

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 739**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| C07D 307/54 | (2006.01) | C07D 233/90 | (2006.01) |
| A61P 25/28 | (2006.01) | C07D 405/12 | (2006.01) |
| A61P 21/00 | (2006.01) | C07D 413/12 | (2006.01) |
| A61K 31/5377 | (2006.01) | C07D 249/02 | (2006.01) |
| A61K 31/495 | (2006.01) | C07D 307/68 | (2006.01) |
| A61K 31/4192 | (2006.01) | A61P 17/00 | (2006.01) |
| A61K 31/4178 | (2006.01) | A61P 25/00 | (2006.01) |
| C07D 295/15 | (2006.01) | A61P 19/00 | (2006.01) |
| A61K 31/341 | (2006.01) | C07D 403/12 | (2006.01) |
| A61K 31/496 | (2006.01) | C07D 295/185 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2016 PCT/CA2016/050958**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17027967**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2016 E 16836314 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022 EP 3337791**

54 Título: **Inhibidores de enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

17.08.2015 US 201562205939 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
190 Elizabeth Street, R. Fraser Elliott Building -
Room 1S-417
Toronto, Ontario M5G 2C4, CA**

72 Inventor/es:

**KOTRA, LAKSHMI P. y
WASILEWSKI, EWA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 928 739 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD) y usos de los mismos

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 62/205.939, presentada el 17 de agosto de 2015.

10 CAMPO

La presente solicitud se refiere a compuestos de aminoácidos α -sustituidos, a composiciones que comprenden estos compuestos y a su uso, en particular para el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD).

15

ANTECEDENTES

Desmielinización y esclerosis múltiple. La desmielinización es un estado neuropatológico en el que la vaina de mielina aislante sobre los axones de las neuronas se degrada, cuya patogénesis podría deberse a una variedad de causas.¹

20 La esclerosis múltiple (EM), un estado clínico de este tipo, es una enfermedad desmielinizante crónica y la más común, que afecta a alrededor de 2,2 millones de personas a nivel mundial.² Está caracterizada por una degradación por parches de la mielina sobre los axones, conocida como lesiones desmielinizadas, y la curación de estos parches se produce a través de la formación de cicatrices denominadas placas.

25 Se sugiere que una variedad de causas tales como factores genéticos, inmunológicos y medioambientales desempeñan un papel que conduce a este estado.³ La teoría más común es la teoría autoinmune, que postula que la sensibilización de células T en la periferia conduce a que atraviesen una barrera hematoencefálica alterada para atacar y destruir la mielina.⁴ Se ha mostrado que varias proteínas del SNC inducen este estado, incluyendo proteína proteolípida de la mielina (PLP),⁵ glicoproteína asociada a la mielina (MAG),⁶ glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG),⁷ transaldolasa y S100.⁶ Estudios genéticos indican la implicación de alrededor de 30

30 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), aunque sigue estando por ver la relevancia de estos SNP para el desarrollo de productos terapéuticos para la EM.⁸

35 Las terapias para la EM actuales reducen la frecuencia de recaídas, pero no retrasan la progresión de la enfermedad ni invierten la destrucción de mielina.^{9,10,11} El tratamiento más popular es Copaxone™ (también conocido como copolímero-1, Cop-1 o acetato de glatiramero), comercializado por Teva Pharmaceuticals. Este es un fármaco inmunomodulador y es un polímero aleatorio de cuatro aminoácidos - ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina - en la misma proporción encontrados en la proteína básica de la mielina (MBP).

40 Actualmente, existe una necesidad de mecanismos novedosos para prevenir y potencialmente invertir la desmielinización, de modo que las opciones de tratamiento para enfermedades desmielinizantes tales como la esclerosis múltiple puedan concebirse con mejores perfiles de seguridad y con mecanismos moleculares de acción claros.

45 Citrulinación y desmielinización. En general, la autotolerancia inmunológica es una defensa importante frente a muchas enfermedades autoinmunitarias y su colapso en el cuerpo conduce a diversas enfermedades autoinmunitarias. Esto surge principalmente del reconocimiento inmune de autoproteínas que han experimentado modificaciones postraduccionales en condiciones fisiopatológicas que no habrían sucedido en circunstancias normales.

