se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido pegajoso de color blanco. El material en bruto se suspendió en K₂CO₃ 1 M (25 ml) y se extrajo con DCM (3 x 25 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre K₂CO₃, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 221 mg (69 %) del producto del título como un aceite amarillo pálido. La RMN fue según los datos publicados. Véase K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6009-6019.

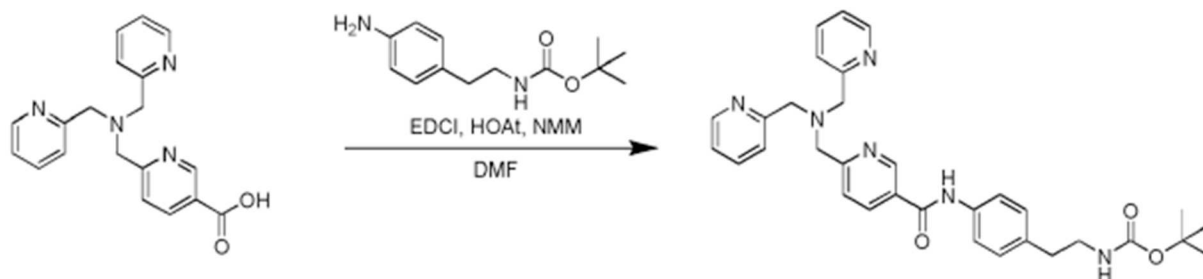
Ejemplo 15 - Síntesis de 1-(5-(clorometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (intermedio).



El alcohol preparado en el ejemplo 14 (500 mg, 1,5 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en CHCl₃ (15 ml) y se enfrió hasta 0 °C antes de añadir gota a gota SOCl₂ (1 ml, 13,8 mmol, 9 eq.). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C antes de calentarla hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas adicionales. A continuación, la solución se concentró a presión reducida para proporcionar una pasta de color verde oscuro. El material en bruto se disolvió en DCM (25 ml) y se lavó con K₂CO₃ 1 M (3 x 25 ml). La fase orgánica se secó sobre K₂CO₃, se filtró y se concentró a

presión reducida. El material se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando Al_2O_3 neutro como fase estacionaria y EtOAc como fase móvil para proporcionar 395 mg (74 %) del compuesto del título como un sólido amarillo pálido. La RMN fue según los datos publicados. Véase K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6009-6019.

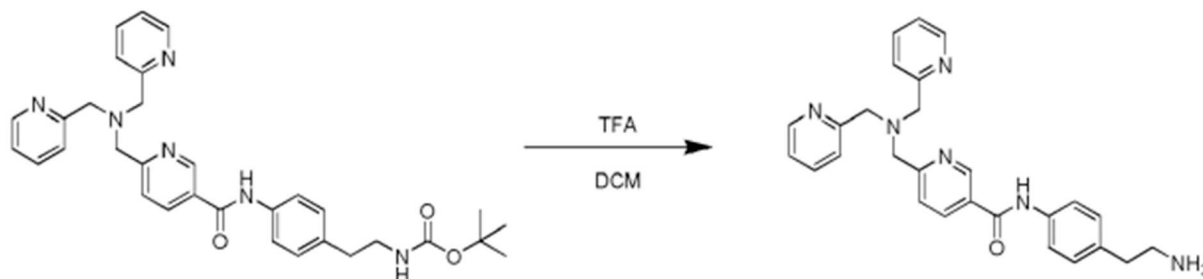
Ejemplo 16 - Síntesis de 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenetilcarbamato de terc-butilo (intermedio).



El ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico preparado en el ejemplo 13 se disolvió en 20 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente y se filtró en un matraz de fondo redondo de 50 ml antes de la reacción para eliminar las sales insolubles. A esta solución se le añadió 4-aminofenetilcarbamato de terc-butilo (1,76 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.), seguido de EDCI (1,428 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.), HOAt (1,014 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.) y NMM (0,821 ml, 7,45 mmol, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La mezcla en bruto residual se disolvió en 100 ml de CHCl_3 , se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con 100 ml de una solución acuosa saturada de K_2CO_3 y 100 ml de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en columna sobre Al_2O_3 neutro utilizando MeOH al 1 % en DCM produciendo el producto con impurezas menores, seguido de C18-SPE utilizando un gradiente de elución (de MeOH al 10 % a MeOH al 90 % en H_2O) proporcionando 1,697 g (3,07 mmol, 62 %) del producto como un aceite amarillo.

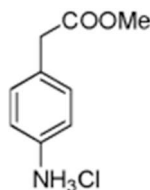
^1H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,96 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 8,46-8,39 (m, 2H), 8,23 (dd, $J = 8,2, 2,3$ Hz, 1H), 7,76 (td, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 3H), 7,62 (dd, $J = 13,5, 8,1$ Hz, 4H), 7,24 (ddd, $J = 7,3, 5,0, 1,1$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,85 (s, 4H), 3,24 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,72 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,40 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 166,10, 163,40, 159,85, 158,28, 149,56, 148,92, 138,55, 137,76, 137,41, 137,15, 130,88, 130,16, 124,83, 124,14, 123,81, 122,23, 79,86, 61,10, 60,84, 42,95, 36,59, 28,79. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_3$: 552,2849, encontrado: 553,2920 $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 17 - Síntesis de N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida (intermedio).

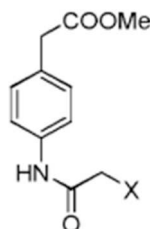


El 4-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-nicotinamido)fenetilcarbamato de terc-butilo (1,697 g, 3,07 mmol, 1 eq.) preparado en el ejemplo 16 se disolvió en 10 ml de DCM a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió TFA (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la CCF (Al_2O_3 , MeOH al 5 % en DCM) o la RMN indicaron una conversión completa. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ destilada/solución acuosa saturada de K_2CO_3 (100 ml/10 ml/100 ml) y se transfirió a un embudo de decantación. Se separó la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo dos veces con 50 ml de CHCl_3 y los extractos orgánicos combinados se lavaron con 100 ml de salmuera, se secaron sobre $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Na}_2\text{SO}_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida con un rendimiento cuantitativo.

^1H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,97 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,45 (ddd, $J = 5,0, 1,7, 0,9$ Hz, 2H), 8,26 (dd, $J = 8,2, 2,3$ Hz, 1H), 7,80 (td, $J = 7,6, 1,6$ Hz, 3H), 7,68 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,28 (ddd, $J = 7,4, 5,0, 1,2$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 3,94 (s, $J = 4,3$ Hz, 2H), 3,90 (s, 4H), 2,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 163,55, 159,96, 149,62, 148,93, 138,69, 137,51, 131,02, 130,19, 124,99, 124,32, 123,92, 122,54, 79,46, 61,24, 60,96, 44,03, 39,22. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}$: 452,2325, encontrado: 453,2396 $[\text{M}+\text{H}]$.

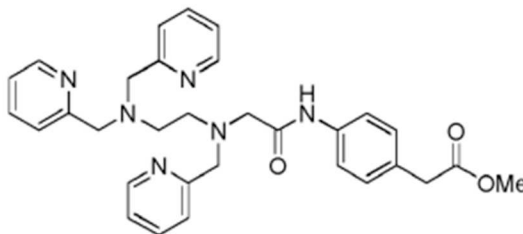
Ejemplo 18 - Síntesis de clorhidrato de 2-(4-aminofenil)acetato de metilo (intermedio).

Se suspendió ácido 2-(4-aminofenil)acético (5,176 g, 34,2 mmol, 1 eq.) en 100 ml de metanol y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta mezcla se le añadió gota a gota SOCl₂ (2,89 ml, 41,07 mmol, 1,2 eq.) durante un período de 10 minutos. La mezcla se agitó a 0 °C durante otros 30 minutos, 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, se mantuvo a reflujo durante 14 horas. A continuación, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido marrón pálido con rendimiento cuantitativo, que se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H RMN fue según los datos publicados. Véase Threadgill et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11, 4189-4206.

Ejemplo 19 - Síntesis de 2-(4-(2-bromoacetamido)fenil)acetato de metilo o 2-(4-(2-cloroacetamido)fenil)acetato de metilo (intermedio).

X = Cl o Br

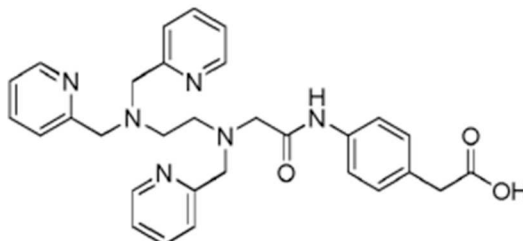
Se suspendió clorhidrato de 2-(4-aminofenil)acetato de metilo preparado en el ejemplo 18 (6,89 g, 34,2 mmol, 1 eq.) en 100 ml de DCM y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota una solución de DMAP (7,51 g, 61,56 mmol, 1,8 eq.) y NMM (3,75 ml, 34,2 mmol, 1 eq.) en 50 ml de DCM durante 30 minutos a través de un embudo de goteo, seguido de la adición gota a gota de bromuro de bromoacetilo o cloruro de cloroacetilo (1,8 eq.) durante 30 minutos a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante otros 30 minutos y a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, la mezcla se lavó con HCl 0,1 M (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml) y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre SiO₂ utilizando elución isocrática con una mezcla 3:1 de *n*-heptano y EtOAc para producir 2-(4-(2-bromoacetamido)fenil)acetato de metilo o 2-(4-(2-cloroacetamido)fenil)acetato de metilo con un rendimiento del 82 % (Br) o del 73 % (Cl) como sólidos blancos que podrían utilizarse directamente en la siguiente etapa. Se podría obtener una purificación adicional opcional mediante recristalización en EtOAc.

Ejemplo 20 - Síntesis de 2-(4-(2-((2-bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenil)acetato de metilo (intermedio).

Se disolvió *N*1,*N*1,*N*2-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina descrita en el ejemplo 6 (1 eq.) en 50 ml de CH₃CN a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió K₂CO₃ (4 eq.) y KI (0,6 eq.), seguidos de 2-(4-(2-bromoacetamido)fenil)acetato de metilo o 2-(4-(2-cloroacetamido)fenil)acetato de metilo preparados en el ejemplo 18 (1,1 eq.). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas hasta que la CCF indicó la conversión completa de la amina. A continuación, la mezcla se hizo pasar a través de un lecho de celite utilizando CH₃CN como eluyente y se concentró a presión reducida. El producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre Al₂O₃ neutro utilizando MeOH al 1-2 % en DCM como eluyente para producir el compuesto del título con un rendimiento del 76 % como un aceite marrón. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,29 (s, 1H), 8,52 (dd, *J* = 4,8, 0,8 Hz, 1H), 8,44 (dd, *J* = 4,8, 0,9 Hz, 2H), 7,71 (td, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,64 (td, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H),

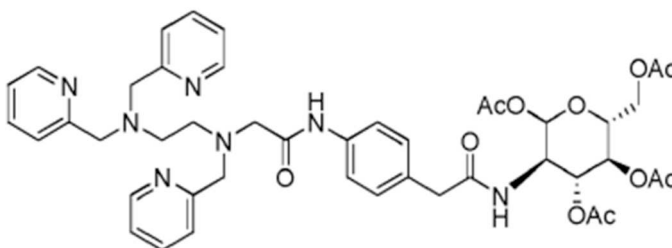
7,33 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,29-7,23 (m, 1H), 7,22-7,16 (m, 4H), 3,75 (s, 2H), 3,69 (s, 4H), 3,62 (s, 2H), 3,61 (s, 3H), 3,28 (s, 2H), 2,76 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,61 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171,74, 169,46, 158,98, 158,53, 149,03, 148,72, 137,41, 136,66, 136,35, 129,64, 129,17, 123,07, 122,75, 122,39, 122,05, 119,11, 60,16, 59,65, 58,15, 51,74, 51,65, 51,14, 30,67.

Ejemplo 21 - Síntesis de ácido 2-(4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenil)acético (intermedio).



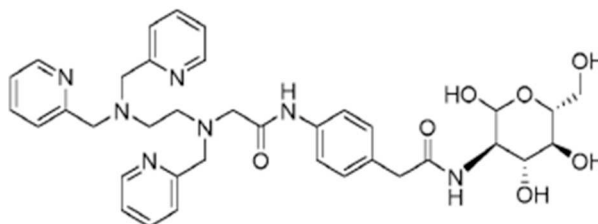
Se disolvió 2-(4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenil)acetato de metilo preparado en el ejemplo 20 (922 mg, 1,7 mmol, 1 eq.) en 10 ml de THF a 0 °C. A esta solución se le añadió LiOH·H₂O (144 mg, 3,4 mmol, 2,0 eq.) en 7 ml de H₂O destilada y la solución se agitó a 0 °C hasta que la CCF indicó la conversión completa (Al₂O₃, MeOH al 5 % en DCM). A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para eliminar el THF y la solución acuosa residual se ajustó a pH 7 con HCl 0,5 M. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto con un rendimiento cuantitativo. ^1H RMN (600 MHz, DMSO) δ 10,20 (s, 1H), 8,51 (dd, $J = 4,7$, 0,7 Hz, 1H), 8,44 (dd, $J = 4,8$, 0,8 Hz, 2H), 7,71 (td, $J = 7,6$, 1,8 Hz, 1H), 7,65 (td, $J = 7,6$, 1,8 Hz, 2H), 7,45 (t, $J = 9,3$ Hz, 2H), 7,42 (t, $J = 9,4$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,27-7,23 (m, 1H), 7,23-7,18 (m, 2H), 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 3,74 (s, 2H), 3,68 (s, 4H), 3,26 (s, 2H), 3,22 (s, 2H), 2,75 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,60 (t, 6,5 Hz, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO) δ 174,40, 169,17, 158,98, 158,57, 149,04, 148,76, 136,69, 136,45, 136,00, 134,36, 129,43, 123,09, 122,79, 122,43, 122,14, 118,65, 60,20, 59,65, 58,18, 51,76, 51,13, 44,97.

Ejemplo 22a - Síntesis de triacetato de (3R,4R,5S,6R)-6-(acetoximetil)-3-(2-(4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenil)acetamido)tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo (según la presente invención).



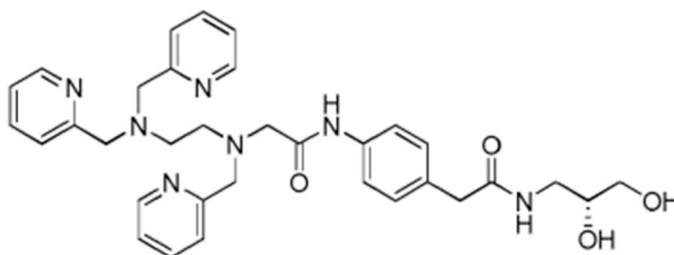
Se suspendió el ácido preparado en el ejemplo 21 (220,8 mg, 0,442 mmol, 1 eq.) en 5 ml de CH₃CN anhidro en atmósfera de N₂ enfriado a 0 °C en baño de hielo. A continuación, se añadieron HATU (168 mg, 0,442 mmol, 1,05 eq.), clorhidrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucosamina (170 mg, 0,442 mmol, 1,05 eq.) y NMM (139 μ l, 3 eq.). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de MeOH al 5 % en DCM y se hizo pasar a través de un lecho de Al₂O₃ neutro eluyendo con MeOH al 10 % en DCM. La solución resultante se concentró a presión reducida y el producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre Al₂O₃ neutro utilizando MeOH al 1-5 % en DCM como eluyente para proporcionar 168,8 mg (48 %) del producto como un semisólido espumoso amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,53 (s, 1H), 8,47 (dd, $J = 5,0$, 1,6 Hz, 1H), 8,44 (dd, $J = 4,9$, 0,8 Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,53 (ddd, $J = 15,9$, 7,9, 1,8 Hz, 3H), 7,36 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,08 (ddd, $J = 8,4$, 7,4, 4,7 Hz, 6H), 6,26 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 5,68 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,16 (dd, $J = 10,5$, 9,4 Hz, 1H), 5,02 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H), 4,24-4,11 (m, 2H), 4,04 (dd, $J = 12,5$, 2,2 Hz, 1H), 3,76-3,69 (m, 7H), 3,38 (s, 2H), 3,29 (s, $J = 10,6$ Hz, 2H), 2,81-2,73 (m, 2H), 2,73-2,63 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,92 (s, 3H), 1,85 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,39, 170,66, 170,64, 170,04, 169,32, 169,23, 158,93, 158,07, 149,52, 149,09, 137,76, 136,63, 136,49, 129,96, 129,50, 123,17, 122,60, 122,17, 120,17, 92,33, 72,77, 72,24, 68,09, 61,74, 60,82, 60,33, 58,70, 52,99, 51,96, 51,44, 43,27, 20,74, 20,71, 20,57, 20,53. APCI-HRMS m/z calculado para C₄₄H₅₁N₇O₁₁: 853,3647, encontrado 854,3726 [M+H].

Ejemplo 22b - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-N-(4-(2-oxo-2-(((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)etil)fenil)acetamida (según la presente invención).



El compuesto del título se puede obtener a partir del ejemplo 22a, tal como se describe en el ejemplo 81.

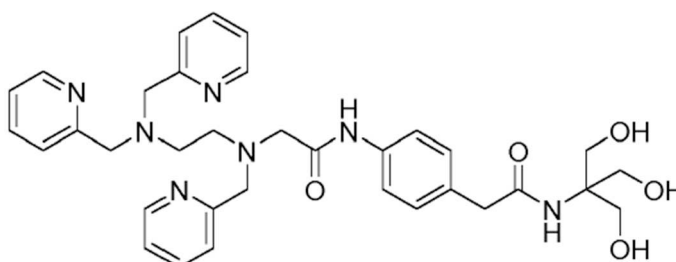
Ejemplo 23 - Síntesis de (*R*)-2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-N-(4-(2-(2,3-dihidroxipropilamino)-2-oxoetil)fenil)acetamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido preparado en el ejemplo 21 (124,3 mg, 0,237 mmol, 1 eq.) en 2 ml de DMF anhidra en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron (*R*)-3-amino-1,2-propanodiol (32 mg, 0,355 mmol, 1,5 eq.), EDCI (68 mg, 0,355 mmol, 1,5 eq.), HOAt (48 mg, 0,355 mmol, 1,5 eq.) y NMM (39 µl, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto se aisló mediante cromatografía de fase inversa con sílice-C18 utilizando MeOH al 20-75 % en H₂O proporcionando 61 mg (50 %) del producto del título como un aceite vítreo amarillo.

¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,51 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 8,43 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H), 7,75 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,70 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,56 (dd, *J* = 19,5, 8,1 Hz, 4H), 7,39 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,34-7,22 (m, 5H), 3,81 (s, 2H), 3,77 (s, 4H), 3,75-3,70 (m, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,54-3,48 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 13,8, 4,8 Hz, 1H), 3,33 (s, 2H), 3,26 (dd, *J* = 13,8, 6,7 Hz, 1H), 2,83 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,60, 172,23, 160,20, 159,47, 150,20, 149,50, 138,58, 138,53, 138,15, 132,84, 130,57, 125,00, 124,88, 124,02, 123,79, 121,38, 71,96, 65,05, 62,08, 61,27, 59,78, 53,72, 53,10, 43,56, 43,26. APCI-HRMS *e/z* calculado para C₃₃H₃₉N₇O₄: 597,3064, encontrado 598,3135 [M+H].

Ejemplo 24 - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-N-(4-(2-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-ilamino)-2-oxoetil)fenil)acetamida (según la presente invención).



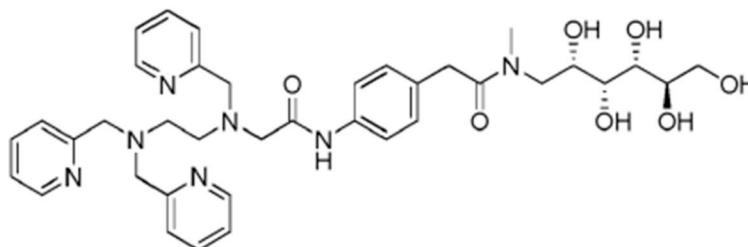
CLogP: 1,5964

Se disolvió el ácido preparado en el ejemplo 21 (185,4 mg, 0,354 mmol, 1 eq.) en 3 ml de DMF anhidra en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron tris-(hidroximetil)-aminometano (base Trizma, 64 mg, 0,53 mmol, 1,5 eq.), EDCI (101 mg, 0,53 mmol, 1,5 eq.), HOAt (72 mg, 0,53 mmol, 1 eq.) y NMM (58 µl, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto se aisló mediante cromatografía de fase inversa con sílice-C18 utilizando MeOH al 10-90 % en H₂O proporcionando 59,2 mg (27 %) del producto del título como un aceite vítreo amarillo.

¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,49 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 8,42 (d, *J* = 4,5 Hz, 2H), 7,71 (dt, *J* = 20,2, 7,6 Hz, 3H), 7,59 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,52 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,26 (dd, *J* = 13,2, 7,0 Hz, 3H), 3,80 (s, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,75 (s, 4H), 3,61 (s, 2H), 3,32 (s, 2H), 2,82 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,71 (t, *J* = 6,1 Hz,

2H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 175,00, 172,18, 160,17, 159,43, 150,20, 149,51, 138,56, 138,49, 138,18, 132,73, 130,73, 124,97, 124,86, 123,99, 123,77, 121,36, 63,56, 62,54, 62,06, 61,23, 59,73, 53,65, 53,06, 49,00, 43,74. APCI- HRMS m/z calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_5$: 627.3169. encontrado 628.3236 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

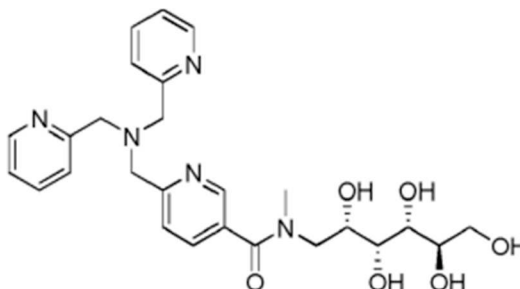
5 **Ejemplo 25** - Síntesis de 2-(4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-il metil)amino)acetamido)fenil)-*N*-metil-*N*-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).



10 Se disolvió el ácido preparado en el ejemplo 21 (203,2 mg, 0,387 mmol, 1 eq.) en 2 ml de DMF anhidra en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron N-metil-D-glucamina (113 mg, 0,581 mmol, 1,5 eq.), EDCI (111 mg, 0,581 mmol, 1,5 eq.), HOAt (79 mg, 0,581 mmol, 1,5 eq.) y NMM (64 µl, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, a continuación, se calentó hasta 50 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto se aisló mediante cromatografía de fase inversa con sílice-
15 C18 utilizando MeOH al 10-90 % en H₂O proporcionando 109,6 mg (40 %) del producto como un aceite amarillo. El producto aparece como una mezcla *syn/anti* con respecto al enlace amida.

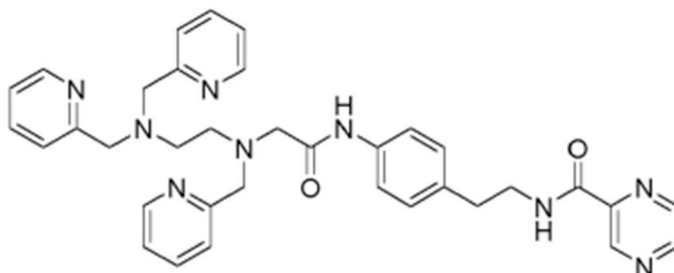
¹H RMN (600 MHz, MeOD) δ 8,48-8,45 (m, 1H), 8,39 (d, *J* = 4,1 Hz, 2H), 7,71 (td, *J* = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 7,67 (tt, *J* = 7,7, 2,1 Hz, 2H), 7,55 (dd, *J* = 11,3, 8,5 Hz, 2H), 7,50 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,35 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,24 (dd, *J* = 14,8, 8,0 Hz, 5H), 4,05-3,98 (m, 1H), 3,94-3,78 (m, 2H), 3,78-3,74 (m, 4H), 3,72 (s, 5H), 3,70-3,60 (m, 4H), 3,44 (ddd, *J* = 8,0, 5,2, 1,4 Hz, 1H), 3,28 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 3,15, 3,00 (2xs, 3H), 2,79 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H). ¹³C RMN (201 MHz, MeOD) δ 174,65, 174,54, 172,19, 172,16, 160,14, 159,46, 150,23, 149,54, 138,61, 138,54, 138,03, 137,93, 132,89, 132,22, 130,54, 130,45, 125,00, 124,89, 124,02, 123,81, 121,45, 121,34, 74,09, 73,74, 73,07, 73,01, 72,82, 72,32, 71,54, 71,24, 64,77, 64,74, 62,03, 61,20, 59,69, 54,12, 53,59, 53,03, 52,72, 49,00, 41,07, 40,65, 38,31, 34,81. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₃₇H₄₇N₇O₇: 701,3537, encontrado 702,3607 [M+H]

25 **Ejemplo 26** - Síntesis de 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-*N*-metil-*N*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)nicotinamida (según la presente invención).



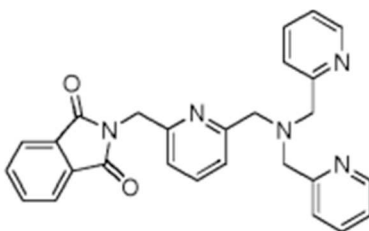
El ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico preparado en el ejemplo 13 (194 mg, 0,58 mmol, 1 eq.) se disolvió en 5 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron N-metil-D-glucamina (170 mg, 0,87 mmol, 1,5 eq.), EDCI (167 mg, 0,87 mmol, 1,5 eq.), HOAt (118 mg, 0,87 mmol, 1,5 eq.) y NMM (96 µl, 0,87 mmol, 1,5 eq.). Después de la adición de HOAt, la mezcla pasó de incolora a amarilla. La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 16 horas con agitación y, a continuación, se concentró a presión reducida. El producto se aisló mediante cromatografía de fase inversa con sílice-C18 utilizando MeOH al 10-90 % en H₂O produciendo 99 mg (33 %) de producto como un aceite vítreo amarillo. El producto aparece como una mezcla syn/anti con respecto al enlace amida.

¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,57 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 7,89 (dd, *J* = 20,9, 7,9 Hz, 1H), 7,79 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,72 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,67 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,34-7,22 (m, 2H), 4,08 (dt, *J* = 18,6, 6,6 Hz, 1H), 3,87 (s, *J* = 3,1 Hz, 6H), 3,84-3,46 (m, 7H), 3,14, 3,07 (2 x s, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 170,57, 169,95, 160,31, 159,73, 158,51, 148,12, 147,03, 146,52, 137,21, 136,23, 135,55, 131,20, 130,93, 123,50, 122,84, 122,60, 122,43, 72,52, 72,02, 71,59, 71,51, 70,97, 70,24, 70,10, 69,65, 63,27, 59,88, 59,73, 59,60, 59,43, 53,78, 51,00, 38,54, 32,37. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₆H₃₃N₅O₆: 511,2431, encontrado 512,2503 [M+H]

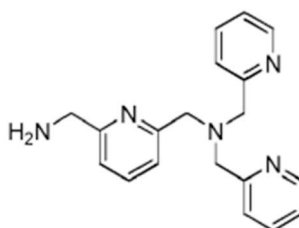
Ejemplo 27 - Síntesis de *N*-(4-(2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetil)pirazina-2-carboxamida (según la presente invención).

La amina preparada en el ejemplo 8 (87,7 mg, 0,172 mmol, 1 eq.) se disolvió en 6 ml de acetona enfriada hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió anhídrido del ácido 2,3-pirazindicarboxílico (25,8 mg, 0,172 mmol, 1 eq.). La solución amarilla se convirtió en una suspensión y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El precipitado se separó por filtración con succión, se lavó con acetona, se disolvió en metanol y se concentró a presión reducida para producir 54 mg (51 %) del producto del título como un sólido naranja.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,23 (s, 1H), 8,92 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,80 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,76 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 8,75 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 8,51 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 7,71 (td, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,64 (td, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 2H), 7,53 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 9,2 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,28-7,15 (m, 5H), 3,76 (s, 2H), 3,72 (s, 4H), 3,49 (dd, *J* = 14,2, 6,5 Hz, 3H), 3,28 (s, 2H), 2,81 (dt, *J* = 13,7, 8,2 Hz, 4H), 2,65 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 169,28, 166,90, 165,62, 163,12, 158,66, 158,42, 149,03, 148,75, 147,71, 146,48, 145,66, 144,90, 143,82, 143,43, 136,84, 136,72, 136,46, 134,16, 128,88, 123,13, 122,87, 122,44, 122,16, 119,27, 60,09, 59,53, 58,08, 54,89, 51,65, 51,16, 48,62, 34,30. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₃₅H₃₇N₉O₂: 615,3070, encontrado 616,3141 [M+H]

Ejemplo 28 - Síntesis de 2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona (intermedio).

El compuesto del título se preparó según un procedimiento de la bibliografía publicada ligeramente modificado, véase Z. Guo, G.-H. Kim, J. Yoon, I. Shin, Nat. Protocols 2014, 9, 1245-1254. Se suspendió 2-((6-(clorometil)piridin-2-il)metil)isoindolin-1,3-diona (0,842 g, 3,16 mmol, 1 eq.) en 10 ml de CH₃CN a temperatura ambiente. Se añadieron bis(2-piridilmetil)amina (0,625 ml, 3,48 mmol, 1,1 eq.) y K₂CO₃ (0,917 g, 6,63 mmol, 2,1 eq.) y la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se hizo pasar a través de un lecho de celite utilizando CH₃CN como eluyente y la solución se concentró a presión reducida. El producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre Al₂O₃ neutro utilizando MeOH al 3-5 % en DCM como eluyente para producir 952 mg (66 %) de un aceite amarillo que era lo suficientemente puro para la siguiente etapa. Se consiguió una purificación adicional del aceite amarillo obtenido mediante la adición de Et₂O y la precipitación de un sólido de color beige pálido (614 mg). Los datos de RMN obtenidos para el producto correspondían a los datos indicados en la referencia.

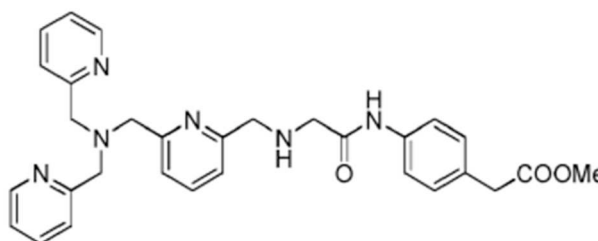
Ejemplo 29 - Síntesis de 1-(6-(aminometil)piridin-2-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (intermedio).

El compuesto del título se preparó según un procedimiento de la bibliografía publicada ligeramente modificado a partir de la amina protegida con ftalimida en el ejemplo 28, véase Z. Guo, G.-H. Kim, J. Yoon, I. Shin, Nat. Protocols

2014, 9, 1245-1254. La 2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona preparada en el ejemplo 28 (0,499 g, 1,11 mmol, 1 eq.) se disolvió en 10 ml de MeOH a temperatura ambiente. Se añadió una solución de hidrato de hidrazina (35 %, 1,11 ml, 12,24 mmol, 11 eq.) y la mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas hasta que la CCF (Al₂O₃, MeOH al 3 % en DCM) indicó una conversión completa del material de partida y se reveló una nueva mancha que se tiñó con una solución de ninhidrina. La mezcla se concentró a presión reducida a 30 °C y el sólido blanco residual se disolvió en 150 ml de CHCl₃ y se lavó con 100 ml de H₂O. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CHCl₃ (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 50 ml de una solución de NaOH 1 M y 50 ml de salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida a 30 °C para producir un aceite de color amarillo pálido. El producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre Al₂O₃ neutro utilizando MeOH al 5-10 % en DCM como eluyente para producir 241 mg (68 %) del producto del título como un aceite amarillo pálido. El producto se utilizó directamente para la siguiente etapa sin un almacenamiento prolongado.

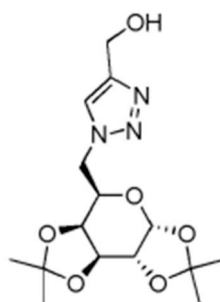
¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 8,49 (d, *J* = 4,4 Hz, 2H), 7,69-7,55 (m, 5H), 7,41 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,17-7,10 (m, 3H), 3,92 (s, 2H), 3,84 (s, 4H), 3,82 (s, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₂Cl₂) δ 160,25, 159,46, 149,58, 137,39, 136,83, 123,45, 122,48, 121,49, 119,86, 60,77, 60,63, 48,02.

Ejemplo 30 - Síntesis de 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metilamino)acetamido)fenil)acetato de metilo (intermedio).



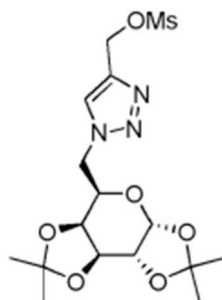
La amina preparada en el ejemplo 29 (214 mg, 0,67 mmol, 1 eq.) se disuelve en 10 ml de CH₃CN a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añade 2-(4-(2-cloroacetamido)fenil)acetato de metilo preparado en el ejemplo 19 (170 mg, 0,7 mmol, 1,05 eq.), KI (66,7 mg, 0,402 mmol, 0,6 eq.) y K₂CO₃ (185 mg, 1,34 mmol, 2 eq.). La mezcla se calienta a reflujo durante 16 horas o hasta que se ha consumido todo el material de partida, tal como es evidente, mediante un análisis por CCF. A continuación, la mezcla se hace pasar a través de un lecho de celite utilizando CH₃CN como disolvente. La solución se concentra a presión reducida y el producto se puede aislar mediante cromatografía en columna sobre Al₂O₃ neutro o con sílice C18 en fase inversa utilizando un sistema de disolventes apropiado.

Ejemplo 31 - Síntesis de (1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahydro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (intermedio).



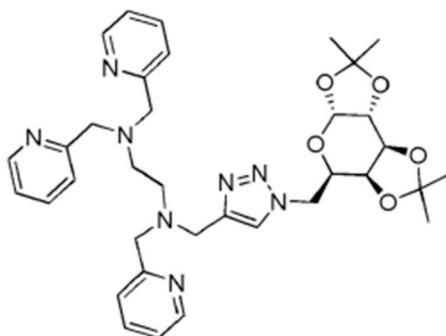
A una solución de 6-azido-6-desoxi-1,2:3,4-di-O-isopropiliden-α-D-galactosa (286 mg, 1,0 mmol) en 3 ml de acetonitrilo, se le añadió alcohol de propargilo (0,12 ml, 2,1 mmol), seguido de yoduro de cobre (I) (40,5 mg, 0,21 mmol). La reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después de eliminar el disolvente, el producto se purificó en una columna de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/heptano 3:1 hasta acetato de etilo puro. Se recogieron fracciones que contenían producto puro y se eliminó el disolvente a presión reducida para producir 247,7 mg de producto (73 %) que se utilizó directamente en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 32 - Síntesis de metanosulfonato de (1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahydro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilo (intermedio).



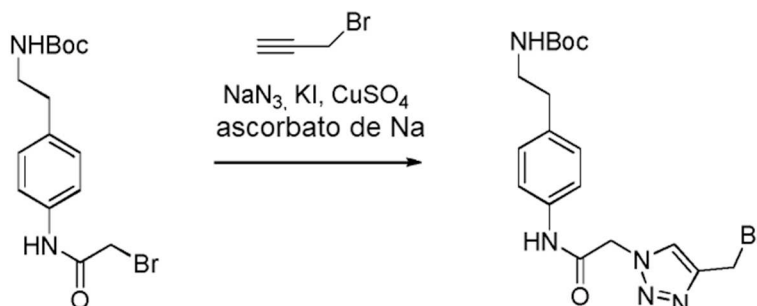
El alcohol inicial descrito en el ejemplo 31 (246,3 mg, 0,722 mmol) se disolvió en 5 ml de DCM y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió trietilamina (0,15 ml, 1,08 mmol), seguida de cloruro de metanosulfonilo (0,07 ml, 0,9 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se cargó inmediatamente en un lecho de sílice y se eluyó con acetato de etilo. La eliminación del disolvente produjo una conversión cuantitativa en un producto en bruto, el cual se utilizó en la etapa posterior (ejemplo 34) sin purificación adicional.

Ejemplo 33 - Síntesis de N¹,N¹,N²-tris(piridin-2-ilmetil)-N²-((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahydro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina (intermedio).

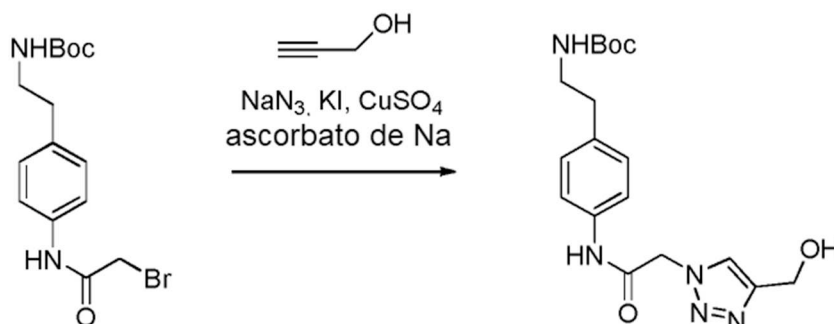


A una solución enfriada con hielo de N¹,N¹,N²-tris(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina descrita en el ejemplo 6 (241,2 mg, 0,723 mmol) en 10 ml de acetonitrilo, se le añadió K₂CO₃ (208 mg, 1,50 mmol) y posteriormente se añadió gota a gota una solución de metanosulfonato de (1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahydro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilo, tal como se ha descrito en el ejemplo 32 (0,722 mmol) en 5 ml de acetonitrilo, después de lo cual se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente para reaccionar más durante una noche. Después de la filtración a través de celite y la posterior eliminación del disolvente a presión reducida, el producto en bruto se purificó en una columna de alúmina con un gradiente de metanol al 1 % - 1,5 % en DCM como eluyente. La purificación adicional del aceite marrón resultante se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material Bondesil C18-OH, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 30 % al 70 % en agua. La evaporación de los disolventes produjo el producto como una goma de color naranja (93,8 mg, 20 %).

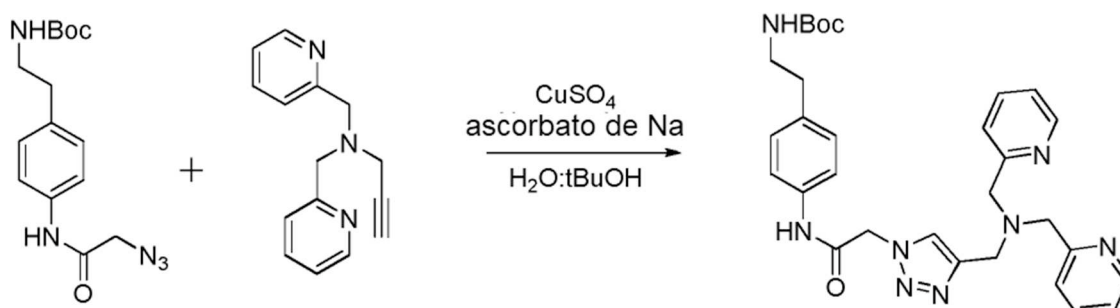
¹H RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ 8,40 (m, 3H), 7,90 (s, 1H), 7,69-7,76 (m, 3H), 7,50-7,56 (m, 3H), 7,24-7,27 (m, 3H), 5,41 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 4,67 (dd, *J* = 2,5 Hz, 7,9 Hz, 1H), 4,61 (dd, *J* = 3,2 Hz, 14,2 Hz, 1H), 4,46 (dd, *J* = 9,3 Hz, 14,2 Hz, 1H), 4,35 (dd, *J* = 2,5 Hz, 4,9 Hz, 1H), 4,30 (dd, *J* = 1,9 Hz, 7,9 Hz, 1H), 4,19 (ddd, *J* = 1,9 Hz, 3,2 Hz, 9,3 Hz, 1H), 3,76 (s, 6H), 3,68 (s, 2H), 2,66-2,72 (m, 4H), 1,47 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,21 (s, 3H). ¹³C RMN (100 MHz, metanol-*d*₄) δ 160,7, 149,39, 149,37, 145,3, 138,64, 138,60, 126,0, 124,9, 124,8, 123,73, 123,69, 110,9, 110,0, 97,7, 72,6, 72,2, 71,8, 68,8, 61,5, 60,8, 53,4, 52,7, 51,8, 50,2, 26,3, 26,2, 25,1, 24,6.

Ejemplo 34 - Síntesis de (4-(2-(4-(bromometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

Se suspende (4-(2-bromoacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (1 eq.) en una mezcla de *tert*-butanol y agua u otra mezcla de disolventes apropiados, y se mezcla con yoduro de potasio (0,1-1,0 eq.) y sulfato de cobre (0,1-1,0 eq.). A continuación, se añade una solución de bromuro de propargilo (1,0-100 eq.) a la mezcla en agitación y se agita durante 1-72 horas a una temperatura entre 20 y 100 °C o hasta que todo el material de partida se consume, según se supervisa mediante CCF o HPLC. A continuación, la mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, DCM) tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran al vacío. Si es necesaria una purificación adicional, el material en bruto se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y mezcla de disolventes o recristalización en un disolvente o mezcla de disolventes apropiados.

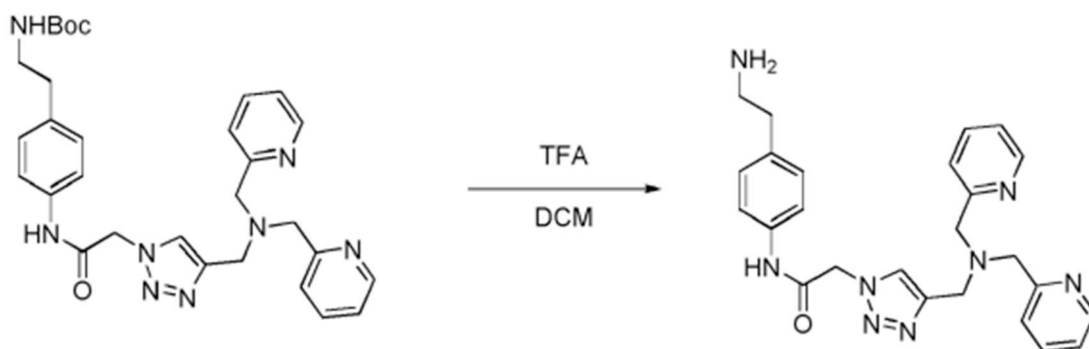
Ejemplo 35 - Síntesis de (4-(2-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

Se suspende (4-(2-bromoacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (1 eq.), tal como se describe en el ejemplo 2, en una mezcla de *tert*-butanol y agua u otra mezcla de disolventes apropiados, y se mezcla con yoduro de potasio (0,1-1,0 eq.) y sulfato de cobre (0,1-1,0 eq.). A continuación, se añade una solución de alcohol propargílico (1,0-100 eq.) a la mezcla en agitación y se agita durante 1-72 horas a una temperatura entre 20-100 °C o hasta que todo el material de partida se consume, según se supervisa mediante CCF o HPLC. A continuación, la mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, DCM) tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran al vacío. Si es necesaria una purificación adicional, el material en bruto se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y mezcla de disolventes o recristalización en un disolvente o mezcla de disolventes apropiados.

Ejemplo 36 - Síntesis de (4-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

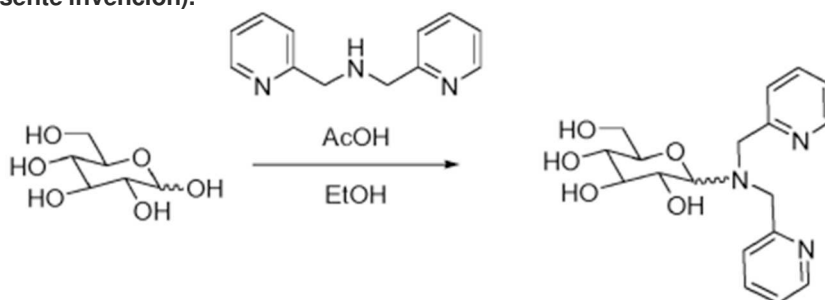
Se suspende (4-(2-azidoacetamido)fenil)carbamato de *tert*-butilo (1 eq.), tal como se prepara en el ejemplo 1, en una mezcla de *tert*-butanol y agua u otra mezcla de disolventes apropiados, y se mezcla con sulfato de cobre (0,1-1,0 eq.). A continuación, se añade *N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)prop-2-in-1-amina (1,0-100 eq.) a la mezcla en agitación y se agita durante 1-72 horas a una temperatura entre 20 y 100 °C o hasta que todo el material de partida se consume, según se supervisa mediante CCF o HPLC. A continuación, la mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, DCM) tres veces, las fases orgánicas combinadas se secan sobre K₂SO₄, se filtran y se concentran al vacío o se purifican directamente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y mezcla de disolventes o recristalización en un disolvente o mezcla de disolventes apropiados para proporcionar el compuesto del título.

Ejemplo 37 - Síntesis de *N*-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamida (intermedio).

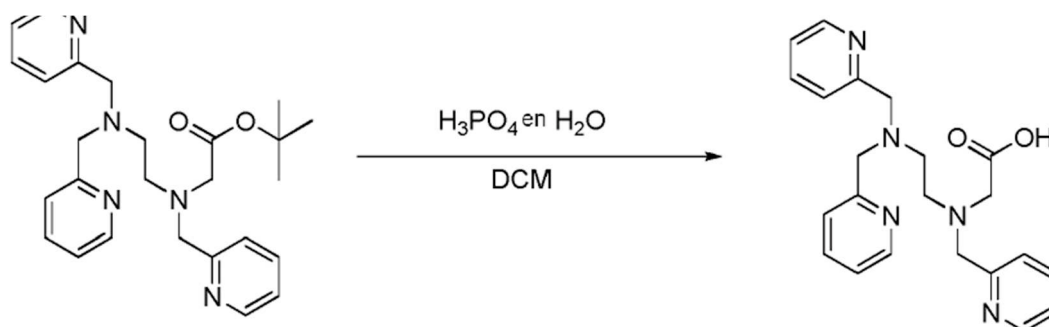


El carbamato preparado en el ejemplo 36 se disuelve en DCM y se enfría hasta 0 °C. A continuación, se añade lentamente ácido trifluoroacético (5-100 eq.) a la mezcla en agitación y la solución se mantiene fría utilizando un baño de hielo. La mezcla se deja a 0 °C hasta que se añade todo el ácido trifluoroacético, a continuación, se agita a temperatura ambiente hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se concentra al vacío, se disuelve en NaOH 2 M y se extrae tres veces con un disolvente apropiado (por ejemplo, DCM). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran al vacío. Si se necesita una purificación adicional, el material se puede someter a cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

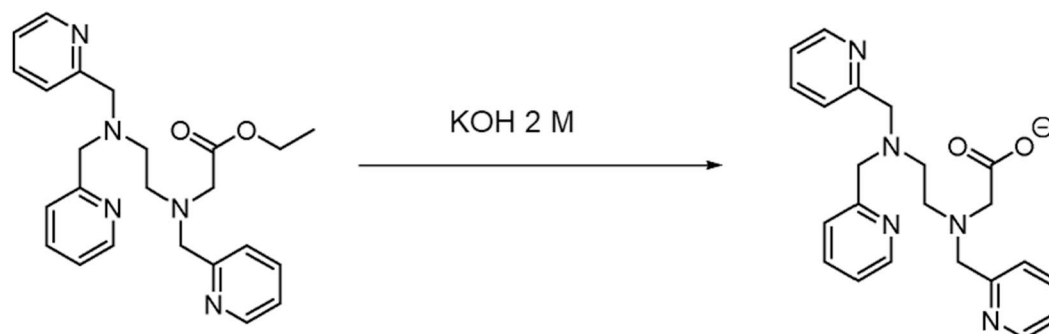
Ejemplo 38 - Síntesis de (3R,5S,6R)-2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol (según la presente invención).



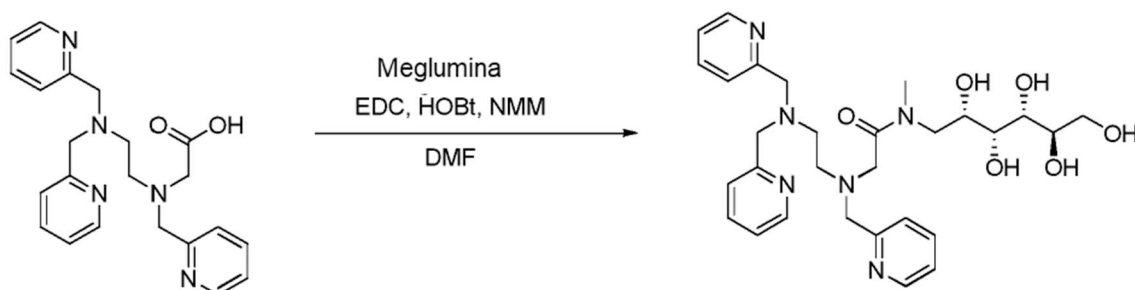
Se suspenden dipicolilamina (1,0 eq.) y D-glucosa (1,0-10,0 eq.) en etanol absoluto. A continuación, se añade ácido acético glacial (3,0-20,0 eq.) y la mezcla se agita a una temperatura entre temperatura ambiente y reflujo durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se purifica mediante extracción, cromatografía en columna, recristalización, HPLC preparativa o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 39 - Síntesis de *N*-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)-*N*-(piridin-2-ilmetil)glicina (según la presente invención)

Se disuelve el éster preparado en el ejemplo 10 en DCM y se agita rápidamente. A continuación, se añade H_3PO_4 (85 %) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, el disolvente orgánico se elimina al vacío y la fase acuosa se neutraliza con NaHCO_3 o K_2CO_3 a pH 7. A continuación, la solución se concentra a presión reducida, los sólidos se lavan con etanol absoluto y se filtran para eliminar las sales inorgánicas. A continuación, la solución etanólica se concentra a presión reducida para proporcionar el ácido del título.