50 La citrulinación, un evento postraducciona, está implicada en general en muchos procesos celulares tales como la regulación génica, el desarrollo embrionario y la diferenciación.^{12,13} Recientemente, se ha descubierto el papel anómalo de la (hiper)citrulinación en una variedad de enfermedades, incluyendo en EM, artritis reumatoide, Alzheimer, tembladera, psoriasis y enfermedad de Creutzfeld-Jacob.^{14,15}

55 En la EM, estudios extensos de la MBP hipercitrulinada indicaron que la MBP, un componente clave de la vaina de mielina y crítico para el mantenimiento de la compactación de la mielina, contenía al aminoácido no codificado citrulina en proporciones anómalas. En el cerebro normal, la "MBP citrulinada" representa el 20% de la MBP total, mientras que en EM crónica representa el 45%¹⁶ y en EM fulminante es el 90% de la MBP.¹⁷ En varios estudios que usan una variedad de técnicas biofísicas,^{18,19,20,21,22} se demostró que la MBP citrulinada prevenía la compactación de la bicapa, dando como resultado la desestabilización de la membrana y la degradación posterior que conduce a la

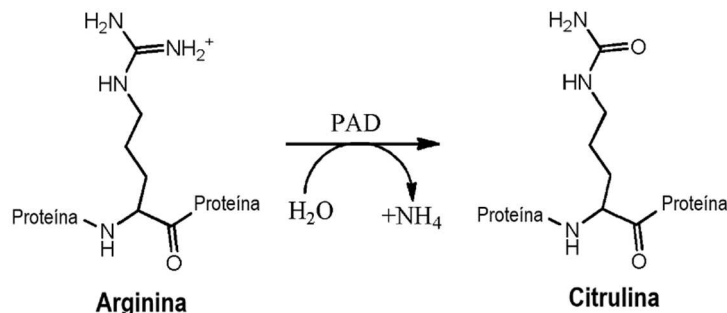
60

desmielinización, y un daño irreversible a los axones.^{23,24}

Por tanto, la hipercitrulinación es la raíz de la neuropatogénesis debida la desmielinización. En el sistema nervioso central, las peptidil arginina desiminasas (específicamente PAD2 y PAD4) son responsables de la citrulinación.

65

Enzimas PAD y citrulinación. La peptidil arginina desiminasa (PAD) cataliza la citrulinación postraduccional de las proteínas.^{25,26,27} La citrulinación es el proceso de desiminación de residuos Arg en proteínas seleccionadas, o, en otras palabras, la transformación de Arg a citrulina a través de desiminación (esquema 1). Hay cinco isoformas de PAD que existen en humanos: PAD-1, -2, -3, -4 y -6. Su expresión en tejidos varía significativamente, regulada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. PAD2 y PAD4 están implicadas específicamente en la EM, ya que se observan niveles aumentados de estas dos isoformas en el SNC en condiciones inflamadas.^{28,29}



Esquema 1

Hay evidencia convincente *in vivo* de que se observan niveles mayores de actividades PAD e hipercitrulinación en EM.³⁰ Por ejemplo, un modelo de MOG-EAE usado de manera rutinaria para EM, que es un modelo basado en células T CD4(+), inducido con el péptido 35-55 inmunodominante de la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (pMOG35-55) se usó para someter a prueba si la citrulinación de un epítipo de células T puede contribuir a la etiopatología de la enfermedad.^{23,31} En este modelo experimental, las enzimas PAD2 y PAD4 se regularon por incremento significativamente en el SNC inflamado de los animales. Las células T que respondieron específicamente a la pMOG citrulinada no podían iniciar la lesión de EAE, pero estas células podían provocar la exacerbación de la patología si se transfería a ratones con una EAE en curso. Este experimento sugería fuertemente que una vez que se establece inflamación en la EM, la citrulinación de autoantígenos diana puede permitir que un repertorio expandido de células T contribuya a la patología del SNC, y se observan niveles aumentados de enzimas PAD en estos tejidos.³¹ Un estudio similar que usa los péptidos de epítipos de la proteína básica de la mielina (MBP) indicó que los autoantígenos podían potencialmente desencadenar la enfermedad en individuos susceptibles que portan epítipos de péptidos citrulinados.^{32,33}

Inhibidores de enzimas PAD: Un inhibidor de PAD de sitio activo, no específico, 2-cloroacetamida (2CA), atenuó la enfermedad EM, disminuyó la cantidad de proteína citrulinada y disminuyó la actividad PAD en el cerebro en cuatro modelos animales de EM: dos modelos de neurodegenerativa y dos de enfermedad autoinmunitaria.³⁴

2CA es un inhibidor covalente de PAD4 (Figura 2).

Se mostró previamente que un inhibidor de PAD de sitio activo, no específico, 2-cloroacetamida (2CA), que atenuaba la enfermedad EM, disminuía la cantidad de proteína citrulinada y disminuía la actividad PAD en el cerebro en cuatro modelos animales diferentes de EM.³⁵ En uno de estos modelos murinos, la administración de 2CA temprana y prolongada prevenía esencialmente la enfermedad. Sin embargo, una enfermedad clínica completamente progresiva volvía a emerger repentinamente tras el cese de la terapia a los 6 meses.³⁴ Por tanto, sigue existiendo una necesidad de identificar productos terapéuticos mejorados para inhibir la hipercitrulinación relacionada con enfermedad.

Estructuras de enzimas PAD. Estructuralmente, las enzimas PAD son enzimas dependientes de Ca^{2+} que catalizan la conversión de residuos arginina en proteínas a citrulina a través de la desiminación del resto guanidinio en la cadena lateral de residuos Arg.^{36,37} La estructura consiste en el dominio N-terminal plegado predominantemente en láminas β , y el dominio C-terminal, en el que está ubicado el sitio catalítico. El sitio catalítico, donde se une el sustrato, tiene dos residuos Asp, un residuo His y un residuo Cys que están implicados en la reacción de desiminación. Los aminoácidos ácidos, Asp350 y Asp473, funcionan como residuos de base generales durante la hidrólisis de la amina en el resto guanidinio de las peptidil argininas. Estos dos residuos Asp están ubicados en la parte inferior del bolsillo de unión a sustrato (Figura 2). La 2CA, debido a su estructura acetamida que porta una carga positiva, se une a este bolsillo aniónico y modifica el residuo Cys que está en proximidad cercana (Figura 1). La 2CA no porta ninguna característica estructural adicional que le dote de especificidad para inhibir solo enzimas PAD, ni ninguna otra enzima similar.

A lo largo de la última década, solo ha habido un puñado de esfuerzos centrados en entender diversos ligandos, su interacciones y los inhibidores que seleccionan como diana enzimas PAD y, de la manera más notable, diversos derivados peptídicos para entender el sustrato y las propiedades inhibitoras de selección como diana de enzimas PAD.^{33,38,39,40} Los compuestos no peptídicos más potentes de estas investigaciones son clortetraciclina, un derivado de tetraciclina con una Cl_{50} de $100 \pm 10 \mu\text{M}$ como inhibidor competitivo y un análogo de sustrato, F-amidina con una Cl_{50} de $21 \pm 2,1 \mu\text{M}$ como inactivador irreversible.

Las terapias de moléculas pequeñas no inmunes que seleccionan como diana mecanismos neurológicos específicos son muy necesarias para las enfermedades neurodegenerativas, porque las terapias de base inmune no son efectivas. Las enzimas PAD hipercitrulinan las proteínas en el cerebro conduciendo a la patología y la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (EA).⁴¹ Se ha mostrado que este mecanismo funciona en otras enfermedades neurodegenerativas tales como EM, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia multisistémica (AMS) y enfermedades priónicas tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, en las que también se observa hipercitrulinación de mielina, mayor expresión de PAD2 y PAD4, y neurodegeneración asociada.^{58,42,43,44,45,46,47,48,49,67} Se muestra que PAD2 y PAD4 causan la patología en regiones del cerebro tales como el hipocampo y la corteza cerebral, conduciendo en última instancia a neurodegeneración y muerte celular. En la EM y la enfermedad de Alzheimer, niveles y actividades de PAD aumentados, proteínas hipercitrulinadas y en última instancia neurodegeneración se han correlacionado con enfermedad en muestras cerebrales de pacientes. En modelos animales de EM, inhibición de actividades PAD mediante el tratamiento con inhibidores de moléculas pequeñas conduce a la prevención y la inversión de la neurodegeneración y/o a una respuesta inflamatoria altamente reducida en el cerebro.^{50,51}