Ejemplo 40 - Síntesis de *N*-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)-*N*-(piridin-2-ilmetil)glicina (según la presente invención).

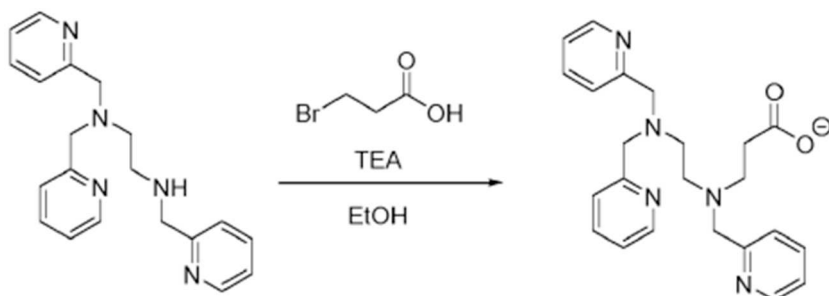
Se suspende el éster preparado en el ejemplo 11 en KOH 2 M y se agita a temperatura ambiente durante 1-72 horas o hasta que todo el material de partida se haya consumido. La fase acuosa se neutraliza con HCl 1 M hasta pH 7. A continuación, la solución se concentra a presión reducida, los sólidos se lavan con etanol absoluto y se filtran para eliminar las sales inorgánicas. A continuación, la solución etanólica se concentra a presión reducida para proporcionar el ácido del título.

Ejemplo 41 - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-*N*-metil-*N*-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).

Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 40 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0°C antes de meglumina (1,0-10,0 eq.). A continuación, se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-10,0 eq.) y, si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-20,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-15 minutos antes de añadir la base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (1,0-40,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0°C y 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K_2CO_3 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K_2CO_3 , se filtran y se concentran a

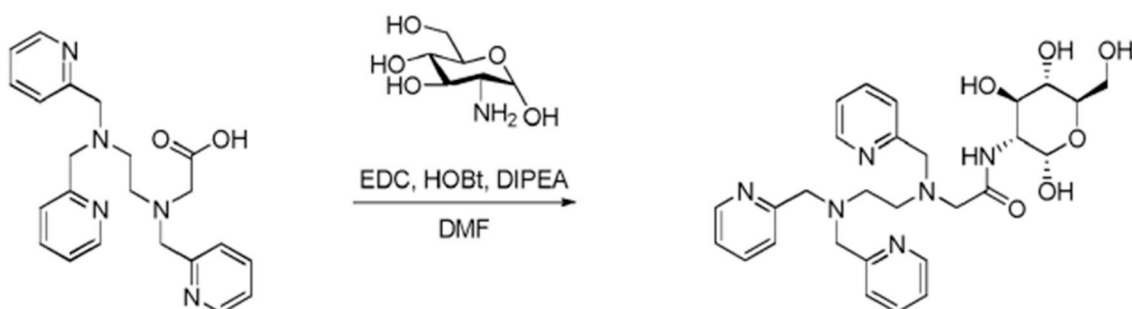
presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 42 - Síntesis de ácido 3-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)propanoico (según la presente invención).



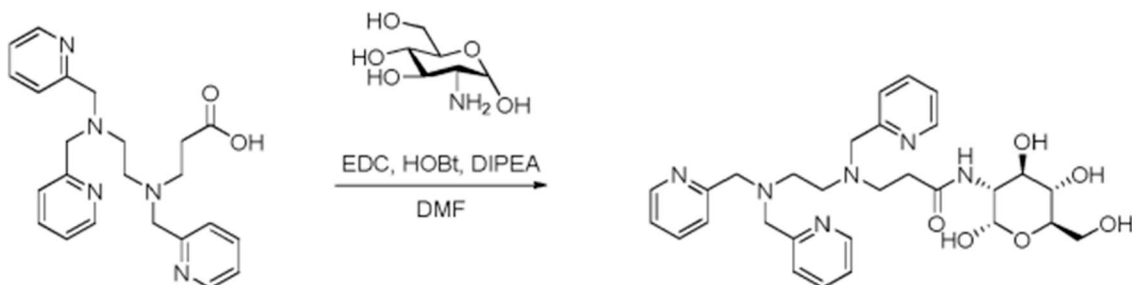
- Se disuelve la amina preparada en el ejemplo 6 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, EtOH (abs)) y se mezcla con ácido 3-bromopropiónico (1,1-5,0 eq.) y TEA (1,2-10,0 eq.). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida hasta una cantidad mínima absoluta de disolvente, se filtra y se diluye con Et₂O. A continuación, la mezcla se filtra de nuevo y la solución restante se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 43 - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-N-((2S,3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida (según la presente invención).



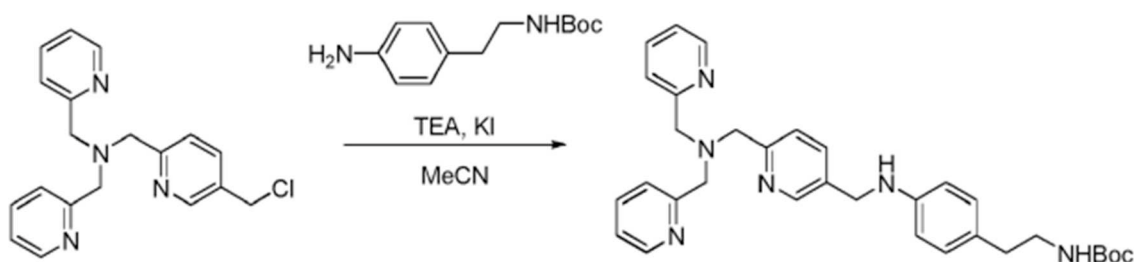
- Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 40 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir clorhidrato de D-glucosamina (1,0-10,0 eq.). A continuación, se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-10,0 eq.) y, si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-20,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-15 minutos antes de añadir la base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (1,0-40,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K₂CO₃ 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 44 - Síntesis de 3-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)-N-((2S,3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)propanamida (según la presente invención).



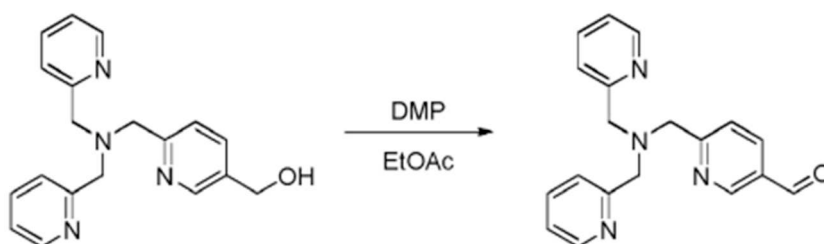
Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 42 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir clorhidrato de D-glucosamina (1,0-10,0 eq.). A continuación, se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-10,0 eq.) y, si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-20,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-15 minutos antes de añadir la base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (1,0-40,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K₂CO₃ 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 45 - Síntesis de (4-(((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metil)amino)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

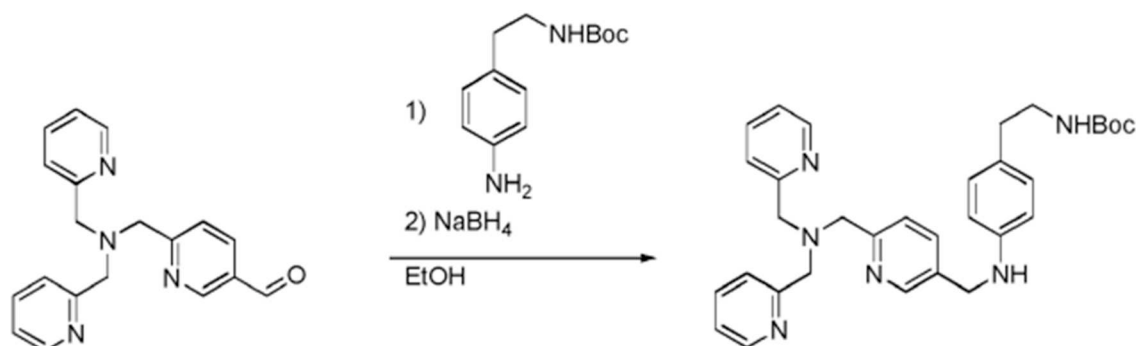


Se disuelve el cloruro descrito en el ejemplo 15 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, MeCN) y se mezcla con KI (0,1-5,0 eq.) y TEA (1,0-20,0 eq.). A continuación, se añade la anilina (0,5-10,0 eq.). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se suspende en K₂CO₃ 1 M y se extrae con DCM tres veces, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida o se someten directamente a cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y fase móvil (por ejemplo, alúmina neutra con MeOH al 0-5 % en DCM). Si es necesaria una purificación adicional, el compuesto se puede someter a HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

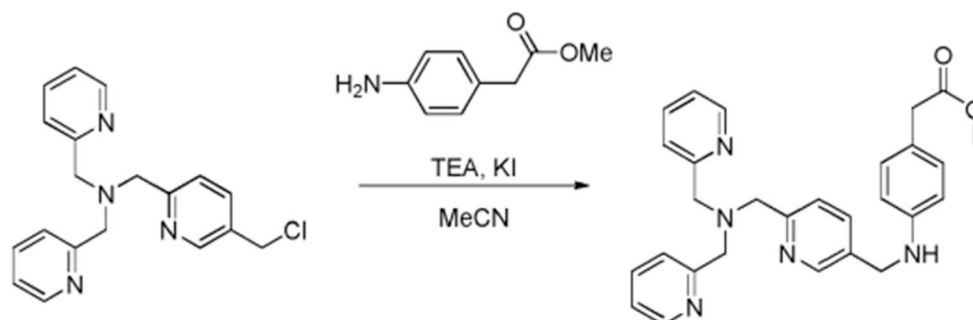
Ejemplo 46 - Síntesis de 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinaldehído (intermedio).



Se disuelve el alcohol preparado en el ejemplo 14 en EtOAc. A continuación, se añade un agente oxidante suave (por ejemplo, DMP, IBX o TEMPO/H₂O₂) y la mezcla se agita durante 1-72 horas a una temperatura entre 20 °C y reflujo o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y, a continuación, primero se diluye con K₂CO₃ 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

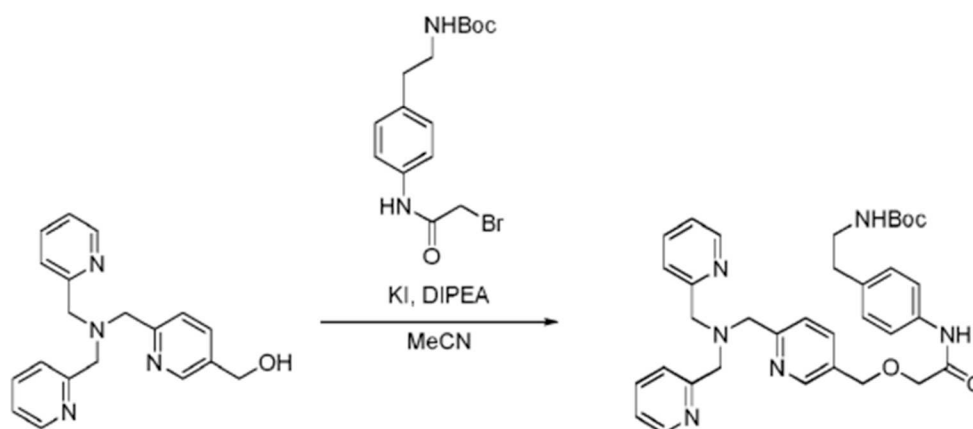
Ejemplo 47 - Síntesis de 4-(((6-(((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metil)amino)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).

Se disuelve el aldehído descrito en el ejemplo 46 (1,0 eq.) en etanol absoluto en atmósfera de argón y se añade la anilina (0,5-5,0 eq.). Pueden añadirse tamices moleculares de 3Å o 4Å para aumentar la proporción o el rendimiento de la formación de imina. La mezcla se calienta a reflujo durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se añade NaBH₄ (1-20 eq.). La mezcla se agita durante 1-72 horas a 20-78 °C antes de añadir la solución de NH₄Cl. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida, se suspende en K₂CO₃ 1 M y se extrae con DCM tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 48 - Síntesis de 2-(4-(((6-(((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metil)amino)fenil)acetato de metilo (intermedio).

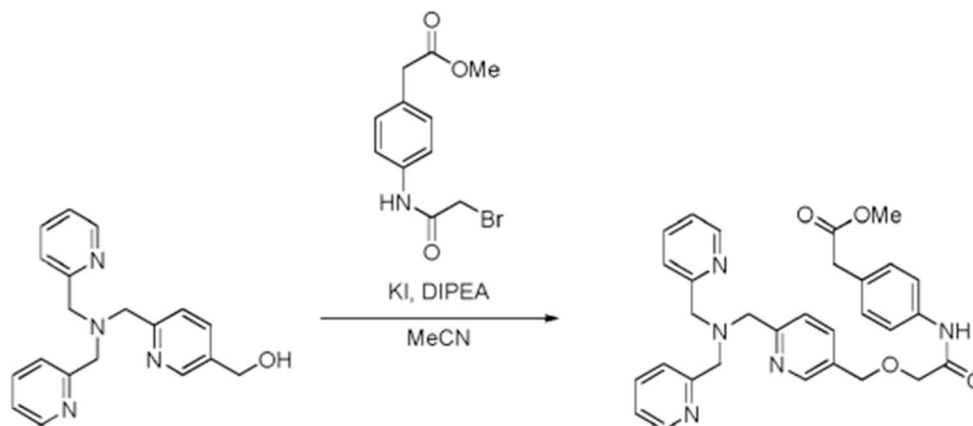
Se disuelve el cloruro descrito en el ejemplo 15 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, MeCN) y se mezcla con KI (0,1-5,0 eq.) y TEA (1,0-20,0 eq.). A continuación, se añade la anilina (0,5-10,0 eq.). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se suspende en K₂CO₃ 1 M y se extrae con DCM tres veces, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida o se someten directamente a cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y fase móvil (por ejemplo, alúmina neutra con MeOH al 0-5 % en DCM). Si es necesaria una purificación adicional, el compuesto se puede someter a HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 49 - Síntesis de (4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)acetamido)fenil) carbamato de terc-butilo (según la presente invención).



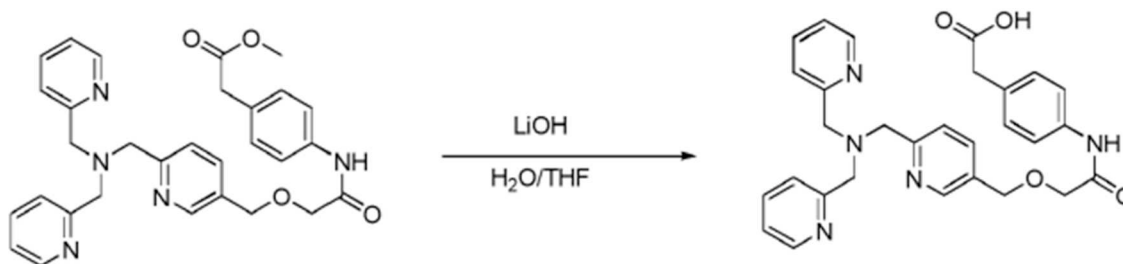
Se disuelve el alcohol preparado en el ejemplo 14 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, MeCN) y se mezcla con KI (0,1-5,0 eq.) y una base (por ejemplo, DIPEA) (1,0-20,0 eq.). A continuación, se añade la bromoamida descrita en el ejemplo 2 (0,5-10,0 eq.). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se suspende en K_2CO_3 1 M y se extrae con DCM tres veces, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K_2CO_3 , se filtran y se concentran a presión reducida o se someten directamente a cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y fase móvil (por ejemplo, alúmina neutra con MeOH al 0-5 % en DCM). Si es necesaria una purificación adicional, el compuesto puede someterse a HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 50 - Síntesis de 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)acetamido)fenil) acetato de metilo (intermedio).



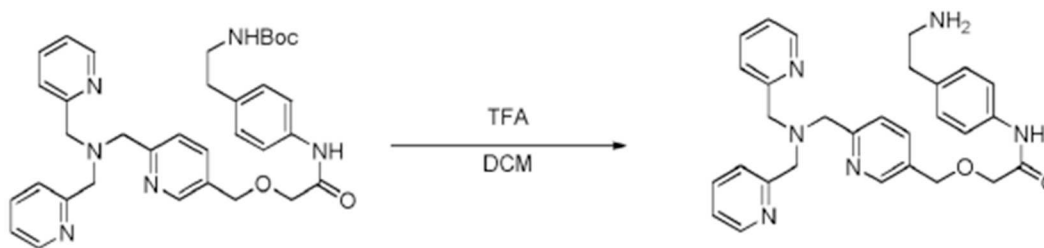
Se disuelve el alcohol preparado en el ejemplo 14 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, MeCN) y se mezcla con KI (0,1-5,0 eq.) y una base (por ejemplo, DIPEA) (1,0-20,0 eq.). A continuación, se añade la cloroamida descrita en el ejemplo 18 (0,5-10,0 eq.). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se suspende en K_2CO_3 1 M y se extrae con DCM tres veces, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K_2CO_3 , se filtran y se concentran a presión reducida o se someten directamente a cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y fase móvil (por ejemplo, alúmina neutra con MeOH al 0-5 % en DCM). Si es necesaria una purificación adicional, el compuesto puede someterse a HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 51 - Síntesis de ácido 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)acetamido)fenil)acético (según la presente invención).



Se disuelve el éster descrito en el ejemplo 50 en THF y se coloca en atmósfera de argón y se añade una solución de LiOH 2 M a 0 °C. La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 0-72 horas a temperatura ambiente antes de neutralizar la mezcla con HCl 1 M hasta pH 7. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida y el material en bruto se suspende en MeOH y se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y se utiliza directamente sin purificación adicional.

Ejemplo 52 - Síntesis de N-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)acetamida (intermedio).



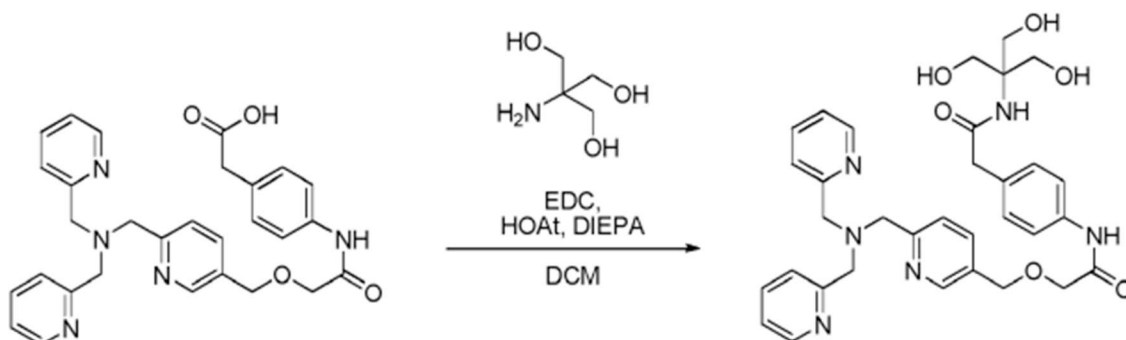
Se disuelve el carbamato descrito en el ejemplo 49 en DCM en atmósfera de argón y se enfría hasta 0 °C. A continuación, se añade lentamente TFA (1-200 eq.) a la mezcla en agitación y se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 0-72 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida, se suspende en K₂CO₃ 1 M y se extrae tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 53 - Síntesis de 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)acetamido)fenil)-N-metil-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).



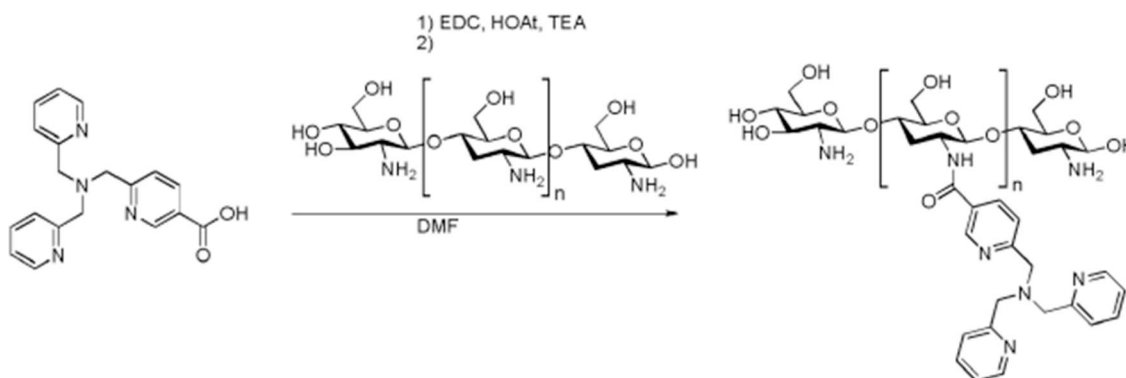
Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 51 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir meglumina (1,0-10,0 eq.). A continuación, se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-10,0 eq.) y, si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-20,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-15 minutos antes de añadir la base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (1,0-40,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K₂CO₃ 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 54 - Síntesis de 2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metoxi)-N-(4-((1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)amino)-2-oxoetil)fenil)acetamida (según la presente invención).



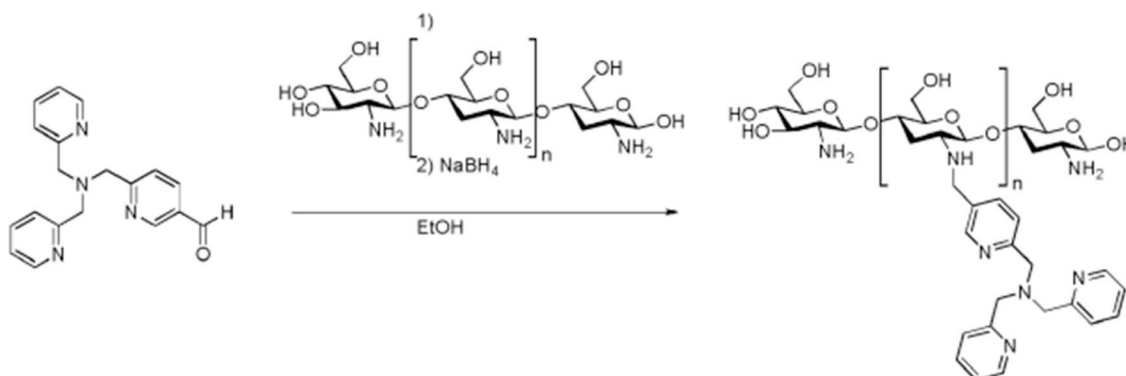
Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 51 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (1,0-10,0 eq.). A continuación, se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-10,0 eq.) y, si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-20,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-15 minutos antes de añadir la base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (1,0-40,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-72 horas a 0 °C y 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K₂CO₃ 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K₂CO₃, se filtran y se concentran a presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 55 - Síntesis de quelantes de zinc funcionalizados con quitosano mediante formación de enlaces amida (según la presente invención).



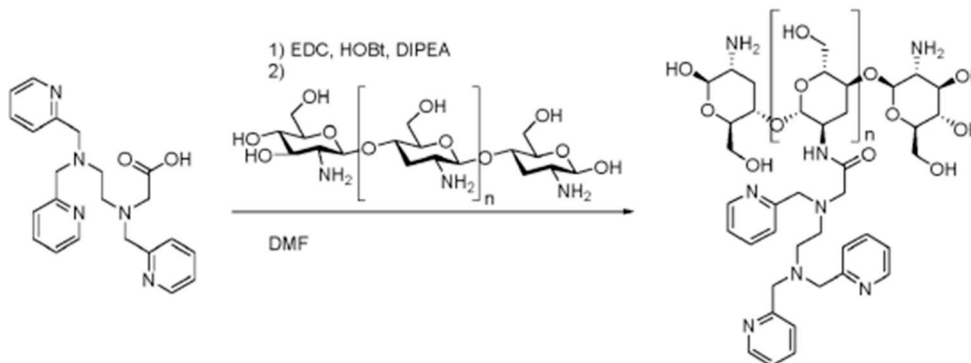
Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 13 (1,0-100 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C y se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-200,0 eq.), si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-400,0 eq.) y una base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (2,0-800,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-1 horas a 0 °C y 0-1 horas adicionales a temperatura ambiente antes de añadir quitosano (1,0 eq.). A continuación, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 56 - Síntesis de quelantes de zinc funcionalizados con quitosano mediante aminación reductora (según la presente invención).



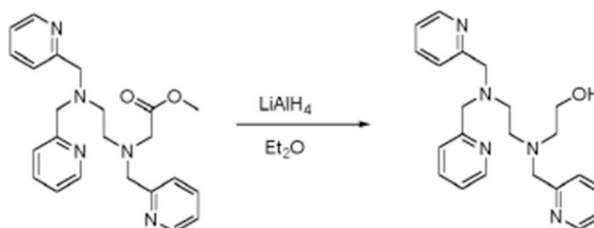
5 Se disuelve el aldehído descrito en el ejemplo 46 (1,0-100 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir quitosano (1,0 eq.). A continuación, la mezcla se agita a una temperatura entre 20-80 °C durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente antes de añadir NaBH₄ (3-300 eq.) y la mezcla se agita durante 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añade lentamente K₂CO₃ o NH₄Cl 1 M para detener la reacción. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

15 **Ejemplo 57** - Síntesis de quelantes de zinc funcionalizados con quitosano mediante formación de enlace amida 2 (según la presente invención).



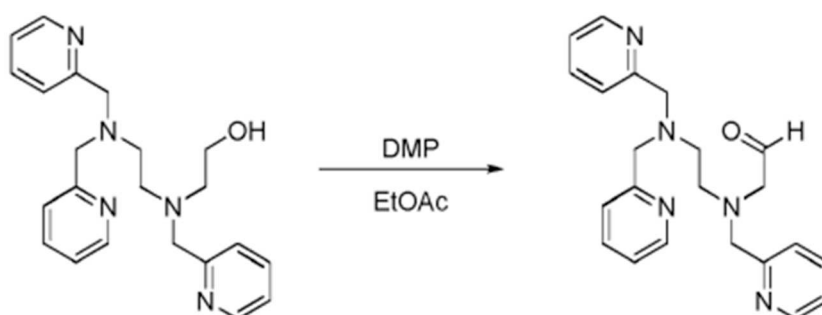
20 Se disuelve el ácido descrito en el ejemplo 40 (1,0-100 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM o EtOH) y se enfría hasta 0 °C y se añaden un agente de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, CDI, EDC, DCC, COMU) (1,0-200,0 eq.), si es necesario, un aditivo (HOAt, Oxyma) (0,5-400,0 eq.) y una base (por ejemplo, NMM o DIPEA) (2,0-800,0 eq.). La mezcla se agita durante 0-1 horas a 0 °C y 0-1 horas adicionales a temperatura ambiente antes de añadir quitosano (1,0 eq.). A continuación, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

30 **Ejemplo 58** - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)etan-1-ol (según la presente invención).



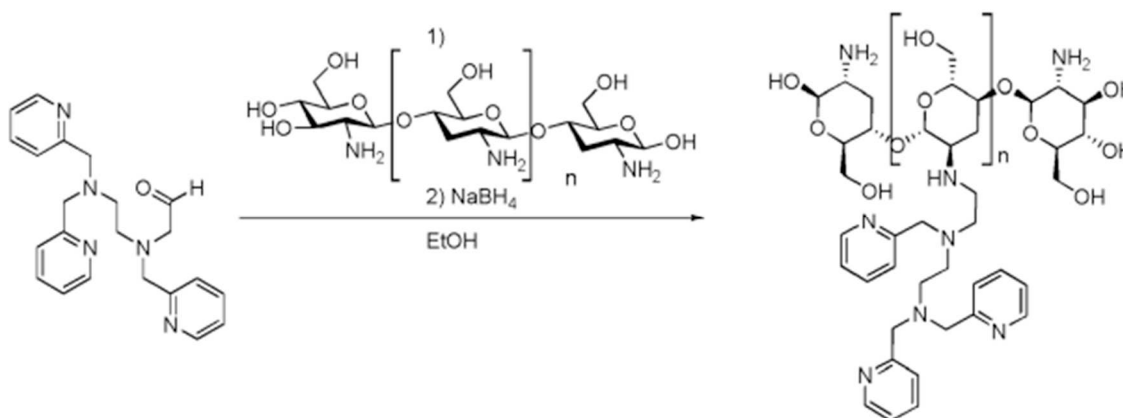
Se disuelve el éster preparado en el ejemplo 11 (1,0 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, etanol absoluto) y se coloca en una atmósfera de argón. Se añaden gránulos o una solución de LiAlH_4 (1,0-10,0 eq.) a la mezcla en agitación y la suspensión espesa se agita a una temperatura entre -20 - 80 °C durante 1-78 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se inactiva mediante la adición de una solución de NH_4Cl y se concentra a presión reducida. A continuación, la mezcla se diluye primero con K_2CO_3 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K_2CO_3 , se filtran y se concentran a presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 59 - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)acetaldehído (intermedio).

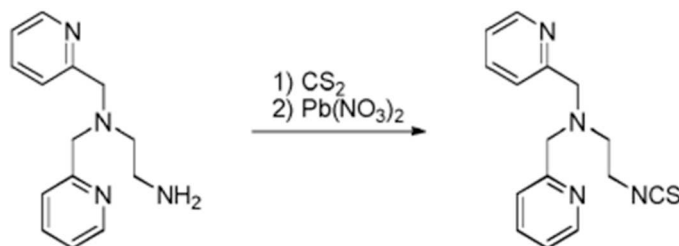


Se disuelve el alcohol preparado en el ejemplo 58 en EtOAc. A continuación, se añade un agente oxidante suave (por ejemplo, DMP, IBX o TEMPO/ H_2O_2) y la mezcla se agita durante 1-72 horas a una temperatura entre 20 °C y reflujo o hasta que se consume todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y a continuación, primero se diluye con K_2CO_3 1 M y se extrae repetidamente con EtOAc, las fases orgánicas se agrupan, se secan sobre K_2CO_3 , se filtran y se concentran a presión reducida, o se concentran directamente a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

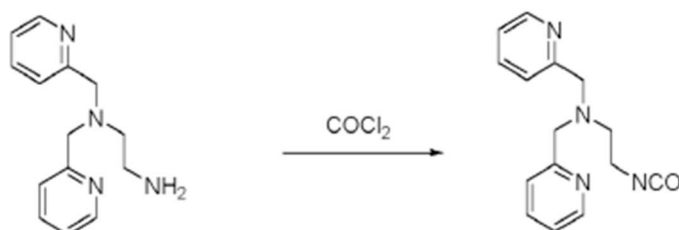
Ejemplo 60 - Síntesis de quelantes de zinc funcionalizados con quitosano mediante aminación reductora 2 (según la presente invención)



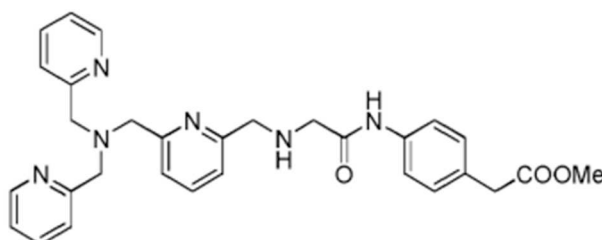
Se disuelve el aldehído descrito en el ejemplo 59 (1,0-100 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, EtOH) y se enfría hasta 0 °C antes de añadir el quitosano (1,0 eq.). A continuación, la mezcla se agita a una temperatura entre 20 - 80 °C durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente antes de añadir NaBH_4 (3,0-300,0 eq.) y la mezcla se agita durante 1-72 horas adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añade lentamente K_2CO_3 o NH_4Cl 1 M para detener la reacción. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 61 - Síntesis de 2-isotiocianato-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)etan-1-amina (intermedio).

- 5 Se disuelve la amina preparada en el ejemplo 5 en un disolvente apropiado (por ejemplo, DCM, DMF o MeCN) en atmósfera de argón antes de añadir CS_2 . A continuación, la mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se añade $\text{Pb}(\text{NCO}_3)_2$. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1-72 horas o hasta que se observa la conversión completa del producto mediante CCF, HPLC, RMN o GC. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

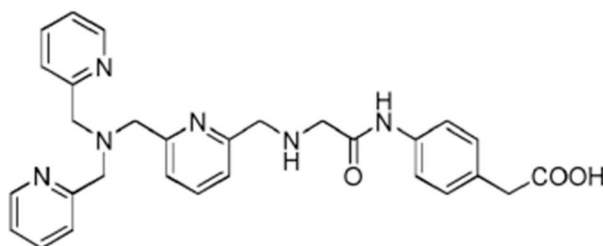
Ejemplo 62 - Síntesis de 2-isocianato-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)etan-1-amina (intermedio).

- La amina preparada en el ejemplo 5 se disuelve en un disolvente apropiado (por ejemplo, DCM, DMF o MeCN) en argón y se enfría hasta 0°C antes de añadir COCl_2 . A continuación, la mezcla se agita a 0°C durante 0-2 horas antes de que la mezcla se caliente a reflujo y se agite durante 1-72 horas o hasta que se haya consumido todo el material de partida. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida. A continuación, el material en bruto se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando una combinación apropiada de fase estacionaria y eluyente, HPLC preparativa, recristalización o combinaciones de las mismas.

Ejemplo 63 - Síntesis de 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metilamino)acetamido)fenil)acetato de metilo (según la presente invención).

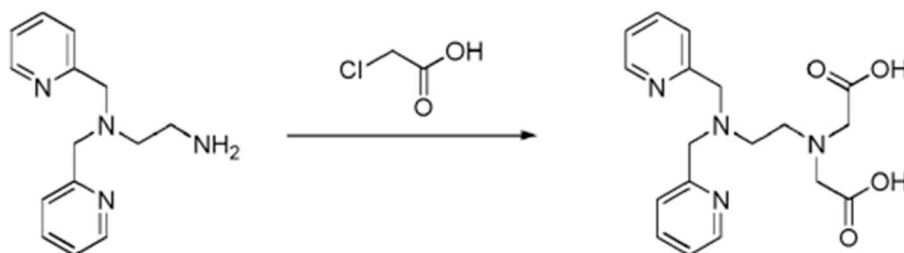
- La amina preparada en el ejemplo 29 (1 eq.) se disuelve en 10 ml de CH_3CN a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añade 2-(4-(2-cloroacetamido)fenil)acetato de metilo preparado en el ejemplo 19 (1,05 eq.), KI (0,6 eq.) y K_2CO_3 (2 eq.). La mezcla se calienta a reflujo durante 16 horas hasta que el control con CCF revela la conversión completa de la amina. A continuación, la mezcla se hace pasar a través de un lecho de celite utilizando CH_3CN y la solución se concentra a presión reducida. El producto se aísla mediante cromatografía en columna en una fase estacionaria apropiada utilizando una mezcla de disolventes apropiados como eluyente.

Ejemplo 64 - Síntesis de ácido 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metilamino)acetamido)fenil)acético (según la presente invención).



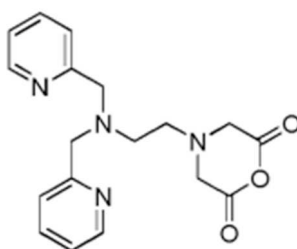
Se disuelve 2-(4-(2-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-2-il)metilamino)acetamido)fenil)acetato de metilo preparado en el ejemplo 63 (1 eq.) en una cantidad apropiada de THF enfriado a 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añade LiOH·H₂O (2,0 eq.) en una cantidad apropiada de H₂O destilada y la solución se agita a 0 °C hasta que la CCF indica una conversión completa. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida para eliminar el THF y la solución acuosa residual se ajusta a pH 7 con HCl 0,5 M. El agua se elimina a presión reducida para proporcionar el producto ácido.

Ejemplo 65 - Síntesis de ácido 2,2'-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)azanodiil)diacético (según la presente invención).



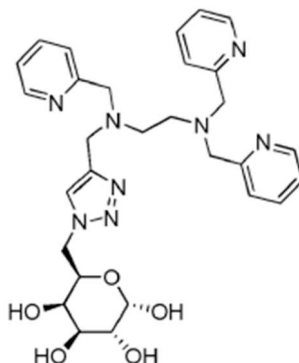
Se neutraliza ácido cloroacético (2 mmol), disuelto en 2 ml de agua, mediante una cantidad equimolar de hidróxido de sodio en 2 ml de agua, y se añade Nⁱ,Nⁱ-bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina, tal como se ha descrito en el ejemplo 5 (1 mmol). Después de calentar a reflujo, se añade gota a gota más hidróxido de sodio (2,1 mmol en 2 ml de agua) y la solución se mantiene a reflujo durante 1 hora. Después de neutralización con HCl 4 M (acuoso) y posterior adición a pH ácido, el compuesto se purifica utilizando un gradiente de pH en una columna de intercambio catiónico fuerte o mediante cristalización a partir de una mezcla de metanol-piridina.

Ejemplo 66 - Síntesis de 4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)morfolin-2,6-diona (intermedio).



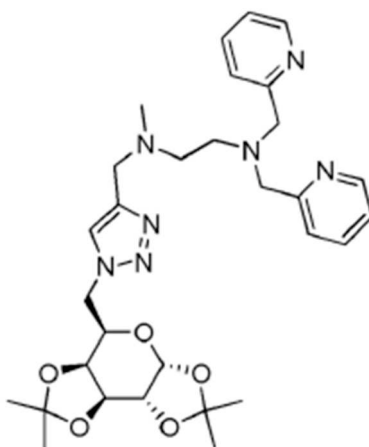
Se calienta ácido 2,2'-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)azanodiil)diacético (descrito en el ejemplo 65) a reflujo en anhídrido acético en exceso y un disolvente apropiado. Después de la eliminación de los compuestos volátiles, el producto en bruto se utiliza tal cual para las etapas posteriores o se purifica mediante procedimientos de cristalización/precipitación a partir de disolventes o mezclas de disolventes apropiados.

Ejemplo 67 - Síntesis de (2S,3R,4S,5R,6R)-6-(((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (según la presente invención).



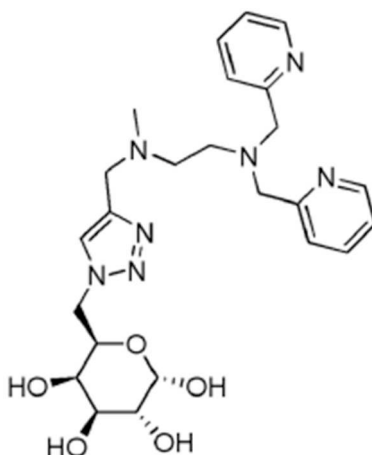
El tratamiento de la N^1, N^1, N^2 -tris(piridin-2-ilmetil)- N^2 -(((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina, tal como se describe en el ejemplo 33, con ácido trifluoroacético al 50 % en agua durante 1 hora - 24 horas proporciona, después de la eliminación de los disolventes, el compuesto del título. El producto en bruto se puede purificar adicionalmente con procedimientos cromatográficos de fase inversa o materiales de intercambio catiónico o combinaciones de los mismos.

Ejemplo 68a - Síntesis de N^1 -metil- N^2, N^2 -bis(piridin-2-ilmetil)- N^1 -(((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina (intermedio).



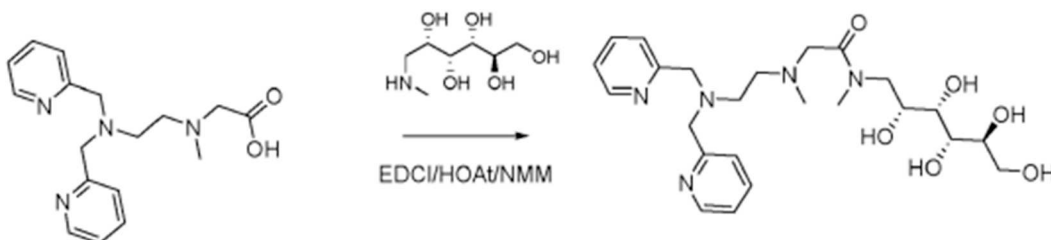
A una solución de N -metil- N' , N' -bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina, tal como se ha descrito en la bibliografía (G. Berggren et al, Dalton Trans., (2009), 10044-10054) 2 mmol) en 30 ml de acetonitrilo u otros disolventes no nucleofílicos adecuados, se le añade K_2CO_3 (4 mmol) y, a continuación, la mezcla se enfría en un baño de hielo. A continuación, se añade gota a gota una solución de metanosulfonato de (1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilo, tal como se describe en el ejemplo 32 (2 mmol) en el mismo disolvente, y la mezcla se deja calentar hasta temperatura ambiente para reaccionar adicionalmente durante 4 horas - 48 horas. Después de la filtración y eliminación del disolvente, el producto se puede purificar adicionalmente utilizando cromatografía sobre alúmina, sílice o materiales de fase inversa y/o con procedimientos de SPE, tanto de intercambio catiónico como de materiales de relleno de fase inversa.

Ejemplo 68b - Síntesis de (2S,3R,4S,5R,6R)-6-((4-(((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(metil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (según la presente invención).



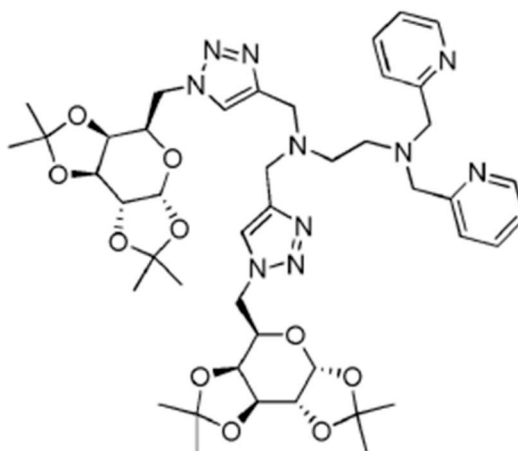
El tratamiento del compuesto, tal como se describe en el ejemplo 68a, con ácido trifluoracético al 50 % en agua durante 1 hora - 24 horas proporciona, después de la eliminación de los disolventes, el compuesto del título. El producto en bruto se puede purificar adicionalmente con procedimientos cromatográficos de fase inversa o materiales de intercambio catiónico o combinaciones de los mismos.

Ejemplo 69 - Síntesis de 2-((2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)(metil)amino)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).



El compuesto del título se preparó, tal como se describe, a continuación, para el ejemplo 96e.

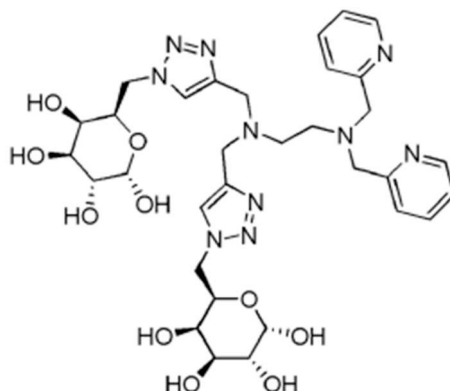
Ejemplo 70 - Síntesis de N¹,N¹-bis(piridin-2-ilmetil)-N²,N²-bis((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina (intermedio).



A una solución de N¹,N¹-bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina, tal como se describe en el ejemplo 5 (2 mmol) en 30 ml de acetonitrilo u otros disolventes no nucleófilos adecuados, se le añade K₂CO₃ (8 mmol) y, a continuación, la mezcla se enfría en un baño de hielo. A continuación, se añade gota a gota una solución de metanosulfonato de (1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilo, tal como se describe en el ejemplo 32 (4 mmol) en el mismo disolvente, y la mezcla se deja calentar

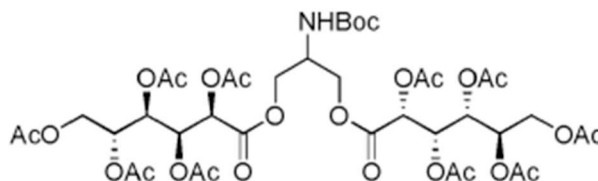
hasta temperatura ambiente para reaccionar adicionalmente durante 4 horas - 48 horas. Después de la filtración y eliminación del disolvente, el producto se puede purificar adicionalmente utilizando cromatografía sobre alúmina, sílice o materiales de fase inversa, y/o con procedimientos de SPE, tanto de intercambio catiónico como de materiales de relleno de fase inversa.

Ejemplo 71 - Síntesis de (2S,2'S,3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R,6R,6'R)-6,6'-((((2-bis(piridin-2-ilmetil)amino)etil)azanodiiil)bis(metilen))bis(1H-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(metilen))bis(tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol) (según la presente invención).



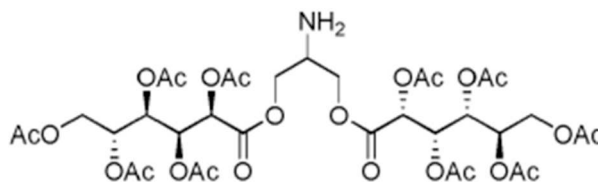
El tratamiento de la N^1,N^1 -bis(piridin-2-ilmetil)- N^2,N^2 -bis(((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina, tal como se describe en el ejemplo 70, con ácido trifluoroacético al 50 % en agua durante 1 hora - 24 horas proporciona, después de la eliminación de los disolventes, el compuesto del título. El producto en bruto se puede purificar adicionalmente con procedimientos cromatográficos de fase inversa o materiales de intercambio catiónico o combinaciones de los mismos.

Ejemplo 72 - Síntesis de gluconato bis-pentaacetilado, según un procedimiento de la bibliografía publicada descrito por I.-H. Paik, D. Tapriyal, R. M. Enick, A. D. Hamilton, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3284-3287 (intermedio).



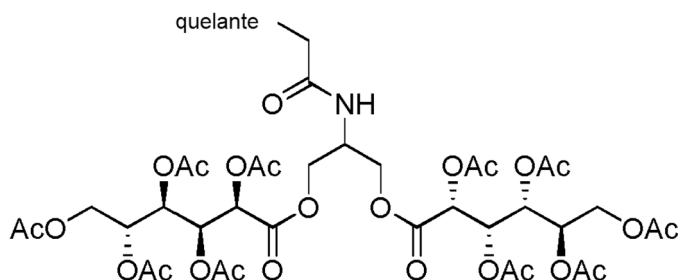
Se trata una solución de ácido glucónico pentaacetilado (2,08 eq.) en DCM anhidro con EDCI (2,2 eq.) y piridina (3,4 eq.). Se añade N -Boc-serinol (1,0 eq.) a la mezcla de reacción, seguido de la adición de DMAP (cantidad catalítica). La mezcla de reacción se agita durante 12 horas y se vierte en una solución acuosa saturada de cloruro de amonio. La fase orgánica se separa y se extrae con DCM, se seca sobre $MgSO_4$ y se concentra a presión reducida para producir un sólido pegajoso. La cromatografía en columna ultrarrápida sobre sílice eluyendo con metanol al 2 %/DCM produce éster de gluconato bis-acetilado protegido con N -Boc como un aceite denso incoloro.

Ejemplo 73 - Desprotección de Boc de gluconato bis-pentaacetilado, según un procedimiento de la bibliografía publicada descrito por I.-H. Paik, D. Tapriyal, R. M. Enick, A. D. Hamilton, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3284-3287 (intermedio).



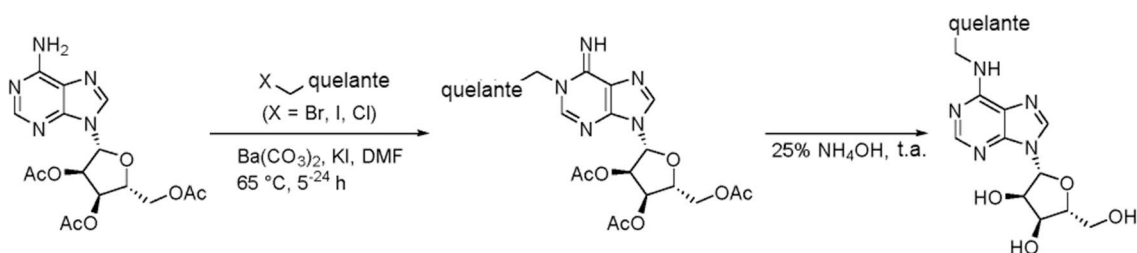
A una solución de éster de gluconato bis-acetilado protegido con N -Boc preparado en el ejemplo 72 en diclorometano anhidro se le añade gota a gota lentamente ácido trifluoroacético en gran exceso (50-100 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agita durante 3 horas y se concentra a presión reducida y se seca completamente a vacío elevado para proporcionar la amina de gluconato bis-pentaacetilado desprotegida.

Ejemplo 74 - Procedimiento general para el acoplamiento de quelante-enlazador-ácido o quelante-ácidos a la amina de gluconato bis-pentaacetilado (intermedio).