Las enzimas PAD y sus actividades catalíticas que conducen a mayores niveles de proteínas citrulinadas en regiones del cerebro tales como el hipocampo, la corteza cerebral y la mielina están correlacionadas con cambios neurodegenerativos típicos para la EA.⁵² Durante todo el proceso del proceso de neurodegeneración, PAD2 y PAD4 específicamente se expresan de manera abundante en el cerebro.^{69,53} Colectivamente, la evidencia sugiere que una activación anómala de PAD2 y PAD4 en los hipocampos de pacientes con EA conduce finalmente a neurodegeneración.⁷⁰ Se han hecho observaciones similares en los modelos de ratón y de rata de EA.⁵⁴ Las observaciones descritas en este caso en el área de la citrulinación de proteínas, la inhibición de enzimas PAD y el desarrollo de inhibidores novedosos de PAD para prevenir y/o invertir la neurodegeneración y la inflamación asociada^{67,68} tendrán aplicaciones como productos terapéuticos novedosos que seleccionan como diana enfermedades neurodegenerativas tales como EA, EM, ELA, AMS, ECJ, etc.

Aunque la bibliografía actual sugiere que la enzima de mamífero peptidil arginina desiminasa tipo II (PAD2) no usa arginina libre como sustrato⁵⁵, la enzima es responsable de la conversión de arginina positiva unida a péptido a citrulina neutra por medio de una reacción de desiminación inducida por calcio (Ca^{2+}).^{55,56} Esta desiminación afecta al comportamiento de las proteínas en el entorno celular dado que induce que las proteínas se desplieguen, lo que podría actuar posteriormente como catalizador para la agregación de proteínas susceptibles.⁵⁷ La reacción catalizada por PAD2 está restringida a los péptidos en los astrocitos en el tejido cerebral que, como se mencionó anteriormente, son reservorios de almacenamiento de arginina dentro del cerebro.⁵⁸

Knuckley B, *et al.*: "Profiling Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4): A novel screen to identify PAD4 inhibitors", *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 16, 1 de enero de 2008, páginas 739-7, 45, se refiere al desarrollo de una criba para inhibidores de PAD4 que se basa en un reactivo de perfilado de proteínas basado en la actividad seleccionada como diana de PAD4.

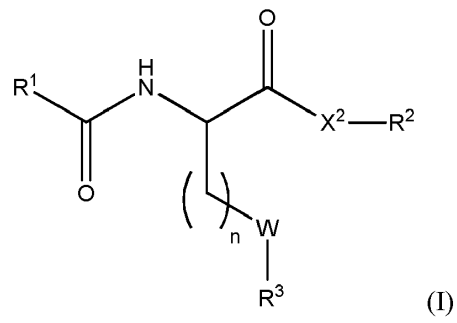
El documento WO2014/019092A1 se refiere a imidazolidinonas, a composiciones que comprenden estos compuestos y a su uso, en particular para el tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD).

El documento US 2012/108562 A1 se refiere a composiciones inhibitoras de PAD4 y a métodos para su uso en el tratamiento del cáncer y de enfermedad autoinmunitaria.

SUMARIO DE LA SOLICITUD

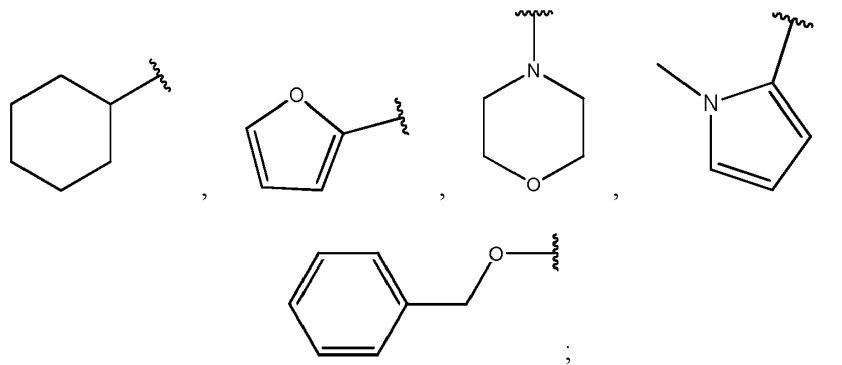
Los experimentos de enzimología *in vitro* dados a conocer en el presente documento revelaron que los compuestos descritos en el presente documento son, en un aspecto de la divulgación, inhibidores de PAD1, PAD2 y/o PAD4. Los compuestos de la presente solicitud son, en una realización de la divulgación, útiles como medicamentos, por ejemplo, para tratar enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD) tales como PAD1, PAD2 y PAD4.

Por consiguiente, la presente solicitud incluye compuestos de fórmula (I)



en la que:

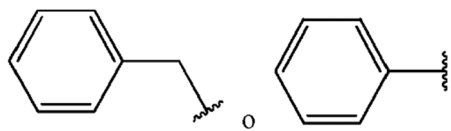
5 R¹ es



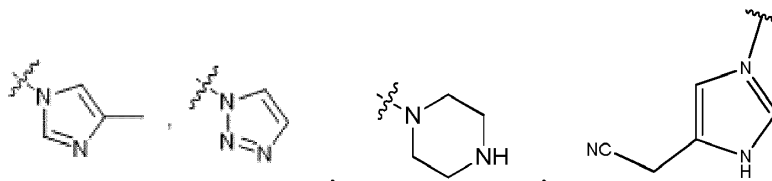
10 X² es O o NH;

R² es CH₃,

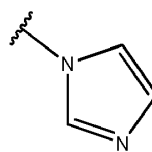
15 n es 0 o 1;



20 R³ es

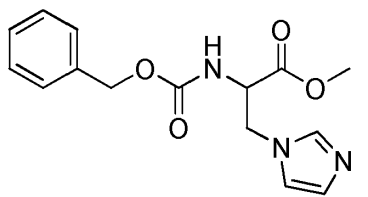


o



25 ;y W es -CH₂- o -C(O);

30 o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato de los mismos o un estereoisómero de los mismos,
no siendo el compuesto de fórmula I



La presente divulgación incluye también una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula I tal como se definió anteriormente, para tratar enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante peptidil arginina desiminasa (PAD), seleccionándose las enfermedades, los trastornos o los estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD de esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, tembladera y enfermedad de Creutzfeld-Jacob, preferiblemente esclerosis múltiple.

La presente solicitud incluye también una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de fórmula I tal como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otras características y ventajas de la presente solicitud resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones de la solicitud, se facilitan solo a modo de ilustración, no debiendo estar limitado el alcance de las reivindicaciones por las realizaciones expuestas en los ejemplos, sino que se le debe dar la interpretación más amplia consistente con la descripción en su conjunto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente solicitud se describirá ahora en mayor detalle con referencia a los dibujos, en los que:

la Figura 1 muestra un modelo del complejo covalente de 2CA unido a Cys645 en el sitio activo de PAD4. La esfera etiquetada como Ca^{2+} es uno de los iones Ca^{2+} en la proximidad del sitio activo;

la Figura 2 muestra una vista estereoscópica de las cuatro características seleccionadas en el sitio catalítico de PAD4 solapadas sobre la enzima (modelo animado; fuente: estructura cristalina de PAD4 unida mediante un análogo de sustrato N-benzoilester-L-arginina-amida, código PDB: 1WDA).

la Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de (A) PAD1, y (B) PAD4 usando compuestos de la divulgación;

la Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de PAD2 de ratón usando compuestos de la divulgación; y

la Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de PAD4 humana usando compuestos de la divulgación.

la Figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de compuestos de la divulgación en un modelo de ratón *in vivo*, de EAE, para estudiar la eficacia de inhibidores de PAD.

La Figura 7 muestra los niveles de PAD2 y citrulinación en corteza cerebral de ratón, que corresponden al estudio en la Figura 6.

La Figura 8 muestra (A) La progresión de EAE en ratones hembra C57BL/6 tratados con PBS (n=5) o un compuesto de la divulgación (n=7). (B) Peso normalizado de ratones con EAE tratados con o bien PBS o bien un compuesto de la divulgación. (C) Gráfico de supervivencia que muestra las tasas de mortalidad en PBS y ratones tratados.

La Figura 9 son micrográficos que muestran el cerebelo de ratones sanos (A) y afectados por EAE (B y C). Los animales control de EAE recibieron PBS y a los animales tratados con fármaco se les inyectó (i.p.) un compuesto de la divulgación.

La Figura 10 son gráficos de barras que muestran la inmunohistoquímica de cerebros de ratones afectados por EAE. El tejido se sondeó con anticuerpo CD3+ve para detectar linfocitos T en el SNC de ratones sanos y enfermos. Los animales enfermos se trataron con PBS o un compuesto de la divulgación.

La Figura 11 son micrográficos que muestran la tinción de CD3 +ve para linfocitos de células T que muestran inflamación en el cerebelo (A - C) y a lo largo de la cápsula interna (D - F).