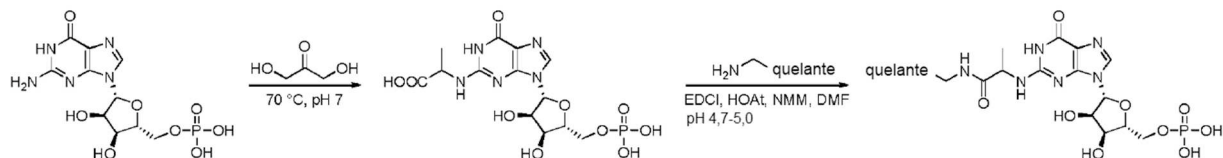
Se disuelve el quelante-enlazador-ácido o quelante-ácido preparados, por ejemplo, en los ejemplos 13 o 21 (1 eq.) en un disolvente apropiado (por ejemplo, pero sin limitarse a estos, DMF, CH₃CN, EtOAc, CH₂Cl₂). A esta mezcla se le añade el reactivo de acoplamiento (por ejemplo, pero sin limitarse a estos, HATU, COMU, PyBOP, EDCI), (1-1,5 eq.), activador opcional (por ejemplo, sin limitarse a estos, HOAt, HOBt) (1-1,5 eq.) y una base no nucleofílica apropiada (por ejemplo, pero sin limitarse a estas, NMM, DIPEA), (2-3 eq.) a una temperatura entre 0 °C y temperatura ambiente. Se añade la amina del ejemplo 73 (1-1,2 eq.). De manera alternativa, se puede utilizar un ácido activado (1 eq.) y se añaden a la mezcla la amina del ejemplo 73 (1-1,2 eq.) y la base (1-1,2 eq.). La mezcla de reacción se agita a una temperatura entre 0 °C y reflujo hasta la conversión completa del ácido o éster activo indicado mediante CCF. El disolvente se elimina a presión reducida y el producto se aísla mediante cromatografía en columna en una fase estacionaria apropiada utilizando una mezcla de disolventes apropiados como eluyente.

Ejemplo 75 - Procedimiento general para la síntesis de alquiladenosinas con haloquelantes según un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada descrito por V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2015, 34, 475-499 (según la presente invención).



A una solución de triacetiladenosina (1 eq.) en DMF, se le añaden carbonato de bario (2,5 eq.), yoduro de potasio (2 eq.) y el quelante-cloruro preparado en el ejemplo 15 (2 eq.), y la mezcla se agita a 65 °C durante 24 horas. A continuación, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se diluye con acetato de etilo y se filtra a través de celite de BaCO₃. El celite se lava con acetato de etilo y el filtrado combinado se evapora al vacío hasta un volumen de aproximadamente 2 ml. A continuación, se añade amoníaco acuoso al 25 % y la mezcla se deja reposar a t.a. (temperatura ambiente) durante una semana. La mezcla se evapora a presión reducida, se evapora con EtOH y el producto se aísla mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

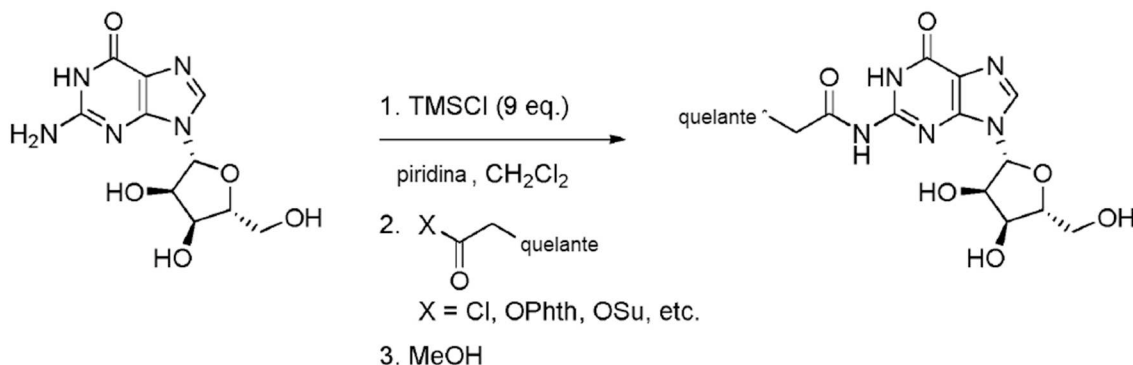
Ejemplo 76 - Síntesis de amidas a partir de N2-(1-carboxietil)-guanosina 5'-monofosfato según un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada descrito por D. Festring, A. Brockhoff, W. Meyerhof, T. Hofmann, J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 8875-8885 (según la presente invención).



Se calienta una mezcla de guanosina 5'-monofosfato (1 eq.) y el dímero de 1,3-dihidroxiacetona (1,5 eq.) en tampón de fosfato (1 mol/l, pH 7,0; 5 ml) durante 24 horas a 70 °C. La mezcla en bruto se diluye con agua y se purifica mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas. Una solución del carboxietilo (1 eq.), EDCI (5 eq.) y la amina quelante, por ejemplo, la amina preparada en el ejemplo 29 (20 eq.) en H₂O o un disolvente alternativo apropiado se ajusta a pH 5 con HCl 1 M o NaOH 1 M. La mezcla se agita a temperatura ambiente manteniendo un pH de 5 hasta que se detecta la conversión

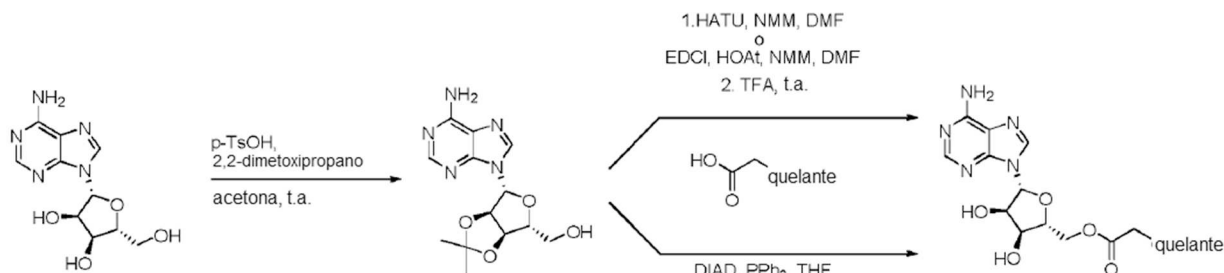
completa. El producto se aísla y se purifica mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

Ejemplo 77 - Procedimiento general para la N-acilación de guanosina con ácido quelante activado según un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada, véase: Y. Fan, B. L. Gaffney, R. A. Jones, Org. Lett. 2004, 6, 2555-2557 (según la presente invención).



A guanosina hidratada seca (1 eq.) en diclorometano anhidro en atmósfera de N₂ enfriada en un baño de hielo, se le añade TMSCl (9 eq.) durante 2 minutos y la mezcla se deja agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, el matraz se enfría de nuevo en un baño de hielo y se añade el ácido quelante activado, por ejemplo, la versión activada del ácido descrito en el ejemplo 13 (1,1 eq.) disuelto en un disolvente apropiado durante 10 minutos. La mezcla se agita a una temperatura entre 0 °C y temperatura ambiente hasta la conversión completa (CCF, ninhidrina). A continuación, se añade metanol en exceso y la solución se agita a temperatura ambiente hasta la desililación completa. La mezcla se evapora y el producto se aísla mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

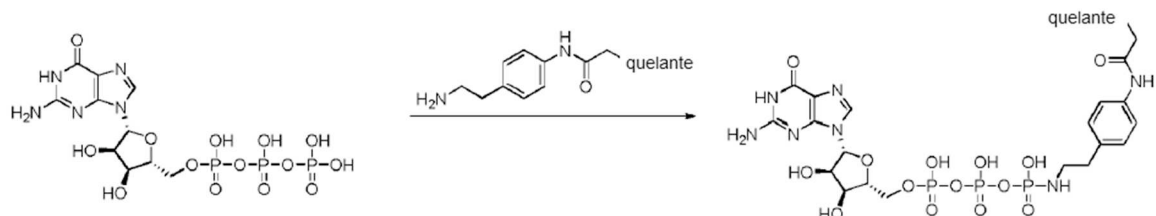
Ejemplo 78 - Procedimiento general para la síntesis de nucleósidos esterificados en 5' utilizando los quelante-ácidos según los procedimientos de la bibliografía adoptados de manera apropiada, véase: W. Wei, W.-K. Shi, P.-F. Wang, X.-T. Zeng, P. Li, J.-R. Zhang, Q. Li, Z.-P. Tang, J. Peng, L.-Z. Wu, M.-Q. Xie, C. Liu, X.-H. Li, Y.-C. Wang, Z.-P. Xiao, H.-L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 6602-6611; E. Hernández-Vázquez, V. Chagoya, *Med. Chem. Res.* 2014, 24, 2325-2335 (según la presente invención).



A una suspensión de nucleósido (1 eq.) y ácido p-toluenosulfónico (1,1 eq.) en acetona anhidra, se le añade 2,2-dimetoxipropano (4 eq.). Después de 3 días de agitación vigorosa, la solución se neutraliza con una solución saturada de Na₂CO₃ y, a continuación, se extrae con cloroformo. Las capas orgánicas se unen y se secan utilizando Na₂SO₄. El disolvente se elimina a presión reducida y el sólido restante se suspende con éter y se lava con agua fría obteniendo un producto en bruto que se purifica y aísla mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas. La 2',3'-O-isopropilidenadenosina preparada anteriormente (1 eq.) y el quelante-ácido, por ejemplo, el descrito en el ejemplo 13, (1 eq.) se disuelven en un disolvente anhidro apropiado (por ejemplo, pero sin limitarse a estos, DMF, CH₃CN, EtOAc, CH₂Cl₂) a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añade el reactivo de acoplamiento (por ejemplo, pero sin limitarse a estos, HATU, COMU, PyBOP, EDCI) (1-1,5 eq.), activador opcional (por ejemplo, pero sin limitarse a estos, HOAt, HOBt) (1-1,5 eq.) y una base no nucleofílica apropiada (por ejemplo, pero sin limitarse a estas, NMM, DIPEA) (2-3 eq.) a una temperatura entre 0 °C y temperatura ambiente. La mezcla se agita durante 1 hora - 20 horas hasta la conversión completa y se procesa mediante extracción, filtración con celite o concentración directa a presión reducida, seguida de purificación y aislamiento mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

Ejemplo 79 - Procedimiento general para la síntesis de trifosfatos de guanosina funcionalizados con quelantes según un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada, véase: S. Masuda, T. Tomohiro, S. Yamaguchi, S. Morimoto, Y. Hatanaka, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015, 25, 1675-1678 (según la presente invención).

5

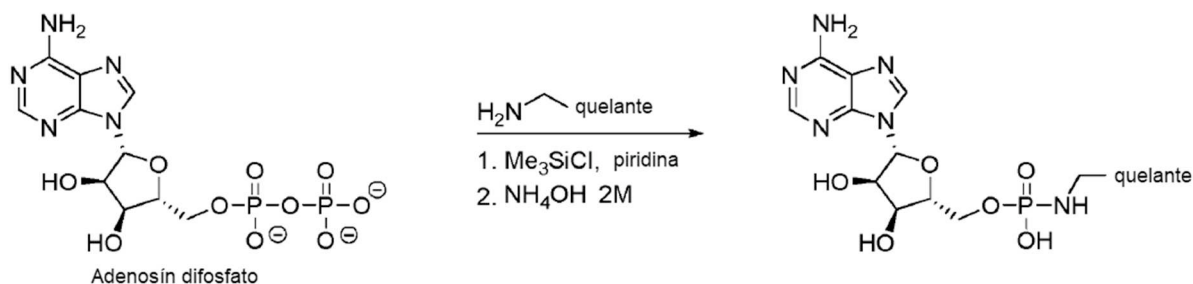


Se añade una solución del quelante-amina descrito en el ejemplo 8 en agua (50 mM) o una mezcla de agua y, por ejemplo, metanol, DMF, acetonitrilo, THF a una solución tamponada (pH 6,8) de ATP (50 mM). Se añaden una solución acuosa de EDCl y una solución tamponada (pH 6,8) de NEt₃ (600 mM) a temperatura ambiente y la mezcla se agita durante 1-8 horas. A continuación, la mezcla se concentra a presión reducida y el producto se aísla y se purifica mediante cromatografía en columna utilizando la fase estacionaria y el eluyente apropiados, HPLC preparativa, cristalización o destilación.

10

Ejemplo 80 - Procedimiento general para la síntesis de monofosfatos de adenosina funcionalizados con quelantes según un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada, véase: H. Fu, B. Han, Y.-F. Zhao, Chem. Commun. 2003, 134-135 (según la presente invención).

15

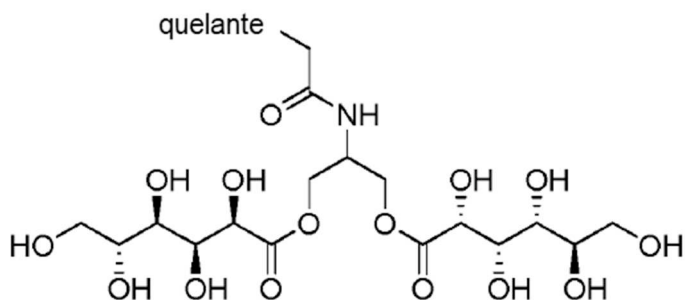


En una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente se añade gota a gota cloruro de trimetilsililo (10 eq.) a una mezcla de ADP (sal disódica de adenosín 5A-difosfato) y un quelante-amina, por ejemplo la amina descrita en el ejemplo 29 (2 eq.) en piridina y se agita durante dos días. El disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se hidroliza en NH_3 (acuoso) 2 M, se extrae con éter dietílico cuatro veces y la solución restante se evapora hasta sequedad. El producto se aísla mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

20

Ejemplo 81 - Procedimiento general para la desprotección con acetato de los productos acoplados preparados en el ejemplo anterior según un procedimiento de bibliografía modificado de manera adecuada, véase: L. Zeng, G. Xu, P. Gao, M. Zhang, H. Li, J. Zhang, Eur. J. Med. Chem. 2015, 93, 109-120 (según la presente invención).

30

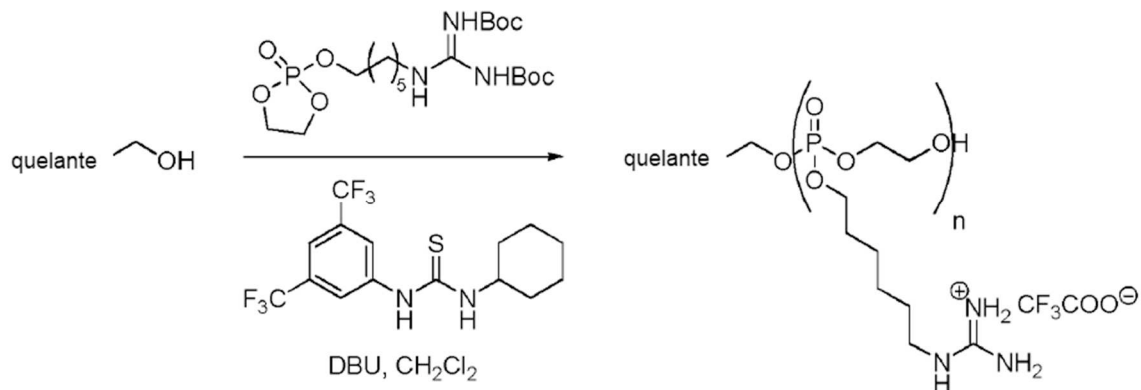


Se añade CH_3ONa (15 eq.) a una solución de la amida gluconato bis-pentaacetilado preparada en el ejemplo 74 (1 eq.) en metanol a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 4 horas y su pH se ajustó a 7 con 4 mol/l de HCl en EtOAc. La mezcla de reacción se sometió a evaporación para eliminar el disolvente y se purificó y aisló mediante cromatografía en columna, HPLC preparativa, cristalización o destilación en las condiciones adecuadas.

35

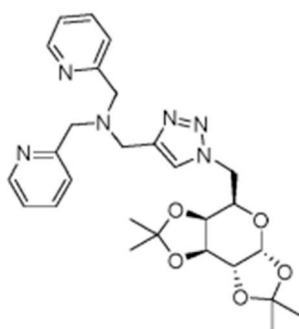
Ejemplo 82 - Procedimiento general para la reacción de sales de polifosfatoguanidina unidas a un quelante-enlazador-alcohol utilizando un procedimiento de la bibliografía modificado de manera adecuada, véase: C. J. McKinlay, R. M. Waymouth, P. A. Wender, J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3510-3517 (según la presente invención)

5



Ejemplo 83a - 1-(piridin-2-il)-N-(piridin-2-ilmetil)-N-(((1-(((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioxolo)[4,5-b:4':5'-d]piran-5-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)metanamina (intermedio).

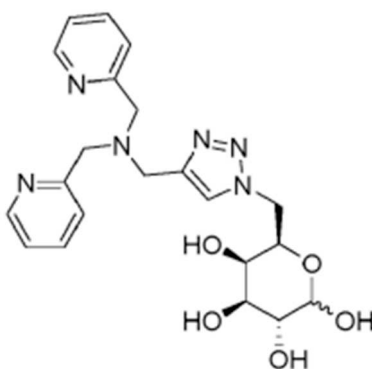
10



El compuesto del título se preparó haciendo reaccionar el producto del ejemplo 32 con di-(2-piridil-metil)amina (DPA), tal como se describe en el ejemplo 68a.

15

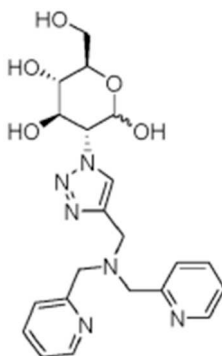
Ejemplo 83b - (3R,4S,5R,6R)-6-((4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)tetrahidro-2H-pirán-2,3,4,5-tetraol (según la presente invención).



20

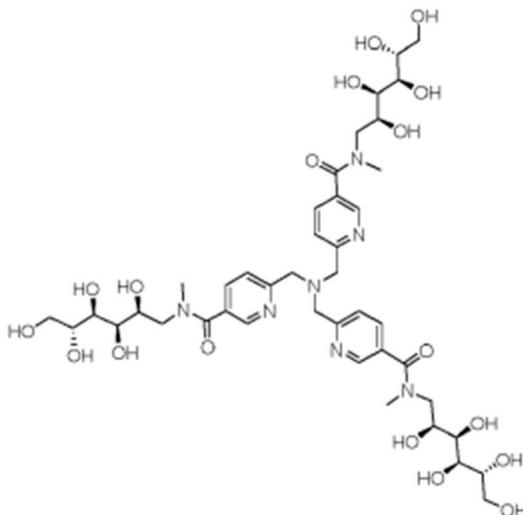
El compuesto del título se preparó mediante la desprotección del producto del ejemplo 83a, tal como se describe en el ejemplo 68b.

Ejemplo 84 - (3R,4R,5S,6R)-3-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol P



5 El compuesto del título se prepara a partir de 2-azido-2-desoxi-D-glucosa (712795 Aldrich) disponible en el mercado, utilizando una modificación del procedimiento en el ejemplo 83.

10 **Ejemplo 85** - 6,6',6''-(nitrilotris(metilen))tris(N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)nicotinamida) (según la presente invención).

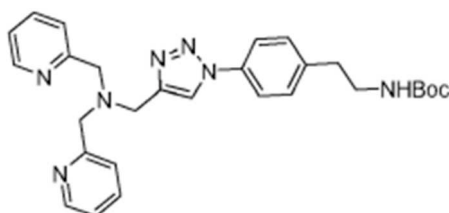


15 El compuesto del título se puede preparar utilizando modificaciones de los procedimientos descritos en el ejemplo 106.

Ejemplos 86-94 (según la presente invención).

20 Los compuestos indicados en los esquemas 10-20 anteriores se pueden preparar utilizando modificaciones de los procedimientos descritos anteriormente.

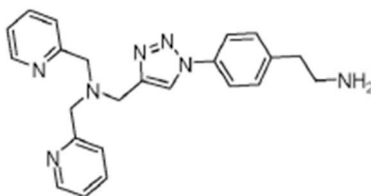
Ejemplo 95a - (4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenetil)carbamato de terc-butilo (intermedio).



25 Se mezclaron rápidamente ascorbato de sodio (10,15 g, 51,24 mmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (6,40 g, 25,62 mmol) en 60 ml de agua y la solución amarilla resultante se transfirió a un matraz que contenía N-propargil-di(2-picolil)amina (6,08 g, 25,62 mmol), preparada, tal como se ha descrito por Simmons et al., Inorg. Chem., 2013, 52, 5838-5850, disuelto en 60 ml de terc-butanol. Después de agitar rápidamente, la solución verde resultante se transfirió a un matraz que

contenía 4-azidofenilcarbamato de terc-butilo (5,60 g, 21,35 mmol), preparado según Murai et al., Eur. J. Org. Chem., 2013, 2428-2433, y se dejó agitar durante 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua/salmuera 1:1. A continuación, la fase acuosa se alcalinizó a pH 9-10 y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una mezcla de EDTA 0,025 M/NaHCO₃ 0,5 M y se secaron sobre sulfato de sodio. La filtración y la posterior eliminación del disolvente a presión reducida produjeron un producto en bruto como un aceite marrón que se pudo purificar sobre alúmina neutra, gradiente de 0-1 % de metanol en diclorometano, produciendo el producto como un aceite naranja espeso. La purificación se realizó en tres lotes combinados de diferentes tamaños con un rendimiento combinado de 14,09 g (73%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,73 (s, 1H), 8,51 (m, 2H), 7,83-7,77 (m, 4H), 7,63 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,41 (m, 2H), 7,27 (m, 2H), 6,92 (t ancho, NH, 1H), 3,89 (s, 2H), 3,85 (s, 4H), 3,19 (m, 2H), 2,78 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H). MS (ESI, modo positivo) *m/z* 500,5 [M+H]⁺.

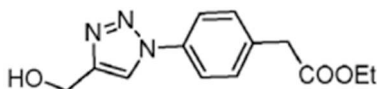
Ejemplo 95b - 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)etan-1-amina (según la presente invención).



A una solución de 4-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)carbamato de terc-butilo (12,70 g, 25,4 mmol) en 96 ml de dioxano, se le añadió lentamente HCl 4 M en dioxano (46 ml). Después de agitar en una atmósfera de Ar durante una noche, los compuestos volátiles se eliminaron a presión reducida. El producto en bruto se redisolvió en 50 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con 250 ml de diclorometano. Este primer extracto contenía producto con una pureza bastante baja. Las extracciones repetidas con 100 ml de diclorometano (> 10 repeticiones) proporcionaron, después de eliminar el disolvente a presión reducida, el producto puro como un aceite espeso de color naranja (8,98 g, 88,5 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,70 (s, 1H), 8,50 (m, 2H), 7,82-7,75 (m, 4H), 7,63 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 3,86 (s, 2H), 3,82 (s, 4H), 2,83 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 1,74 (ancho, 2H). MS (ESI, modo positivo) *m/z* 400,4 [M+H]⁺.

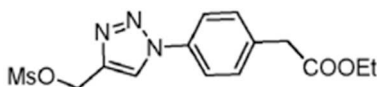
Ejemplo 96 - 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).

Ejemplo 96a - 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetato de etilo (intermedio).

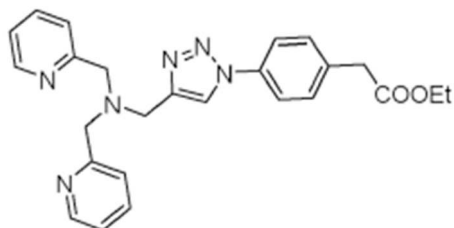


A una solución de 4-azidofenilacetato de etilo (5,00 g, 24,4 mmol), preparado según Rao et al.,³ en 58 ml de acetonitrilo, alcohol propargílico (2,73 g, 48,7 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,928 g, 4,87 mmol). Después de agitar durante 24 horas, se eliminaron los compuestos volátiles a presión reducida y el producto en bruto se purificó utilizando cromatografía en columna sobre sílice, utilizando un gradiente de acetato de etilo en diclorometano. La eliminación del disolvente produjo el producto en forma de un sólido amarillo (6,14 g, 96 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,66 (s, 1H), 7,86 (m, 2H), 7,48 (m, 2H), 5,33 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 4,11 (q, *J* = 7,12 Hz, 2H), 3,78 (s, 2H), 1,21 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). MS (ESI, modo positivo) *m/z* 262,3 [M+H]⁺.

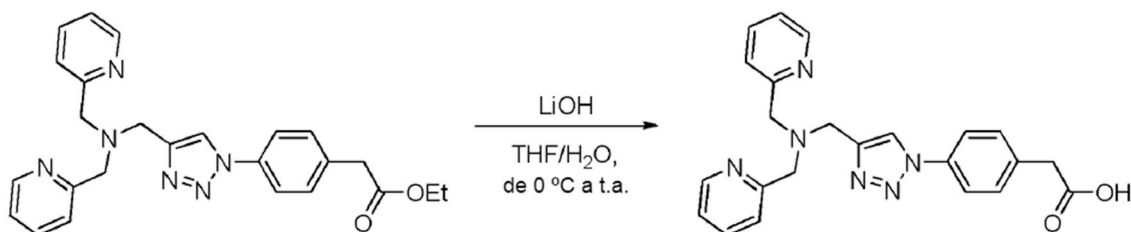
Ejemplo 96b - 2-(4-(4-((metanosulfonilo)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetato de etilo (intermedio).



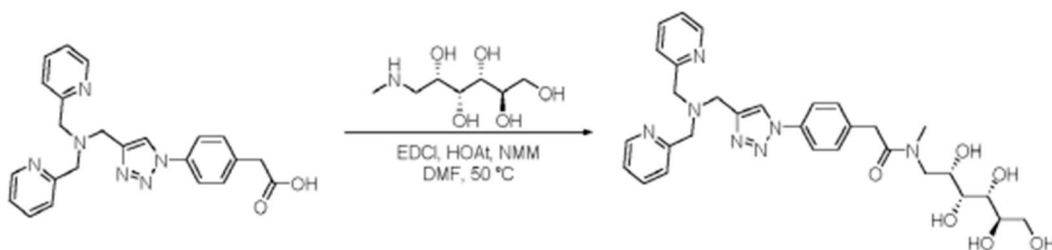
Se disolvió 2-(4-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetato de etilo (6,100 g, 23,35 mmol) en 58 ml de diclorometano y se mantuvo en un baño de hielo. Se añadió trietilamina (3,544 g, 35,02 mmol), seguida de cloruro de metanosulfonilo (3,209 g, 28,02 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación en un baño de hielo durante 3 horas, después de lo cual se eliminaron los compuestos volátiles a presión reducida. La purificación del producto en bruto en una columna de sílice, utilizando un gradiente de 5 %-10 % de acetato de etilo en diclorometano, produjo, después de eliminar el disolvente, el producto como un sólido incoloro (5,11 g, 64 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,99 (s, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,51 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 4,11 (q, *J* = 7,12 Hz, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,29 (s, 3H), 1,21 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Ejemplo 96c - 2-[4-4-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]acetato de etilo (intermedio).

- 5 Se disolvió di-(2-picolil)amina (2,83 g, 14,2 mmol) en acetonitrilo. Se añadió carbonato de potasio (3,93 g, 28,4 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió gota a gota 2-[4-4-[(metanosulfoniloxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]acetato de etilo (4,82 g, 14,2 mmol), disuelto en acetonitrilo (el volumen total de acetonitrilo en la reacción fue de 310 ml) y, después de retirar el baño de hielo, se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas. La filtración a través de celite y con el posterior lavado del celite con diclorometano produjo, después de la eliminación de los disolventes, un producto en bruto como un aceite espeso de color naranja oscuro. La purificación en una columna de sílice, utilizando un gradiente de metanol en diclorometano, con amoníaco adicional añadido a la fase móvil, produjo el producto como un aceite naranja oscuro. La purificación se realizó sobre tres lotes combinados de diferentes tamaños con un rendimiento combinado de 6,02 g (80 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,75 (s, 1H), 8,50 (m, 2H), 7,87 (m, 2H), 7,78 (td, *J* = 7,6 Hz, 1,9 Hz, 2H), 7,63 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,49 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 4,11 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,86 (s, 2H), 3,82 (s, 4H), 3,78 (s, 2H), 1,20 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). MS (ESI, modo positivo) *m/z* 443,2 [M+H]⁺.

Ejemplo 96d ácido 2-[4-4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]acético (según la presente invención).

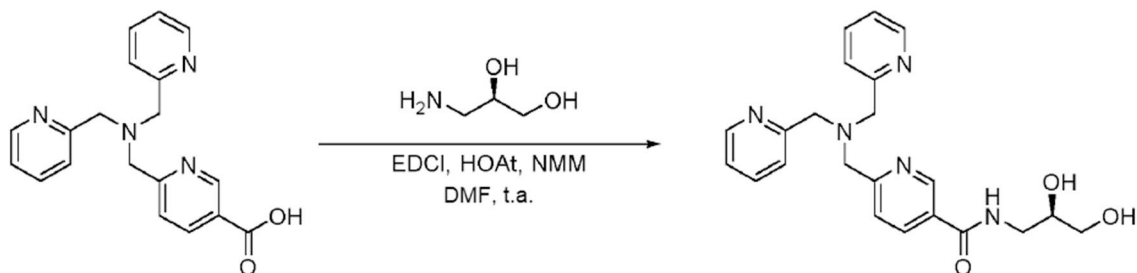
- 20 Se disolvió 2-[4-4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]acetato de etilo (323,1 mg, 0,73 mmol, 1,0 eq.) del ejemplo 96a en 10 ml de THF y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió una solución de LiOH hidratado (61 mg, 1,46 mmol, 2,0 eq.) en 5 ml de H₂O destilada y la solución se agitó a 0 °C hasta que la CCF (alúmina, MeOH al 5 %/CH₂Cl₂) indicó la conversión completa. El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa residual se ajustó a pH = 6 utilizando HCl 4 N. El disolvente se eliminó a presión reducida proporcionando el producto con un rendimiento cuantitativo, utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 96e - 2-[4-4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)acetamida (según la presente invención).

- 35 Se disolvió el ácido 2-[4-4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]acético del ejemplo 96d (302 mg, 0,73 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron *N*-metil-*D*-glucamina (213 mg, 1,059 mmol, 1,5 eq.), EDCI (209,9 mg, 1,095 mmol, 1,5 eq.), HOAt (149 mg, 1,095 mmol, 1,5 eq.) y NMM (120 µl, 1,095 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 16 horas con agitación y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 321,1 mg (0,542 mmol, 74 %) de producto como una espuma de color amarillo pálido. El producto aparece como una mezcla syn/anti con respecto al enlace amida. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,50-8,39 (m, 3H), 7,78 (dd, *J* = 13,8, 7,2 Hz, 4H), 7,69 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,47 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,32-7,20 (m, 2H), 4,08-

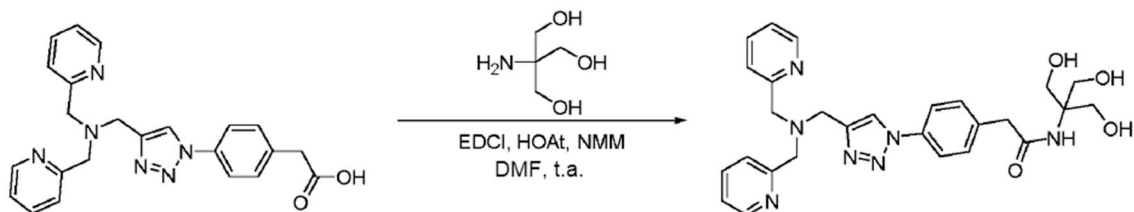
3,96 (m, 2H), 3,93 (s, 2H), 3,87 (s, 5H), 3,83-3,57 (m, 6H), 3,46 (dd, $J = 13,3, 6,5$ Hz, 1H), 3,19, 3,02 (2xs, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,01, 173,91, 160,20, 149,49, 146,06, 138,69, 138,29, 137,62, 137,13, 137,04, 131,81, 131,70, 124,99, 123,82, 123,51, 121,66, 121,54, 74,11, 73,69, 73,11, 73,04, 72,76, 72,22, 71,61, 71,24, 64,77, 64,75, 60,63, 54,09, 52,73, 40,92, 40,49, 38,25, 34,79. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_6$: 591,2805, encontrado: 592,2878 $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 97 - (R)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2,3-dihidroxipropil)nicotinamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (135,7 mg, 0,406 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron (R)-3-aminopropano-1,2-diol (55 mg, 0,609 mmol, 1,5 eq.), EDCI (117 mg, 0,609 mmol, 1,5 eq.), HOAt (83 mg, 0,609 mmol, 1,5 eq.) y NMM (67 μl , 0,609 mmol, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y la purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 61 mg (0,162 mmol, 40 %) de producto. ^1H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,88 (dd, $J = 2,2, 0,6$ Hz, 1H), 8,44 (ddd, $J = 5,0, 1,6, 0,9$ Hz, 2H), 8,17 (dd, $J = 8,2, 2,3$ Hz, 1H), 7,78 (ddd, $J = 11,4, 8,7, 5,2$ Hz, 3H), 7,66 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,27 (ddd, 7,4, 5,0, 1,2 Hz, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,86-3,78 (m, 1H), 3,61-3,51 (m, 3H), 3,41 (dd, $J = 13,7, 7,0$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 168,32, 163,39, 159,94, 149,59, 148,72, 138,68, 137,26, 130,28, 124,97, 124,30, 123,90, 71,95, 65,22, 61,25, 60,95, 44,12. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3$: 407,1957, encontrado 408,2029 $[\text{M}+\text{H}]$.

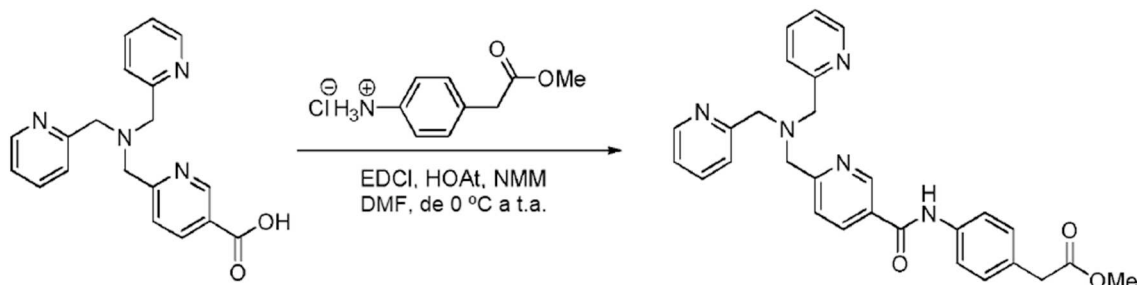
Ejemplo 98 - 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)-N-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)acetamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acético del ejemplo 96d (132,5 mg, 0,3199 mmol, 1,0 eq.) en 2 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (58 mg, 0,479 mmol, 1,5 eq.), EDCI (91,6 mg, 0,479 mmol, 1,5 eq.), HOAt (65 mg, 0,479 mmol, 1,5 eq.) y NMM (53 μl , 0,479 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 76,3 mg (0,147 mmol, 46 %) de producto. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,45 (s, 1H), 8,43 (d, $J = 3,7$ Hz, 2H), 7,78 (t, $J = 7,9$ Hz, 4H), 7,68 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,25 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,92 (s, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,75 (s, 6H), 3,68 (s, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,24, 160,15, 149,47, 146,05, 138,67, 138,03, 137,17, 131,78, 124,96, 123,81, 123,47, 121,54, 63,68, 62,49, 60,62, 49,96, 43,54. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_4$: 517,2438, encontrado: 518,2509 $[\text{M}+\text{H}]$.

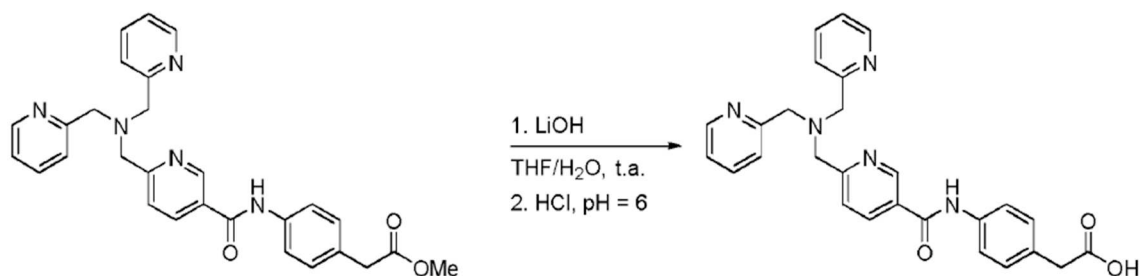
Ejemplo 99 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(4-(2-(metil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)-2-oxoetil)fenil)nicotinamida (según la presente invención)

Ejemplo 99a - 2-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenil)acetato de metilo (intermedio).



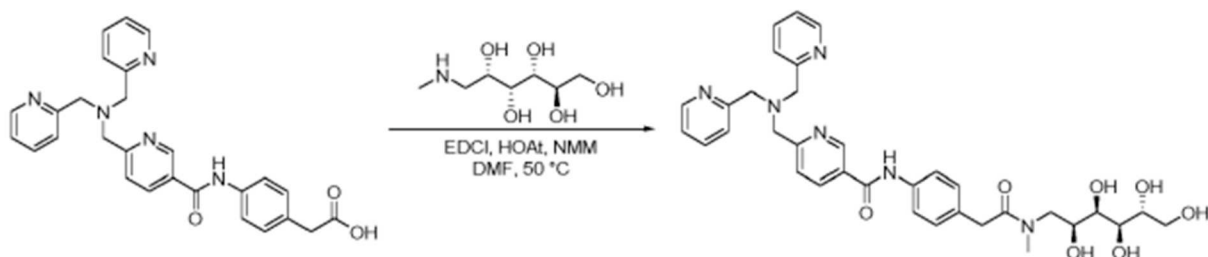
Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (976,3 mg, 2,92 mmol, 1,0 eq.) en 20 ml de DMF anhidra, se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadieron clorhidrato de 2-(4-aminofenil)acetato de metilo (883 mg, 4,38 mmol, 1,5 eq.), EDCI (839 mg, 4,38 mmol, 1,5 eq.) y HOAt (596 mg, 4,38 mmol, 1,5 eq.), seguido de NMM (740 µl, 6,71 mmol, 2,3 eq.) gota a gota durante un período de 30 minutos a 0 °C. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 100 ml de CHCl₃ y se transfirió a un embudo de decantación. La fase orgánica se lavó con una mezcla de una solución acuosa saturada de K₂CO₃ y H₂O (50 ml de cada una), seguidas de salmuera (50 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua, proporcionando 723,9 mg (1,5 mmol, 51 %) de producto en forma de aceite amarillo. ¹H RMN (200 MHz, MeOD) δ 8,97 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,49-8,41 (m, 2H), 8,27 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,81 (td, J = 7,5, 1,8 Hz, 3H), 7,73-7,61 (m, 4H), 7,28 (ddd, J = 6,5, 4,8, 2,3 Hz, 4H), 3,94 (s, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,68 (s, 3H), 3,65 (s, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 173,93, 166,05, 161,46, 157,71, 157,66, 149,15, 148,63, 140,22, 138,46, 137,69, 132,12, 131,28, 130,80, 125,48, 124,72, 124,52, 122,21, 60,53, 60,17, 52,47, 41,08. APCI-HRMS e/z calculado para C₂₈H₂₇N₃O₃: 481,2114, encontrado: 482,2184 [M+H].

Ejemplo 99b - ácido 2-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenil)acético (según la presente invención).



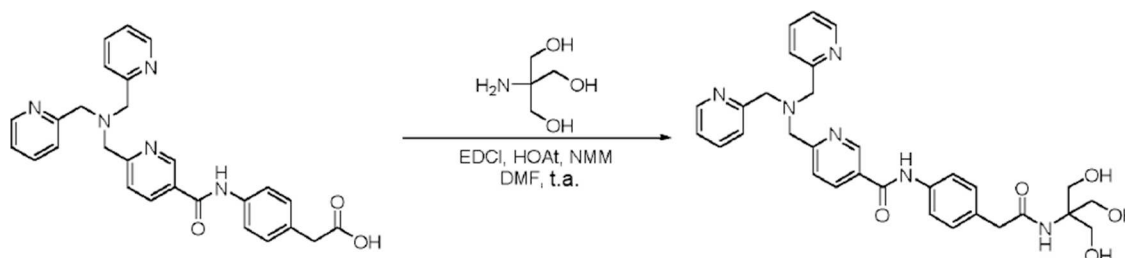
Se disolvió 2-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenil)acetato de metilo del ejemplo 99a (287,7 mg, 0,59 mmol, 1,0 eq.) en 10 ml de THF y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió una solución de LiOH hidratado (49,5 mg, 1,18 mmol, 2,0 eq.) en 10 ml de H₂O destilada y la solución se agitó a 0 °C hasta que la CCF (alúmina, MeOH al 5 % en CH₂Cl₂) indicó la conversión completa. El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa residual se ajustó a pH = 6 utilizando HCl 4 N. El disolvente se eliminó a presión reducida proporcionando el producto con un rendimiento cuantitativo que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 99d - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(4-(2-(metil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)-2-oxoetil)fenil)nicotinamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 2-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenil)acético del ejemplo 99b (276 mg, 0,59 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron *N*-metil-*D*-glucamina (173 mg, 0,885 mmol, 1,5 eq.), EDCI (169 mg, 0,885 mmol, 1,5 eq.), HOAt (120 mg, 0,885 mmol, 1,5 eq.) y NMM (98 µl, 0,885 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 16 horas con agitación y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 207,4 mg (0,322 mmol, 54 %) de producto como una espuma blanca. El producto aparece como una mezcla *syn/anti* con respecto al enlace amida. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 9,00-8,93 (m, 1H), 8,44 (dd, *J* = 4,9, 0,7 Hz, 2H), 8,25 (dd, *J* = 8,2, 1,7 Hz, 1H), 7,79 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 3H), 7,65 (dd, *J* = 16,4, 7,7 Hz, 4H), 7,27 (dd, *J* = 9,5, 4,5 Hz, 4H), 4,06-3,97 (m, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 4H), 3,82-3,58 (m, 7H), 3,43 (ddd, *J* = 7,9, 5,1, 1,4 Hz, 1H), 3,15, 3,00 (2xs, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,60, 174,50, 166,30, 163,54, 163,52, 159,93, 149,60, 148,94, 138,66, 138,32, 138,22, 137,51, 133,40, 132,71, 130,98, 130,55, 130,45, 124,95, 124,28, 123,89, 122,40, 122,30, 74,12, 73,78, 73,09, 73,04, 72,80, 72,33, 71,56, 71,24, 64,76, 64,74, 61,21, 60,94, 54,14, 52,71, 41,09, 40,66, 38,29, 34,82. ESI-HRMS *e/z* calculado para C₃₄H₄₀N₆O₇: 644,2958, encontrado: 707,2166 [(M-H)Zn]⁺.

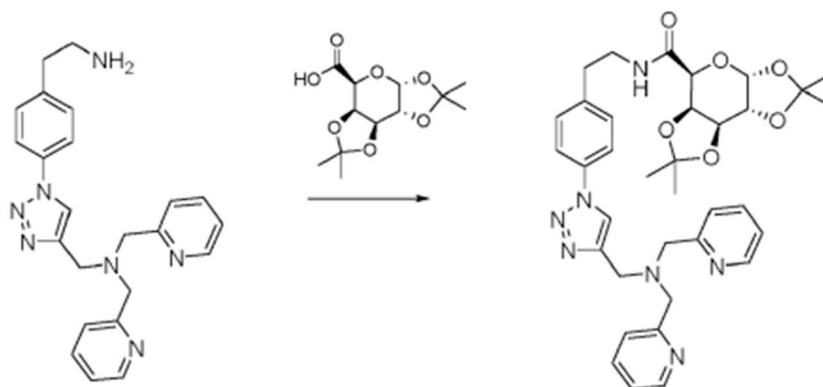
Ejemplo 100 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-*N*-(4-(2-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-ilamino)-2-oxoetil)fenil)nicotinamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 2-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenil)acético del ejemplo 99b (99,5 mg, 0,213 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (38,7 mg, 0,3195 mmol, 1,5 eq.), EDCI (61 mg, 0,3195 mmol, 1,5 eq.), HOAt (43 mg, 0,3195 mmol, 1,5 eq.) y NMM (35 µl, 0,3195 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 91,4 mg (0,16 mmol, 75 %) de producto. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,97 (s, 1H), 8,45 (s, 2H), 8,26 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,79 (t, *J* = 7,8 Hz, 3H), 7,66 (t, *J* = 8,2 Hz, 4H), 7,30 (dd, *J* = 13,2, 6,6 Hz, 4H), 3,94 (s, 2H), 3,89 (s, 4H), 3,72 (s, 6H), 3,58 (s, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,99, 166,34, 163,56, 159,94, 149,61, 148,94, 138,69, 138,50, 137,52, 133,28, 131,00, 130,75, 124,97, 124,31, 123,91, 122,33, 63,58, 62,51, 61,23, 60,95, 43,73. APCI-HRMS *e/z* calculado para C₃₁H₃₄N₆O₅: 570,2591, encontrado: 571,2664 [M+H].

Ejemplo 101 - (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-*N*-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)fenil)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxamida (según la presente invención).

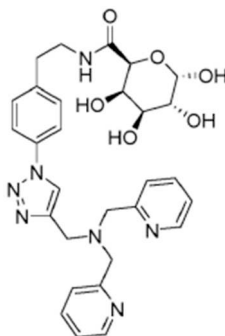
Ejemplo 101a - (3*aR*,5*S*,5*aR*,8*aS*,8*bR*)-*N*-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)fenil)-2,2,7,7-tetrametil-2,3,4,5-tetrahidro-5*H*-bis([1,3-dioxolo][4,5-*b*:4',5'-*d'*]piran-5-carboxamida (intermedio).



A un matraz enfriado con hielo en atmósfera de nitrógeno, que contenía 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)fenil)etan-1-amina (207,5 mg, 0,519 mmol) del ejemplo 95b, 1,2:3,4-di-*O*-isopropiliden- α -*D*-galactouronida (141,3 mg, 0,515 mmol) y HATU (201,5 mg, 0,530 mmol), disueltos en 3 ml de DMF, se le añadió *N*-

metilmorfolina (0,07 ml, 0,6 mmol). Después de agitar durante 30 min, el matraz se dejó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto en bruto se cargó en un lecho de material Bondesil C-18 OH para SPE. El producto se eluyó utilizando adiciones en porciones de mezclas de metanol/agua en el intervalo del 50 % al 75 % de metanol. Se recogieron las fracciones puras y la eliminación del disolvente produjo el compuesto del título como una película de color amarillo pálido (195,1 mg, 57,8%). ¹H RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ (aprox. dt, *J* = 1,8 Hz, 7,8 Hz, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,70 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,27 (m, 2H), 5,61 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 4,69 (dd, *J* = 7,8 Hz, 2,5 Hz, 1H), 4,58 (dd, *J* = 7,8 Hz, 2,1 Hz, 1H), 4,41 (dd, *J* = 4,9 Hz, 2,5 Hz, 1H), 4,23 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,87 (s, 4H), 3,57 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 2,91 (aprox. t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,47 (s, 3H), 1,38 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,32 (s, 3H). ¹³C RMN (100 MHz, metanol-*d*₄) δ 136,8, 131,4, 125,0, 123,9, 123,5, 121,5, 110,6, 110,3, 97,8, 73,0, 72,1, 72,0, 70,0, 60,6, 50,0, 41,3, 36,0, 26,34, 26,26, 25,0, 24,5. MS (APCI, modo positivo) *m/z* 656,3 [M+H]⁺, HR-MS (APCI, modo positivo) *m/z* 656,3191 calculado para C₃₅H₄₂N₇O₆, encontrado *m/z* 656,3189.

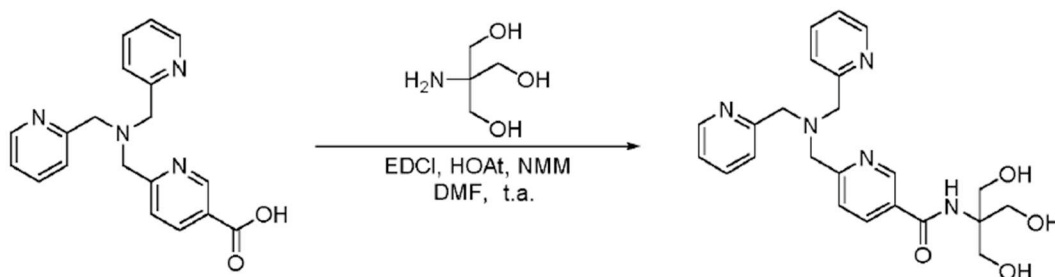
Ejemplo 101b - (2S,3R,4S,5R,6S)-N-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenetil)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamida (según la presente invención).



A partir del azúcar doblemente protegido con isopropilideno del ejemplo 101a (186,6 mg, 0,285 mmol), se obtuvo el producto desprotegido agitando a temperatura ambiente con 20 ml de ácido trifluoroacético y 15 ml de agua durante 4 horas. Los materiales volátiles se eliminaron después de adiciones repetidas de 10 ml de tolueno, seguido de evaporación en un evaporador rotatorio entre cada adición. El producto en bruto se cargó en un pequeño cartucho para SPE con material C18 y se eluyó con un gradiente de metanol en agua, pasando del 25 % al 45 %. Solo se observó una retención limitada en este material. La purificación final se consiguió después de eliminar el eluyente y recargar el material en un cartucho que contenía material para SPE de intercambio catiónico fuerte, utilizando metanol/agua 1:1 y un gradiente de pH, de pH 3 a pH 10, con ácido fórmico y amoniaco como aditivos para eluir el producto. El producto eluyó a pH 9 y la eliminación del disolvente a presión reducida proporcionó el compuesto del título como un aceite o una espuma incoloros (128,9 mg, 78,6 %). Los espectros de RMN tienen una apariencia global muy compleja debido a la presencia de los anómeros α y β, y también picos menores adicionales, probablemente de formas de furanosa. Para δ_H por debajo de 6 ppm, los picos del resto de azúcar se indican solo con desplazamiento. En el espectro de HSQC editado con multiplicidad, 20 resonancias de metino, algunas de las cuales se superponen parcialmente, son claramente visibles. Sin embargo, solo se han indicado datos de δ_C para resonancias claramente visibles en el espectro 1D. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,46-8,43 (m, 3H), 7,80 (aprox. dt, *J* = 1,8 Hz, 7,7 Hz, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,70 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,47 (m, 2H), 7,28 (m, 2H), 5,24, 5,14, 4,49, 4,41, 4,36, 4,21, 4,15, 4,10, 4,08, 4,02, 3,94 (s, 2H), 3,91, 3,87 (s, 4H), 3,83, 3,76, 3,53 (m, 2,8H (metileno que se superpone con resonancias de azúcar), 2,92 (m, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,8, 172,1, 171,3, 160,2, 149,5, 145,94, 145,93, 141,74, 141,69, 138,8, 136,8, 131,44, 131,43, 131,36, 131,34, 125,0, 123,9, 123,5, 121,66, 121,64, 121,62, 98,7, 94,4, 76,6, 74,7, 73,2, 72,4, 71,6, 70,9, 70,0, 60,6, 50,0, 41,47, 41,44, 41,37, 36,1, 36,0.

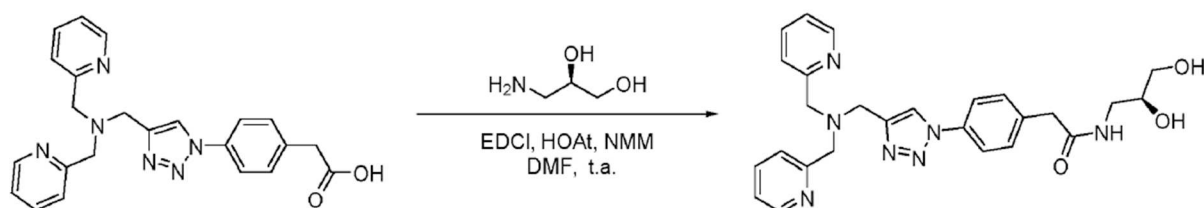
El compuesto 102 proporcionado en los esquemas 10-20 anteriores se puede preparar utilizando las modificaciones de los procedimientos descritos anteriormente.

Ejemplo 103 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)nicotinamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (121 mg, 0,363 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. Se añadieron 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (66 mg, 0,545 mmol, 1,5 eq.), EDCI (104 mg, 0,545 mmol, 1,5 eq.), HOAt (74 mg, 0,545 mmol, 1,5 eq.) y NMM (60 µl, 0,545 mmol, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y la purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua produciendo 97,2 mg (0,222 mmol, 61 %) de producto. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,92-8,81 (m, 1H), 8,44 (ddd, J = 5,0, 1,6, 0,8 Hz, 2H), 8,15 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,78 (ddd, J = 14,2, 10,1, 5,0 Hz, 3H), 7,66 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,27 (ddd, J = 7,4, 5,0, 1,2 Hz, 2H), 3,90 (s, 2H), 3,87 (s, 6H), 3,87 (s, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 168,80, 163,25, 159,93, 149,59, 148,78, 138,67, 137,36, 131,11, 124,94, 124,16, 123,89, 64,23, 62,38, 61,15, 60,89. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₃H₂₇N₅O₄: 437,2063, encontrado 438,2134 [M+H]

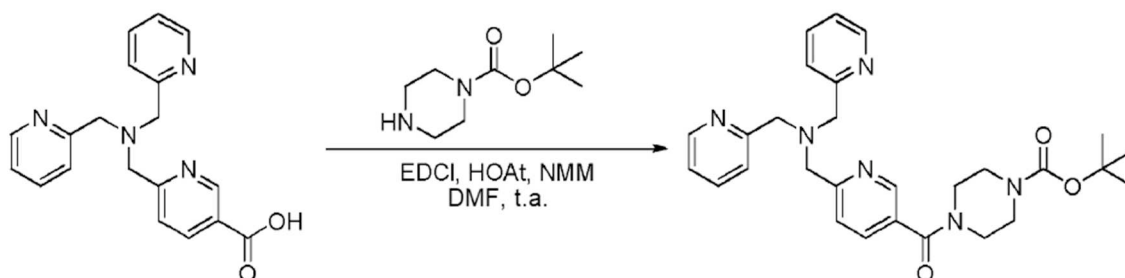
Ejemplo 104 - (S)-2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)-N-(2,3-dihidroxiopropil)acetamida (según la presente invención).



Se disolvió el ácido 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acético del ejemplo 96d (152 mg, 0,367 mmol, 1,0 eq.) en 2 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron (R)-3-aminopropano-1,2-diol (50 mg, 0,55 mmol, 1,5 eq.), EDCI (105 mg, 0,55 mmol, 1,5 eq.), HOAt (75 mg, 0,55 mmol, 1,5 eq.) y NMM (60 µl, 0,55 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 126,8 mg (0,26 mmol, 71 %) de producto. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,46 (s, 1H), 8,43 (ddd, J = 5,0, 1,6, 0,8 Hz, 2H), 7,84-7,71 (m, 4H), 7,69 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,49 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,25 (ddd, J = 7,3, 5,0, 1,2 Hz, 2H), 3,92 (s, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,80-3,66 (m, 1H), 3,62 (s, 2H), 3,50 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 3,48 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 3,40 (dd, J = 13,8, 4,8 Hz, 1H), 3,24 (dd, J = 13,8, 6,8 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 173,80, 160,12, 149,46, 146,03, 138,67, 138,03, 137,16, 131,60, 124,94, 123,80, 123,45, 121,53, 71,93, 65,07, 60,58, 43,62, 43,10. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₆H₂₉N₇O₃: 487,2332, encontrado: 488,2403 [M+H].

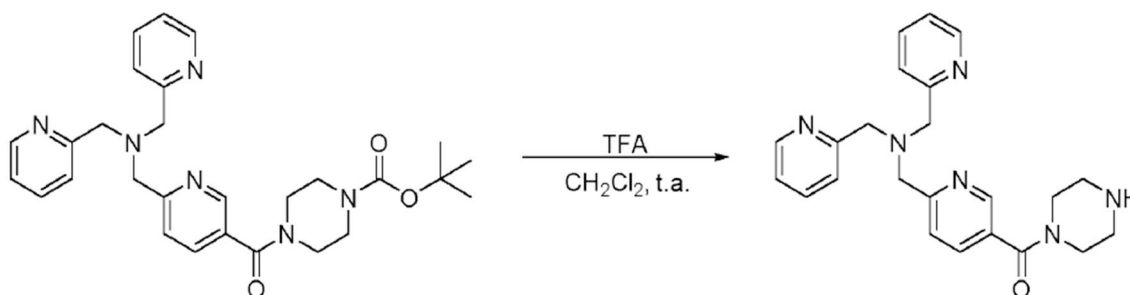
Ejemplo 105 - (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)(piperazin-1-il)metanona (según la presente invención) -

Ejemplo 105a - 4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinoil)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (intermedio).



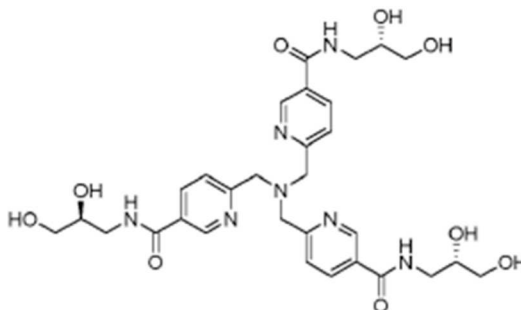
Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (179,5 mg, 0,537 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. Se añadieron piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (150 mg, 0,806 mmol, 1,5 eq.), EDCI (134 mg, 0,806 mmol, 1,5 eq.), HOAt (109,6 mg, 0,806 mmol, 1,5 eq.) y NMM (89 µl, 0,806 mmol, 1,5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y la purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 244 mg (0,486 mmol, 91 %) de producto. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,52 (dd, J = 2,1, 0,7 Hz, 1H), 8,44 (ddd, J = 4,9, 1,6, 0,9 Hz, 2H), 7,80 (ddd, J = 9,4, 7,9, 2,0 Hz, 3H), 7,74 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,27 (ddd, J = 7,4, 5,0, 1,2 Hz, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,89 (s, 4H), 3,82-3,62 (m, 2H), 3,46 (s, 6H), 1,46 (s, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 169,81, 162,16, 159,99, 156,19, 149,59, 148,15, 138,64, 137,18, 131,40, 124,97, 124,38, 123,87, 81,71, 61,32, 61,02, 28,59. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₈H₃₄N₆O₃: 502,2692, encontrado 503,2765 [M+H]

Ejemplo 105b - (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)(piperazin-1-il)metanona (según la presente invención).

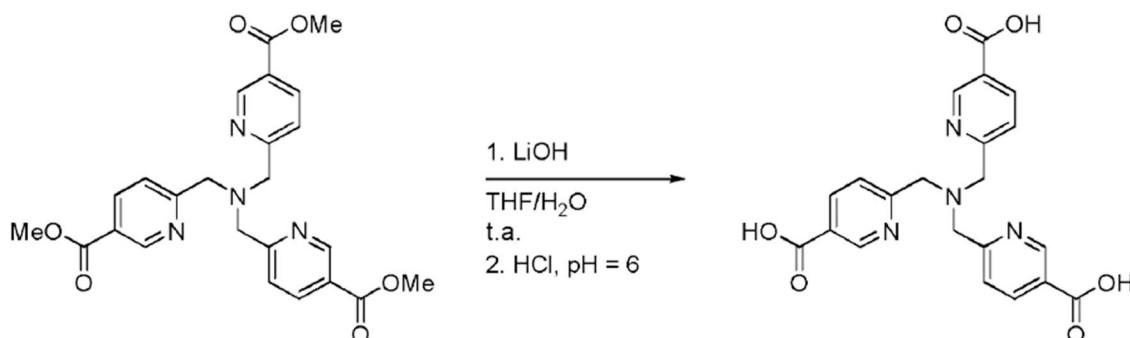


Se disolvió el 4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinoil)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo preparado en la reacción anterior (233,5 mg, 0,465 mmol, 1,0 eq.) en 10 ml de CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió TFA (2,84 ml, 80 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la RMN indicó una conversión completa. La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en H_2O destilada, se neutralizó con una solución acuosa saturada de K_2CO_3 y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 79,6 mg (0,35 mmol, 76 %) de producto. ^1H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,50 (dd, $J = 2,1, 0,7$ Hz, 1H), 8,44 (ddd, $J = 5,0, 1,7, 0,9$ Hz, 2H), 7,79 (ddd, $J = 9,6, 6,2, 2,3$ Hz, 3H), 7,75-7,70 (m, 1H), 7,67 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,27 (ddd, $J = 7,4, 5,0, 1,2$ Hz, 2H), 3,90 (s, 2H), 3,89 (s, 4H), 3,72 (s, $J = 15,5$ Hz, 2H), 3,40 (s, $J = 18,3$ Hz, 2H), 2,84 (d, $J = 17,0$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 169,56, 162,02, 160,00, 149,58, 148,01, 138,64, 137,10, 131,57, 124,98, 124,41, 123,87, 61,36, 61,06, 45,67, 44,01. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$: 402,2168, encontrado 403,2240 $[\text{M}+\text{H}]$

Ejemplo 106 - 6,6',6''-nitrilotris(metilen)tris(N-((S)-2,3-dihidroxipropil)nicotinamida) (según la presente invención).



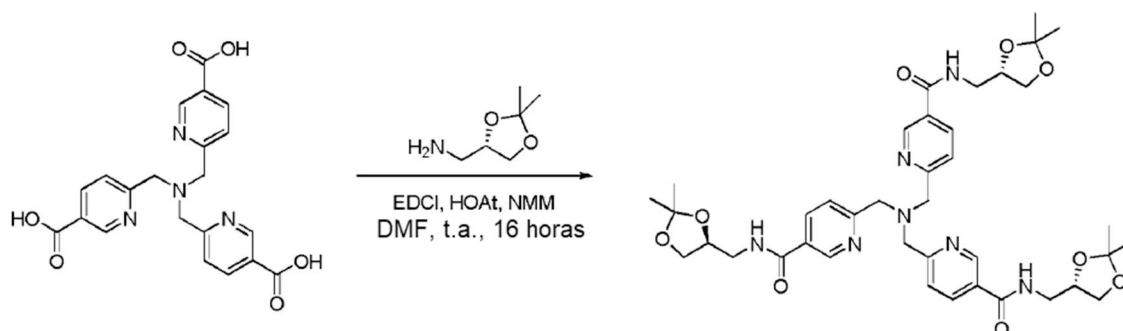
Ejemplo 106a - 6,6',6''-nitrilotris(metilen)tris(N-((S)-2,3-dihidroxipropil)nicotinamida) (según la presente invención).



Se disolvió 6,6',6''-nitrilotris(metilen)trinicotinato de trimetilo disponible en el mercado (0,222 g, 0,478 mmol, 1,0 eq.) en una mezcla de 10 ml de THF y 10 ml de H_2O a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g, 4,87 mmol, 10,0 eq.) y se supervisó el progreso de la reacción mediante CCF en alúmina utilizando MeOH al 5 % en CH_2Cl_2 . Después de la conversión completa, la mezcla de reacción en bruto se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en 5 ml de H_2O destilada. El pH de la solución básica se ajustó a 6 con HCl 2 M y la mezcla se concentró a presión reducida. El ácido 6,6',6''-nitrilotris(metilen)trinicotínico obtenido se utilizó para la siguiente

reacción sin purificación adicional. ^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 8,76 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,09 (dd, 8,1, 2,0 Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 3,94 (s, 1H).

Ejemplo 106b - 6,6',6"-nitrilotris(metilen)tris(N-(((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)nicotinamida) (intermedio).



Se disolvió el ácido 6,6',6"-nitrilotris(metilen)trinicotínico (0,202 g, 0,478 mmol, 1,0 eq.) en 10 ml de DMF anhidra y se filtró en un matraz de 25 ml de fondo redondo secado en el horno para eliminar sales insolubles de la neutralización en la reacción anterior. A esta solución, se le añadieron (R)-3-aminopropano-1,2-diol (0,376 g, 2,87 mmol, 6,0 eq.), EDCI (0,550 g, 2,87 mmol, 6,0 eq.), HOAt (0,390 g, 2,87 mmol, 6,0 eq.) y NMM (0,316 ml, 2,87 mmol, 6,0 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y la purificación del producto se consiguió por medio de cromatografía en columna seca al vacío en el material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 0,177 g (0,23 mmol, 49 %) de producto. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,87 (d, $J = 1,9$ Hz, 3H), 8,15 (dd, $J = 8,2$, 2,3 Hz, 3H), 7,73 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H), 4,31 (p, $J = 5,8$ Hz, 3H), 4,07 (dd, $J = 8,5$, 6,3 Hz, 3H), 3,95 (s, 6H), 3,74 (dd, $J = 8,5$, 6,0 Hz, 3H), 3,53 (dd, $J = 5,5$, 1,6 Hz, 6H), 1,40 (s, 9H), 1,32 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 168,12, 163,13, 148,77, 137,30, 130,29, 124,48, 110,56, 75,89, 68,20, 61,14, 43,51, 27,16, 25,57. APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_9$: 761,3748, encontrado 762,3814 $[\text{M}+\text{H}]$

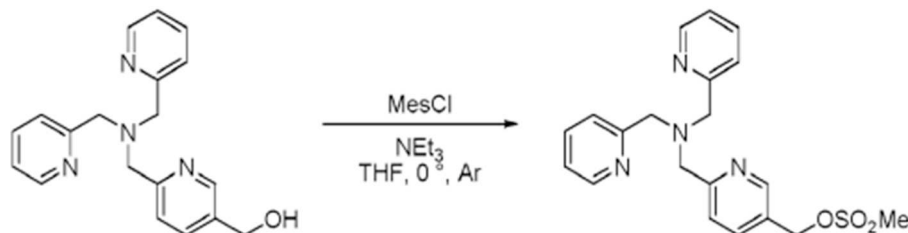
Ejemplo 106c - el compuesto del título 6,6',6"-nitrilotris(metilen)tris(N-((S)-2,3-dihidroxiopropil)nicotinamida) (según la presente invención)



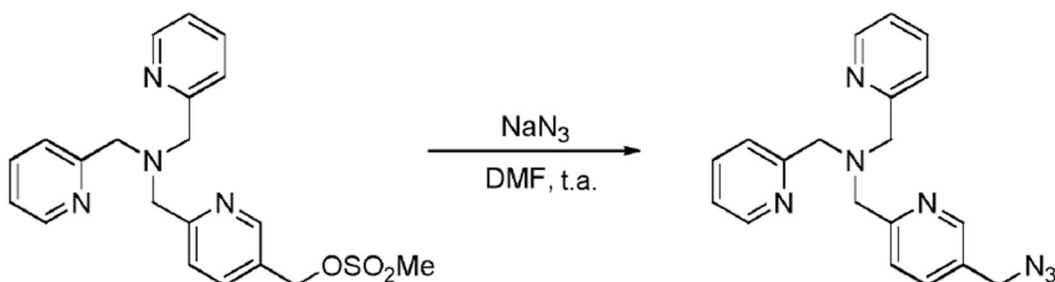
Se disolvió la 6,6',6"-nitrilotris(metilen)tris(N-(((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)nicotinamida) (50,5 mg, 0,066 mmol, 1,0 eq.) en 1,5 ml de MeOH a temperatura ambiente en un vial con tapón de rosca. A esta solución se le añadieron 1 ml de H_2O y 3 gotas de HCl concentrado. La mezcla de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La mezcla en bruto obtenida se disolvió en 1 ml de H_2O , el pH se ajustó a 7 con NaOH 0,1 M y se concentró a presión reducida hasta sequedad. El semisólido resultante se trató con MeOH enfriado con hielo (2 ml) y se filtró en un nuevo matraz. La eliminación del disolvente a presión reducida dio lugar a 36,1 mg (0,056 mmol, 85 %) de producto. ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 8,61 (d, $J = 1,8$ Hz, 3H), 7,94 (dd, $J = 8,2$, 2,1 Hz, 3H), 7,47 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H), 3,93 (ddd, $J = 11,3$, 6,7, 4,7 Hz, 3H), 3,84 (s, 5H), 3,68 (dd, $J = 11,8$, 4,1 Hz, 3H), 3,58 (dd, $J = 11,9$, 6,3 Hz, 3H), 3,52 (dd, $J = 14,0$, 4,7 Hz, 3H), 3,41 (dd, $J = 14,0$, 7,3 Hz, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O) δ 168,05, 161,27, 146,78, 136,06, 128,24, 124,17, 70,26, 63,33, 61,10, 42,37. ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_9$: 641,2809, encontrado 664,2701 $[\text{M}+\text{Na}]$

Ejemplos 107 - 144 (según la presente invención).

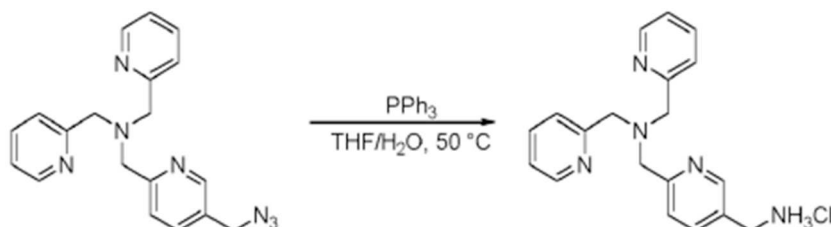
Los compuestos 107-144 proporcionados en los esquemas 10-20 anteriores se pueden preparar utilizando modificaciones de los procedimientos descritos anteriormente.

Ejemplo 145 – metanosulfonato de (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metilo (según la presente invención).

- Se disolvió (6-((bis(bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metanol preparado en el ejemplo 14a (2,822 g, 8,81 mmol, 1,0 eq.) en 150 ml de THF anhidro en una atmósfera de Ar y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió NEt_3 (2,45 ml, 17,62 mmol, 2,0 eq.), seguido de una solución de cloruro de mesilo (1,363 ml, 17,62 mmol, 2,0 eq.) en 30 ml de THF anhidro, gota a gota. Se formó un precipitado y la suspensión se agitó a 0 °C durante 30 minutos hasta que la CCF (alúmina, MeOH al 3 % en CH_2Cl_2) indicó una conversión completa. La mezcla se filtró en un nuevo matraz, se concentró a presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 100 ml a 40 °C y se añadió DMF (80 ml). El THF restante se eliminó a presión reducida y la solución obtenida de metanosulfonato de (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metilo en DMF se utilizó en la siguiente reacción sin tratamiento adicional suponiendo una conversión cuantitativa. ^1H RMN (300 MHz, cloroformo- d) δ 10,59 (s, 1H), 8,70 (ddd, J = 5,5, 1,6, 0,8 Hz, 2H), 8,50 (dd, J = 2,2, 0,8 Hz, 1H), 8,05 (td, J = 7,8, 1,7 Hz, 2H), 7,80 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,69 (dd, J = 8,1, 2,3 Hz, 1H), 7,61-7,37 (m, 2H), 4,47 (s, 2H), 4,42 (s, 4H), 4,16 (s, 2H), 3,06 (s, 3H).

Ejemplo 146 - 1-(5-(azidometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (intermedio).

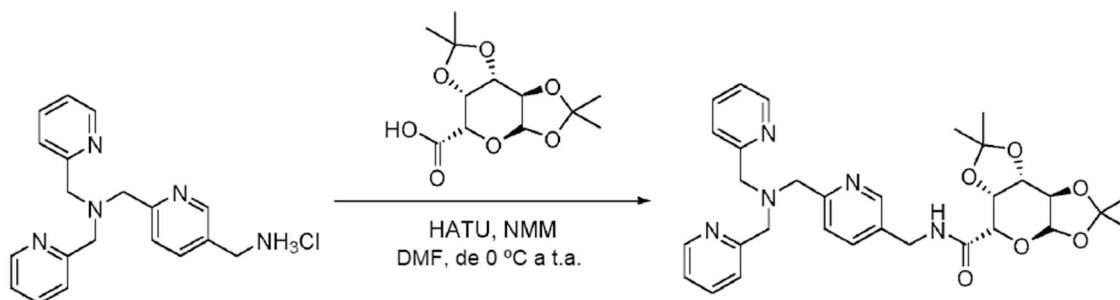
- A la solución del metanosulfonato de (6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metilo (3,51 g, 8,81 mmol, 1,0 eq.) en 80 ml de DMF, obtenido en el ejemplo 145, se le añadió NaN_3 (2,864 g, 44,04 mmol, 5,0 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, a continuación, se filtró en un nuevo matraz y se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 30 ml. La mezcla se diluyó con 100 ml de H_2O , se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de K_2CO_3 (50 ml), salmuera (50 ml), se secaron sobre K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin tratamiento adicional.

Ejemplo 147 - clorhidrato de 1-(5-(aminometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (según la presente invención).

- Se disolvió la 1-(5-(azidometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina, obtenida en el ejemplo 146 (2,783 g, 8,06 mmol, 1,0 eq.) en 50 ml de THF. A esta solución se le añadieron 5 ml de H_2O destilada y PPh_3 (4,228 g, 16,12 mmol, 2,0 eq.) de una vez. La mezcla se calentó hasta 50 °C y se agitó durante 3 horas hasta que la CCF (alúmina, MeOH al 3 % en CH_2Cl_2) indicó una conversión completa. La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se trató con CH_2Cl_2 y H_2O (100 ml de cada uno) y el pH de la fase acuosa se ajustó a 1 con HCl concentrado con agitación. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación, la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 (50 ml) y se concentró a presión reducida para producir 2,825 g (7,93 mmol, 98 %) de 1-(5-(aminometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina como sal de clorhidrato. ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 9,00 (s, 3H), 8,91 (d, J = 1,6

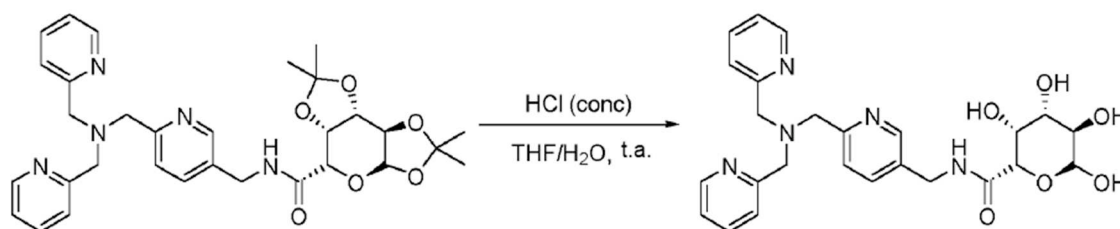
Hz, 1H), 8,81 (dd, $J = 5,7, 0,9$ Hz, 2H), 8,48 (ddd, $J = 9,3, 8,3, 1,5$ Hz, 3H), 8,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 8,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,94-7,84 (m, 2H), 4,38 (s, 4H), 4,30 (s, 2H), 4,17 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 153,22, 152,46, 145,43, 142,25, 131,67, 126,96, 125,90, 125,82, 56,20, 55,59.

- 5 **Ejemplo 148** - (3aS,5S,5aR,8aS,8bR)-N-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metil)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis[1,3[dioxolo[4,5-b:4',5'-d]piran-5-carboxamida (intermedio).

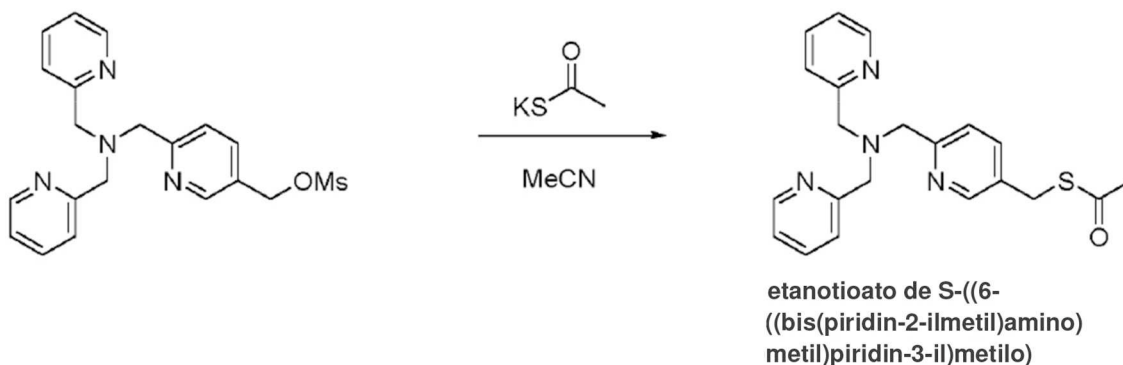


- 10 Se suspendió el clorhidrato de 1-(5-(aminometil)piridin-2-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina del ejemplo 147 (0,276 g, 0,775 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de DMF anhidra y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta suspensión se le añadieron 1,2:3,4-di-O-isopropiliden-a-D-galacturónico (0,213 g, 0,775 mmol, 1,0 eq.), HATU (0,295 g, 0,775 mmol, 1,0 eq.) y NMM (0,256 ml, 2,325 mmol, 3,0 eq.), después de lo cual la mezcla se convirtió en una solución. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos, a continuación, a temperatura ambiente durante 16
- 15 horas y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 70 % en agua proporcionando 156,1 mg (0,271 mmol, 35 %) de producto. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,42 (dd, $J = 7,1, 3,3$ Hz, 3H), 7,77 (ddd, $J = 16,5, 8,3, 1,9$ Hz, 3H), 7,66 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,30-7,24 (m, 2H), 5,62 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,71 (dd, $J = 7,7, 2,5$ Hz, 1H), 4,63 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), 4,59 (dd, $J = 7,8, 2,1$ Hz, 1H), 4,43 (dd, $J = 4,9, 2,6$ Hz, 1H), 4,30 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,25 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), 3,84 (s, 6H), 1,49 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,30 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 171,51, 160,15, 158,85, 149,62, 148,80, 138,76, 137,99, 134,94, 124,94, 124,47, 123,95, 110,79, 110,45, 97,89, 73,28, 72,07, 72,04, 70,30, 61,21, 60,97, 40,81, 26,39, 26,29, 25,06, 24,61. APCI-HRMS e/z calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_6$: 575,2744, encontrado 576,2817 [M+H].
- 20

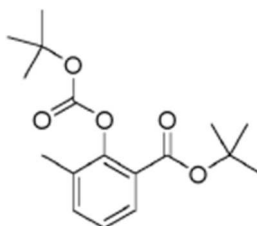
- 25 **Ejemplo 149** - (2S,3R,4S,5R,6R)-N-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metil)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamida (según la presente invención).



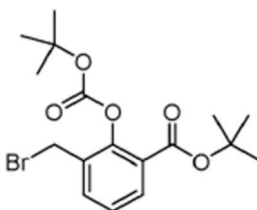
- 30 Se disolvió el material de partida protegido (0,1339 mg, 0,232 mmol, 1,0 eq.) en 10 ml de THF y 5 ml de H_2O a temperatura ambiente. A esta solución se le añadieron 5 gotas de HCl concentrado y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas en un recipiente herméticamente cerrado. El pH se ajustó a 9 con solución acuosa saturada de K_2CO_3 y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se trató con MeOH (30 ml), se filtró en un nuevo matraz y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante
- 35 cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 50 % en agua proporcionando 45,7 mg (0,092 mmol, 40 %) de producto.

Ejemplo 150 - etanotioato de S-((6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)piridin-3-il)metilo) (intermedio).

- 5 Se disolvió el mesilato del ejemplo 145 (64 mg, 0,16 mmol) en 10 ml de MeCN antes de añadir tioacetato de potasio (100 mg, 0,88 mmol). La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente antes de concentrarse a presión reducida. El material en bruto se purificó en una columna de alúmina neutra utilizando MeOH al 0-2 % en DCM como eluyente produciendo el producto. ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 8,51 (ddd, *J* = 5,0, 1,8, 1,0 Hz, 2H), 8,43 (dd, *J* = 2,4, 0,9 Hz, 1H), 7,63 (td, *J* = 7,6, 1,9 Hz, 2H), 7,59-7,42 (m, 4H), 7,12 (ddd, *J* = 7,5, 4,9, 1,4 Hz, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,89 (aprox. d, *J* = 5,3 Hz, 6 H), 2,33 (s, 3H).
- 10

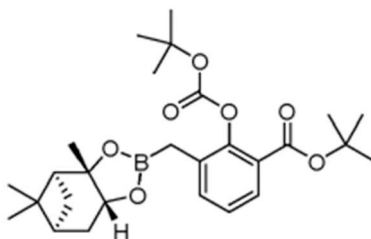
Ejemplo 151 - 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilbenzoato de *terc*-butilo (intermedio).

- 15 El compuesto del título se preparó a partir de ácido 3-metilsalicílico (19,1 g, 0,1255 mol), tal como se ha descrito por Reddy et al en la Patente WO 2016/003929. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna seca al vacío utilizando sílice como adsorbente produciendo 9,85 g de producto (25,5 %). ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7,74 (m, 1H), 7,35 (m, 1H), 7,15 (aprox. t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 2,26 (s, 3H), 1,57 (s, 9H), 1,56 (s, 9H).
- 20

Ejemplo 152 - 3-(bromometil)-2-((terc-butoxicarbonil)oxi)benzoato de *terc*-butilo (intermedio).

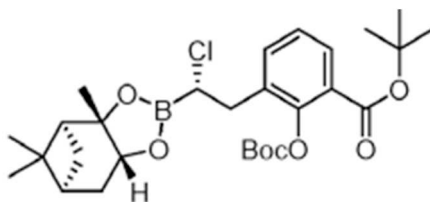
- 25 Se realizó la bromación por radicales libres de 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilbenzoato de *terc*-butilo (8,72 g, 28,3 mmol) con *N*-bromosuccinimida (5,29 g, 29,7 mmol) en tetraclorometano (100 ml), tal como se ha descrito por Hecjer et al en la Patente WO 201614939. Se utilizó azobisisobutironitrilo (463 mg, 2,82 mmol) como iniciador de radicales. Después de recristalizar en hexano, se obtuvo el producto como un sólido incoloro (8,18 g, 74,6 %). ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7,83 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1,7 Hz, 1H), 7,55 (dd, *J* = 7,7 Hz, 1,7 Hz, 1H), 7,24 (aprox. t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,50 (s, 2H), 1,57 (s, 18H).
- 30

Ejemplo 153 - 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-(((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)benzoato de terc-butilo (intermedio).



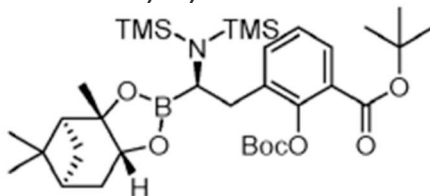
Se realizó una borilación de Miyaura de 3-(bromometil)-2-((terc-butoxicarbonil)oxi)benzoato de *terc*-butilo (4,71 g, 12,2 mmol), tal como se ha descrito por Reddy et al en la Patente WO 2016/003929, y se obtuvo el compuesto del título como un aceite incoloro después de la purificación en una columna de sílice eluida con un gradiente de acetato de etilo en *n*-heptano (3,18 g, 53,8 %). ^1H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7,70 (dd, $J = 7,8$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,40 (dd, $J = 7,7$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,14 (aprox. t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 4,25 (dd, $J = 8,7$ Hz, 2,0 Hz, 1H), 2,31-2,24 (m, 3H), 2,19 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,90-1,81 (m, 2H), 1,554 (s, 9H), 1,548 (s, 9H), 1,38 (s, 3H), 1,27 (s, metilo que se superpone con impurezas lipídicas), 1,18 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 0,82 (s, 3H). MS (ESI, modo positivo) m/z 509,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, modo positivo) m/z 509,2681 calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_7^{11}\text{BNa}$, encontrado m/z 509,2682.

Ejemplo 154 - 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-((S)-2-cloro-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)benzoato de *terc*-butilo (intermedio).



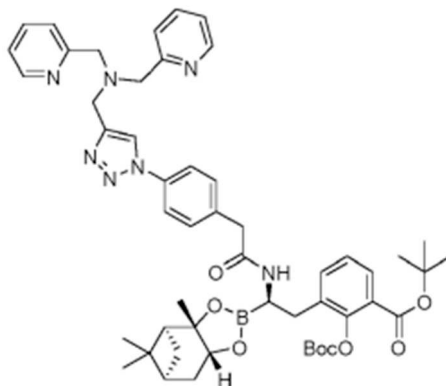
Se realizó una homologación de Matteson de 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-(((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)benzoato de *terc*-butilo (3,03 g, 6,24 mmol), tal como se ha descrito por Reddy et al en la Patente WO2016003929. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en columna, con sílice como adsorbente y un gradiente de acetato de etilo en *n*-heptano como eluyente. Después de eliminar el disolvente, se obtuvo el producto como un aceite de color amarillo pálido (2,10 g, 62,9 %). ^1H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7,81 (dd, $J = 7,8$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 7,6$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,19 (aprox. t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 4,36 (dd, $J = 8,8$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 3,67 (dd, $J = 9,0$ Hz, 6,9 Hz, 1H), 3,23 (dd, $J = 14,2$ Hz, 6,9 Hz, 1H), 3,05 (dd, $J = 14,2$ Hz, 9,0 Hz, 1H), 2,33 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,06 (m, 1H), 1,92-1,85 (m, 2H), 1,56 (s, 9H), 1,55 (s, 9H), 1,37 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,10 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 0,83 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, cloroformo-*d*) δ 164,1, 151,4, 149,1, 135,2, 132,4, 130,5, 125,7, 125,4, 87,0, 83,7, 81,6, 78,7, 51,3, 41,4 (ancho), 39,5, 38,4, 35,3, 35,1, 28,5, 28,3, 27,9, 27,2, 26,4, 24,1. Los picos menores del diastereoisómero fueron visibles en los espectros de ^1H y ^{13}C . MS (ESI, modo positivo) m/z 557,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, modo positivo) m/z 557,2448 calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}^{35}\text{ClO}_7^{11}\text{BNa}$, m/z encontrado 557,2450.

Ejemplo 155 - 3-((R)-2-(bis(trimetilsilil)amino)-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)-2-((terc-butoxicarbonil)oxi)benzoato de terc-butilo (intermedio).



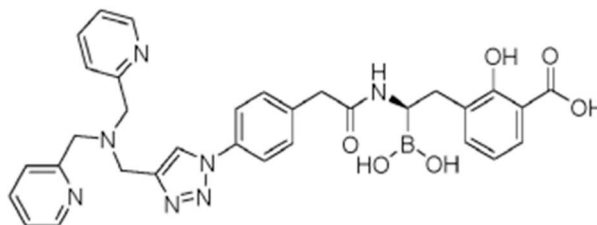
Se disolvió un matraz que contenía 2-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-((S)-2-cloro-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)benzoato de *terc*-butilo (113,5 mg, 0,212 mmol) en una atmósfera de nitrógeno en 5 ml de tetrahidrofurano y se enfrió hasta -78°C . Se añadió una solución de bis(trimetilsilil)amida de litio, 1,0 M en tetrahidrofurano (0,21 ml, 0,21 mmol) y, a continuación, se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. Se continuó agitando durante una noche, después de lo cual se eliminaron los compuestos volátiles a presión reducida y la mezcla en bruto resultante se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Ejemplo 156a - 3-((R)-2-(2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetamido)-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2[dioxaborol-2-il)etil]-2-((terc-butoxicarbonil)oxi)benzoato de *terc-butilo* (intermedio).



Se disolvió el ácido 2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acético (0,248 mmol) del ejemplo 96d en 5 ml de dimetilformamida y se enfrió en un baño de hielo. A esta solución, se le añadieron una sal de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (59,7 mg, 0,311 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (34,4 mg, 0,253 mmol) y se dejó agitar en un baño de hielo durante 30 minutos. Se añadió una solución del compuesto de bis(trimetilsilil)amino, descrito anteriormente, en 2 ml de dimetilformamida (se asumen 0,212 mmol), seguido de *N*-metilmorfolina (0,08 ml, 0,7 mmol). Se dejó agitar la mezcla durante una noche. Después de concentrarse en un evaporador rotatorio, la mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y una mezcla de una solución acuosa de K_2CO_3 0,5 M y una solución saturada de NaCl. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con más diclorometano. A continuación, los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El producto en bruto se cargó en un lecho para SPE de 2 g con material C18. El producto puro se eluyó pasando por porciones de 25 ml de mezcla de metanol/agua, que pasaba de manera gradual de metanol al 70 % al 90 %, produciendo después de la eliminación de los disolventes a presión reducida, 70,9 mg de producto (36,7 % en dos etapas). 1H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 8,55 (d ancho, 2H), 8,05 (s, 1H), 7,73 (dd, J = 7,8 Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,68-7,64 (m, 4H), 7,59 (d ancho, J = 7,8 Hz, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 7,17-7,10 (m, 3H), 4,31 (dd, J = 8,9 Hz, 2,1 Hz, 1H), 3,96 (s, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,62 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 2,95-2,84 (m, 3H), 2,35 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,02 (aprox. t, J = 5,5 Hz, 1H), 1,92-1,84 (m, 2H), 1,67 (s, 3H (protones de intercambio)), 1,54 (s, 9H), 1,53 (s, 9H), 1,44-1,40 (m, 4H), 1,29 (s, 3H), 0,87 (s, 3H). Los picos menores del diastereómero fueron visibles en el espectro de 1H . ^{13}C RMN (100 MHz, cloroformo-*d*) δ 173,5 (solo visible de HMBC), 164,0, 159,3, 152,1, 149,3, 148,8, 145,3, 136,64, 136,58, 134,9, 134,4, 130,9, 130,1, 125,9, 125,7, 123,5, 122,2, 121,3, 121,0, 84,6, 84,1, 81,8, 77,3, 59,9, 52,2, 48,8, 42,1 (solo visible en el espectro de HSQC), 40,1, 39,9, 38,3, 36,5, 31,4, 29,1, 28,3, 27,9, 27,5, 26,7, 24,3. MS (APCI, modo positivo) m/z 912,5 $[M+H]^+$, HR-MS (APCI, modo positivo) m/z 911,4862 calculado para $C_{51}H_{63}N_7O_8$, m/z encontrado 911,4863.

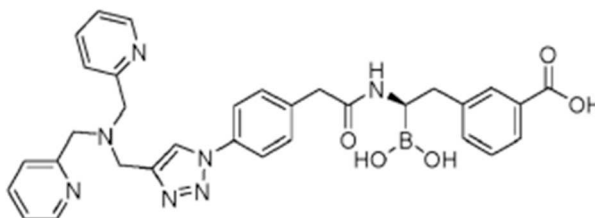
Ejemplo 156b - clorhidrato del ácido (R)-3-(2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetamido)-2-hidroxi-3,4-dihidro-2H-benzo[e][1,2]oxabormina-8-carboxílico (según la presente invención).



La desprotección global y la ciclación se consiguieron mediante el tratamiento de una solución del precursor triplemente protegido (64,1 mg, 0,0703 mmol) en 2 ml de dioxano con 1 ml de HCl 4 M en dioxano. Después de calentar a reflujo durante 2 horas, se formó un precipitado sólido, que después de enfriar se recogió mediante filtración por succión. Esto produjo, después de secar, un polvo ocre (58,3 mg, > 100 %), que contenía una cantidad desconocida de HCl. Se intentó la purificación utilizando lechos para SPE con materiales de intercambio catiónico, intercambio aniónico y fase inversa (C18), respectivamente, sin ningún éxito. La pureza cromatográfica del precipitado fue del 80 %, utilizando una columna híbrida de fase inversa C18 con tolerancia a pH elevado, un gradiente de metanol y tamponado con fosfato de potasio ajustado con solución acuosa de HCl a pH 11,5. 1H RMN (400 MHz, mezcla de ácido trifluoroacético-*d* y agua-*d*₂) δ (no calibrada) 8,55 (d ancho, J = 6,0 Hz, 2H), 8,33 (aprox. t ancho, J = 8,0 Hz, 2H), 8,13 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,75 (aprox. t ancho, 2H), 7,11 (m, 4H), 6,75 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,67 (aprox. t, J = 7,6 Hz, 1H), 4,23 (s, 4H), 3,88 (s, 2H). Las señales restantes se ampliaron más allá de la

identificación, posiblemente debido a los numerosos equilibrios mostrados por el compuesto. MS (ESI, modo negativo, disuelto en agua/metanol) m/z 648,3 (100 %, "pico base", boro tetraédrico doblemente esterificado con metanol), 634,3 (23 %, boro tetraédrico, con un metanol), 616,2 (31 %, boro planar trigonal, con un metanol).

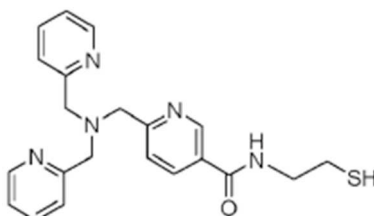
- 5 **Ejemplo 157** – ácido (R)-3-(2-(2-(4-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)acetamido)-2-boronoetil)benzoico (intermedio).



- 10 El compuesto del título se puede preparar de forma análoga utilizando los procedimientos descritos en el ejemplo 156.

Ejemplo 158 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2-mercaptoetil)nicotinamida (según la presente invención).

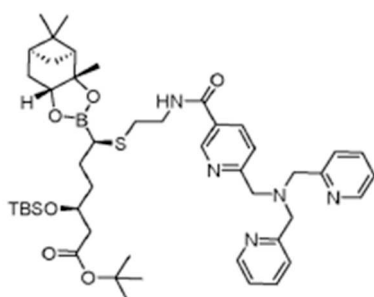
15



Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico preparado en el ejemplo 13 en 20 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente y se filtró en un matraz de fondo redondo de 50 ml antes de la reacción para eliminar las sales insolubles. A esta solución se le añadió 2-aminoetano-1-tiol (575 mg, 7,45 mmol, 1,5 eq.), seguido de EDCI (1,428 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.), HOAt (1,014 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.) y NMM (0,821 ml, 7,45 mmol, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y a continuación, se concentró a presión reducida. La mezcla en bruto residual se disolvió en 100 ml de CHCl_3 , se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con 100 ml de una solución acuosa saturada de K_2CO_3 y 100 ml de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en columna sobre Al_2O_3 neutro utilizando MeOH al 1 % en DCM proporcionando el producto con impurezas menores, seguido de C18-SPE utilizando un gradiente de elución (MeOH al 10 % a MeOH al 90 % en H_2O) proporcionando el producto como un aceite amarillo sin impurezas visibles, que se utilizó sin purificación adicional.

30

Ejemplo 159 - (3S,6R)-6-((2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)tio)-3-((terc-butildimetilsilil)oxi)-6-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)hexanoato de *terc*-butilo (intermedio).



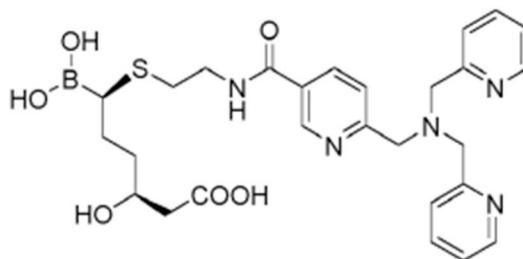
35

A un matraz que contenía 3-(*terc*-butildimetilsililoxi)-6-cloro-6-[(2S,6R)-2,9,9-trimetil-3,5-dioxa-4-boratriciclo[6.1.1.0^{2,6}]-decan-4-il]hexanoato de (3S,6S)-*terc*-butilo (293,8 mg, 0,570 mmol), preparado, tal como se ha descrito en Hecker et al. J. Med. Chem., 2015, 58, 3682-3692, se le añadió 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2-mercaptoetil)nicotinamida (298 mg, 0,757 mmol) del ejemplo 158 como una solución en 15 ml de diclorometano. Después de la adición gota a gota de trietilamina (0,21 ml, 1,5 mmol), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se trató mediante la transferencia a un embudo de decantación con 50 ml de solución acuosa de NaHCO_3 0,5 M y se extrajo dos veces con 50 ml de acetato de etilo. El extracto se

40

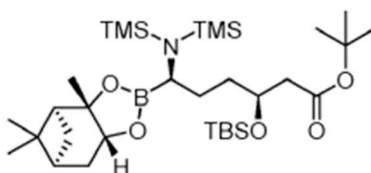
lavó con una solución acuosa saturada de NaCl y se secó sobre Na_2SO_4 . La filtración y la posterior eliminación de los disolventes a presión reducida produjeron un producto en bruto que se purificó inicialmente cargándolo en un lecho de material Bondesil-C18 OH para SPE y eluyó pasando porciones de la mezcla de metanol/agua, pasando por etapas del 50 % a metanol puro. Este procedimiento se repitió una vez y la purificación final se consiguió cargando un lecho de material para SPE de intercambio catiónico fuerte, utilizando metanol/agua 1:1 y un gradiente de pH, de pH 3 a pH 10, con ácido fórmico y amoníaco como aditivos. Se recogieron las fracciones que contenían el producto y se eliminó el disolvente a presión reducida para producir el producto deseado (136,3 mg, 27,4 %). ^1H RMN (400 MHz, cloroformo- d) δ 8,91 (m, 1H), 8,54 (m, 2H), 8,08 (dd, $J = 8,1$ Hz, 2,3 Hz, 1H), 7,68-7,63 (m, 3H), 7,55 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,15 (m, 2H), 6,90-6,84 (m ancho, 1H), 4,30-4,26 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,66 (m, 2H), 2,83 (m, 2H), 2,41-2,27 (m, 3H), 2,23-2,12 (m, 2H), 2,03-2,00 (m, 1H), 1,89-1,79 (m, 2H), 1,76-1,57 (m, 4H), 1,42 (s, 2,5 H (diastereómero)), 1,41 (s, 6,5H), 1,36 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 1,13 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,80 (s, 3H), 0,05 (s, 3H), 0,04 (s, 3H). El producto parece ser una mezcla 5:2 de diastereómeros, más fácilmente aparente por los desplazamientos químicos divididos de los protones del éster *terc*-butílico. ^{13}C RMN (100 MHz, cloroformo- d) δ 171,1, 165,7, 162,9, 159,2, 149,3, 147,7, 136,7, 135,7, 128,8, 123,2, 122,7, 122,3, 86,4, 80,5, 78,3, 69,1, 60,3, 60,1, 51,4, 43,9, 39,5, 39,2, 38,3, 36,2, 35,6, 32,0, 28,7, 28,3, 27,1, 26,7, 26,6, 26,0 (superposición con resonancia δ muy ampliada con respecto a boro, solo visible en HSQC), 24,1, 18,2, -4,3, -4,5. Los desplazamientos solo se indican para el diastereoisómero principal. MS (APCI, modo positivo) m/z 872,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, HR-MS (APCI, modo positivo) m/z 871,5018 calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{71}\text{NSO}_6\text{Si}^{10}\text{B}$, encontrado m/z 871,5015.

Ejemplo 160 – ácido 2-((3R,6S)-3-((2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)tio)-2-hidroxi-1,2-oxaborinan-6-il)acético (según la presente invención).