La Figura 12 muestra células PAD2 positivas y células citrulina positivas tal como se cuantificaron para tejido cerebral de ratones sanos, control de EAE (PBS) y tratados para EAE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA SOLICITUD

5

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, las definiciones y realizaciones descritas en esta y otras secciones pretenden ser aplicables a todas las realizaciones y los aspectos de la solicitud descritos en el presente documento para las que sean adecuadas como entendería un experto en la técnica.

10

Tal como se usa en esta solicitud, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, una realización que incluye “un compuesto” debe entenderse como que presenta ciertos aspectos con un compuesto, o dos o más compuestos adicionales.

15

En las realizaciones que comprenden un componente “adicional” o un “segundo” componente, tal como un compuesto adicional o un segundo compuesto, el segundo componente tal como se usa en el presente documento es químicamente diferente de los otros componentes o del primer componente. Un “tercer” componente es diferente de los otros componentes, del primer y del segundo componente, y los componentes enumerados adicionalmente o “adicionales” son diferentes de manera similar.

20

En la comprensión del alcance de la presente divulgación, el término “que comprende” y sus derivados, tal como se usan en el presente documento, pretenden ser términos de extremos abiertos que especifican la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas establecidos, pero no excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas no establecidos. Lo anterior también es aplicable a palabras que tengan significados similares tales como los términos, “que incluye”, “que tiene” y sus derivados. El término “que consiste” y sus derivados, tal como se usan en el presente documento, pretenden ser términos cerrados que especifican la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas establecidos, pero excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas no establecidos. El término “que consiste esencialmente en”, tal como se usa en el presente documento, pretende especificar la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas establecidos, así como aquellos que no afecten materialmente a la(s) característica(s) básicas y novedosas de características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas.

25

30

35

Los términos de grado tal como “sustancialmente”, “alrededor de” y “aproximadamente” tal como se usan en el presente documento significan una cantidad razonable de desviación del término modificado de modo que el resultado final no se cambie significativamente. Estos términos de grado deben interpretarse como que incluyen una desviación de al menos $\pm 5\%$ del término modificado si esta desviación no invalida el significado de la palabra que modifica.

40

La expresión “avanzar en un grado suficiente” tal como se usa en el presente documento con referencia a las reacciones o etapas de proceso dadas a conocer en el presente documento significa que las reacciones o etapas de proceso avanzan en un grado tal que se maximiza la conversión del material de partida o sustrato en producto. La conversión puede maximizarse cuando más de alrededor del 5, del 10, del 15, del 20, del 25, del 30, del 35, del 40, del 45, del 50, del 55, del 60, del 65, del 70, del 75, del 80, del 85, del 90, del 95 o del 100% del material de partida o sustrato se convierte en producto.

45

El término “adecuado/a”, tal como en, por ejemplo, “reactivos adecuados”, “condiciones adecuadas”, “disolvente adecuado” o “cantidad adecuada” significa que la selección de un compuesto, grupo o condiciones particulares dependería de la manipulación de síntesis específica que deba realizarse, y la identidad de la molécula que deba transformarse, pero que la selección estaría ampliamente dentro de la habilidad de un experto en la técnica. Todas las etapas de proceso descritas en el presente documento deben llevarse a cabo en condiciones suficientes para proporcionar el producto mostrado. Un experto en la técnica entendería que todas las condiciones de reacción, incluyendo, por ejemplo, disolvente de reacción, tiempo de reacción, temperatura de reacción, presión de reacción, relación de reactantes y si la reacción debiera realizarse bajo una atmósfera anhidra o inerte o no, pueden variarse para optimizar el rendimiento del producto deseado y está dentro de su habilidad hacerlo.

50

55

El término “compuesto(s) de la divulgación” o “compuesto(s) de la presente divulgación” y similares tal como se usan en el presente documento incluye compuestos de fórmula I, y una sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo/de los mismos, o estereoisómero del mismo/de los mismos tal como se definen en el presente documento.

60

El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal incluyendo mamíferos, y de manera adecuada se refiere a humanos.

65

El término “farmacéuticamente aceptable” significa compatible con el tratamiento de sujetos, en particular humanos.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal de adición de ácido o una sal de adición de base que es adecuada para, o compatible con, el tratamiento de sujetos.