Se mezcló una mezcla del precursor triplemente protegido del ejemplo 159 (84,4 mg, 0,0967 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (1,9 g, 10 mmol) con 20 ml de acetonitrilo y se calentó a reflujo durante dos horas. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en 15 ml de HCl 0,5 M (acuoso) y se lavó con éter dietílico. La fase acuosa se cargó en un lecho de material para SPE de intercambio catiónico fuerte y se eluyó utilizando metanol/agua 1:1 y un gradiente de pH, de pH 3 a pH 9, con ácido fórmico y amoníaco como aditivos. El ácido eluyó en las fracciones ácidas, mientras que el producto deseado eluyó a pH 9. La pureza fue difícil de evaluar mediante HPLC debido a la presencia de diastereómeros (metanol en agua, gradiente eluido, con un 0,5 % de ácido trifluoroacético en el eluyente). ^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4) δ 8,88 (m, 1H), 8,44 (m, 2H), 8,18 (m, 1H), 7,81-7,65 (m, 5H), 7,28 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 3,92 (s, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,65 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 2,74-2,55 (m, 3H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 1H), 1,84-1,74 (m, 2H), 1,58 (d ancho, 1H), 1,45 (m, 1H). Los picos e integrales descritos corresponden a los picos principales del espectro de HSQC editado. También hay varios picos menores no descritos; que surgen de formas en equilibrio y/o diastereómeros del producto o dichas formas, y posiblemente también de impurezas. ^{13}C RMN (100 MHz, metanol- d_4) δ 178,5, 168,2, 163,1, 159,8, 149,6, 148,9, 138,8, 137,3, 130,5, 125,0, 124,3, 124,0, 68,1, 61,3, 61,0, 40,8, 37,1, 35,3, 29,8, 28,9. Los desplazamientos del espectro de 1D ^{13}C solo se proporcionan para el diastereoisómero principal, según se interpreta a partir de los espectros adicionales de HSQC y HMBC. El desplazamiento del carbono δ con respecto a boro no es visible en ningún espectro. MS (ESI, modo negativo) m/z 548,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, HR-MS (ESI, modo negativo) m/z 547,2181 calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_3\text{B}$, encontrado m/z 547,2180.

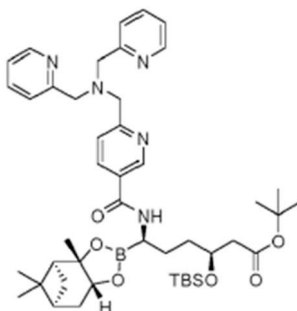
Ejemplo 161 - (3S,6R)-6-(bis(trimetilsilil)amino)-3-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-6-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)hexanoato de *terc*-butilo (intermedio).



Se puso un matraz que contenía 3-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-6-cloro-6-[(2S,6R)-2,9,9-trimetil-3,5-dioxaboratriciclo[6.1.1.0^{2,6}]-decan-4-il)hexanoato de (3S,6S)-*terc*-butilo (307,9 mg, 0,598 mmol), preparado tal como se ha descrito en Hecker et al. J. Med. Chem., 2015, 58, 3682-3692, en una atmósfera de nitrógeno, se disolvió en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro y se enfrió en un baño de hielo seco/acetona hasta -78 °C. Se añadió

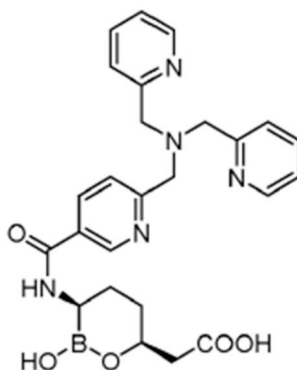
bis(trimetilsilil)amida de litio (solución 1,0 M en THF, 0,60 ml, 0,60 mmol), después de lo cual se retiró el baño de enfriamiento y se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Al final de la reacción, se añadieron 5 ml de dimetilformamida anhidra y el disolvente de tetrahidrofurano se eliminó a presión reducida. El producto inestable se transfirió a la siguiente etapa de reacción como una solución en DMF sin ninguna purificación o caracterización adicional.

Ejemplo 162 - (3S,6R)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido-3-((terc-butildimetilsilil)oxi)-6-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)hexanoato de terc-butilo (intermedio).



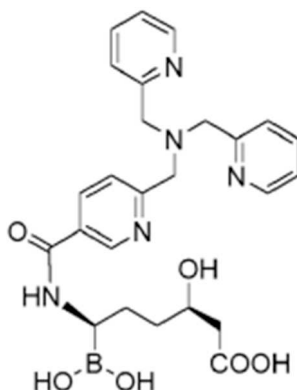
A un matraz que contenía ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (0,718 mmol), preparado *in situ* mediante hidrólisis, neutralización y posterior eliminación del disolvente del éster metílico correspondiente, se le añadió dimetilformamida (5 ml) y la solución resultante se enfrió en un baño de hielo en atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añadió la sal de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (177,2 mg, 0,924 mmol), seguida de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (103,4 mg, 0,760 mmol), seguido de una solución de (3S,6R)-6-((bis(trimetilsilil)amino)-3-((terc-butildimetilsilil)oxi)-6-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)hexanoato de terc-butilo (0,598 mmol, preparado como se describió anteriormente) en 5 ml de dimetilformamida. Finalmente, se añadió *N*-metilmorfolina (0,20 ml, 1,8 mmol) y se dejó agitar la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación que contenía una mezcla de solución acuosa saturada de NaCl y solución acuosa de K₂CO₃ 0,5 M. Después de extraer dos veces con 40 ml de diclorometano, la fase orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ (s), se filtró y, a continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se cargó en un lecho de material Bondesil-C18 para SPE y se eluyó pasando por porciones de una mezcla de metanol/agua, pasando por etapas desde el 70 % hasta metanol puro. Se recogieron las fracciones que contenían producto puro y se eliminó el disolvente a presión reducida para proporcionar 191,4 mg de producto (39,4 %). ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 8,93 (m, 1H), 8,53 (m, 2H), 8,10 (m, 1H), 7,67-7,62 (m, 3H), 7,52 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,15 (m, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,20 (m, 1H), 2,46-2,31 (m, 3H), 2,17 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,92-1,57 (m, debería ser 6H, pero se integra a 9H, probablemente debido a la superposición de desplazamientos diastereoméricos), 1,43 (s, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,34 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 1,28 (s, 3H), 0,85 (s, 9H), 0,84 (s, 3H), 0,054 (s, 3H), 0,048 (s, 3H). El producto parece ser una mezcla 5:2 de diastereómeros, que se determina más fácilmente a partir del patrón multiplete a δ_H 8,93 ppm. Por la misma razón, la mayoría de los picos parecen divididos. ¹³C RMN (100 MHz, cloroformo-*d*) δ 172,0, 167,4, 163,6, 159,2, 149,3, 148,0, 136,6, 135,9, 126,1, 123,2, 122,7, 122,3, 85,2, 81,0, 77,6, 68,2, 60,4, 60,0, 51,9, 43,6, 40,0, 39,5 (solo visible del espectro de HSQC), 36,2, 34,7, 29,0, 28,3, 27,4, 26,7, 26,4, 26,0, 24,3, 18,1, -4,4, -4,5. Los desplazamientos solo se proporcionan para el diastereoisómero principal. MS (APCI, modo positivo) *m/z* 812,5 [M+H]⁺, HR-MS (APCI, modo positivo) *m/z* 811,4984 calculado para C₄₅H₆₇N₅O₆Si¹⁰ B, encontrado *m/z* 811,4981.

Ejemplo 163a - ácido 2-((3R,6S)-3-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)-2-hidroxi-1,2-oxaborinan-6-il)acético (según la presente invención).



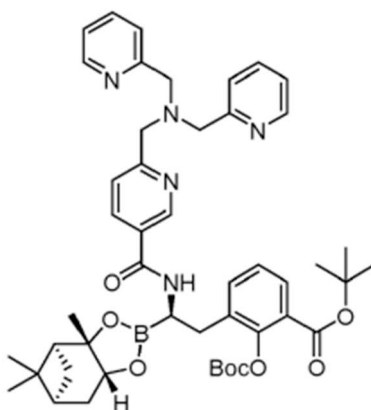
A partir del compuesto triplemente protegido descrito anteriormente (109 mg, 0,132 mmol), se consiguió la desprotección global disolviendo el material de partida en 4 ml de dioxano y añadiendo 2 ml de HCl 4 M en dioxano y calentando hasta 70 °C durante 30 minutos. Después de enfriar, se depositó un precipitado higroscópico amarillo pálido sobre la superficie del vidrio, que se aisló mediante filtración por succión. El precipitado se lavó sobre el filtro con éter dietílico y se redisolvió en agua. La purificación final se consiguió mediante HPLC preparativa, con múltiples inyecciones, en una columna de fase inversa de sílice C18 híbrida a escala preparativa eluida con una mezcla de agua/metanol 28:72 que contenía ácido trifluoroacético al 0,5 %. Las fracciones se recogieron como cortes en el tiempo y se analizaron con HPLC analítica utilizando una columna y eluyente similares. Las fracciones que contenían el producto con una pureza satisfactoria se cargaron directamente en un lecho de material de intercambio catiónico fuerte y el exceso de ácido se lavó utilizando metanol/agua 1:1. El producto se eluyó utilizando la misma mezcla 1:1 con adición de NH₃ (acuoso). La eliminación de los compuestos volátiles a presión reducida produjo 14,8 mg del compuesto del título como un sólido incoloro con una pureza de aproximadamente el 95 % según HPLC (27,7 %). ¹H RMN (300 MHz, metanol-*d*₄) δ 8,90 (m, 1H), 8,48 (m, 2H), 8,18 (dd, *J* = 8,2 Hz, 2,3 Hz, 1H), 7,82 (aprox. dt, *J* = 1,8 Hz, 7,7 Hz, 2H), 7,70-7,63 (m, 3H), 7,31 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,97 (s, 4H), 3,07 (dd, *J* = 10,4 Hz, 5,7 Hz, 1H), 2,68 (dd, *J* = 17,4 Hz, 7,2 Hz, 1H), 2,26 (dd, *J* = 17,2 Hz, 1,5 Hz, 1H), 2,11 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,53 (m, 1H), 1,36 (m, 1H). El espectro no muestra signos de diastereómeros ni un ensanchamiento excesivo debido a los equilibrios. ¹³C RMN (100 MHz, metanol-*d*₄) δ 179,0, 162,7 (solo visible del espectro de HMBC), 159,8, 149,6, 149,5, 148,7, 138,8, 138,7, 137,0, 125,0, 124,2, 123,9, 68,3, 61,3, 61,0, 43,3 (solo visible del espectro de HSQC), 37,4 (ancho), 33,6 (ancho), 27,3. MS (ESI, modo negativo) *m/z* 488,2 [M-H]⁻.

Ejemplo 163b - sal de clorhidrato de los compuestos del ejemplo 163a (según la presente invención).



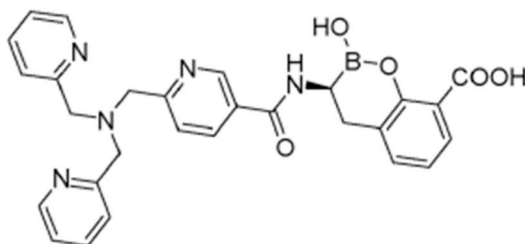
En una preparación alternativa, se disolvió el compuesto en el ejemplo 162 (41,2 mg, 0,0507 mmol) en 2 ml de dioxano, se añadió 1 ml de HCl 4 M en dioxano, y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. Después de transferir a un embudo de decantación utilizando 20 ml de agua y lavando la fase acuosa dos veces con 20 ml de éter dietílico, la fase acuosa se evaporó para producir 30,0 mg de producto (cuantitativo, con una cantidad desconocida de HCl presente). La pureza mediante HPLC fue inferior al 70 % y la RMN mostró alguna evidencia de desprotección parcial. MS (ESI, modo negativo) *m/z* 488,2 [M-H]⁻, HR-MS (ESI, modo negativo) *m/z* 487,2147 calculado para C₂₅H₂₇N₅O₅¹⁰B, encontrado *m/z* 487,2150.

Ejemplo 164 - 3-((R)-2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)-2-((terc-butoxicarbonil)oxi)benzoato de terc-butilo (intermedio).



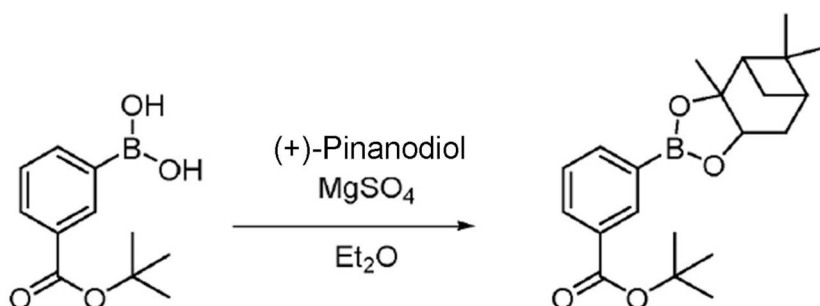
A un matraz que contenía ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (0,471 mmol), preparado *in situ* mediante hidrólisis, neutralización y posterior eliminación del disolvente del éster metílico correspondiente, se le añadió dimetilformamida (5 ml) y la solución resultante se enfrió en un baño de hielo en atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añadió sal de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115,2 mg, 0,601 mmol), seguida de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (65,5 mg, 0,481 mmol), seguido de una solución de 3-((*R*)-2-((bis(trimetilsilil)amino)-2-((3*a*S,4*S*,6*S*,7*a**R*)-3*a*,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)-2-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)benzoato de *tert*-butilo (0,387 mmol, preparado en un procedimiento adaptado de Hecker et al. J. Med. Chem., 2015, 58, 3682-3692 y Reddy et al en la Patente WO2016003929A1, en 5 ml de dimetilformamida. Finalmente, se añadió *N*-metilmorfolina (0,13 ml, 1,2 mmol) y se dejó agitar la mezcla durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación que contenía una mezcla de solución acuosa saturada de NaCl y solución acuosa de K₂CO₃ 0,5 M. Después de extraer dos veces con 40 ml de diclorometano, la fase orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ (s), se filtró y, a continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se cargó en un lecho de material Bondesil-C18 para SPE y se eluyó pasando porciones de mezcla de metanol/agua, pasando por etapas desde el 60 % hasta metanol puro. Se recogieron las fracciones que contenían producto puro y se eliminó el disolvente a presión reducida para proporcionar 168,4 mg de producto (52,3 %). ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 8,89 (d ancho, 1H), 8,53 (m, 2H), 8,03 (dd, *J* = 8,2 Hz, 2,3 Hz, 1H), 7,79 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1,7 Hz, 1H), 7,67-7,62 (m, 3H), 7,54-7,48 (m, 3H), 7,24 (m, 1H), 7,14 (m, 2H), 4,34 (m, 1H), 3,92 (s, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,12 (m, 1H), 3,00 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 2,05 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 1,93-1,87 (m, 2H), 1,57-1,54 (m, 10H), 1,46 (s, 3H), 1,34 (s ancho, 7-8H, posiblemente algo de hidrólisis *in situ*), 1,30 (s, 3H), 0,89 (s, 3H). ¹³C RMN (100 MHz, cloroformo-*d*) δ 168,8, 164,6, 163,9, 159,1, 149,4, 148,8, 148,7, 136,6, 136,1, 135,2, 130,2, 126,2, 125,5, 123,2, 123,1, 122,6, 122,3, 84,3, 84,2, 81,8, 77,4, 60,4, 60,0, 52,4, 44,2 (solo visible en el espectro de HSQC), 40,2, 38,4, 36,7, 31,3 (ancho), 29,2, 28,3, 27,7, 27,5, 26,9, 24,4. Picos menores adicionales no descritos visibles en el espectro de ¹³C, probablemente de un diastereoisómero. No se pudieron identificar dos señales de carbonilo. MS (APCI, modo positivo) *m/z* 832,4 [M+H]⁺, HR-MS (APCI, modo positivo) *m/z* 831,4488 calculado para C₄₇H₅₉N₅O₈¹⁰B, *m/z* encontrado 831,4483.

Ejemplo 165 – ácido (*R*)-3-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)-2-hidroxi-3,4-dihidro-2H-benzo[e][1,2]oxaborinina-8-carboxílico (según la presente invención).



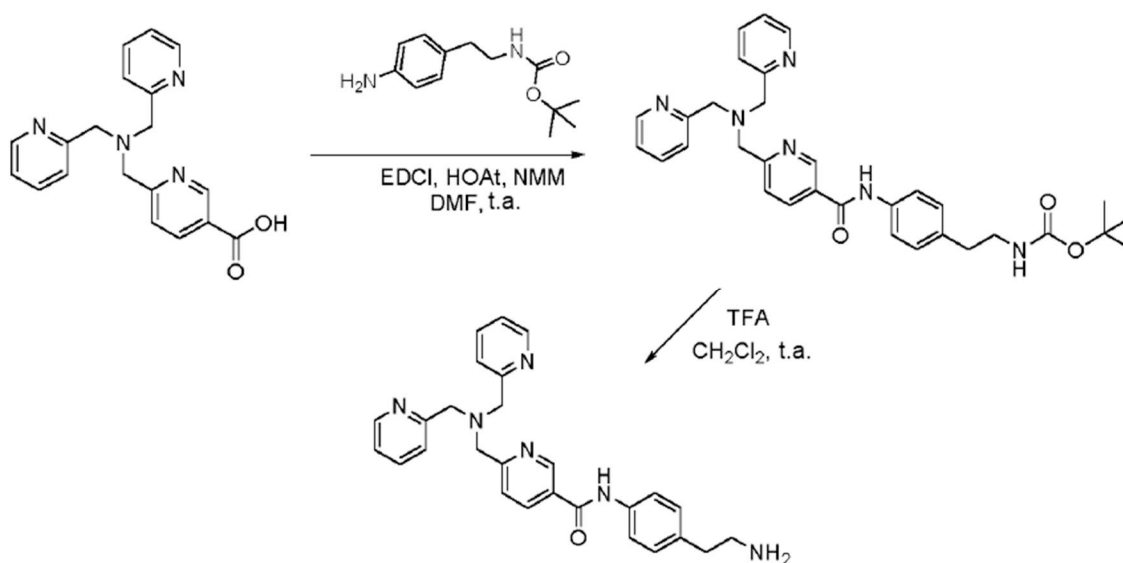
La desprotección global del precursor descrito anteriormente se consiguió resolviendo el precursor (90,8 mg, 0,109 mmol) en 8 ml de dioxano anhidro, seguido de la adición de 2 ml de HCl 4 M en dioxano. Después de calentar hasta 70 °C durante 1 hora y enfriar posteriormente hasta temperatura ambiente, se aisló un precipitado higroscópico no homogéneo mediante filtración por succión, se lavó con éter dietílico y se redisolvió en agua antes de cargarlo en un lecho de material de intercambio catiónico fuerte. El lecho se lavó con metanol/agua 1:1 y el producto se eluyó con los mismos disolventes, con la adición de algo de amoníaco acuoso. La eliminación del disolvente a presión reducida produjo el producto en forma de una película que se podía raspar de la pared de vidrio para proporcionar un polvo amarillo (35,4 mg, 62,1 %). No se pudieron registrar datos de RMN significativos. La pureza por HPLC se estimó en el 70-80 % utilizando tampón de fosfato a pH 11,5, tal como se describió anteriormente. MS (ESI, modo negativo) *m/z* 522,2 [M-H]⁻, HR-MS (ESI, modo negativo) *m/z* 521,1991 calculado para C₂₈H₂₅N₅O₅¹⁰B, encontrado *m/z* 521,1989.

Ejemplo 166 - 3-(3*a*,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)benzoato de *tert*-butilo (intermedio).

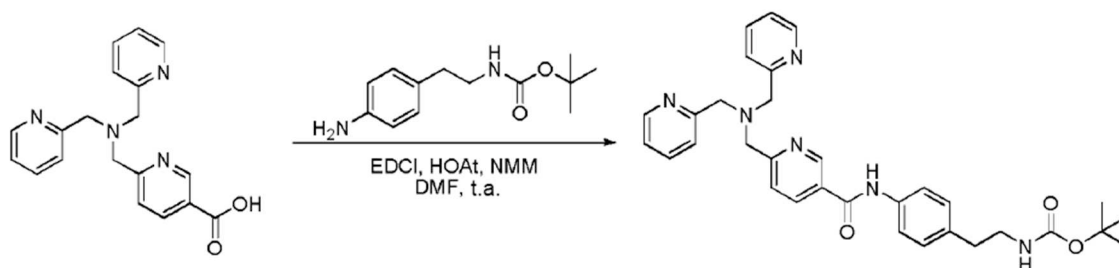


Se suspendió el ácido (3-(terc-butoxicarbonil)fenil)borónico (978 mg, 4,40 mmol) en 40 ml de Et₂O y se mezcló con (+)-pinanodiol (750 mg, 4,40 mmol) y MgSO₄ anhidro (1 gramo, 8,30 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 3 horas antes de filtrar el material inorgánico y concentrar el filtrado a presión reducida. Esto produjo un aceite transparente pegajoso (1.568 mg, 4,40 mmol, > 99 %) que solidificó durante una noche a temperatura ambiente. ¹H RMN (600 MHz, cloroformo-*d*) δ 8,41 (t, *J* = 1,5 Hz, 1H), 8,07 (dt, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,95 (dt, *J* = 7,4, 1,4 Hz, 1H), 7,42 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 4,47 (dd, *J* = 8,8, 1,9 Hz, 1H), 2,42 (ddt, *J* = 14,8, 8,8, 2,4 Hz, 1H), 2,30-2,20 (m, 1H), 2,16 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 2,05-1,89 (m, 2H), 1,60 (s, 10H), 1,49 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 1,19 (s, 1H), 0,89 (s, 3H). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ 166,04, 138,84, 135,78, 132,22, 131,60, 127,79, 86,62, 81,12, 78,57, 77,37, 77,16, 76,95, 66,00, 51,53, 39,67, 38,35, 35,64, 28,84, 28,37, 27,25, 26,65, 24,20, 15,43. MS (modo positivo ESI): *m/z* 379,2 (M+Na⁺)

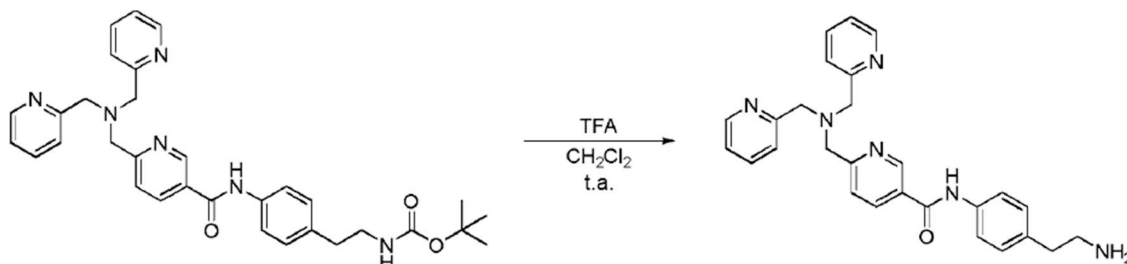
Ejemplo 167 - ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (intermedio).



Ejemplo 167a - 4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenetilcarbamato de terc-butilo (intermedio).

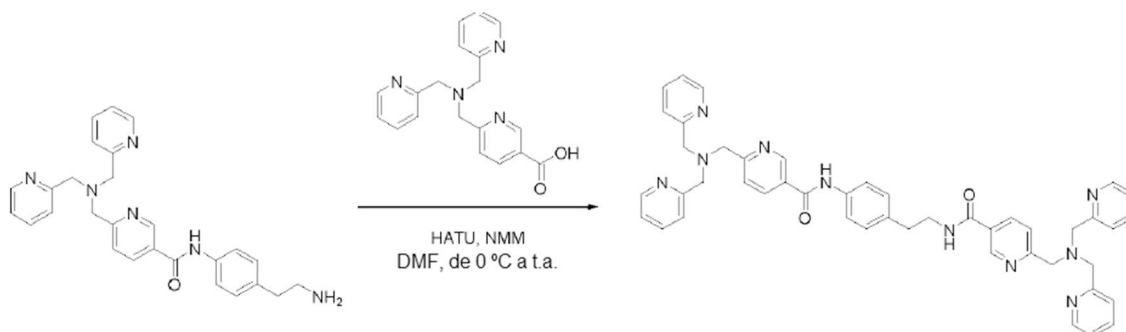


Se disolvió el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (1,66 g, 4,97 mmol, 1,0 eq.) en 20 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente y se filtró en un matraz de fondo redondo de 50 ml antes de la reacción para eliminar los compuestos inorgánicos insolubles. A esta solución se le añadió 4-aminofenetilcarbamato de terc-butilo (1,76 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.), seguido de EDCI (1,428 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.), HOAt (1,014 g, 7,45 mmol, 1,5 eq.) y NMM (0,821 ml, 7,45 mmol, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. La mezcla en bruto residual se disolvió en 100 ml de CHCl₃, se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con una solución acuosa saturada de K₂CO₃ (100 ml) y salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en columna sobre alúmina utilizando MeOH al 1 % en CH₂Cl₂ produciendo el producto con impurezas menores, seguido de C18-SPE utilizando un gradiente de elución del 10 % al 90 % de metanol en agua produciendo 1,697 g (3,07 mmol, 62 %) del producto como un aceite amarillo. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,96 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,46-8,39 (m, 2H), 8,23 (dd, *J* = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,76 (td, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 3H), 7,62 (dd, *J* = 13,5, 8,1 Hz, 4H), 7,24 (ddd, *J* = 7,3, 5,0, 1,1 Hz, 2H), 7,17 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,85 (s, 4H), 3,24 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,72 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 166,10, 163,40, 159,85, 158,28, 149,56, 148,92, 138,55, 137,76, 137,41, 137,15, 130,88, 130,16, 124,83, 124,14, 123,81, 122,23, 79,86, 61,10, 60,84, 42,95, 36,59, 28,79. APCI-HRMS *e/z* calculado para C₃₂H₃₆N₆O₃: 552,2849, encontrado: 553,2920 [M+H].

Ejemplo 167b - N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida (según la presente invención).

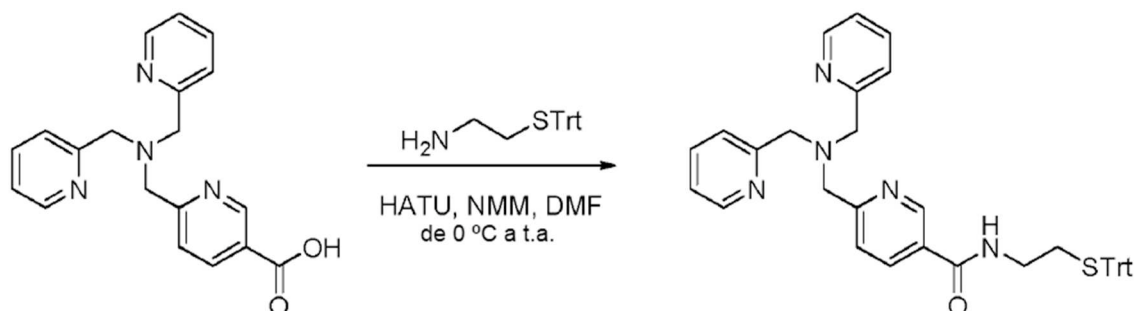
Se disolvió el 4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenetilcarbamato de *terc*-butilo del ejemplo 167a (1,697 g, 3,07 mmol, 1,0 eq.) en 10 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió TFA (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la CCF (alúmina, MeOH al 5 % en CH₂Cl₂) o la RMN indicaron la conversión completa.

La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en una mezcla de CHCl₃/H₂O destilada/solución acuosa saturada de K₂CO₃ (100 ml/10 ml/100 ml) y se transfirió a un embudo de decantación. Se separó la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo con CHCl₃ (2 veces 50 ml) y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre K₂CO₃/Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida con rendimiento cuantitativo. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,97 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,45 (ddd, *J* = 5,0, 1,7, 0,9 Hz, 2H), 8,26 (dd, *J* = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,80 (td, *J* = 7,6, 1,6 Hz, 3H), 7,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,62 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,28 (ddd, *J* = 7,4, 5,0, 1,2 Hz, 2H), 7,23 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 3,94 (s, *J* = 4,3 Hz, 2H), 3,90 (s, 4H), 2,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,76 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 163,55, 159,96, 149,62, 148,93, 138,69, 137,51, 131,02, 130,19, 124,99, 124,32, 123,92, 122,54, 79,46, 61,24, 60,96, 44,03, 39,22. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₇H₂₈N₆O: 452,2325, encontrado: 453,2396 [M+H].

Ejemplo 168 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(4-(2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)fenil)nicotinamida (según la presente invención).

Se disolvieron el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico del ejemplo 13 (70,9 mg, 0,212 mmol, 1,05 eq.) y N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida del ejemplo 17 (91,3 mg, 0,202 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra enfriada a 0 °C en un baño de hielo. Se añadieron HATU (80,6 mg, 0,212 mmol, 1,05 eq.) y NMM (49 µl, 0,444 mmol, 2,1 eq.) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 84 mg (0,11 mmol, 55 %) de producto. ¹H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,96 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,80 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 8,43 (tdd, *J* = 2,5, 1,6, 0,8 Hz, 4H), 8,25 (dd, *J* = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 8,09 (dd, *J* = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,78 (dtd, *J* = 7,9, 6,3, 1,8 Hz, 5H), 7,73-7,58 (m, 7H), 7,27 (ddd, *J* = 8,7, 6,1, 3,0 Hz, 6H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,86 (s, 4H), 3,61 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,91 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 167,80, 166,28, 163,50, 163,27, 159,91, 149,60, 149,56, 148,97, 148,58, 138,67, 138,65, 137,96, 137,49, 137,12, 137,07, 130,99, 130,43, 130,28, 124,96, 124,28, 123,91, 123,88, 122,38, 61,27, 61,20, 60,95, 42,50, 35,88. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₄₆H₄₄N₁₀O₂: 768,3649, encontrado: 769,3719 [M+H].

Ejemplo 169 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2-(trilitio)etil)nicotinamida - Los ejemplos 169 y 170 son un procedimiento alternativo para preparar el compuesto del ejemplo 158 (intermedio).

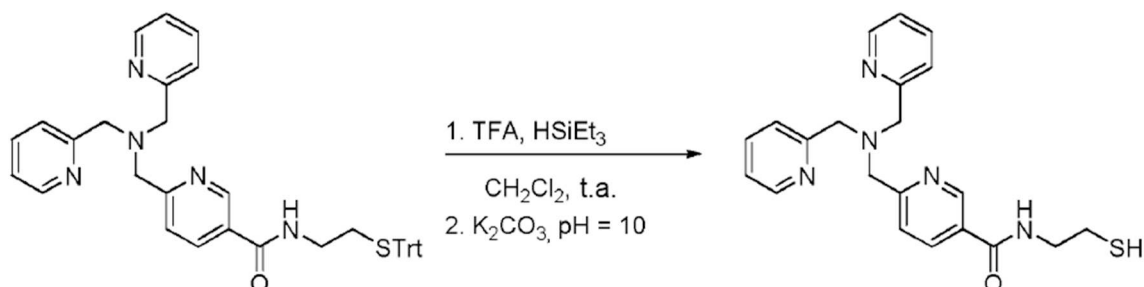


Se disolvieron el ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (0,763 g, 2,343 mmol, 1,0 eq.), preparado en el ejemplo 13, y 2-(trilitio)etanamina (0,823 g, 2,577 mmol, 1,1 eq.) en 15 ml de DMF anhidra enfriada a 0 °C en un baño de hielo. Se añadieron HATU (0,98 g, 2,577 mmol, 1,1 eq.) y NMM (0,284 ml, 2,577 mmol, 2,0 eq.). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró a presión reducida.

La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 1,053 g (1,65 mmol, 71 %) de producto.

^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,82 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,41 (d, J = 4,9 Hz, 2H), 8,09 (dd, J = 8,2, 2,1 Hz, 1H), 7,75 (td, J = 7,7, 1,3 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 7,5 Hz, 6H), 7,22 (dd, J = 9,9, 4,8 Hz, 8H), 7,16 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 3,89 (s, J = 7,4 Hz, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,28 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 2,45 (t, J = 6,9 Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 148,18, 147,30, 137,28, 135,85, 129,31, 127,54, 126,44, 123,57, 122,93, 122,51, 59,88, 59,58, 38,56, 31,31.

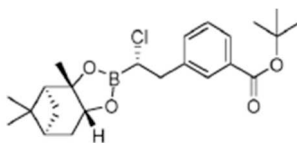
Ejemplo 170 - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2-mercaptoetil)nicotinamida (igual que el ejemplo 158) (según la presente invención).



Se disolvió 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-(2-(trilitio)etil)nicotinamida (1,053 g, 1,65 mmol, 1,0 eq.) en 25 ml de CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. A esta solución se le añadieron TFA (25 ml, 330 mmol, 200 eq.) y HSiEt_3 (0,527 ml, 3,3 mmol, 2,0 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, a continuación, se concentró a presión reducida para eliminar tanto TFA como fuera posible. El residuo se disolvió en 100 ml de CH_2Cl_2 y se transfirió a un embudo de decantación. La fase orgánica se extrajo con 100 ml de H_2O , la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 (5 veces con 50 ml) y el pH se ajustó a 10 con una solución acuosa saturada de K_2CO_3 . A continuación, la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 veces con 100 ml), las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 0,549 g (1,397 mmol, 85 %) del tiol, que se utilizó inmediatamente para la siguiente etapa sin purificación adicional o se almacenó en un vial herméticamente cerrado en el congelador. ^1H RMN (300 MHz, MeOH) δ 8,87 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 8,44 (d, J = 4,2 Hz, 2H), 8,16 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 7,78 (ddd, J = 12,1, 9,0, 5,0 Hz, 3H), 7,66 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,36-7,19 (m, 2H), 3,92 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,54 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,72 (t, J = 6,9 Hz, 2H). APCI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{OS}$: 393,1623, encontrado 394,1695 [$\text{M}+\text{H}$].

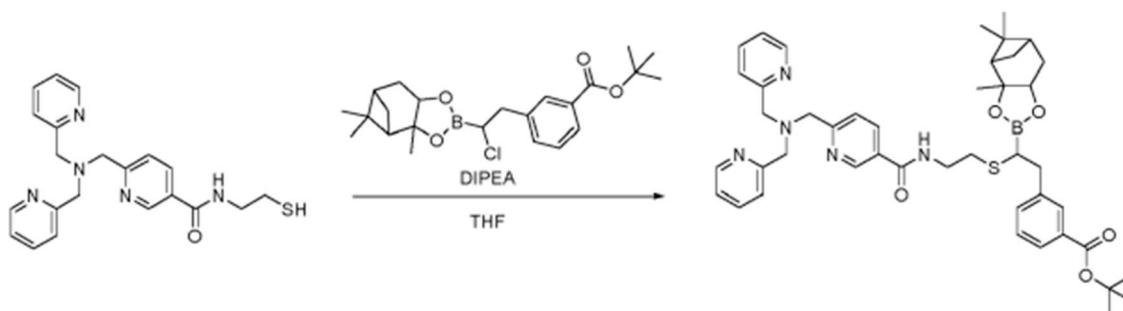
Ejemplo X (OAHA-VII-75).

Ejemplo 171 - 2-(3-((S)-2-cloro-2-((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)benzoato de *tert*-butilo (intermedio).



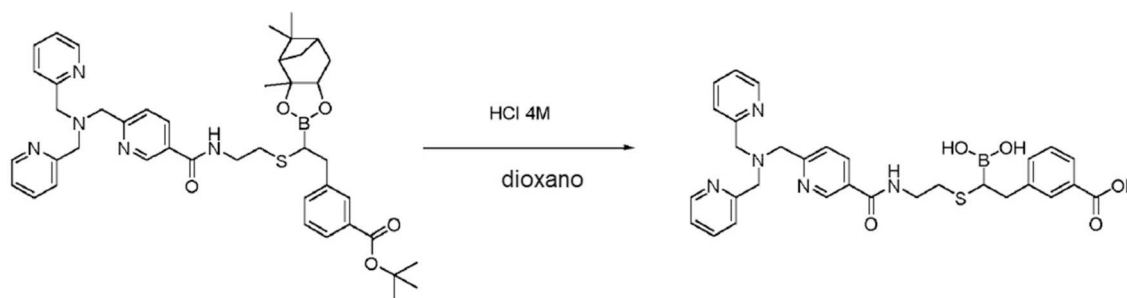
Se realizó la homologación de Matteson de (3-(((3aS,4S,6S,7aR)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)benzoato de *tert*-butilo (3,03 g, 6,24 mmol), tal como se describe en el ejemplo 154 y en Reddy et al en la Patente WO2016003929, para producir el compuesto del título.

Ejemplo 172 - 3-(2-((2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)tio)-2-(3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)etil)benzoato de *tert*-butilo (intermedio).



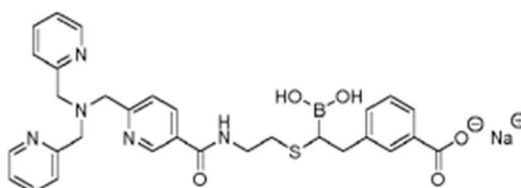
Se disolvió el tiol (254 mg, 0,64 mmol) del ejemplo 174 en 8 ml de THF y se colocó en una atmósfera de argón y se enfrió hasta 0 °C. A continuación, se añadió DIPEA (250 µl), seguida del cloruro del ejemplo 175 (52 mg, 0,12 mmol) con la ayuda de 2 ml de THF. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C y, a continuación, a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida y el material en bruto se purificó sobre Al₂O₃ neutro utilizando MeOH al 0-5 % en DCM produciendo 32 mg de un aceite amarillo pálido. MS (modo positivo APCI) *m/z* 776,401 (M+H). C₄₄H₅₄BN₅O₅S calculado a 775,39.

Ejemplo 173 - ácido 3-(2-((2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)tio)-2-boronoetil)benzoico (según la presente invención).



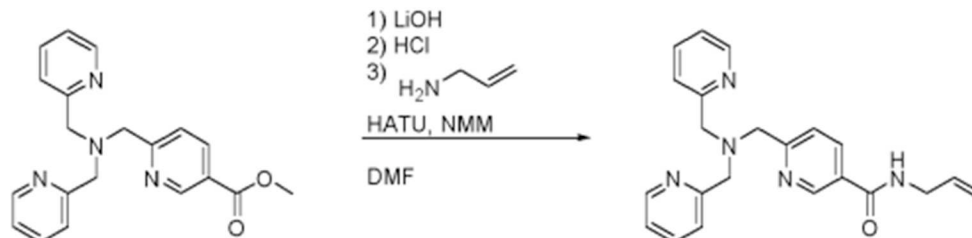
Se consiguió la desprotección global y ciclación, tal como se describe en el ejemplo 157, mediante tratamiento de una solución del precursor doblemente protegido del ejemplo 172 (64,1 mg, 0,0703 mmol) en 2 ml de dioxano con 1 ml de HCl 4 M en dioxano.

Ejemplo 174 - sal sódica del ácido 3-(2-((2-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)etil)tio)-2-boronoetil)benzoico (según la presente invención)



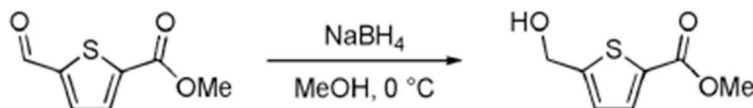
Se prepara una solución de la sal sódica del ejemplo 173 mediante la adición de 1 equivalente molar de NaOH a una solución del ejemplo 173 en dioxano/agua 50:50.

Ejemplo 175 - N-alil-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida (intermedio).



Se disolvió el éster (1.043 mg, 2,99 mmol) en THF (5 ml) y se añadió LiOH hidratado (376 mg, 8,97 mmol) con la ayuda de 5 ml de agua. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente antes de añadir 10 ml de HCl 1 M y la mezcla se concentró a presión reducida. El ácido en bruto se recogió en 20 ml de DMF y se añadieron HATU (1.140 mg, 2,99 mmol), la amina (751 μ l, 9,99 mmol) y NMM (751 μ l, 4,00 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche antes de concentrarla a presión reducida. El material en bruto se suspendió en 250 ml de K_2CO_3 1 M y se extrajo con 5 x 25 ml de EtOAc. Las fracciones orgánicas combinadas se agruparon, se secaron sobre K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir un aceite de color pardo pálido. El material se purificó en Al_2O_3 neutro utilizando MeOH al 0-5 % en DCM como eluyente. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,93 (dd, $J = 2,3, 0,8$ Hz, 1H), 8,77 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 8,49 (ddd, $J = 4,9, 1,8, 0,9$ Hz, 2H), 8,17 (dd, $J = 8,1, 2,3$ Hz, 1H), 7,77 (td, $J = 7,6, 1,9$ Hz, 2H), 7,69 (dd, $J = 8,2, 0,8$ Hz, 1H), 7,58 (dt, $J = 7,8, 1,1$ Hz, 2H), 7,25 (ddd, $J = 7,4, 4,8, 1,2$ Hz, 2H), 5,89 (ddt, $J = 17,2, 10,4, 5,3$ Hz, 1H), 5,27-5,01 (m, 2H), 3,91 (tt, $J = 5,5, 1,7$ Hz, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,80 (s, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, $DMSO$) δ 164,52, 161,79, 158,75, 148,82, 147,70, 136,52, 135,41, 135,09, 128,29, 122,59, 122,14, 121,95, 115,27, 59,37, 59,15, 41,40. MS (APCI modo positivo) m/z 374,20 $[M+H]^+$, HRMS (APCI modo positivo) m/z 373,1904 calculado para $C_{22}H_{23}N_5O$, encontrado m/z 374,1975.

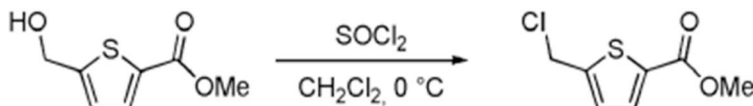
Ejemplo 176 - 5-(hidroximetil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (intermedio).



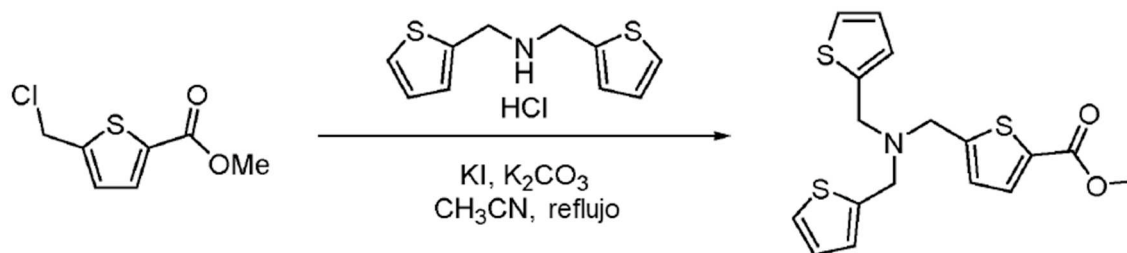
Se disolvió 5-formiltiofeno-2-carboxilato de metilo (1,0 g, 5,87 mmol, 1,0 eq.) en 50 ml de MeOH enfriado a 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió lentamente en porciones $NaBH_4$ (0,445 g, 11,75 mmol, 2,0 eq.) y la reacción se supervisó mediante CCF (SiO_2 , n-hexanos:EtOAc 9:1). Después de la conversión completa del aldehído, la reacción se detuvo mediante la adición lenta de agua enfriada con hielo (10 ml). A continuación, la mezcla se transfirió a un embudo de decantación, se diluyó con 50 ml de H_2O y se extrajo con éter dietílico (3 veces con 100 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto se obtuvo puro (0,935 g, 5,4 mmol, 92 %) y se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,67 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 6,98 (dt, $J = 3,8, 0,8$ Hz, 1H), 4,85 (d, $J = 0,7$ Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 1,95 (s (ancho), 1H).

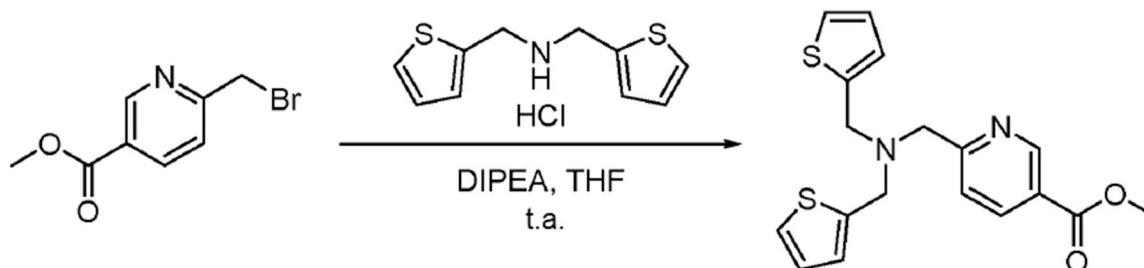
Ejemplo 177 - 5-(clorometil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (intermedio).



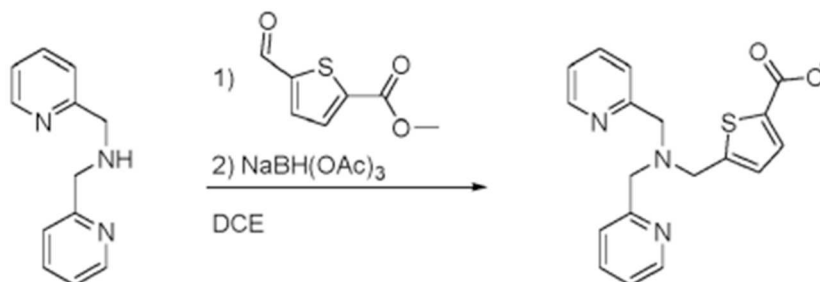
Se disolvió el 5-(hidroximetil)tiofeno-2-carboxilato de metilo preparado en la reacción anterior (0,935 g, 5,4 mmol, 1,0 eq.) en 50 ml de CH_2Cl_2 enfriado a 0 °C en un baño de hielo. A este se le añadió gota a gota una solución de $SOCl_2$ (0,787 ml, 10,8 mmol, 2,0 eq.) en 10 ml de CH_2Cl_2 a través de un embudo de goteo. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas. El control con CCF indicó la conversión completa del alcohol (SiO_2 , n-hexanos:EtOAc 5:1) y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (100 ml), se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con una solución acuosa saturada de K_2CO_3 (50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía en columna sobre sílice utilizando un gradiente de elución (n-hexanos a n-hexanos:EtOAc 9:1) proporcionó 0,754 g (3,9 mmol, 73 %) de 5-(clorometil)tiofeno-2-carboxilato de metilo como un aceite amarillo pálido. 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,65 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 7,07 (dt, $J = 3,8, 0,7$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J = 0,6$ Hz, 2H), 3,88 (s, $J = 1,6$ Hz, 3H).

Ejemplo 178 - 5-((bis(tiofen-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (intermedio).

- 5 Se disolvió el 5-(clorometil)tiofeno-2-carboxilato de metilo obtenido en la reacción anterior (0,405 g, 2,12 mmol, 1,0 eq.) en 25 ml de CH₃CN anhidro a temperatura ambiente. A esta solución se le añadieron clorhidrato de bis(tiofen-2-ilmetil)amina (0,575 g, 2,34 mmol, 1,1 eq.), KI (0,352 g, 2,12 mmol, 1,0 eq.) y K₂CO₃ (0,877 g, 6,3 mmol, 3,0 eq.). La mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante 16 horas, a continuación, se filtró en un nuevo matraz y se concentró a presión reducida. El residuo oleoso se trató con 50 ml de EtOAc, se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con H₂O (30 ml), una solución acuosa saturada de K₂CO₃ (30 ml) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía en columna sobre sílice utilizando un gradiente de elución (de n-hexanos a n-hexanos:EtOAc 9:1) proporcionó 0,488 g (1,34 mmol, 63 %) de 5-((bis(tiofen-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxilato de metilo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,00-6,93 (m, 5H), 3,89 (s, 4H), 3,88 (s, 3H), 3,85 (s, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 162,92, 151,22, 141,95, 133,48, 132,57, 126,63, 126,26, 126,12, 125,30, 52,16, 51,85, 51,81. APCI-HRMS e/z calculado para C₁₇H₁₇NO₂S₃: 363,0421, encontrado 364,0494 [M+H]

Ejemplo 179 - 6-((bis(tiofen-2-ilmetil)amino)metil)nicotinato de metilo (intermedio).

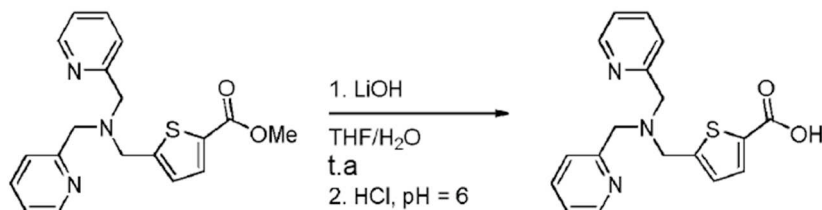
- 20 Se suspendió 6-(bromometil)nicotinato de metilo (1,044 g, 4,53 mmol, 1,0 eq.) en 60 ml de THF a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añadieron clorhidrato de bis(tiofen-2-ilmetil)amina (1,222 g, 5,0 mmol, 1,1 eq.) y DIPEA (2,13 ml, 12,23 mmol, 2,7 eq.) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se filtró en un nuevo matraz y se concentró a presión reducida, dando lugar a un semisólido pardusco. El residuo se trató con éter dietílico (100 ml), se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con H₂O (50 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía en columna sobre sílice utilizando un gradiente de elución (de n-hexanos a n-hexanos:EtOAc 5:1) proporcionó 0,184 g (0,51 mmol, 11 %) de 6-((bis(tiofen-2-ilmetil)amino)metil)nicotinato de metilo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,10 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 8,30 (dd, J = 8,2, 2,2 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,24 (dd, J = 4,9, 1,3 Hz, 2H), 7,01-6,91 (m, 4H), 3,94 (s, 3H), 3,90 (s, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 166,02, 150,29, 137,83, 126,73, 126,20, 125,25, 52,54, 52,45, 31,07. APCI-HRMS e/z calculado para C₁₈H₁₈N₂O₂S₂: 358,0810, encontrado 359,0882 [M+H].

Ejemplo 180 - 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (intermedio).

Se añadió el aldehído (851 mg, 5,0 mmol) de una vez a una solución en agitación de la amina (996 mg, 5,0 mmol) en 20 ml de dicloroetano. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente antes de añadir NaBH(OAc)₃

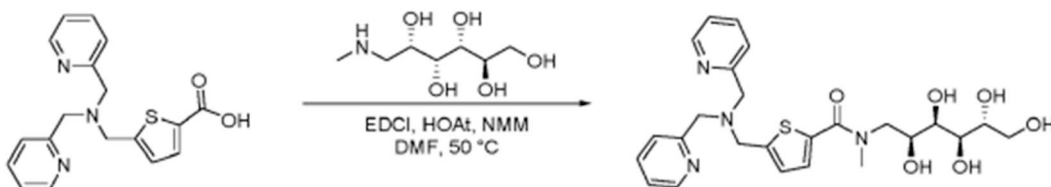
(5,3 gramos, 25 mmol). A continuación, la mezcla se agitó durante una noche antes de concentrarla a presión reducida hasta un sólido pegajoso de color naranja pálido. Este se diluyó con 100 ml de K_2CO_3 0,5 M y se extrajo con 3 x 25 ml de DCM. Las fracciones orgánicas combinadas se agruparon, se secaron sobre K_2CO_3 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. La mezcla en bruto se purificó sobre Al_2O_3 neutro utilizando EtOAc al 10-100 % en DCM, lo que produjo 885 mg (50 %) de un sólido marrón. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,50 (ddd, $J = 4,8, 1,8, 0,9$ Hz, 2H), 7,81 (td, $J = 7,7, 1,8$ Hz, 2H), 7,67 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 7,57 (dt, $J = 7,8, 1,1$ Hz, 2H), 7,27 (ddd, $J = 7,5, 4,9, 1,2$ Hz, 2H), 7,14-7,04 (m, 1H), 3,93-3,86 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,78 (s, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, $DMSO$) δ 161,87, 158,51, 151,56, 148,87, 136,70, 133,66, 131,34, 126,85, 122,40, 122,29, 58,85, 52,21, 52,07.

Ejemplo 181 - ácido 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxílico (según la presente invención).



Se disolvió el 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (0,325 g, 0,919 mmol, 1,0 eq.), preparado en el ejemplo anterior, en una mezcla de 10 ml de THF y 10 ml de H_2O a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió $LiOH \cdot H_2O$ (0,193 g, 4,6 mmol, 5 eq.) y se supervisó el progreso de la reacción mediante CCF sobre alúmina utilizando MeOH al 5 % en CH_2Cl_2 . Después de la conversión completa, la mezcla de reacción en bruto se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en 5 ml de H_2O destilada. El pH de la solución básica se ajustó a 4 con HCl 2 M y la mezcla se concentró a presión reducida. El ácido 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxílico obtenido se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional después de la confirmación de la pureza mediante 1H RMN. 1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 8,37 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 7,76 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,52 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 7,34-7,23 (m, 2H), 6,93 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 3,88 (s, 2H), 3,80 (s, 4H).

Ejemplo 182 - 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)tiofeno-2-carboxamida (según la presente invención).



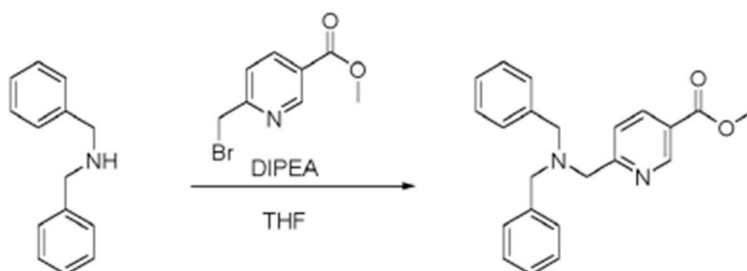
Se disolvió el ácido 5-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)tiofeno-2-carboxílico obtenido en la reacción anterior (0,312 g, 0,919 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron *N*-metil-D-glucamina (0,269 g, 1,378 mmol, 1,5 eq.), EDCI (0,264 g, 1,378 mmol, 1,5 eq.), HOAt (0,187 g, 1,378 mmol, 1,5 eq.) y NMM (0,152 ml, 1,378 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 16 horas con agitación y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas del 10 % al 90 % de metanol en agua proporcionando 0,357 g (0,691 mmol, 75 %) de producto.

1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,44 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H), 7,83 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,72 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,32-7,26 (m, 2H), 6,98 (s, 1H), 4,16-4,06 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,84 (s, 4H), 3,81-3,55 (m, 6H), 3,34 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 2,15 (s, 3H).

^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 149,21, 138,53, 131,04, 126,94, 124,36, 123,67, 72,73, 64,47, 60,16, 53,80, 30,39.

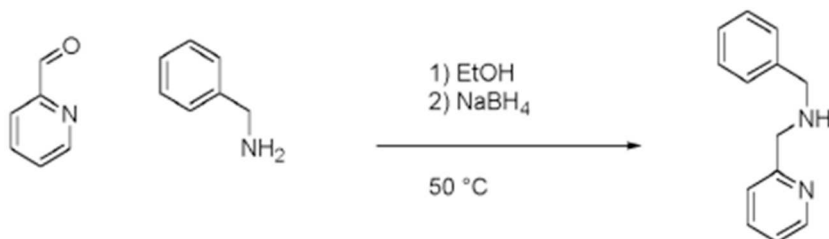
APCI-HRMS m/z calculado para $C_{25}H_{32}N_4O_6S$: 516,2043, encontrado 517,2115 $[M+H]^+$.

Ejemplo 183 - 6-((dibencilamino)metil)nicotinato de metilo (intermedio).



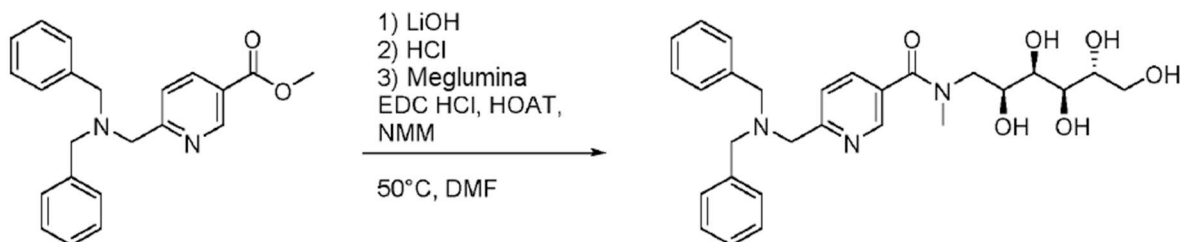
Se disolvió dibencilamina (986 mg, 5 mmol) en 100 ml de THF y se mezcló con bromometil nicotinato de metilo (1.150 mg, 5 mmol) y DIPEA (1.275 ml, 7,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de filtrarla a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida, se redisolvió en 50 ml de Et₂O y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida para producir 1,66 gramos (96 %) de material. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,98 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 8,27 (dd, *J* = 8,1, 2,2 Hz, 1H), 7,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,39 (d, *J* = 7,1 Hz, 4H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 4H), 7,24 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,71 (s, 2H), 3,57 (s, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 165,19, 164,31, 149,38, 138,61, 137,33, 128,57, 128,29, 127,04, 123,99, 122,25, 58,66, 57,35, 52,29.

Ejemplo 184 - N-bencil-1-(piridin-2-il)metanamina (intermedio).



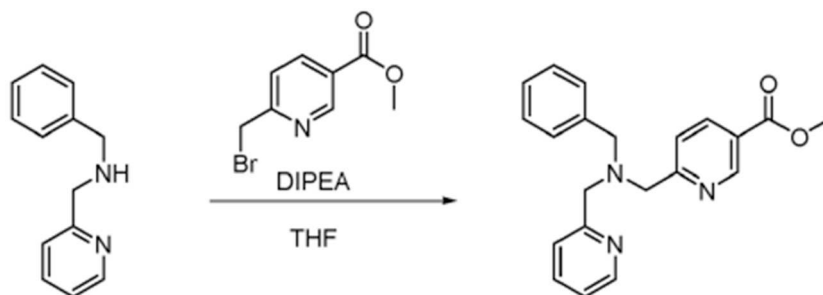
Se disolvió bencilamina (1.000 mg, 9,33 mmol) en 50 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente y se mezcló con 2-piridincarboxaldehído (1.000 mg, 9,34 mmol). La solución se volvió roja y se calentó hasta 50 °C y se agitó durante 24 horas antes de añadir NaBH₄ (2.500 mg, 66,09 mmol) en porciones. A continuación, la mezcla se agitó durante 4 días a 50 °C antes de concentrarla a presión reducida para producir un sólido amarillo. El sólido en bruto se disolvió en K₂CO₃ 1 M (100 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se agruparon, se secaron sobre K₂CO₃, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir 1,826 gramos (99 %) de un aceite amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,70-8,21 (m, 1H), 7,75 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,39-7,28 (m, 5H), 7,27-7,19 (m, 2H), 3,78 (s, 2H), 3,72 (s, 2H), 2,70 (s, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 160,29, 148,70, 140,69, 136,40, 128,10, 127,92, 126,54, 121,81, 121,74, 53,81, 52,41.

Ejemplo 185 - 6-((dibencilamino)metil)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)nicotinamida (según la presente invención).

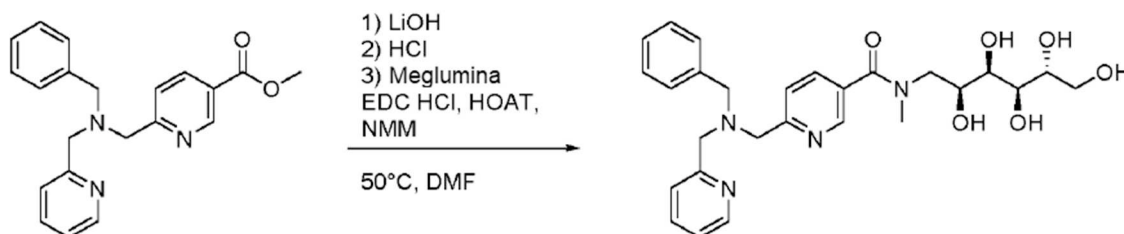


Se disolvió el éster (1,73 gramos, 5,0 mmol) en 10 ml de THF y se añadió LiOH monohidratado (1.049 mg, 25,0 mmol) con la ayuda de 2 ml de agua. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de añadir 20 ml de HCl 1 M (20,0 mmol) para neutralizar la reacción. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar un polvo blanco que se disolvió en 15 ml de DMF. Se añadieron clorhidrato de EDC (959 mg, 5,0 mmol), meglumina (976 mg, 5,0 mmol) y HOAT (681 mg, 5,0 mmol) antes de añadir NMM (1,10 ml, 10,0 mmol). La mezcla se calentó hasta 50 °C y se dejó durante 18 horas antes de enfriarse hasta temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 80 % en agua, proporcionando 0,457 g (0,09 mmol, 18 %) de producto.

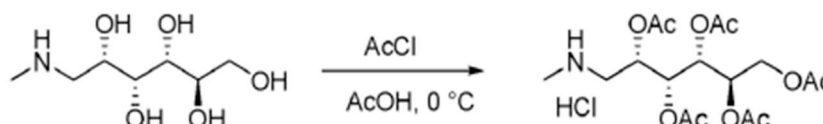
¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,54 (d, *J* = 21,2 Hz, 1H), 7,91 (dd, *J* = 36,5, 7,6 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 7,4 Hz, 4H), 7,35-7,25 (m, 4H), 7,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 4,24-3,98 (m, 1H), 3,87-3,45 (m, 12H), 3,14, 3,07 (2xs, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 172,09, 171,47, 162,93, 162,35, 148,23, 147,65, 140,21, 137,80, 137,05, 132,52, 132,24, 130,01, 129,37, 128,23, 124,04, 123,75, 73,96, 73,49, 73,01, 72,91, 72,42, 71,62, 71,51, 71,01, 64,75, 60,21, 59,96, 59,64, 59,37, 55,24, 52,44, 40,02, 33,75. APCI-HRMS *m/z* calculado para C₂₈H₃₅N₃O₆: 509,2526, encontrado 510,2599 [M+H].

Ejemplo 186 - 6-((bencil(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinato de metilo (intermedio).

- 5 Se disolvió N-bencil-1-(piridin-2-il)metanamina (991 mg, 5 mmol) en 30 ml de THF y se mezcló con bromometil nicotinato de metilo (1.150 mg, 5 mmol) y DIPEA (1,36 ml, 8,0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de filtrarla a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida, se redisolvió en 50 ml de Et₂O y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida para producir 1,66 gramos (96 %) de material.

Ejemplo 187 - 6-((bencil(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)nicotinamida (según la presente invención).

15 Se disolvió el éster (973 mg, 2,8 mmol) en 10 ml de THF y se añadió LiOH monohidrato (588 mg, 14,0 mmol) con la ayuda de 2 ml de agua. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de añadir 11,2 ml de HCl 1 M (11,2 mmol) para neutralizar la reacción. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar un polvo blanco que se disolvió en 10 ml de DMF. Se añadieron clorhidrato de EDC (537 mg, 2,8 mmol), meglumina (547 mg, 2,8 mmol) y HOAT (381 mg, 2,8 mmol) antes de añadir NMM (616 µl, 5,6 mmol). La mezcla se calentó hasta 50 °C y se dejó durante 18 horas antes de enfriar hasta temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 70 % en agua, proporcionando 0,72 g (1,4 mmol, 50 %) de producto. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,56 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 8,43 (dd, J = 4,9, 0,7 Hz, 1H), 7,91 (ddd, J = 33,7, 8,0, 1,8 Hz, 1H), 7,80 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,72 (dd, J = 7,7, 5,8 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,35-7,15 (m, 4H), 4,21-3,97 (m, 1H), 3,88-3,46 (m, 12H), 3,14, 3,07 (xs, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 172,03, 171,41, 162,28, 161,70, 160,43, 149,42, 148,37, 147,83, 139,69, 138,72, 137,78, 137,06, 132,58, 132,31, 130,10, 129,42, 128,36, 124,79, 124,15, 123,84, 73,93, 73,45, 73,00, 72,90, 72,40, 71,63, 71,51, 71,02, 64,70, 60,92, 60,70, 60,62, 60,40, 60,02, 59,83, 57,57, 55,22, 52,43, 44,78, 40,01, 33,77. APCI-HRMS e/z calculado para C₂₇H₃₄N₄O₆: 510,2478, encontrado 511,2551 [M+H].

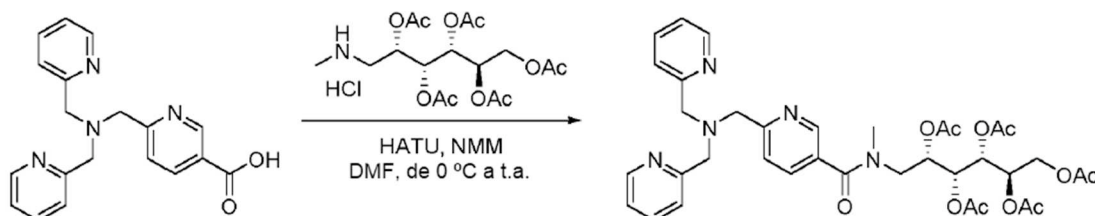
Ejemplo 188 - clorhidrato de pentaacetato de (2R,3R,4R,5S)-6-(metilamino)hexano-1,2,3,4,5-pentailo (intermedio).

Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3284-3287.

40 Se disolvió N-metil-D-glucamina (2,6 g, 13,3 mmol, 1,0 eq.) en 15 ml de ácido acético concentrado y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió gota a gota cloruro de acetilo (21,8 ml, 306 mmol, 23 eq.) durante un período de aproximadamente 1 hora. La mezcla se dejó en agitación durante 16 horas, mientras se agotaba el baño de hielo. A continuación, la solución incolora se concentró a presión reducida hasta sequedad. El residuo oleoso obtenido se disolvió en una mezcla de metanol (8 ml) y etanol (5 ml) y se diluyó con EtOAc (50 ml). Se añadió éter dietílico con agitación hasta que la mezcla se volvió turbia y, a continuación, se colocó en el congelador durante 12 horas. El precipitado blanco formado se separó por filtración con succión, aunque parecía

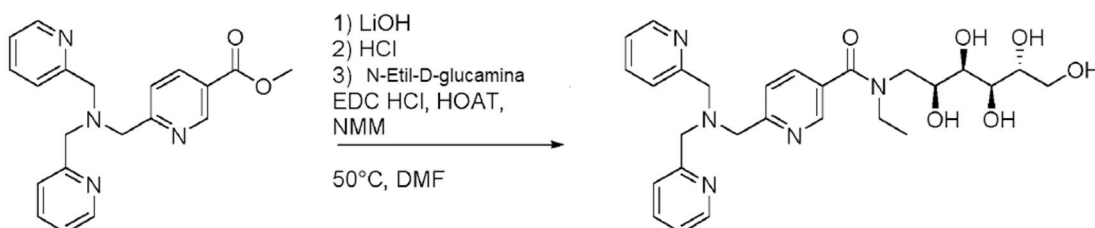
higroscópico, y se convirtió en un aceite. A continuación, se disolvió el compuesto oleoso en MeOH, se recogió y se concentró a presión reducida para proporcionar un semisólido incoloro que se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

- 5 **Ejemplo 189** – pentaacetato de (2R,3R,4R,5S)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-metilnicotinamido)hexano-1,2,3,4,5-pentailo (según la presente invención).



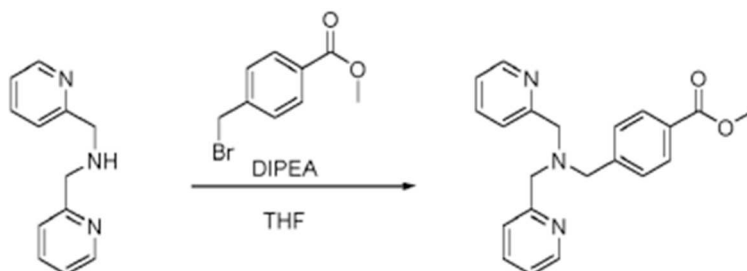
- 10 Se disolvió ácido 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotínico (0,275 g, 0,823 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de DMF anhidra y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadieron gota a gota clorhidrato de pentaacetato de (2R,3R,4R,5S)-6-(metilamino)hexano-1,2,3,4,5-pentailo (0,655 g, 1,48 mmol, 1,8 eq.), preparado en la reacción previa, HATU (0,328 g, 0,864 mmol, 1,05 eq.) y NMM (0,272 ml, 2,47 mmol, 3,0 eq.). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua, seguido de cromatografía en columna sobre alúmina básica utilizando MeOH al 1 % en CH₂Cl₂ proporcionando 177,6 mg (0,246 mmol, 30 %) de producto. APCI-HRMS *e/z* calculado para C₃₆H₄₃N₅O₁₁: 721,2959, encontrado 722,3027 [M+H]

- 20 **Ejemplo 190** - 6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-etil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)nicotinamida (según la presente invención).



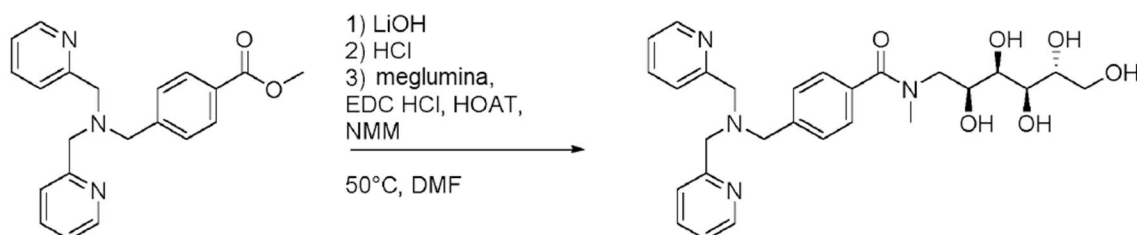
- 25 El éster (255 mg, 0,73 mmol) se disolvió en 5 ml de THF y se añadió LiOH monohidratado (154 mg, 3,67 mmol) con la ayuda de 2 ml de agua. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de añadir 2,94 ml de HCl 1 M (2,94 mmol) para neutralizar la reacción. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar un polvo blanco que se disolvió en 5 ml de DMF. Se añadieron clorhidrato de EDC (140 mg, 0,73 mmol), n-etil-d-glucamina (153 mg, 0,73 mmol) y HOAT (99 mg, 0,73 mmol) antes de añadir NMM (161 µl, 1,47 mmol). La mezcla se calentó hasta 50 °C y se dejó durante 18 horas antes de que se enfriara hasta temperatura ambiente y se concentrara a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 20 % al 50 % en agua proporcionando 0,135 g (0,22 mmol, 30 %) de producto.
- 30 ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,55 (d, *J* = 23,8 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 4,5 Hz, 2H), 7,85 (dt, *J* = 15,6, 7,4 Hz, 3H), 7,70 (dd, *J* = 19,7, 8,4 Hz, 3H), 7,33-7,23 (m, 2H), 4,22-3,94 (m, 1H), 3,94-3,85 (m, 6H), 3,84-3,33 (m, 9H), 1,27, 1,12 (2xt, *J* = 6,7 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 171,72, 171,57, 161,58, 160,98, 159,93, 149,55, 148,36, 147,32, 138,71, 137,60, 136,47, 133,00, 132,74, 124,98, 124,41, 124,06, 123,92, 74,09, 73,37, 73,00, 72,62, 71,75, 71,44, 64,73, 61,35, 61,12, 60,85, 52,65, 46,66, 41,62, 14,08, 12,66. APCI-HRMS *e/z* calculado para C₂₇H₃₅N₅O₆: 525,2587, encontrado 526,2660 [M+H].

- 40 **Ejemplo 191** - 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzoato de metilo (intermedio).



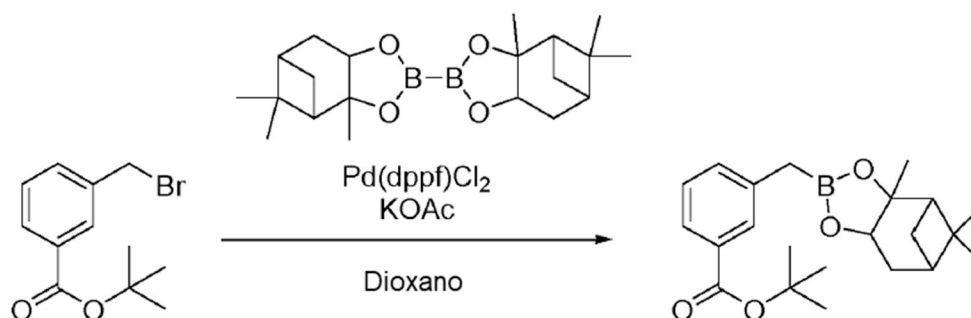
Se disolvió dipicolilamina (1,84 ml, 10 mmol) en 150 ml de THF y se mezcló con 2-bromometil benzoato de metilo (2,29 mg, 10 mmol) y DIPEA (2,7 ml, 16,0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de filtrarla a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida, se redisolvió en 50 ml de Et₂O y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida para producir 3,683 gramos (> 99 %) de material con trazas de impurezas de disolvente.

Ejemplo 192 - 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)benzamida (según la presente invención).



Se disolvió el 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzoato de metilo (0,560 g, 1,61 mmol, 1,0 eq.), preparado en el ejemplo anterior, en una mezcla de 10 ml de THF y 10 ml de H₂O a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió LiOH·H₂O (0,203 g, 4,84 mmol, 3 eq.) y el progreso de la reacción se supervisó mediante CCF sobre alúmina utilizando MeOH al 5 % en CH₂Cl₂. Después de 16 horas, la mezcla de reacción en bruto se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en 5 ml de H₂O destilada. El pH de la solución básica se ajustó a 4 con HCl 2 M y la mezcla se concentró a presión reducida. El ácido 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzoico obtenido se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional. El ácido 4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzoico obtenido en la reacción anterior (0,537 g, 1,61 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 20 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron N-metil-D-glucamina (0,471 g, 2,41 mmol, 1,5 eq.), EDCI (0,462 g, 2,41 mmol, 1,5 eq.), HOAt (0,328 g, 2,41 mmol, 1,5 eq.) y NMM (0,266 ml, 2,41 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 16 horas con agitación y, a continuación, se concentró a presión reducida. La purificación del producto se consiguió mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material bondesil C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua proporcionando 0,108 g (0,212 mmol, 13 %) de producto. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,43 (d, J = 4,5 Hz, 2H), 7,81 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,46 (ddd, J = 29,4, 16,9, 8,5 Hz, 4H), 7,33-7,19 (m, 2H), 4,21-3,91 (m, 1H), 3,86-3,42 (m, 13H), 3,13, 3,05 (2xs, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, MeOD) δ 174,87, 174,42, 174,29, 167,61, 160,36, 151,72, 149,45, 143,89, 142,08, 141,70, 141,53, 140,45, 138,73, 136,78, 136,42, 131,67, 130,11, 129,94, 128,94, 128,59, 128,40, 128,07, 127,37, 124,78, 124,64, 123,85, 121,06, 74,06, 73,72, 73,61, 73,33, 73,02, 72,92, 72,59, 71,98, 71,62, 71,43, 70,99, 64,76, 62,10, 60,88, 60,72, 60,20, 59,49, 59,36, 55,83, 55,38, 54,38, 52,33, 40,07, 34,01. APCI-HRMS e/z calculado para C₂₇H₃₅N₄O₆: 510,2478, encontrado 511,2551 [M+H]⁺ M. N. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β-Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases Hecker et al. J. Med. Chem., 2015, 58, 3682-3692.

Ejemplo 193 - 3-((3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)benzoato de terc-butilo (intermedio).

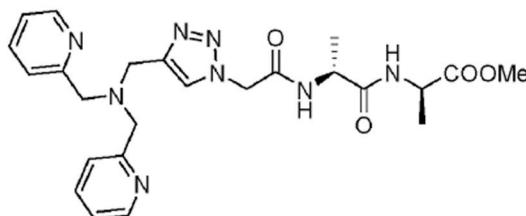


Se mezcló 3-(bromometil)benzoato de terc-butilo (1.000 mg, 3,69 mmol) con KOAc (542 mg, 5,53 mmol) y el complejo Pd(dppf)Cl₂ DCM (139 mg, 0,17 mmol) y se suspendió en 20 ml de dioxano. La mezcla se purgó con argón tres veces, se calentó hasta 90 °C y se agitó durante una noche. A continuación, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se concentró a presión reducida, se disolvió en una mezcla 1:1 de heptano:DCM (15 ml) y se filtró. Los sólidos se lavaron con DCM (3 x 15 ml) y el filtrado orgánico combinado se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre SiO₂ utilizando EtOAc al 2-5 % en heptano produciendo 899 mg (66 %) de un aceite transparente. ¹H RMN (300 MHz, cloroformo-d) δ 7,81 (td, J = 1,8, 0,6 Hz, 1H), 7,76 (dt, J = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,36 (ddd, J = 7,7, 2,0, 1,4 Hz, 1H), 7,30 (dd, J = 7,6, 0,6 Hz, 1H), 4,28 (dd, J = 8,7, 2,0 Hz, 1H), 2,38 (s, 2H), 2,31 (ddt, J = 14,4, 8,9, 2,4 Hz, 1H), 2,19 (dtd, J = 10,9, 6,0, 2,2 Hz, 1H),

2,04 (dd, $J = 6,0, 5,0$ Hz, 1H), 1,93-1,76 (m, 2H), 1,38 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,07 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 0,83 (s, 3H). RMN según la bibliografía (J. Med. Chem. 2010, 53, 7852)

Ejemplos 194 y 195 - ejemplos de análogos a base de péptidos para comparación experimental con compuestos no peptídicos según la presente invención.

Ejemplo 194 - análogo a base de péptidos - (2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)1H-1,2,3-triazol-1-il)acetil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.



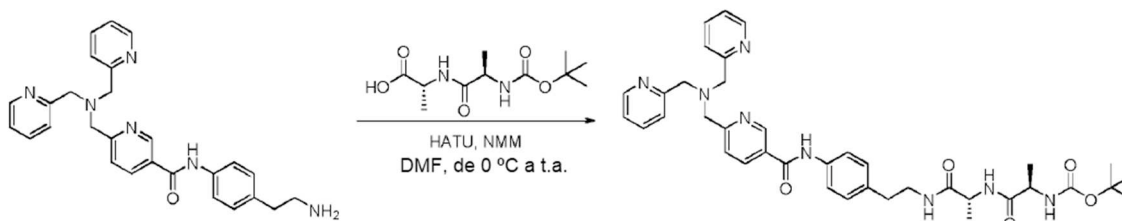
CLogP: -0,6678

El compuesto se preparó, tal como se ha descrito en la Patente WO 2015/049546. Se añadieron de manera simultánea acetato de cobre (200 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de H₂O y (+)-ascorbato de sodio (396 mg, 2,0 mmol, 2,0 eq.) en 2,5 ml de H₂O a una solución en agitación del alquino (237 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de tBuOH. A continuación, se añadió la azida preparada en el ejemplo 32 (257 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación, se añadió EDTA (293 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) a la solución en agitación y se dejó durante 60 minutos antes de que la mezcla se diluyera con 50 ml de H₂O y el pH de la mezcla se ajustó a > 10 con NaOH 1 M. A continuación, la suspensión espesa se extrajo con 2 x 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre K₂CO₃ y se concentraron a presión reducida para producir un aceite rojo oscuro. Los productos en bruto se purificaron utilizando cromatografía en columna mediante la elución de una columna de Al₂O₃ neutro con metanol al 0-5 % en diclorometano para producir 134 mg del compuesto del título como un aceite naranja pálido (27 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,59 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,49 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 8,43 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,77 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,57 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,29-7,21 (m, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,42-4,21 (m, 2H), 3,77-3,70 (m, 6H), 3,62 (s, 3H), 1,31-1,21, (m, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 172,8, 171,8, 165,0, 159,0, 148,8, 143,1, 136,5, 125,3, 122,5, 122,1, 58,7, 51,8, 51,4, 48,0, 47,9, 47,5, 31,3, 18,3, 16,8.

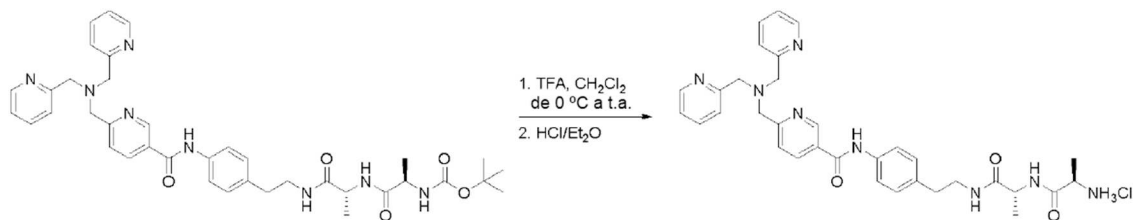
HRMS m/z calculado para C₂₄H₃₀N₈O₄: 494,2390, encontrado 495,2463 (M+H).

Ejemplo 195 - análogo a base de péptidos - clorhidrato de N-(4-(2-((R)-2-((R)-2-aminopropanamido)propanamido)etil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida.

Ejemplo 195a - (R)-1-((R)-1-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-il-carbamato de terc-butilo.



Se disolvió N-(4-(2-aminoetil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida del ejemplo 167b (218 mg, 0,48 mmol, 1,0 eq.) en 3 ml de DMF anhidra, se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadieron Boc-D-Ala-D-Ala-OH (132 mg, 0,506 mmol, 1,05 eq.), HATU (192 mg, 0,506 mmol, 1,05 eq.) y NMM (116 µl, 1,056 mmol, 2,2 eq.) y la solución se agitó a 0 °C durante 30 minutos, a continuación, a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía en columna seca al vacío sobre material C18, utilizando una elución por etapas a partir de metanol del 10 % al 90 % en agua, proporcionando 217,7 mg (0,313 mmol, 65 %) del producto en forma de aceite de color amarillo pálido. ¹H RMN (600 MHz, MeOD) δ 8,96 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,44 (d, $J = 4,3$ Hz, 2H), 8,25 (dd, $J = 8,2, 2,2$ Hz, 1H), 7,78 (ddd, $J = 10,3, 6,1, 2,2$ Hz, 3H), 7,67 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,61 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,27 (ddd, $J = 7,3, 5,1, 0,8$ Hz, 2H), 7,20 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 4,30 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,03 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H), 3,92 (s, 2H), 3,88 (s, 4H), 3,48-3,41 (m, 1H), 3,38-3,32 (m, 1H), 2,78 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,30 (dd, $J = 13,2, 7,0$ Hz, 6H). ¹³C RMN (151 MHz, MeOD) δ 175,63, 174,74, 166,17, 163,43, 159,86, 157,98, 149,57, 148,92, 138,68, 137,89, 137,50, 136,92, 130,97, 130,23, 124,92, 124,24, 123,90, 122,28, 80,73, 61,15, 60,88, 51,95, 50,36, 41,96, 35,88, 28,73, 18,21, 18,02. APCI-HRMS m/z calculado para C₃₈H₄₆N₈O₅: 694,3591, encontrado: 695,3659 [M+H].

Ejemplo 195b – clorhidrato de N-(4-(2-((R)-2-aminopropanamido)propanamido)etil)fenil)-6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamida.

Se disolvió (R)-1-((R)-1-(4-(6-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)nicotinamido)fenetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato del ejemplo 195a (176 mg, 0,253 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de CH₂Cl₂, se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió TFA (0,97 ml, 12,65 mmol, 50 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se supervisó la conversión completa mediante ¹H-RMN. La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en una mezcla de EtOAc/H₂O destilada/solución acuosa saturada de K₂CO₃ (30 ml/10 ml/30 ml) y se transfirió a un embudo de decantación. Se separó la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 veces, 30 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre K₂CO₃, se filtraron y se concentraron a presión reducida proporcionando un sólido espumoso blanco. Este se disolvió en 2 ml de CH₂Cl₂ y se añadió HCl 2 M en éter dietílico en exceso dando lugar a un precipitado blanco. La mezcla se almacenó en la nevera durante 4 horas, se filtró con succión y el sólido se lavó con éter dietílico, transformándose en un aceite amarillento. Este aceite se disolvió en H₂O caliente, se recogió en un matraz y se concentró a presión reducida para proporcionar 59,4 mg (0,094 mmol, 37 %) de producto como un aceite amarillento. ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 9,14 (s, 1H), 8,78 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 8,66 (dd, J = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 8,55 (t, J = 7,9 Hz, 2H), 8,10 (t, J = 13,5 Hz, 2H), 8,00 (dd, J = 11,3, 6,3 Hz, 3H), 7,52 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,47 (s, 4H), 4,38 (s, J = 7,6 Hz, 2H), 4,24 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 4,09 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 3,66-3,54 (m, 1H), 3,48-3,33 (m, 1H), 2,96-2,76 (m, 2H), 1,51 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,29 (d, J = 7,1 Hz, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, D₂O) δ 174,42, 170,44, 164,00, 156,34, 151,62, 147,44, 144,52, 142,00, 141,71, 137,18, 134,69, 131,72, 129,77, 129,72, 127,46, 126,65, 126,30, 122,54, 57,78, 56,36, 49,96, 48,91, 40,27, 34,08, 16,75, 16,52. APCI-HRMS e/z calculado para C₃₃H₃₈N₈O₃ (amina libre): 594,3067, encontrado: 595,3135 [M+H].

Ejemplo 196 - pureza mediante HPLC del ejemplo 26

El análisis mediante HPLC isocrática del producto del ejemplo 26 con 91 % de MeOH/9 % de HCOOH 0,5 M como eluyente detectado a 254 nm mostró > 99,5 % de pureza del compuesto, tal como se muestra en la figura 1.

Ejemplo 197 - protocolo general para el procedimiento de dilución en microcaldo para evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos o el efecto sinérgico de la combinación compuesto-antibiótico**Preparación de bacterias**

Día 1:

- Sembrar una cepa o cepas bacterianas en medios apropiados:
 - Bacterias gram-negativas con BLEE o carbapenemasas: placas de agar verde con 100 mg/l de ampicilina
 - Bacterias gram-negativas sin β-lactamasas: placas de agar verde
 - Bacterias gram-positivas (estafilococos y enterococos): placas de agar con sangre
- Incubar durante una noche a 37 °C

Día 2:

Preparar el inóculo bacteriano:

- Preparar una suspensión de bacterias McFarland 0,5 en NaCl al 0,85 %. (Debe utilizarse dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación).
 - Diluir la suspensión McFarland 0,5 1:100 en caldo MH.
 Comprobar el inóculo diluyendo la suspensión bacteriana preparada 1:100 (10 µl de suspensión bacteriana + 990 µl de NaCl al 0,85 %). Sembrar 10 µl de la dilución en placas de agar MH (x2). Incubar durante una noche a 37 °C, contar las colonias y calcular las UFC/ml final del inóculo en la placa multiplicando el número promedio de colonias por 10.000 y dividir por 2. El inóculo final debe estar entre 3-7x10⁵ UFC/ml.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana preparada a cada pocillo de la placa de microtitulación, excepto el control de crecimiento negativo.

Preparación de compuestos/antibióticos

• Calcular el intervalo de concentraciones y el volumen deseados de los compuestos/antibióticos en el ensayo. En el caso de los antibióticos, esto dependerá de la MIC para meropenem de las cepas bacterianas a analizar. Diluir la solución madre en caldo MH. Realizar diluciones posteriores al doble en caldo MH de las concentraciones deseadas si se va a analizar un intervalo de concentraciones (recordar el factor de dilución adicional en la placa de ensayo). Incluir siempre un volumen adicional para pipetear. Tener en cuenta las soluciones madre que se preparan en tampones que tienen un efecto sobre el crecimiento bacteriano (por ejemplo, DMSO).

Ensayo:

• Determinar la MIC de compuestos/antibióticos solos:

- Añadir 25 µl de cada concentración de compuesto/antibiótico a las filas 2-11 (concentración más elevada en la fila 2)
- Añadir 25 µl de caldo MH a las filas 2-11
- Añadir 50 µl de caldo MH a fila 12 (control positivo)
- Añadir 100 µl de caldo MH a la fila 1
- Añadir 50 µl de suspensión bacteriana a las filas 2-12.

• Determinar la MIC de antibióticos + compuestos:

- Añadir 25 µl de cada concentración de antibiótico a las filas 2-11 (concentración más elevada en la fila 2)
- Añadir 25 µl de compuesto a las filas 2-11
- Añadir 50 µl de caldo MH a fila 12 (control positivo)
- Añadir 100 µl de caldo MH a la fila 1
- Añadir 50 µl de suspensión bacteriana a las filas 2-12.

• Incubar la placa durante 20 horas a 37 °C y determinar la MIC en presencia y ausencia de inhibidor.

Este diseño experimental se utilizó para los resultados de las tablas 2-6, a continuación. En la tabla 2, se estudió la dependencia de la concentración de inhibidor con respecto a la MIC de meropenem.

Tabla 2 - Estudio de la dependencia de la concentración de inhibidor con respecto a la MIC de meropenem

No. de referencia	K66-45					K34-7				
Especie	<i>K. pneumoniae</i>					<i>P. aeruginosa</i>				
MBL	NDM-1					VIM-2				
Concentración de inhibidor (µM)	125	62,5	50	31,25	15,63	125	62,5	50	31,25	15,63
sin inhibidor	32-64					32-64				
Ejemplo 9	≤ 0,5	0,125		0,125	2	≤ 0,5	1		16	32
Ejemplo 12			0,25	0,125	4			1	1	4
Ejemplo 14			0,125	0,125	16			2	2	32
Ejemplo 23	0,125	0,125		0,125	0,125	1	1		1	32
Ejemplo 24			0,125	0,125	16			1	2	32
Ejemplo 25	0,125	0,125		0,125	8	2	1		1	32
Ejemplo 26			0,125	0,125	8			1	1	
Ejemplo 27	0,125	0,125		8	64	1	1		1	32
Ejemplo 84	0,5	2		8	16	2	8		16	32
Ejemplo 85	0,5	2		8	16	2	8		32	32
Ejemplo 87	0,125			0,125	16	2			0,5	32
Ejemplo 91			0,125	0,125	8			1	2	16

Los resultados de un estudio de la concentración mínima inhibidora (MIC) de meropenem contra un amplio espectro de aislados clínicos de bacterias gram-negativas MBL-positivas y MBL-negativas con respecto a la MIC de meropenem se proporciona en la tabla 3. En presencia de inhibidor, los valores de MIC para meropenem se reducen drásticamente, mientras que el efecto sobre las bacterias que carecen de MBL está ausente. Tal como se muestra en la tabla 4, todos los ejemplos muestran el mismo efecto drástico sobre los valores de MIC de meropenem en dos cepas de cepas multirresistentes clínicamente aisladas de *P. Aeruginosa* que albergaban VIM-2 y *K. pneumoniae* que albergaban NDM-1, excepto en los ejemplos 101, 157, 180, 182, 185 y 187.

Tabla 3 – Estudio del efecto del inhibidor sobre un espectro amplio de bacterias gram-negativas MBL-positivas y MBL-negativas sobre la MIC de meropenem

Ejemplo	Presencia de MBL:	Gram-negativas MBL-positivas						Gram-negativas MBL-negativas	
		K34-7	50692172	K66-45	A3-81	K71-77	50639799	50808021	50732159
	No. de referencia:								
	Especie:	<i>P. aeruginosa</i> VIM-2	<i>P. aeruginosa</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> VIM-1	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>E. coli</i> VIM-1	<i>P. aeruginosa</i> No MBL	<i>K. pneumoniae</i> No MBL
	MBL:								
	Actividad de meropenem sin inhibidor	32-64	32-128	32-64	64-256	1-8	8-32	128-256	32-64
Actividad de meropenem (mg/l) en presencia de inhibidor									
	Concentración de inhibidor								
TPEN	63 mg/ml	1	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,064	≤ 0,064	64	≤ 0,064
Captopril	63 mg/ml	32	32-64	64	64-128	2-4	16		
Ejemplo 9	63 mg/ml	≤ 0,5		≤ 0,5					
Ejemplo 22a	63 mg/ml	1		0,25					
Ejemplo 27	63 mg/ml	1		0,125					
Ejemplo 23	25 mg/ml	1	1	0,125	0,125	≤ 0,03	≤ 0,03	> 64	32
Ejemplo 25	25 mg/ml	2	2	0,125	0,125	≤ 0,03	≤ 0,03	> 64	64
Ejemplo 84	25 mg/ml	8		4					
Ejemplo 85	25 mg/ml	8		4					
Ejemplo 91	25 mg/ml	1		0,125					
Ejemplo 83	25 mg/ml	16		8					
Ejemplo 24	25 mg/ml	1		0,125					
Ejemplo 12	25 mg/ml	1		0,25					
Ejemplo 14	25 mg/ml	2		0,125					
Ejemplo 26	25 mg/ml	1	4	0,125	0,125	≤ 0,03	0,6	> 64	32
Ejemplo 95	25 mg/ml	16		4					
Ejemplo 194	25 mg/ml	1	32	0,125	64	0,5	2	> 64	32
Ejemplo 104	25 mg/ml	8		4					
Ejemplo 98	25 mg/ml	8-32		4					
Ejemplo 99	25 mg/ml	1		0,25	1	0,06	0,125	> 64	32
Ejemplo 100	25 mg/ml	1		0,125	0,5	0,06	0,06	> 64	32

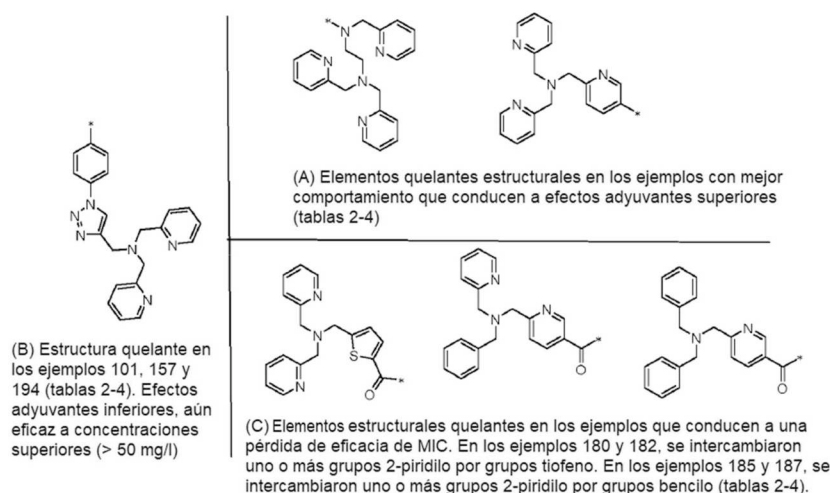
Tabla 4 – Estudio del efecto inhibitor sobre dos aislados clínicos multirresistentes MBL-positivos de bacterias gram-negativas sobre la MIC de meropenem. En todos los casos, la concentración del inhibidor fue de 25 mg/l.

No. de referencia	K34-7	K66-45
Especie	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
MBL	VIM-2	NDM-1
	Valores de MIC (mg/l) de meropenem sin inhibidor	
	32-64	32-64
Ejemplo	Valores de MIC (mg/l) de meropenem en presencia inhibidor	
Ejemplo 101	16	8
Ejemplo 24	1-4	0,25
Ejemplo 24	2	0,125
Ejemplo 195	1	0,125
Ejemplo 195	1	0,125
Ejemplo 195	2	0,125
Ejemplo 26	1	0,125
Ejemplo 26	1	0,25
Ejemplo 25	1	0,125
Ejemplo 25	1	0,125
Ejemplo 105	2	0,125
Ejemplo 147	1	0,25-0,125
Ejemplo 69	1	0,25-0,125
Ejemplo 147	2	0,125
Ejemplo 157	16	8
Ejemplo 160	2	0,125
Ejemplo 163b	1	0,125
Ejemplo 163b	1	0,125
Ejemplo 180	32	8
Ejemplo 147	1	0,25
TPA	1	0,125
Ejemplo 182	32	16
Ejemplo 169	1	0,125
Ejemplo 185	32	64
Ejemplo 187	32	32

5 Resumen del ejemplo 197

En los ejemplos 101 y 157, el resto quelante comprende los elementos estructurales DPA-triazol-*p*-fenil-enlazador (2B), un elemento estructural que muestra menos actividad como adyuvante a 25 mg/l en comparación con los elementos estructurales a base de TPA y tripiridil-etilendiamina en muchos de los otros ejemplos que comprenden los elementos estructurales del esquema 23(A). Sin embargo, los compuestos que comprenden el resto quelante mostrado en el esquema 23(B) consiguen un efecto adyuvante completo en concentraciones > 50 mg/l. La introducción de un grupo tiofeno en el quelante como en los ejemplos 180 y 182 (esquema 23(C)) o la eliminación de uno o dos átomos de nitrógeno en los anillos de piridina en el quelante como en los ejemplos 185 y 187 (C) anula completamente el efecto adyuvante a una concentración de inhibidor de 25 mg/l. En conclusión, el esquema 23 muestra elementos quelantes estructurales que conducen a efectos adyuvantes superiores. Estos quelantes pueden abolir la resistencia antibacteriana con carbapenemas a concentraciones entre 8 y 15 mg/l.

Esquema 23 – Ejemplos de restos quelantes que conducen a efectos adyuvantes inferiores (*indica el punto de unión del quelante al rest de la estructura)



Ejemplo 198 - Efecto de los ejemplos 26 y 195 sobre diferentes cepas de bacterias gram-negativas que albergan una MBL

Se utilizó el protocolo proporcionado en el ejemplo 197 para comparar un compuesto no peptídico representado por el ejemplo 26 con un compuesto peptídico representado en el ejemplo 195, que tiene el mismo quelante en ambos ejemplos (TPA), en un gran número de cepas diferentes que producen MBL. Los resultados muestran que los compuestos peptídicos y no peptídicos muestran un efecto adyuvante espectacular similar junto con meropenem, restaurando el efecto del fármaco antibacteriano.