5 Una sal de adición de ácido que es adecuada para, o compatible con, el tratamiento de sujetos tal como se usa en el presente documento significa cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto básico. Los compuestos básicos que forman una sal de adición de ácido incluyen, por ejemplo, compuestos que comprenden un grupo amina. Los ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen los ácidos clorhídrico, hidrotetrafluoroacético, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, así como sales de metal tales como monohidrogenoortofosfato de sodio e hidrogenosulfato de potasio. Los ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos 10 mono-, di- y tricarbónicos tales como los ácidos glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, benzoico, fenilacético, cinámico y salicílico, así como ácidos sulfónicos tales como los ácidos p-toluenosulfónico y metanosulfónico. Puede formarse cualquiera de las sales de mono- o di-ácido, y tales sales pueden existir en una forma o bien hidratada, solvatada o bien sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición de ácido son más solubles en agua y diversos disolventes orgánicos hidrófilos, y generalmente 15 muestran mayores puntos de fusión en comparación con sus formas de base libre. Un experto en la técnica conocerá la selección de la sal apropiada. En una realización, la sal de adición de ácido es una sal de ácido clorhídrico o hidrotetrafluoroacético.

20 Una sal de adición de base que es adecuada para, o compatible con, el tratamiento de sujetos tal como se usa en el presente documento significa cualquier sal de adición de base orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto ácido. Los compuestos ácidos que forman una sal de adición de base incluyen, por ejemplo, compuestos que comprenden un grupo ácido carboxílico. Las bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen hidróxido de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o bario. Las bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, trimetilamina y picolina, alquilamoniacos o amoniaco. Un experto en la técnica conocerá la selección de la sal apropiada. 25

La formación de una sal de compuesto deseada se consigue usando técnicas estándar. Por ejemplo, el compuesto neutro se trata con un ácido o una base en un disolvente adecuado y la sal formada se aísla mediante filtración, extracción o cualquier otro método adecuado. 30

El término “solvato” tal como se usa en el presente documento significa un compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable, en el que moléculas de un disolvente adecuado están incorporadas en la red cristalina. Un disolvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosificación administrada. Ejemplos de disolventes adecuados son etanol, agua y similares. Cuando el disolvente es agua, la molécula se denomina “hidrato”. La formación de solvatos variará dependiendo del compuesto y del solvato. En general, los solvatos se forman disolviendo el compuesto en el disolvente apropiado y aislando el solvato mediante enfriamiento o usando un antidisolvente. El solvato se seca o se convierte en azeótropo normalmente en condiciones ambientales. 35

El término “estereoisómero”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a todas las formas isoméricas, así como conformacionales diferentes posibles que puede presentar un compuesto de fórmula (I), incluyendo todas las formas isoméricas estereoquímica y conformacionalmente posibles, todos los diastereómeros, enantiómeros y/o confórmeros de la estructura molecular básica. En las realizaciones de la solicitud, los compuestos descritos en el presente documento tienen al menos un centro asimétrico. Cuando los compuestos presentan más de un centro asimétrico, pueden existir como diastereómeros. Debe entenderse que todos de tales isómeros y las mezclas de los mismos en cualquier proporción están abarcados dentro del alcance de la presente solicitud. Debe entenderse además que aunque la estereoquímica de los compuestos puede ser tal como se muestra en cualquier compuesto dado enumerado en el presente documento, tales compuestos también pueden contener ciertas cantidades (por ejemplo, menos del 20%, de manera adecuada menos del 10%, de manera más adecuada menos del 5%) de compuestos de la solicitud que tengan una estereoquímica alternativa. 40 45 50

El término “tratar” o “tratamiento” tal como se usa en el presente documento y como se entenderá ampliamente en la técnica, significa un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o estados, la disminución del grado de la enfermedad, un estado estabilizado (es decir que no empeora) de la enfermedad, prevenir la propagación de la enfermedad, el retardo o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico, la disminución de la recurrencia de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratar” y “tratamiento” también pueden significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. “Tratar” y “tratamiento” tal como se usan en el presente documento incluyen también tratamiento profiláctico. Por ejemplo, un sujeto con EM temprana puede tratarse para prevenir la progresión, o alternativamente un sujeto en remisión puede tratarse con un compuesto o una composición descrita en el presente documento para prevenir la recurrencia. Los métodos de tratamiento comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos de la solicitud y opcionalmente, consisten en una única administración, o alternativamente comprenden una serie de administraciones. Por ejemplo, los compuestos de la solicitud pueden administrarse al menos una vez a la semana. Sin embargo, en otra realización, los compuestos pueden administrarse al sujeto desde alrededor de una vez cada tres semanas, o alrededor de una vez a la semana hasta alrededor de una vez al día para 55 60 65