Tabla 5 - Efecto de los ejemplos 26 y 195 sobre diferentes cepas de bacterias gram-negativas que albergan una MBL

Especie	MIC de meropenem solo [mg/l]	MIC de meropenem + 25 g/l del ejemplo 26 [mg/l]	MIC de meropenem + 25 g/l del ejemplo 195 [mg/l]	MBL
<i>C. freundii</i>	4	0,06	0,125	NDM-1
<i>P. stuartii</i>	8	0,06	0,125	NDM-1
<i>P. mirabilis</i>	32	0,125	0,125	NDM-1
<i>M. morgani</i>	8	1	1	OXA48+NDM-1
<i>K. pneumoniae</i>	64	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-7
<i>E. coli</i>	64	0,25	0,25	NDM-5
<i>K. pneumoniae</i>	64	0,125	0,125	NDM-1
<i>E. coli</i>	0,5	≤ 0,03	≤ 0,03	VIM-1
<i>K. pneumoniae</i>	4	0,06	0,125	VIM
<i>K. pneumoniae</i>	64	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-1
<i>K. pneumoniae</i>	64	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-1
<i>E. coli</i>	64	0,06	0,06	NDM-5
<i>K. pneumoniae</i>	64	0,06	0,06	NDM
<i>E. coli</i>	32	0,125	0,25	NDM
<i>E. coli</i>	32	0,125	0,125	NDM
<i>P. stuartii</i>	64	0,25	0,25	NDM
<i>E. coli</i>	64	0,125	0,25	NDM
<i>K. pneumoniae</i>	64	0,06	0,06	NDM
<i>K. pneumoniae</i>	64	0,06	0,06	NDM
<i>E. coli</i>	32	0,125	0,125	NDM
<i>C. freundii</i>	16	0,06	0,06	NDM
<i>E. coli</i>	4	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM
<i>E. coli</i>	32	0,25	0,25	NDM
<i>K. pneumoniae</i>	8	0,06	0,06	NDM
<i>E. coli</i>	8	0,06	0,06	NDM
<i>E. cloacae</i>	8	≤ 0,03	≤ 0,03	VIM
<i>E. coli</i>	32	0,06	0,125	NDM
<i>K. pneumoniae</i>	32	0,125	0,125	NDM-1

Especie	MIC de meropenem solo [mg/l]	MIC de meropenem + 25 g/l del ejemplo 26 [mg/l]	MIC de meropenem + 25 g/l del ejemplo 195 [mg/l]	MBL
<i>K. pneumoniae</i>	32	0,06	0,06	NDM-1
<i>E. coli</i>	4	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-5
<i>E. coli</i>	8	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-5
<i>E. coli</i>	16	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-5
<i>K. pneumoniae</i>	32	0,06	0,06	NDM-1
<i>E. coli</i>	4	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-5
<i>K. pneumoniae</i>	64	≤ 0,03	≤ 0,03	NDM-1
<i>E. coli</i>	64	0,06	0,125	NDM-5

Ejemplo 199 - El efecto del ejemplo 26 sobre cepas resistentes de aislados clínicos de *K. pneumoniae* K66-45 y *P. aeruginosa* K34-7 con diferentes carbapenemas.

La tabla 6 muestra los resultados cuando se utilizó el protocolo proporcionado en el ejemplo 197 para probar el efecto sinérgico del ejemplo 26 en una población de aislados clínicos en crecimiento de *K. pneumoniae* K66-45 y *P. aeruginosa* K34-7 que albergaban VIM-2 y NDM-1, resistentes a carbapenemas en general. Las dos carbapenemas elegidas fueron meropenem y doripenem. En el estudio se utilizaron tres lotes diferentes del ejemplo 26 en una concentración de 25 mg/l. Los resultados se proporcionan en la tabla 5. Un valor de MIC de 32-64 representa la resistencia a la carbapenema.

Los resultados muestran que los tres lotes del ejemplo 26 contrarrestan la resistencia en las cepas bacterianas y potencia las carbapenemas con un factor de 32-256 veces. Los resultados también muestran que el ejemplo 26 se puede volver a sintetizar de forma reproductiva.

Tabla 6 – El efecto del ejemplo 26 sobre cepas resistentes de aislados clínicos de *K. pneumoniae* K66-45 y *P. aeruginosa* K34-7 que albergaban VIM-2 y NDM-1

MIC de carbapenema en la tabla en mg/l	No. de referencia	Valor de MIC en K34-7	Valor de MIC en K66-45
Compuesto: Lotes del ejemplo 26	Especie MBL	<i>P. aeruginosa</i> VIM-2	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1
Lote 1 + MEM	MEM	1	0,125
Lote 2 + MEM	MEM	1	0,125
Lote 3 + MEM	MEM	1	0,25
Meropenem solo	MEM	32-64	32-64
Lote 1 + DOR	DOR	1	0,25
Lote 2 + DOR	DOR	1	0,125
Lote 3 + DOR	DOR	1	0,125
Doripenem solo	DOR	32-64	> 64

Ejemplo 200 - Estudio en damero del ejemplo 26 y meropenem

Se utilizó el siguiente protocolo para estudiar la sinergia del ejemplo 26 con meropenem contra *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a meropenem. Un ensayo de MIC en damero utilizó el procedimiento de dilución en caldo según las pautas de CLSI. Se disolvió una muestra del ejemplo 26 en solución salina estéril (0,9 %) hasta 16 mg/ml y se diluyó adicionalmente en caldo de Mueller Hinton BBL II (caldo MH) hasta 1,6 mg/ml. Se preparó una solución madre de 80 mg/ml de concentración de meropenem (Mylan, 51B0424/08-2017) disolviendo 1 g de meropenem en 12,50 ml de solución salina estéril (0,9 %). Se realizaron diluciones hasta 4 mg/ml añadiendo + 4,75 ml de solución salina estéril a 0,25 ml de la solución madre, y se realizaron diluciones hasta 512 µg/ml añadiendo 10,9 ml de caldo MH a la solución de 4 mg/ml. Se prepararon inóculos de cepas bacterianas, tal como se describe en la tabla 4, mediante la suspensión de colonias recién preparadas después de una noche a partir de agar con sangre de caballo al 5 % hasta una turbidez de McFarland 0,5 y se diluyeron adicionalmente hasta 1×10^6 UFC/ml en caldo MH. Se añadieron alícuotas de 50 µl de caldo MH a cada pocillo de las placas de microtitulación de poliestireno. A continuación, se añadió la solución de meropenem 512 µg/ml a la columna 1 y se tituló 2 veces en toda la columna 11. Se añadieron soluciones de 50 µl del ejemplo 26 titulado previamente a todos los pocillos y, finalmente, se añadieron 100 µl de suspensión bacteriana diluida a los pocillos. Las placas se incubaron a 35 °C, 16-20 horas.

Resultados:

Los resultados de los dameros se muestran en la tabla 7 como MIC para el compuesto solo y en combinación entre los dos. Además de las diferentes MBL, los aislados fueron productores de un gran número de β-lactamasas no MBL. La tabla 7 muestra un fuerte efecto sinérgico del EJEMPLO 26 en combinación con meropenem para todos los aislados MDR probados. Para algunas de las cepas, la amplificación del efecto del meropenem fue de más de 1.000 veces.

Tabla 7 – Resultados de damero en el estudio del ejemplo 26 con meropenem con una variedad de cepas gram-negativas resistentes que albergan MBL

Categoría del aislado	β -lactamasa/ carbapenamasa	Otras β - lactamasas	Identificación del aislado	MIC solo (mg/ml)			MIC combinado (mg/ml)	
				Ejemplo 26	Meropenem	Ejemplo 26	Meropenem	
NDM de <i>E. coli</i>	NDM-1	CTX-M-15; CMY-6; OXA-1	50676002	> 400	32	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-1	CTX-M-15; CMY-16(v); OXA-10; OXA-1; TEM1	50739822	> 400	32	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-1	CMY-6; similar a DHA-1; OXA-1; TEM-1C	AMA817	> 400	32	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-5	CTX-M14	AMA1563	> 400	64	25		$\leq 0,0625$
VIM de <i>E. coli</i>	VIM-4	CTX-M-15; CTX-M-9; OXA-1	AMA323	> 400	8	12,5		$\leq 0,0625$
	VIM-1	nd	50921466	> 400	2	12,5		$\leq 0,0625$
NDM-1 de <i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	SHV-11; CTX-M-15; OXA-1; OXA-9; TEM-1	K66-45	> 400	64	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-1	SHV-11; CTX-M-15; OXA-1; CMY-6	50627996	> 400	64	12,5		0,125
	NDM-1	SHV-1; CTX-M-15; OXA-1; OXA-9; TEM-1	50752501	> 400	64	25		$\leq 0,0625$
	NDM-1	SHV11(v); OXA-1; TEM-1	50690310	> 400	16	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-1	SHV-11; CTX-M-15; OXA-9; TEM-1	50825040	> 400	64	12,5		$\leq 0,0625$
	NDM-1	CMY-6; SHV-11	50877064	> 400	64	12,5		$\leq 0,0625$
VIM de <i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	SHV-12	K45-67	> 400	32	12,5		$\leq 0,0625$
	VIM-1	SHV-12; TEM-1	K46-62	> 400	32	12,5		$\leq 0,0625$
	VIM	ND	50923744	> 400	2	12,5		$\leq 0,0625$

Ejemplo 201 - Protocolo general y resultados para la toxicidad *in vitro* de compuestos en células hepG2 humanas**5 Materiales y procedimientos:****Células**

10 La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 (HB-8065, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) se cultivó en DMEM-Glutamax™ (glucosa 5,5 mM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, estreptomicina (100 µg/ml) y penicilina (100 unidades/ml) a 37 °C en CO₂ al 5 %. Para los ensayos de viabilidad, las células se sembraron en placas Nunclon blancas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo y se dejaron adherir durante una noche antes de realizar los experimentos.

15 Ensayo de viabilidad celular

Se añadieron quelantes de Zn disueltos en DMSO a placas blancas de 96 pocillos que contenían 20.000 células HepG2/pocillo a concentraciones que variaban de 1 a 1×10^{-6} mM (la concentración máxima de DMSO nunca excedía el 1 %) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas, se añadió el reactivo de viabilidad celular AlamarBlue® (Thermo Fisher, Carlsbad, EE. UU.) (concentración final del 10 %) y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Este colorante es un indicador redox que produce una señal fluorescente proporcional a las células viables en cada pocillo que se midió en un lector de placas de fluorescencia a ex550 nm/em603 nm (Clariostar, BMGlabtech, Alemania) (O'Brien et al., 2000). Los datos de 8 réplicas se ajustaron mediante regresión no lineal para estimar los valores de IC₅₀ utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, EE. UU.).

Referencias

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 267, 5421-5426.

Resultados:

35 Los cálculos numéricos de los valores de IC₅₀ *in vitro* en células HepG2 para los compuestos de la presente invención se proporcionan en la tabla 8. Las curvas en las figuras 2 y 3 muestran la concentración en log₁₀ del n° de ejemplo en función de unidades de fluorescencia relativa (UFR) en suspensiones de células hepG2. Ninguno de los compuestos produjo una UFR < 10³ en el medio libre de células solo.

Tabla 8

Compuesto	IC ₅₀	R cuadrado
TPEN	7,1	0,9372
Ejemplo 12	16,5	0,9363
Ejemplo 14	12,4	0,9911
Ejemplo 25	113,3	0,7048
Ejemplo 26	> 1.000	0,2191, cálculo e inspección visual
Ejemplo 84	> 1.000	0,3462, cálculo e inspección visual
Ejemplo 91	165,2	0,9321
Ejemplo 96	> 1.000	0,8415, cálculo e inspección visual
Ejemplo 97	130,6	0,885
Ejemplo 98	259,1	0,8232
Ejemplo 99	217,3	0,7271
Ejemplo 100	> 100	0,7154
Ejemplo 101	~ 220	Inspección visual
Ejemplo 103	67,61	0,89
Ejemplo 104	224,5	0,884
Ejemplo 105	~ 210	Inspección visual
Ejemplo 107	> 500	0,4354, cálculo e inspección visual
Ejemplo 108	> 1.000	0,5954, cálculo e inspección visual
Ejemplo 109	127,7	0,839
Ejemplo 147	~ 10	Inspección visual
Ejemplo 163b	~ 600	Inspección visual
Ejemplo 180	~ 80	Inspección visual
Ejemplo 186	~ 215	Inspección visual
Ejemplo 195	> 1.000	0,8331, cálculo e inspección visual

Ejemplo 202 - Protocolo general y resultados para la toxicidad celular *in vitro* de glóbulos rojos humanos

Las muestras de sangre humana se incubaron a 37 °C con seis concentraciones de los compuestos proporcionados en la tabla 1 en el intervalo de concentraciones de 1-500 µM. Las muestras de sangre se centrifugaron para eliminar las células completas y los sobrenadantes se analizaron de manera espectrofotométrica. Ninguno de los compuestos indujo hemólisis por debajo de una concentración de 500 µM.

Ejemplo 203 - Protocolo general y resultados para la identificación *in vitro* de la clase bacteriana Ambler

1. Aislar una cepa bacteriana resistente a carbapenem de interés y extenderla sobre una placa de agar.
2. Preparar los siguientes discos:
 - a. Disco A con meropenem solo.
 - b. Disco B con meropenem + ejemplo 26.
 - c. Disco C con imipenem solo.
 - d. Disco D con imipenem + ejemplo 115.
 - e. Disco E con temocilina.
3. Añadir los cinco discos en cinco lugares diferentes de la placa de agar o en cuatro placas diferentes.
4. Incubar durante una noche a 37 °C.
5. Leer todos los diámetros de zona de los lóbulos.
6. La respuesta leída por los diámetros de zona se pueden utilizar para discriminar entre productores de MBL, KPC y OXA, tal como se ha descrito por Teethaisong et al en Journal of Applied Microbiology (2016), 121, 408-414, según la tabla 9.

Tabla 9

Disco	Resultado		
A	-	-	-
B	-	+	-
C	-	-	-
D	-	+	+
E	-	-	-
Conclusión sugerida	Patógeno sin MBL, KPC, pero indica OXA-48	Patógeno a base de MBL	Patógeno a base de KPC
Símbolos: +: zona aumentada. -: zona mínimamente modificada			

Ejemplo 204 - Estudios de destrucción con el tiempo**Materiales:**

Se calentó caldo de Mueller-Hinton (MHB) desde la temperatura fría de la nevera. Los materiales utilizados en el estudio fueron placas de agar LB, de manera preferente, cuadradas, PBS estéril, placas de 96 pocillos, frascos de medio de 30 ml, asas de inoculación, puntas para multicanal, tubos de microcentrifuga estériles (1,5 ml), solución de meropenem (MEM) 40 mg/ml recién preparada en DMSO que aparece como una solución de color amarillo claro/pálido. Se disolvió una muestra del ejemplo 26 en DMSO.

Procedimiento:

Las placas de 96 pocillos se prepararon utilizando una pipeta multicanal, añadiendo 270 µl de PBS a las columnas 2- 9, o el número necesario de diluciones necesarias en el experimento. Cada inóculo se preparó seleccionando una sola colonia de la placa recién preparada que se dispersó en 1 ml de MHB, el asa se agitó para garantizar que toda la colonia se desprendiera del mismo. El tubo se mezcló en vórtice y se tomó una alícuota de 100 µl del tubo en 9,9 ml de MHB en el frasco de medio. Esto da lugar a 10 ml con ~ 10⁵ UFC/ml. El procedimiento se repitió para tantas muestras como sea necesario para el estudio. Se transfirieron alícuotas de 5 ml de inóculo a tantos frascos de medios como sean necesarios, por ejemplo, MEM 4 mg/l, MEM 4 mg/l + sustancia de prueba 50 µM, MEM 4 mg/l + sustancia de prueba 100 µM. A continuación, se tomaron 2 alícuotas de 60 µl de cada cultivo y se añadieron a la columna 1 en la placa de 96 pocillos, por ejemplo, un cultivo 1:50 µl en A1, 50 µl en B1, etc., para el punto de tiempo 0 h. A continuación, se añadió MEM 4 mg/ml en cada frasco, seguido de la cantidad requerida de la sustancia de prueba. Los frascos se mezclaron suavemente para evitar la formación de burbujas y se incubaron en un recipiente secundario a 37 °C a 180 rpm. Finalmente, se realizaron diluciones en serie utilizando una pipeta multicanal tomando 30 µl para la columna 1, añadiendo a la columna 2, mezclando bien, repitiendo de la columna 2 a la 3 con puntas de pipeta limpias.

Resultado:

La figura 4 muestra los resultados de los estudios de destrucción con el tiempo de un aislado clínico resistente de *Klebsiella pneumoniae* que alberga NDM-1 con el ejemplo 26 y meropenem 4 mg/l. Los datos muestran que con meropenem 4 mg/l solo, la UFC empieza a aumentar después de aproximadamente 5 horas y continúa creciendo más allá del recuento inicial de UFC. Con la misma concentración de meropenem añadida al ejemplo 26, la UFC cae por debajo del límite de detección (LOD) después de 5-10 horas, de manera independiente de la concentración del ejemplo 26, y permanece por debajo del LOD en el período del estudio (30 horas).

Ejemplo 205 - Frecuencia de resistencia en función de la fuerza del quelante utilizando los compuestos de los ejemplos 25, 26, 194 y 195, según el esquema 23B

Ejemplo 205A

La frecuencia de resistencia de *K. pneumoniae* K66-45 al tratamiento simultáneo de meropenem con los ejemplos 25, 26, 194 y 195, según se determina mediante la selección en una sola etapa en agar. Se utilizó el siguiente protocolo: placas de agar Mueller-Hinton (MHA) que contenían 15, 25 o 50 mg/l del ejemplo 26 se suplementaron con 1, 2, 4 u 8 mg/l de meropenem. Meropenem 4 mg/l corresponde al nivel medio de antibiótico en estado estacionario en suero cuando se administran dosis normales de meropenem a voluntarios sanos. La UFC de K66-45 fue de $\sim 10^9$ (caldo de Mueller-Hinton, sin selección). Después de sembrar y cultivar durante una noche a 37 °C, solo se contaron las colonias individuales, ignorando cualquier contacto con los bordes de la placa. De manera análoga con la misma configuración, se procesaron 25 mg/l del ejemplo 196 de la misma manera con 1, 2, 4 y 8 mg/l de meropenem.

Resultados y conclusiones:

Los resultados se resumen en la tabla 10. Con el ejemplo 194, se observó en casi todas las placas un crecimiento casi confluyente con > 1.000 colonias, demasiado numerosas para contar/separar. Con el ejemplo 26 que comprende un quelante más fuerte, no se observaron colonias a la concentración clínica anticipada de 4 mg/l o superior de meropenem. Con el ejemplo 25 con un quelante aún más fuerte, no se observaron colonias a la concentración subclínica de MEM 2 mg/l.

Tabla 10 – Frecuencia de resistencia de *K. pneumoniae* K66-45 al tratamiento simultáneo de meropenem con los compuestos de los ejemplos 25, 26, 194 y 15, determinada mediante selección en una etapa sobre agar

Concentración de inhibidor en todos los casos: 25 mg/ml																
Ejemplo de inhibidor	Ejemplo 194				Ejemplo 26				Ejemplo 195				Ejemplo 25			
Conc. de MEM (mg/ml)	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
Sensibilidad	S	S	I	I	S	S	I	I	S	S	I	I	S	S	I	I
RF* - nº de colonias	tntc	tntc	tntc	tntc	74	35	nc	nc	163	nc	nc	nc	64	nc	nc	nc
MEM = meropenem; n.c. = sin colonias, S = sensible, I = intermedio, por ejemplo, 2 < I ≤ 8; tntc = demasiado numerosas para contar, placas que contienen un crecimiento confluyente o > 1.000 colonias; nd = no determinado. MIC de MEM en ausencia del ejemplo 26 > 32 mg/l. MIC de MEM en presencia de 31,25 μM, 50 μM y 100 μM de los ejemplos 25, 26 y 195 = 0,125 mg/l; *RF = frecuencia de resistencia																

Ejemplo 205B - Determinación de la frecuencia de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* K66-45 al tratamiento simultáneo del ejemplo 26 con meropenem

Para investigar la frecuencia de resistencia del ejemplo 26 a concentraciones variables, se utilizó el mismo protocolo que en el ejemplo 205A para investigar la frecuencia de mutantes resistentes en una población de *K. pneumoniae* K66-45 en crecimiento. Las placas de agar Mueller-Hinton que contenían 31, 25 o 50 µM del ejemplo 26 se suplementaron con 1, 2, 4 u 8 mg/l de MEM. Se sembraron 10⁹ UFC de K66-45 (caldo de Mueller-Hinton, sin selección) y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Sólo se contaron las colonias individuales, ignorando cualquier contacto con los bordes de la placa. Una concentración de 4 mg/l de meropenem corresponde a un nivel clínico de concentración en estado estacionario en suero cuando se utilizan dosis normales de meropenem en voluntarios sanos, tal como han descrito Leroy A, Fillastre JP, Borsa-Lebas F, Etienne I, Humbert G. en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (1992), 2794-2798.

Resultados y conclusiones:

Los resultados se resumen en la tabla 11. Hubo una dependencia con la concentración de la frecuencia del número de mutantes con una concentración creciente del ejemplo 26. A la concentración efectiva de 25 mg/l del ejemplo 26, no se observaron colonias a la concentración clínica anticipada de 4 mg/l o superior de meropenem. La concentración de 50 mg/l del ejemplo 26 sigue siendo una concentración totalmente aceptable a la vista de los datos de toxicidad en los ejemplos 202, 203 y 212. A esta concentración, no se observaron colonias a la mitad de la concentración clínica de meropenem de 2 mg/l.

Tabla 11 – Frecuencia de resistencia de *K. pneumoniae* K66-45 al tratamiento simultáneo del compuesto del ejemplo 26 con meropenem, determinada mediante la selección en una etapa en agar

Inhibidor (mg/ml)	Frecuencia de resistencia/mutante (número de colonias)			
	MEM 1 mg/l (S)	MEM 2 mg/l (S)	MEM 4 mg/l (I)	MEM 8 mg/l (I)
15	137	115	4	n.c.
25	74	35	n.c.	n.c.
50	22	n.c.	n.c.	n.c.

MEM = meropenem, n.c. = sin colonias, S = sensible, I = intermedia, por ejemplo, $2 < I \leq 8$. MIC de MEM en ausencia del ejemplo 26 > 32 mg/l. MIC de MEM en presencia de 31,25 µM, 50 µM y 100 µM del ejemplo 26 = 0,125 mg/ml.

Ejemplo 206 - Unión a proteínas del ejemplo 26

Para determinar las propiedades de unión a proteína del ejemplo 26, se utilizó el kit de unión a proteínas Transil^{XL} (Sovicell). Las enzimas del kit se inmovilizan en una fase sólida. Se incubaron alícuotas de 500 µM del ejemplo 26 durante 12 minutos con agitación (1.200 rpm) a diferentes concentraciones de albúmina de suero humano y α₁-glicoproteína ácida (AGP) en una proporción de 24:1 (hasta 140 µM). Se incluyó tampón sin inhibidor como control. Después de la incubación, las suspensiones se centrifugaron y se diluyeron 1:10 en tampón HEPES 50 mM a pH 7,5 suplementado con Zn²⁺ 1 µM y VIM-2 (concentración final 1 nM). Se dejó incubar la enzima y el patrón durante 10 y 30 minutos a 25 °C y se midió la actividad enzimática residual añadiendo nitrocefina como sustrato indicador (concentración final de 50 µM). Se registró la absorbancia a 482 nm y 25 °C y se calculó la actividad enzimática residual.

Resultados:

La figura 5 muestra los resultados del estudio de la unión a proteínas del ejemplo 26. Las barras indicadas como 0 en la concentración de proteínas son los resultados para la inhibición de VIM-2 sin presencia de proteínas.

Conclusión:

Los resultados muestran que la unión a proteínas no afecta a la actividad inhibidora del ejemplo 26 en VIM-2 en cualquiera de las concentraciones de proteína.

Ejemplo 207 – Capacidad de restauración del zinc de la NDM VIM-2 después de la incubación *in vitro* con el ejemplo 26

Se utilizaron columnas de desalación PD-10 que comprendían resina de exclusión por tamaño Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences) para estudiar la irreversibilidad de la interacción entre el ejemplo 26 y la metalo-β-lactamasa VIM-2. La fase estacionaria retiene compuestos de bajo peso molecular y excluye moléculas con un peso molecular superior a 10 kD. El eluyente utilizado fue tampón HEPES 50 mM tratado con Chelex, pH 7,5. En el experimento 207A, se hizo pasar una solución de VIM-2 50 nM a través de una columna. La actividad enzimática

hacia un patrón fue la misma antes y después del paso por la columna. En el experimento 207B, se cargó una solución de 50 mg/l del ejemplo 26 en una columna PD-10 y se mostró analíticamente (de manera espectrofotométrica, HPLC) que el ejemplo 26 estaba completamente retenido en la columna. Por tanto, la fracción eluida solo contiene la enzima pura o la enzima que se ha mezclado con el inhibidor antes del tratamiento con la columna PD10. En el experimento 207C, se incubó una solución de VIM-2 50 nM y el ejemplo 26 140 mg/l en hielo durante 1 hora. En todos los experimentos, se tomaron 16 alícuotas de 250 µl del resto de la columna PD-10 y se analizó la actividad enzimática. La actividad enzimática se midió añadiendo nitrocefina como sustrato indicador (concentración final de 50 µM).

Resultados:

Los resultados se proporcionan en las figuras 6 y 7. Se observó (figura 6) que ninguna de las fracciones eluidas del ejemplo 207B tenía un efecto inhibitor sobre la enzima. Las fracciones eluidas 5-12 de 207A presentaron actividad enzimática completa, tal como se esperaba. De las fracciones eluidas del ejemplo 207C, la fracción 5 mostró sólo un 33 % de actividad enzimática residual.

Conclusión: el experimento muestra que el ejemplo 26 inhibe de manera irreversible VIM-2.

En el ejemplo 207D, a alícuotas que contenían 15 nM de enzima deteriorada del ejemplo 207C se les añadió ZnSO₄ en concentraciones que variaban de 0 a 100 µM. Los resultados se muestran en la figura 7. La actividad enzimática se pudo restaurar solo al 40 %. Para investigar si condiciones más extremas dependientes del tiempo y dependientes de la concentración podrían restaurar la actividad enzimática, se utilizaron alícuotas con concentraciones finales de enzima tratada en columna 30 nM y Zn²⁺ 1.000 µM en hielo y a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado. No se observó ningún aumento de la actividad enzimática en ningún momento del experimento.

Conclusión:

El experimento muestra que la inhibición irreversible de VIM-2 por el ejemplo 26 no fue únicamente una consecuencia de una eliminación reversible de Zn²⁺ de la enzima.

Ejemplo 208 – Capacidad de restauración del zinc de la NDM VIM-2 después de la incubación *in vitro* con el ejemplo 26 en comparación con la incubación con los patrones TPEN y EDTA

Se siguió el protocolo del ejemplo 207 para investigar el efecto de concentraciones crecientes del compuesto TPEN de la bibliografía sobre la enzima VIM2 purificada, y se comparó con el quelante de PAC, EDTA, a una concentración de 100 µM (figura 8A). En un experimento paralelo, se investigó cómo las concentraciones crecientes correspondientes del ejemplo 26 afectaban a la enzima VIM-2 en comparación con el quelante de PAC, EDTA, a una concentración de 100 µM (figura 8B).

Conclusión:

Los experimentos muestran que VIM-2 fue inhibida de manera irreversible por los quelantes de 2-piridilo selectivos de zinc, TPEN y el ejemplo 26, y que la inhibición no era únicamente una consecuencia de la eliminación reversible del Zn²⁺ de la enzima. Los experimentos también muestran que el quelante típico de PAC, EDTA, no inhibió VIM-2 de forma irreversible.

Ejemplo 209 - Interacción *in vitro* del ejemplo 26 con enzimas humanas que contienen zinc - comparación con el quelante de APC, EDTA

Protocolo:

A efectos de investigar si los ejemplos representativos de la presente invención son capaces de interaccionar con una enzima humana que contiene metal, se incubó el ejemplo 26 durante 30 minutos a diferentes concentraciones que variaban de 62,5 a 500 µM a 25 °C con 0,4 ng/µl de enzima. La actividad enzimática se midió añadiendo nitrocefina como sustrato indicador (concentración final de 50 µM). La velocidad de reacción inicial se midió a 405 nm. Se incluyó EDTA como un ejemplo representativo de la clase de quelantes de APC descrita anteriormente.

Resultados y conclusión:

La figura 9 resume los resultados de la investigación. Los datos sugieren que el compuesto del ejemplo 26 no interacciona con la rH glioxilasa II, mientras que el quelante de APC, EDTA, sí lo hace.

Ejemplo 210 - Estabilidad en solución de un inhibidor a base de péptidos (ejemplo 195) en comparación con un inhibidor no peptídico en la presente invención (ejemplo 26)**Protocolo:**

El ejemplo 195 y el ejemplo 26 se almacenaron hasta 8 meses a 2-8 °C y se midió la estabilidad de manera indirecta realizando estudios de MIC, según el protocolo del ejemplo 187, a una concentración final de 25 mg/l de los inhibidores. Se utilizaron *P. aeruginosa* que albergaba VIM-2 y *K. pneumoniae* que contenía NDM-1 como dos cepas indicadoras.

Resultados y conclusiones:

Los resultados se resumen en la figura 10. Con el ejemplo 195, se observó una pérdida de actividad después de un almacenamiento de 5 meses, y después de 8 meses la actividad estaba ausente. Por otro lado, el ejemplo 26 no mostró pérdida de actividad, ni siquiera después de un tiempo de almacenamiento de 8 meses. Estos datos indican que un ejemplo no peptídico representativo (ejemplo 26) de la presente invención tiene una estabilidad significativamente mejor en solución en comparación con un inhibidor peptídico que comprende el mismo quelante. El quelante peptídico todavía puede manipularse como un producto farmacéutico, por ejemplo, en forma liofilizada.

Ejemplo 211 - Toxicidad *in vivo* del ejemplo 26 y ejemplo 195 en ratones sanos**Protocolo:**

Se aclimataron ratones hembra Balb/c (4 semanas de vida, de aproximadamente 20 g, Charles River, L'Arbresle, Francia) durante 4 días en la instalación para animales antes del inicio de los experimentos. Se prepararon soluciones madre con una concentración de 25,6 mg/ml de los dos compuestos de prueba, ejemplo 26 y ejemplo 195. Grupos de 6 ratones fueron no tratados o tratados con 200 µl del ejemplo 26 o el ejemplo 197 por vía intraperitoneal una vez a la semana con dosis crecientes cada vez. Se siguieron los pesos individuales cuatro días a la semana. El peso relativo se calculó como la proporción entre el peso del día y el peso del primer día. El protocolo para experimentos en ratones fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Lyon. Antineo (www.antineo.fr) realizó experimentos de toxicidad. Después de 43 días, los ratones de los dos grupos de prueba habían recibido una dosis acumulada de 252 mg/kg.

Tabla 12 - Los cambios en el peso corporal durante el experimento

Peso relativo de los ratones (% ± SEM)				
Tratamiento (mg/kg)	Día	Ratones no tratados	Ejemplo 26	Ejemplo 195
4	1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
8	8	102 ± 4	101 ± 0	98 ± 5
16	16	109 ± 3	105 ± 0	103 ± 3
32	22	107 ± 3	105 ± 0	103 ± 3
64	29	112 ± 4	106 ± 0	106 ± 6
120	36	114 ± 9	109 ± 0	110 ± 8
Sin inyección, indicador	43	114 ± 9	107 ± 0	110 ± 8

Resultados:

Los cambios en el peso corporal de los ratones durante el experimento se proporcionan en la tabla 12. Después de 43 días, ningún ratón había muerto, y no se observaron signos clínicos de toxicidad. La dosis acumulada recibida en los dos grupos de prueba fue de 252 mg/kg. Se observó una tendencia de crecimiento reducido del peso corporal en comparación con el grupo de control durante el período de prueba. A la dosis más elevada de 128 mg/kg, la reducción del crecimiento del peso corporal estuvo dentro del error estándar de la media (SEM) en comparación con el grupo no tratado.

Ejemplo 212 - Estudio de infección *in vivo* del ejemplo 26 en ratones**Propósito del estudio:**

El propósito de este estudio fue investigar la sinergia entre un ejemplo típico de la presente invención y una carbapenema del estado de la técnica en una cepa bacteriana gram-negativa multirresistente clínicamente relevante que albergaba una metalo-β-lactamasa en el tratamiento de ratones vivos infectados con la cepa bacteriana. El compuesto elegido fue el ejemplo 26 y la carbapenema elegida fue el antibiótico β-lactámico meropenem (MEM) clínicamente relevante. La cepa bacteriana elegida fue un aislado clínico de la cepa 50752501 de *Klebsiella pneumoniae* que albergaba NDM-1. La dosis de meropenem seleccionada en el presente estudio fue de 33

mg/kg. Se observó que esta dosis tiene un efecto menor sobre la reducción de las cargas bacterianas, pero sigue siendo una dosis clínicamente relevante para el tratamiento de la cepa de *K.pneumoniae* susceptible.

Material y procedimientos:

5

Materiales

- 36 ratones hembra NMRI exogámicos, de 26-30 gramos (Harlan)
- Apodan® (ciclofosfamida 1 g) Lote 6F0931 (caducidad 06/2019)
- 10 • Meropenem, Mylan 1 g 51B0424 (caducidad 06/2019)
- NZ148, lote CS3071 recibido 030317
- Placas de agar con sangre de caballo al 5 % (SSI: caducidad 07-06-2017)
- Solución salina estéril al 0,9 % (SSI:)
- Agua MilliQ estéril (SSI.)
- 15 • Nurofen® Junior (20 mg/ml, Novartis)
- Mezcla Zoetil
- Tubos Eppendorf recubiertos con EDTA
- Tubos de vidrio Vidal

20 Instalaciones para animales de laboratorio y alojamiento de ratones

La temperatura y la humedad se registraron diariamente en las instalaciones para los animales. La temperatura fue de 22 °C +/- 2 °C y se puede regular mediante calentamiento y enfriamiento. La humedad fue del 55 +/- 10 %. Los cambios de aire por hora fueron de aproximadamente 8-12 veces (70-73 veces por hora dentro de las jaulas) y el período de luz/oscuridad fue en un intervalo de 12 horas de 6 a.m. a 6 p.m./6 p.m. a 6 a.m. Los ratones tuvieron acceso libre al agua potable de calidad doméstica y alimentos (dieta Teklad Global 2916C-Envigo) y, de manera ocasional, cacahuets y semillas de girasol (Køge Korn A/S). Los ratones se alojaron en jaulas de IVC de tipo 3 con lecho de Tapvei. Además, a los animales se les ofreció material de nidificación Enviro-Dri y casas de cartón (Bio-serv).

30

Preparación de ciclofosfamida

Se disolvió un total de 1 g de ciclofosfamida (una ampolla de Apondan, 1 g) en 50 ml de agua ~ 20 mg/ml en cada día de utilización. Esta solución madre se diluyó adicionalmente hasta 11 mg/ml (16,5 ml de 20 mg/ml + 13,5 ml de solución salina) para su utilización en el día -4 o hasta 5,5 mg/ml (8,25 ml de 20 mg/ml + 21,75 ml de solución salina) para utilizar el día -1.

35

Tratamiento de ratones con ciclofosfamida

40 Los ratones se volvieron neutropénicos mediante la inyección de 0,5 ml de solución de ciclofosfamida por vía intraperitoneal 4 días (aproximadamente 200 mg/kg) y 1 día (aproximadamente 100 mg/kg) antes de la inoculación.

Inoculación de ratones

45 Se suspendieron colonias recientes de la noche de una placa de agar con sangre de caballo al 5 % y se diluyeron en solución salina estéril hasta aproximadamente 10^7 UFC/ml. Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con 0,5 ml de la suspensión. Aproximadamente media hora antes de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 µl de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml correspondiente a aproximadamente 30 mg/kg) como alivio del dolor.

50 Tratamiento de ratones con meropenem y ejemplo 26

Se disolvió un vial con Meropenem, 1 gramo, en solución salina a 50 mg/ml y se diluyó adicionalmente hasta 5 mg/ml en solución salina.

55 Se disolvieron dos viales del ejemplo 26 con 25,7 y 23,7 mg, respectivamente, en PBS a pH 7,4 hasta 15 mg/ml y se combinaron. El pH se verificó a 7,5. La solución madre de 15 mg/ml se diluyó adicionalmente hasta 5 mg/ml y 1,5 mg/ml en PBS a pH 7,4.

60 Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con soluciones de 0,2 ml del ejemplo 26 correspondientes a 10, 33 y 100 mg/kg. 30 minutos más tarde, los ratones se trataron con 33 mg/kg de meropenem o vehículo (véase la tabla 13).

Puntuación clínica de ratones

65 Los ratones se observaron durante el estudio y se puntuaron basándose en su comportamiento y signos clínicos.

Puntuación:

0 Saludable

- 5 1 Signos clínicos menores de infección (movimientos más lentos, piloerección leve en la piel)
 2 Signos moderados de infección (falta de curiosidad o cambio de actividad, piloerección en la piel, cambio de posición corporal)
 3 Signos graves de infección (movimientos reducidos, piloerección en la piel, ligera opresión en los ojos, vientre encogido, cambio de posición del cuerpo).
 10 4 Signos graves de infección (movimientos rígidos, piloerección en la piel, opresión en los ojos, frío, dolor). Sacrificado.
 5 El ratón no se mueve, está frío, acostado de lado. Sacrificado

Muestreo

- 15 Los recuentos de colonias se determinaron a partir de sangre y líquido peritoneal a 1 y 5 horas después de la inoculación. Los ratones se anestesiaron con mezcla de Zoletil y se recogió sangre del corte axilar en tubos Eppendorf recubiertos con 1,5 ml de EDTA. Los ratones se sacrificaron inmediatamente después de la toma de muestras de sangre y se inyectó i.p. un total de 2 ml de solución salina estéril y se masajeó suavemente el abdomen antes de abrirlo y tomar una muestra de líquido con una pipeta. A continuación, cada muestra se diluyó en serie 10 veces en solución salina y se aplicaron puntos de 20 µl, que variaban desde sin diluir hasta una dilución de 10^6 , en placas de agar por duplicado. Además, se esparcieron 100 µl de sangre sin diluir de los 4 grupos de dosis más elevada de meropenem sobre una placa separada para obtener el límite de detección más bajo posible. Todas las placas de agar se incubaron de 18 a 22 horas a 35 °C en aire ambiente. El programa general de tratamiento y muestreo se proporciona en la tabla 13. Los recuentos de colonias se proporcionan en la tabla 14 y se visualizan en las figuras 11 y 12.

Tabla 13 - Programa de tratamiento y muestreo

Tratamiento con el ejemplo 26 T = 1	Tratamiento con meropenem T = 1,5	Muestreo T = 1	Muestreo T = 5
Ninguno	Ninguno	1-2-3-4	
10 mg/kg	33 mg/kg		5-6-7-8
33 mg/kg			9-10-11-12
100 mg/kg			13-14-15-16
10 mg/kg	Vehículo		17-18-19-20
33 mg/kg			21-22-23-24
100 mg/kg			25-26-27-28
Vehículo	33 mg/kg		29-30-31-32
Vehículo	Vehículo		33-34-35-36

Resultados:

- Los recuentos reales de las UFC de cada inóculo fueron como se pretendía, 7,44 $\log_{10}$ UFC/ml. Los ratones se trataron con el EJEMPLO 26 y meropenem solos o combinados. Se realizaron recuentos de colonias en sangre y líquido peritoneal 1 hora después de la inoculación correspondiente al inicio del tratamiento y 4 horas después del tratamiento. Los recuentos de UFC y la puntuación clínica para cada ratón individual se muestran en la tabla 14 y los valores de UFC también se presentan en las figuras 11 y 12.

- El tratamiento con 10-100 mg/kg del ejemplo 26 solo no dio lugar a una reducción de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo en sangre y líquido peritoneal. El tratamiento con meropenem solo dio lugar a niveles de UFC 2,5 y 2,2 $\log_{10}$ inferiores en comparación con el tratamiento con vehículo en la sangre y el líquido peritoneal, respectivamente. El tratamiento de combinación con el ejemplo 26 y meropenem dio lugar a niveles de UFC de 3,95-4,38 y 3,57-3,66 $\log_{10}$ inferiores en comparación con el tratamiento con vehículo en la sangre y el líquido peritoneal, respectivamente. Los niveles de UFC después del tratamiento de combinación fueron significativamente inferiores a los niveles de UFC después del tratamiento con meropenem solo ($p < 0,01$ en sangre y $p < 0,0001$ en líquido peritoneal).

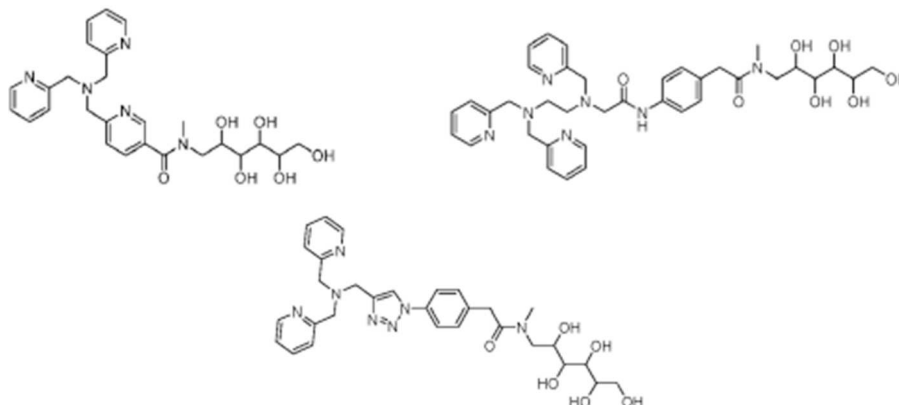
Tabla 14 - Recuentos de colonias en sangre y líquido peritoneal (LP) de ratones neutropénicos inoculados por vía intraperitoneal con *K.pneumoniae* 50752501

Identificación del ratón	Puntuación en la muestra	log UFC/ml en sangre	media	log UFC/ml en LP	media
1	1	3,98	4,39	6,81	6,77
2	1	5,10		6,72	
3	1	3,99		6,80	
4	1	4,51		6,74	
5	2	1,90	1,61	4,18	3,83
6	2	1,00		3,83	
7	2	1,85		3,60	
8	2	1,70		3,72	
9	1	1,78	1,26	3,88	3,80
10	1	1,78		3,80	
11	1	1,00		3,68	
12	1	0,50		3,85	
13	1	1,30	1,18	3,65	3,74
14	1	0,50		3,74	
15	1	1,90		3,92	
16	1	1,00		3,65	
17	2	6,02	5,88	7,92	7,79
18	2	5,70		7,68	
19	2	5,90		7,76	
20	2	5,89		7,81	
21	1	5,83	5,89	7,68	7,60
22	1	5,54		7,51	
23	1	6,78		7,88	
24	1	5,40		7,35	
25	1	5,83	5,84	8,24	7,93
26	1	6,05		7,89	
27	1	5,48		7,63	
28	1	6,02		7,98	
29	2	3,51	2,98	5,72	5,22
30	2	2,80		4,60	
31	2	3,51		5,30	
32	2	2,10		5,24	
33	2	5,60	5,56	7,40	7,40
34	2	5,90		7,48	
35	2	5,18		7,18	
36	2	5,57		7,54	

REIVINDICACIONES

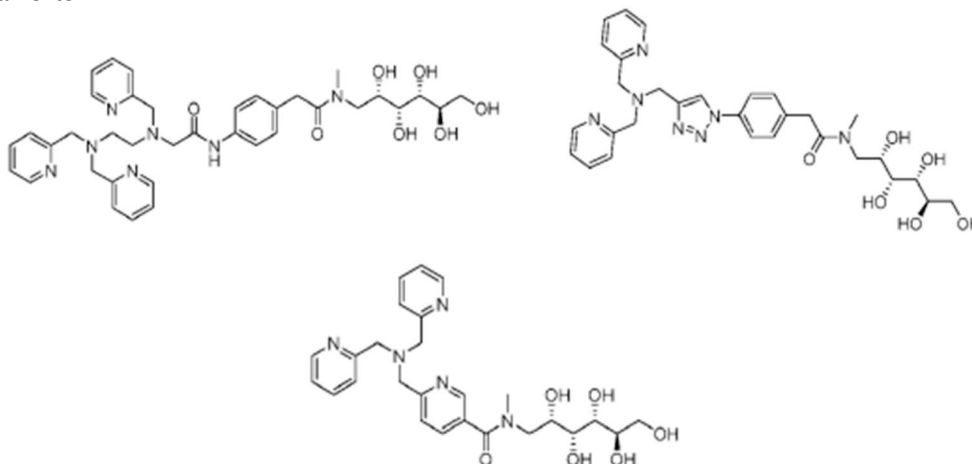
1. Compuesto seleccionado entre cualquiera de los siguientes, sus estereoisómeros y sus sales aceptables farmacéuticamente:

5



2. Compuesto, según la reivindicación 1, seleccionado entre cualquiera de los siguientes y sus sales aceptables farmacéuticamente:

10



15

3. Composición farmacéutica que comprende un compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, junto con uno o más portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente, y, de manera opcional, que incluye uno o más antioxidantes.

4. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o composición, según la reivindicación 3, para su utilización en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de dicho compuesto o composición en combinación con (de manera simultánea, por separado o de manera secuencial) un antibiótico β -lactámico.

25

5. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 4, en el que la infección está asociada con bacterias gram-positivas o gram-negativas que son resistentes a uno o más antibióticos.

6. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 4, en el que la infección está asociada con bacterias gram-negativas que son resistentes a uno o más antibióticos, por ejemplo, un antibiótico β -lactámico.

30

7. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que dichas bacterias comprenden metalo- β -lactamasas.

8. Compuesto o composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la infección está asociada con bacterias gram-negativas multirresistentes que albergan metalo- β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

35

9. Compuesto para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el compuesto se administra junto con un agente antibiótico carbapenémico y la infección está asociada con bacterias gram-negativas

40

resistentes a carbapenemas que albergan metalo- β -lactamasas, o con bacterias gram-negativas resistentes a carbapenemas que albergan carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*, KPC y/o metalo- β -lactamasas.

- 5 10. Compuesto para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el compuesto y el antibiótico β -lactámico se proporcionan en la misma formulación.
11. Compuesto para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el compuesto y el antibiótico β -lactámico se proporcionan en diferentes formulaciones.
- 10 12. Formulación farmacéutica que comprende un compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, junto con un antibiótico β -lactámico y, de manera opcional, uno o más postadores o excipientes aceptables farmacéuticamente.
- 15 13. Kit que comprende:
 - (i) un primer recipiente que contiene un compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 3; y
 - (ii) un segundo recipiente que contiene un antibiótico β -lactámico.
- 20 14. Compuesto para su utilización, formulación farmacéutica o kit, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en los que dicho antibiótico β -lactámico se selecciona entre los siguientes: penamas, cefemas, monobactamas, penemas, carbapenemas y clavamas.
- 25 15. Compuesto para su utilización, formulación farmacéutica o kit, según la reivindicación 14, en los que dicho antibiótico β -lactámico es un carbapenema.

Figura 1

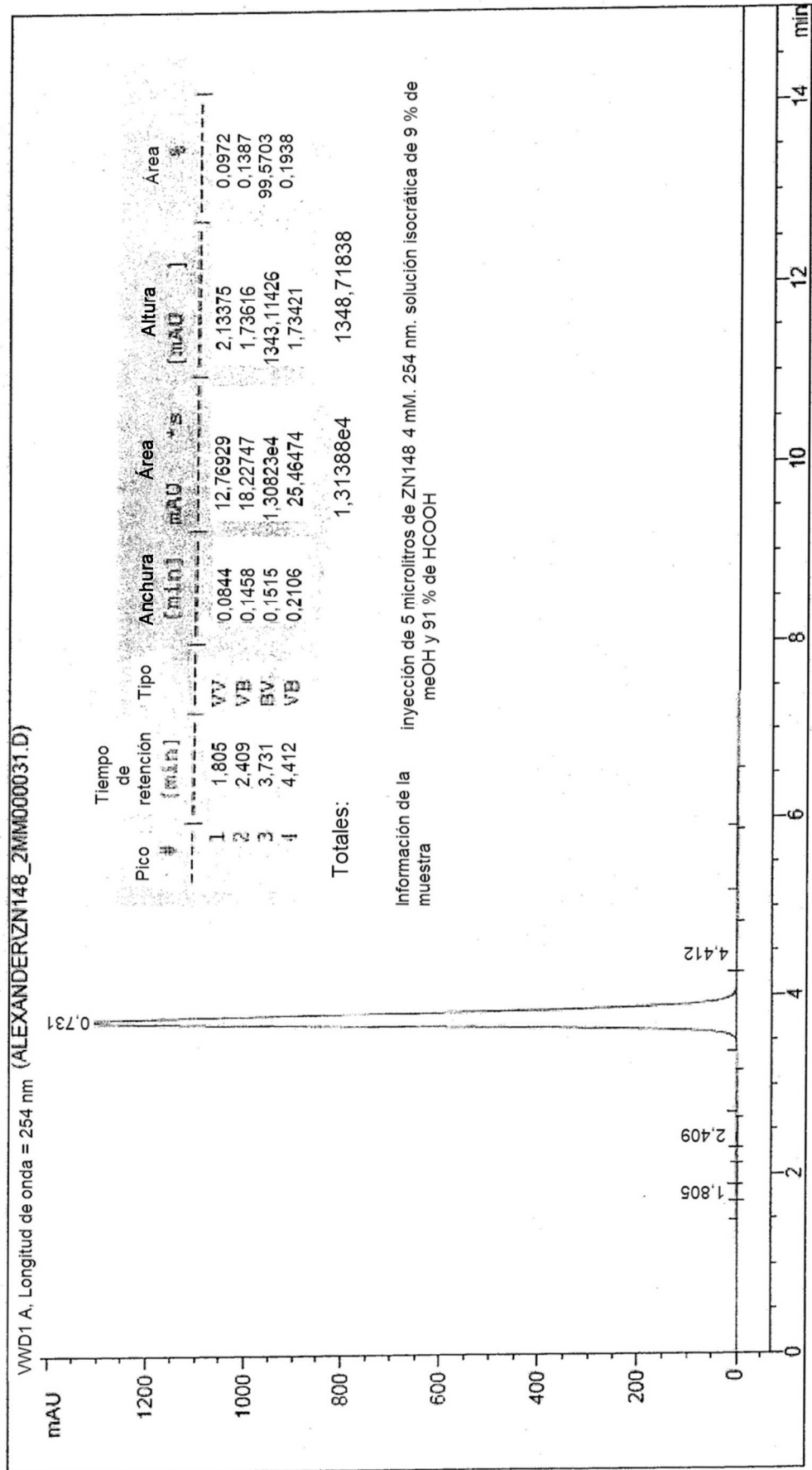


Figura 2

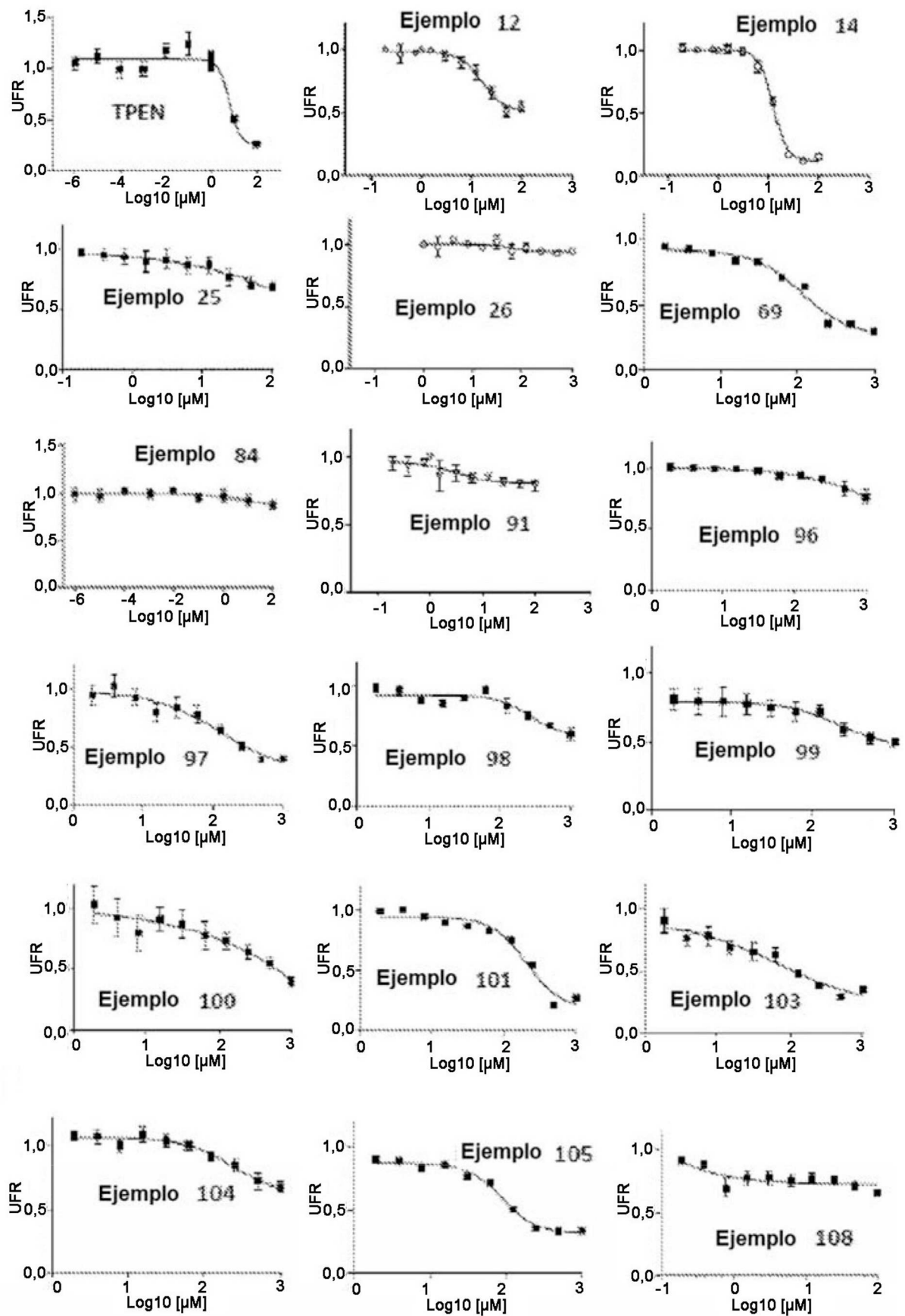
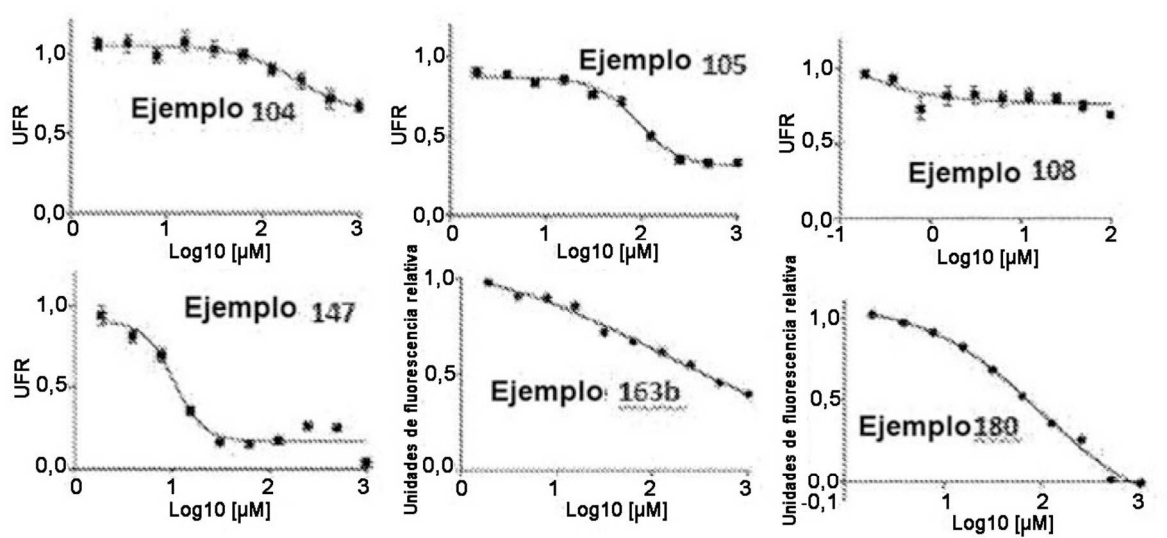


Figura 3



Ejemplos a base de péptidos para la comparación

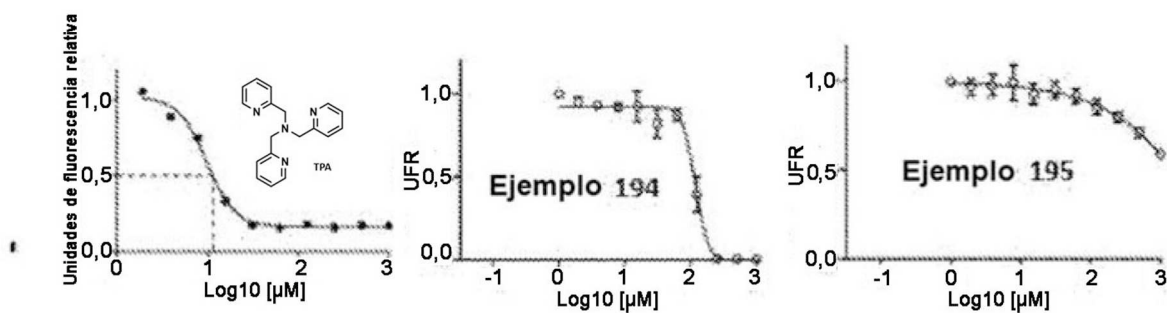
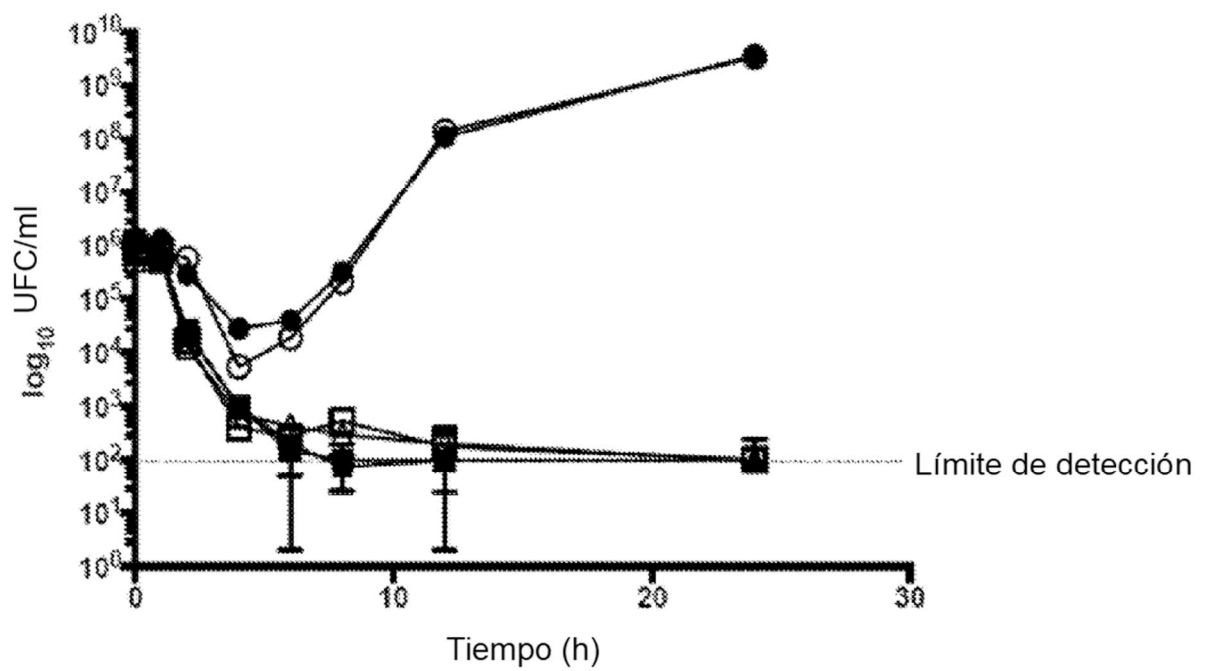


Figura 4



- meropenem 4 mg/l
- meropenem 4 mg/l + ejemplo 26 25 mg/ml
- ▲ meropenem 4 mg/l + ejemplo 26 50 mg/ml
- meropenem 4 mg/l (placa de meropenem)
- meropenem 4 mg/l + ejemplo 26 25 mg/ml (placa)
- △ meropenem 4 mg/l + ejemplo 26 50 mg/ml (placa)

Figura 5

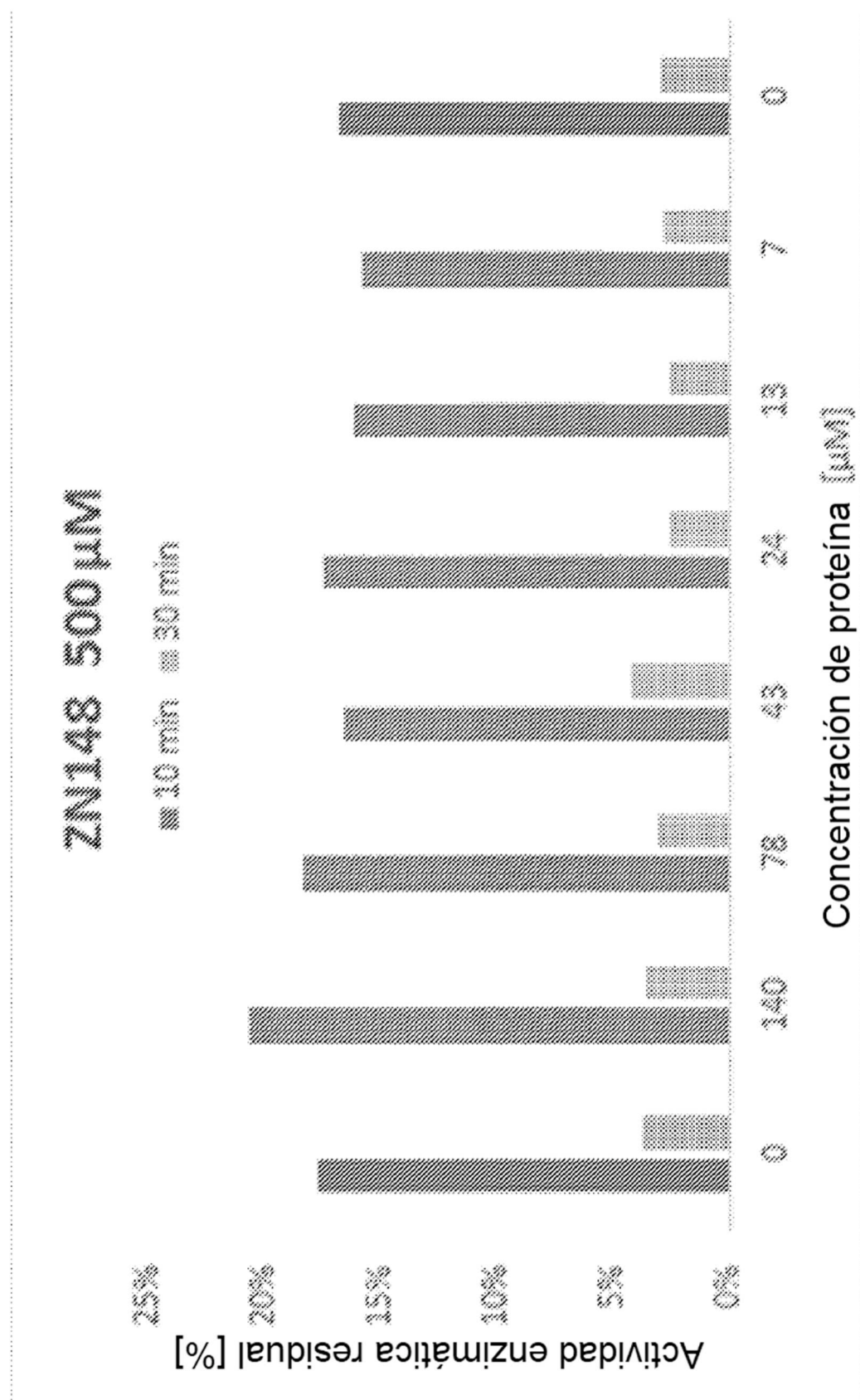


Figura 6

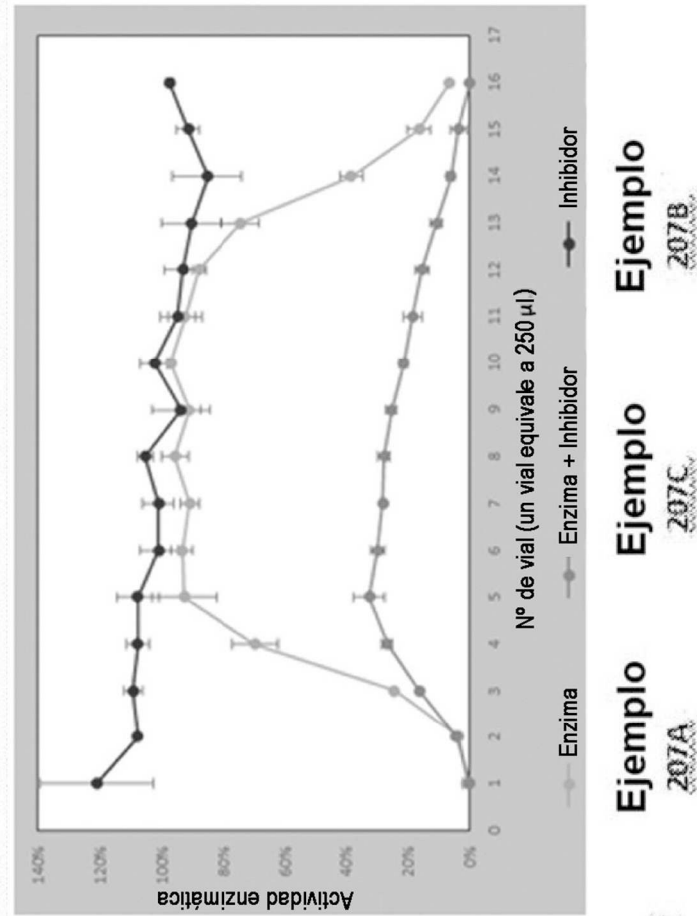
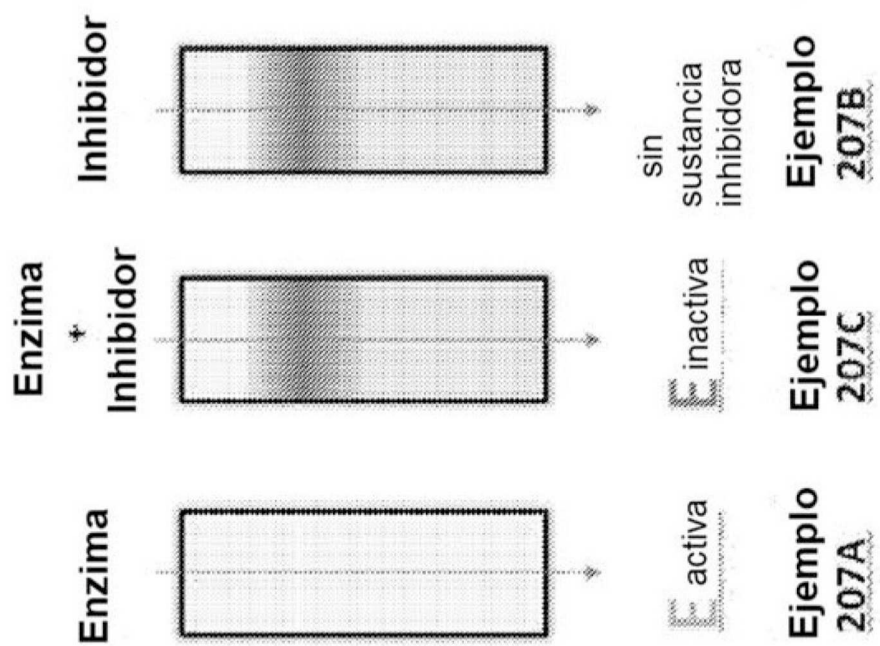
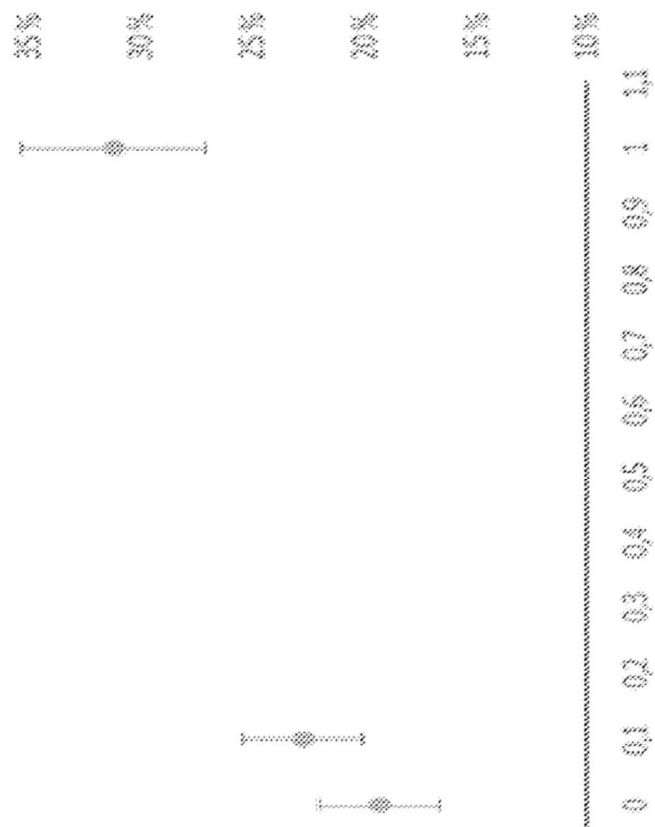
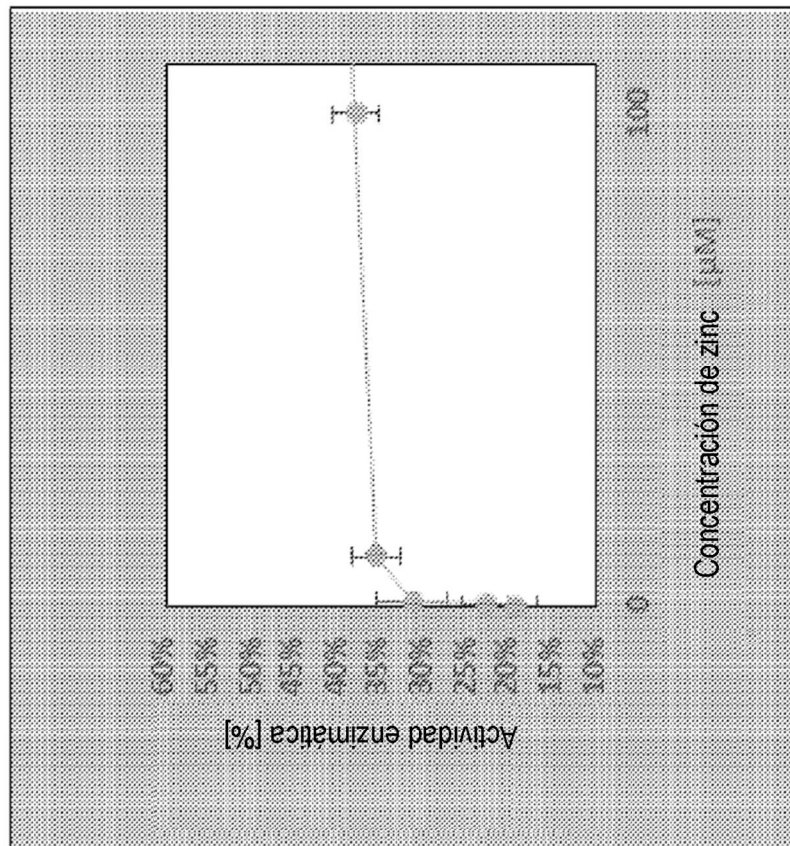


Figura 7



Ejemplo 207D a concentración de zinc²⁺ de 0 a 1 μM (intervalo inicial de la figura 5B)



Ejemplo 207D a concentración de zinc²⁺ de 0 a 100 μM

Figura 8

Figura 8A

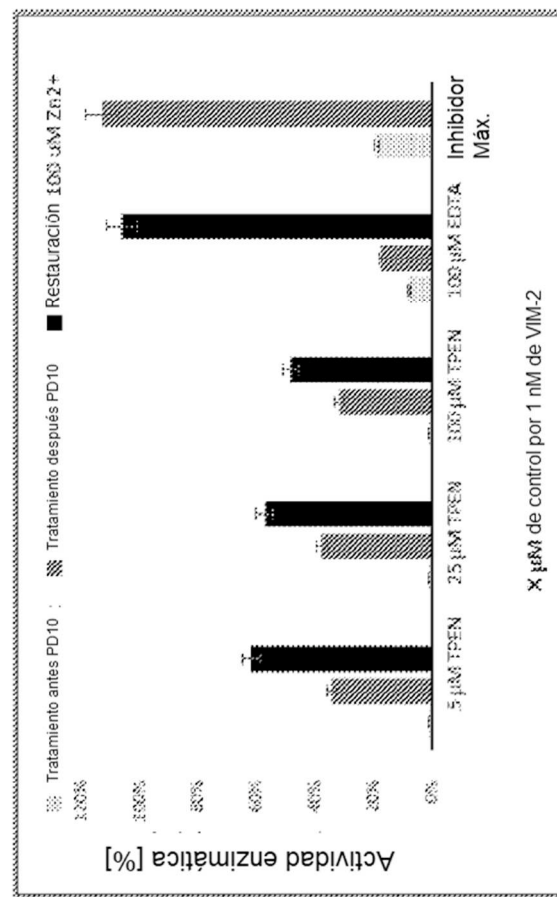


Figura 8B

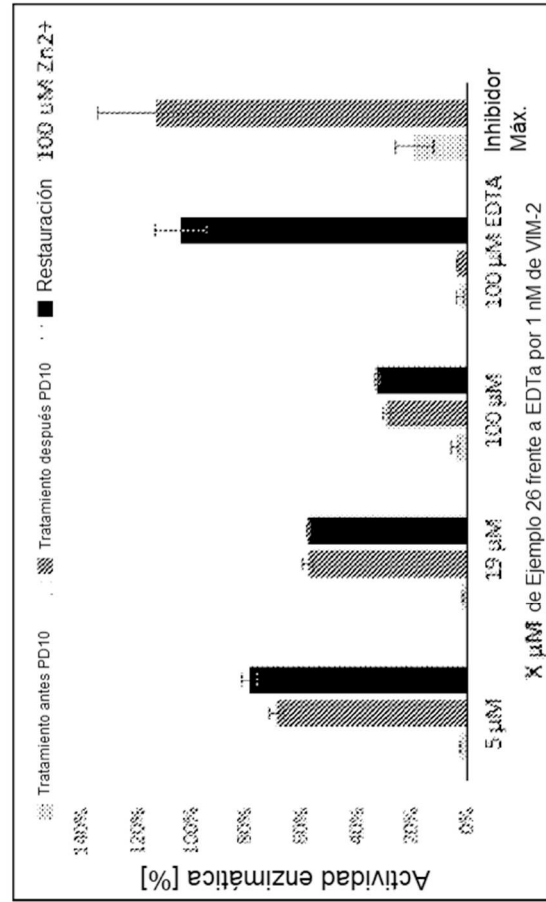


Figura 9

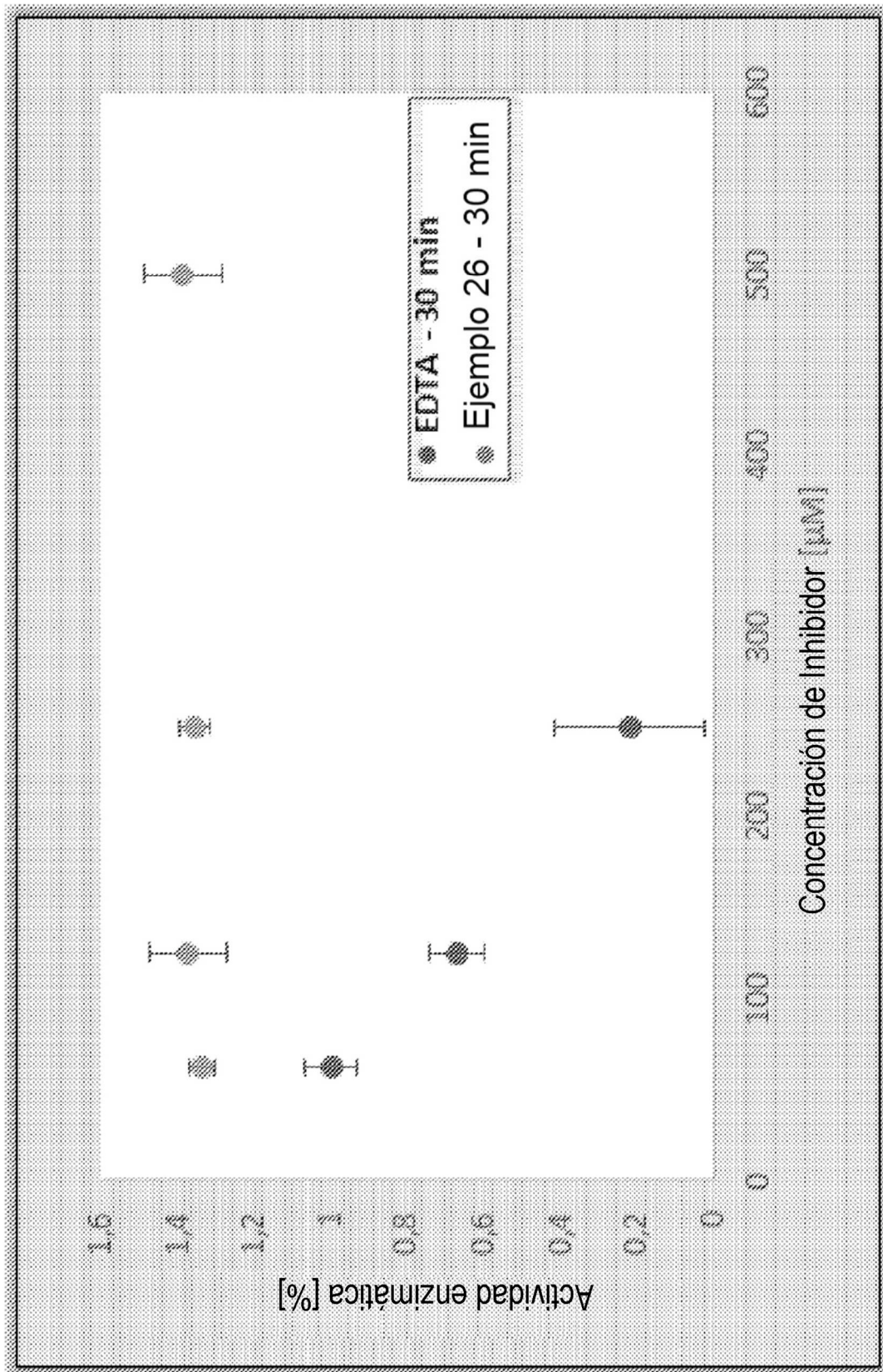


Figura 10

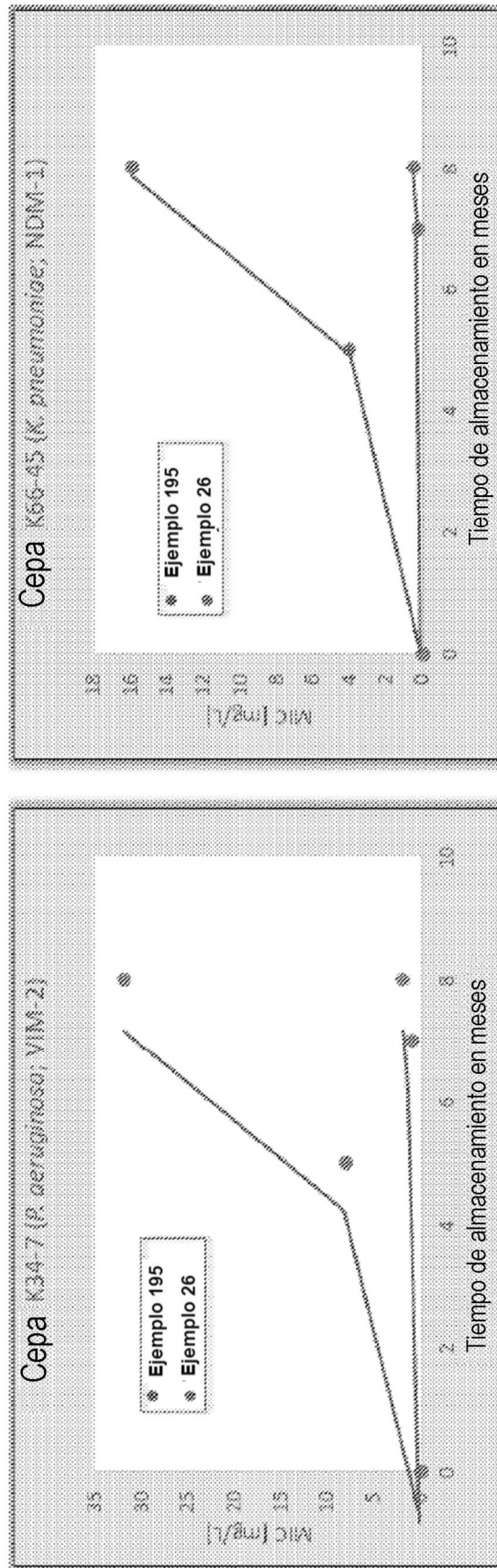


Figura 11

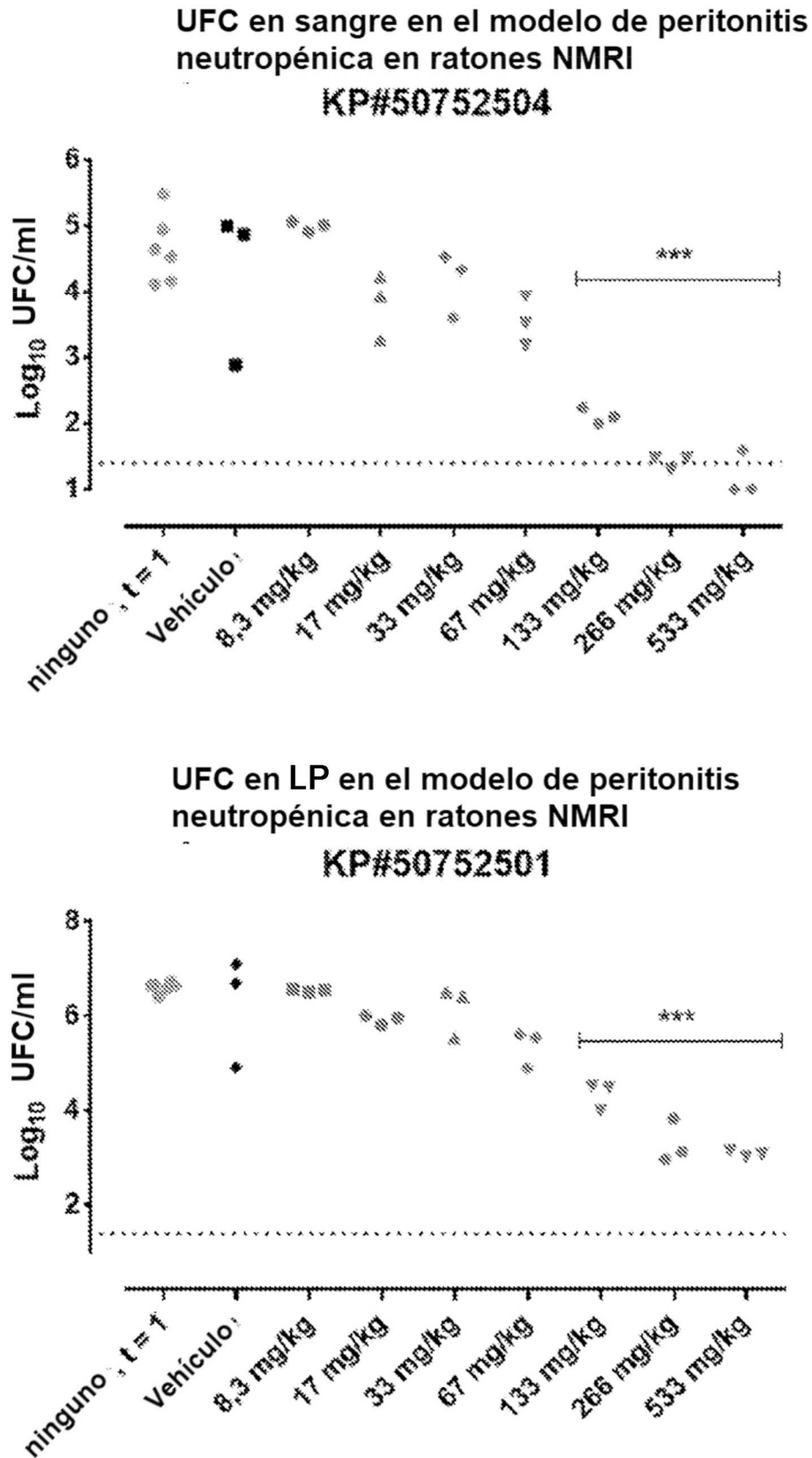
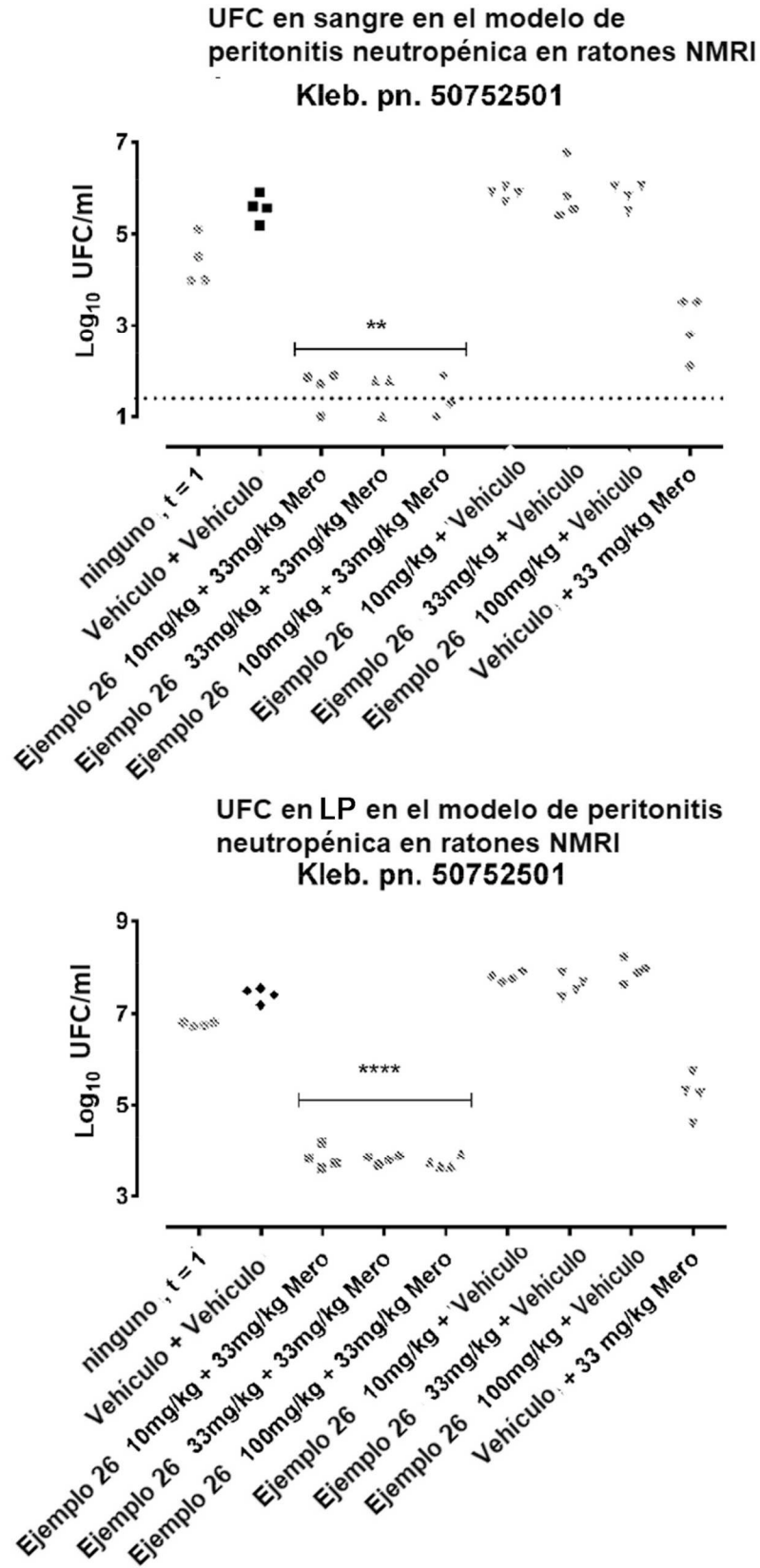


Figura 12



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 98117639 A [0024]
- WO 9730027 A [0024]
- WO 9840056 A [0024]
- WO 9839311 A [0024]
- WO 97110225 A [0024]
- WO 00076962 A [0025]
- WO 01030148 A [0025]
- WO 01030149 A [0025]
- WO 2006117660 A [0026]
- WO 200160349 A [0026] [0032]
- US 6410570 B [0026] [0032]
- WO 2009140215 A [0026] [0032]
- WO 201163394 A [0027] [0032]
- WO 2009155088 A [0027] [0032]
- WO 200471425 A [0027] [0032]
- WO 200643153 A [0027] [0032]
- WO 2006109069 A [0032]
- US 20030225155 A [0032]
- WO 2012088283 A [0037]
- WO 2012088383 A [0037]
- EP 1724263 A [0061] [0088]
- WO 2015049546 A, Rongved [0078] [0079] [0104] [0465]
- WO 2016003929 A, Reddy [0370] [0374] [0376] [0419]
- WO 201614939 A, Hecjer [0372]
- WO 2016003929 A1, Reddy [0400]

Literatura no patente citada en la descripción

- PRASAD et al. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2014, vol. 28 (4), 357-363
- SHAI et al. *ChemMedChem*, 2015, vol. 10 (3), 441-450
- BERTINI et al. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, vol. 111, 150-156
- MARET. *Biometals*, 2011, vol. 24, 411-418
- QUE et al. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, 1517-1549
- PETERSON et al. *Mol. Biol.*, 2009, vol. 388, 144-158
- BARKALIFA et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, vol. 618, 15-2
- MARET et al. *Mol. Med.*, 2007, vol. 13, 371-375
- BOZYM et al. *Exp. Biol. Med.*, 2010, vol. 235, 741-750
- Zinc. EMSLEY, J. *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford University Press, 2001
- KHAN et al. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 2014, vol. 13, 16, 1-16, 6
- LIAO et al. *Toxicology Letters*, 2011, vol. 204, 108-117
- CHO et al. *Neurotox. Res.*, 2010, vol. 17, 156-166
- YU et al. *Zebrafish*, 2013, vol. 10 (1), 30-35
- HUANG. *RSC Advances*, 2014, vol. 4 (94), 52088-52099
- CHANG. *Neuropharmacology*, 2015, vol. 92, 146-157
- SAUVAGE E. et al. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, vol. 32, 234-258
- WALSH et al. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, S8-S14
- JOHNSON AP. et al. *J. Med. Microbiol.*, 2013, vol. 62, 499-513
- WALSH TR. et al. *Lancet Infect. Dis.*, 2011, vol. 11, 355-362
- DRAWZ SM. et al. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 23, 160-201
- DRAWZ SM. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014
- KING AM. et al. *Nature*, 2014, vol. 510, 503-506
- DIENER et al. *Stroke*, 2008, vol. 39 (6), 1774-1778
- SHAH et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2009, vol. 28 (84), 1-10
- ROUFFET et al. *JACS*, 2010, vol. 132, 8232-8233
- CHUN et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, vol. 268, 652-656
- DING et al. *Cancer Letters*, 2008, vol. 271, 251-259
- LEE et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, vol. 362, 766-772
- ZUO. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, vol. 113, 2567-2575
- World Health Organization reports, 1999
- DE KRAKER MEA. et al. *PLoS Med.*, 2011, e1001104
- O'NEILL J. *Tackling drug-resistant infections. Final report and recommendations*
- THEURETZBACHER U. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011, vol. 11, 433-438
- PATEL et al. *Front. Microbiol.*, 2013, vol. 4, 48
- BUTLER MS. et al. *J. Antibiotics*, 2013, vol. 66, 571-591
- BUSH K. et al. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2011, vol. 65, 455-478
- DRAWZ et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, 1835-1846
- PALZKILL T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2013, 91-404
- ATTILI et al. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, vol. 6 (6), 2569-2578
- XU et al. *JACS*, 2010, vol. 132, 601
- GANTA et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, vol. 19, 1618-1622
- HUANG et al. *Metalomics*, 2013, vol. 5, 648-655
- DONADELLI et al. *J. Cell. Biochem*, 2008, vol. 104, 202-212
- SHERIDAN et al. *In Vitro & Molecular Toxicology*, 1998, vol. 11 (2), 161-169

- **MARTINEZ.** *Future Med. Chem.*, 2012, vol. 4 (3), 347-59
- **PAGE et al.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 66, 867-73
- *Biol. Pharm. Bull.*, 1997, vol. 20, 1136
- *FEMS Microbiology Letters*, 1997, vol. 157, 171
- *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, vol. 41, 135
- *Chem. Commun.*, 1998, 1609
- *Biochem.*, 1998, vol. 1 (331), 703
- **NAPOLITANO et al.** *Journal of Bacteriology*, 2012, 2426-2436
- **ELLISON et al.** *PLOS ONE*, 2013, vol. 8, e75389
- **CONRADY et al.** *PNAS*, 2008, vol. 105 (49), 19456-19461
- **PEYMANI et al.** *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 64, 69-71
- **HEYDARI et al.** *Jundishapur J Microbiol.*, 2015, vol. 8 (3), e15514
- **NIKAIDO et al.** *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, vol. 36, 340-363
- **LIANG et al.** *J. Med. Chem.*, 2013, vol. 56, 6954-6966
- **GRAHAM et al.** *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, 18377-18389
- **SHI et al.** *Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment. Food Additives & Contaminants*, 2014, vol. 31 (2), 173-186
- **SMITH, R. M. ; MARTELL, A. E.** NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 2.0. U.S. Department of Commerce, 1995
- **WITESKA et al.** *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2011, vol. 35 (2), 99-104
- **IGBOKWE et al.** *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 2015, vol. 26 (2), 171-9
- **P. M. WAX.** *J. Med. Toxicol.*, 2013, vol. 9, 303-307
- **R. S. LANIGAN ; T. YAMARIK.** *International Journal of Toxicology*, 2002, vol. 21 (2), 95-142
- **BENOIST, E.** *Carbohydrate Research*, 2011, vol. 346 (1)
- **SCHÖNAUER et al.** *J. Med. Chem.*, 2016, vol. 59, 5695-5705
- **CHATTERJEE et al.** *Nature America*, 2012, vol. 7 (3), 432-445
- **OVADIA et al.** *Molecular Pharmaceutics*, 2011, vol. 8, 479-487
- **YANG et al.** *Inorg. Chem.*, 2000, vol. 39, 2397-2404
- **PRAKASH, V. ; SURESH, M. S.** *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2013, vol. 4 (4), 1536-1550
- **TEETHAISONG et al.** *Journal of Applied Microbiology*, 2016, vol. 121, 408-414
- **POLLINI et al.** *Antimicrob Agents Chemother.*, 2013, vol. 57 (1), 410-6
- **SENER et al.** *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, 1124-1127
- **PORRES-OSANTE et al.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014, vol. 79 (3), 399-400
- **F. HANSEN et al.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014, vol. 79, 486-488
- **KIKUCHI et al.** *Inorg. Chem.*, 2009, vol. 48 (16), 7630-7638
- **CANZONIERO et al.** *Neuropharmacology*, 2003, vol. 45, 420-428
- **WEI, L. et al.** *Inorganic Chemistry*, 2005, vol. 44 (7)
- **R.D. HANCOCK ; A.E. MARTELL.** *Chem. Rev.*, 1989, vol. 89, 1875-1914
- **ÅSTRAND et al.** *Tetrahedron*, 2013, vol. 69, 8645-8654
- **G. ANDEREGG et al.** *Helv. Chim. Acta*, 1977, vol. 60, 123-140
- **J. T. SIMMONS et al.** *Inorg. Chem.*, 2013, vol. 52, 5838-5850
- **CHENG, K.T.** *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD).* National Center for Biotechnology Information, 2006
- **E. TOTH et al.** *Inorg. Chim. Acta*, 1996, vol. 249, 191-199
- **XU et al.** *Tetrahedron*, 2009, vol. 65, 2307-2312
- **NG K.K.F. ; VANE J.R.** *Nature*, 1967, vol. 216, 762-766
- **K.S. SIDDIQ et al.** *Chin. J. Chem.*, 2009, vol. 27, 1755-1761
- **KUCHARCZYK et al.** *Inorganic Biochemistry*, 2008, vol. 102, 936-942
- **A. ZARKAN et al.** *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, 19602
- **YE, Z. et al.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, vol. 26 (3)
- **ASTRAND, O. et al.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 21 (17)
- **WEI, H. et al.** *Organic Letters*, 2007, vol. 9 (24)
- **HANAOKA, K. et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126
- **BAILEY, G. A. et al.** *Inorganic Chemistry*, 2012, vol. 51 (22)
- **R.J. ANDERSON et al.** *Antibacterial Agents.* John Wiley & Sons, 2012
- **KIM et al.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, vol. 21 (1), 183-189
- **MANZOOR UMAIR, M. et al.** *PloS one*, 2016, vol. 11 (5), e0154704
- **PATI et al.** *Nanomedicine*, 2014, vol. 10 (6), 1195-1208
- **COSTELLO et al.** *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2004, vol. 7, 111-117
- **K. J. HUMPHREYS; K. D. KARLIN; S. E. ROKITA.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, 6009-6019
- **NATSUHO YAMAMOTO et al.** *J. Med. Chem.*, 2012, 11013-11021
- **THREADGILL et al.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 11, 4189-4206
- **Z. GUO; G.-H. KIM ; J. YOON ; I. SHIN.** *Nat. Protocols*, 2014, vol. 9, 1245-1254
- **G. BERGGREN et al.** *Dalton Trans.*, 2009, 10044-10054
- **SIMMONS et al.** *Inorg. Chem.*, 2013, vol. 52, 5838-5850
- **MURAI et al.** *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 2428-2433
- **HECKER et al.** *J. Med. Chem.*, 2015, vol. 58, 3682-3692
- *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, vol. 46, 3284-3287
- *J. Med. Chem.*, 2010, vol. 53, 7852
- **O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F.** *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.* *Eur J Biochem*, 2000, vol. 267, 5421-5426
- **LEROY A; FILLASTRE JP; BORSA-LEBAS F; ETIENNE I; HUMBERT G.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, vol. 36, 2794-2798