- un tratamiento dado. En otra realización, los compuestos se administran 2, 3, 4, 5 o 6 veces al día. La duración del periodo de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración, la actividad de los compuestos de la solicitud y/o una combinación de los mismos. Se apreciará también que la dosificación efectiva del compuesto usado para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir a lo largo del transcurso de un régimen de tratamiento o profilaxis particular. Cambios en la dosificación pueden resultar y volverse evidentes mediante ensayos de diagnóstico estándar conocidos en la técnica. En algunos casos puede requerirse administración crónica. Por ejemplo, los compuestos se administran al sujeto en una cantidad y durante una duración suficientes para tratar al paciente.
- 5 “Paliar” una enfermedad o un trastorno significa que se disminuyen el grado y/o manifestaciones clínicas no deseables de un trastorno o un estado patológico y/o se ralentiza o se prolonga el curso de tiempo de la progresión, en comparación con no tratar el trastorno.
- 10 El término “prevención” o “profilaxis”, o un sinónimo de los mismos, tal como se usa en el presente documento se refiere a una reducción en el riesgo o la probabilidad de que un paciente se vea aquejado con una enfermedad, trastorno o estado caracterizado por o asociado con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD o manifieste un síntoma asociado con una enfermedad, trastorno o estado caracterizado por o asociado con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad efectiva, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, en el contexto de tratar una enfermedad, trastorno o estado caracterizado por o asociado con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD), una cantidad efectiva es una cantidad que, por ejemplo, reduce la hipercitrulinación de proteínas en comparación con la hipercitrulinación de proteínas sin administración del compuesto. Las cantidades efectivas pueden variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo y/o peso del sujeto. La cantidad de un compuesto dado que corresponderá a una cantidad de este tipo variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de estado, enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto que esté tratándose y similares, pero no obstante puede determinarse de manera rutinaria por un experto en la técnica.
- 20 Los términos “caracterizado por” o “asociado con” tal como se usan en el presente documento se refieren a una enfermedad, trastorno o estado en un sujeto, en el que al menos una de las causas es un nivel aumentado de actividad en una o más de las enzimas PAD que catalizan la citrulinación postraduccional de proteínas, en comparación con sujetos que no tienen la enfermedad, el trastorno o el estado. En una realización, la enzima PAD es PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 y/o PAD6. En una realización adicional, la enzima PAD es PAD1, PAD2 y/o PAD4. En aún otra realización, la enzima PAD es PAD2 y/o PAD4.
- 25 El término “administrado” tal como se usa en el presente documento significa la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto o una composición de la solicitud a una célula o bien en cultivo celular o bien en un paciente.
- 30 La frase “grupo que interacciona con el sitio activo de PAD” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo o radical químico que estructuralmente capaz de unirse a y/o interaccionar con el sitio activo o sitio catalítico de una enzima PAD, tal como PAD1, PAD2 y/o PAD4, para efectuar la inhibición de la actividad catalítica de la enzima PAD. Los ejemplos de grupos que interaccionan con el sitio activo de PAD incluyen, pero no se limitan a, radicales que contienen heteroátomos tales como heterociclos, heteroaromáticos, etc., que encajan en el sitio activo de una enzima PAD, tal como se representa, por ejemplo, en las Figuras 1 y 2.
- 35 El uso del término “C_{x-y}”, donde x e y son números enteros significa un radical que incluye al menos x y no más de y átomos de carbono. Sin embargo, para los grupos que contienen heteroátomos, este término también incluiría tales átomos, aunque no sean carbono. Por ejemplo, “heteroarilo C₅₋₁₀” indica grupos arilo en un anillo de tamaño de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos pesados, de los que al menos un átomo es O, S o N. Véanse las definiciones a continuación para ejemplos adicionales.
- 40 El término “alquilo” tal como se usa en el presente documento, ya se use solo o como parte de otro grupo, significa grupos alquilo saturados, de cadena lineal o ramificada. El término alquilo C₁₋₆ significa un grupo alquilo que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.
- 45 El término “cicloalquilo” tal como se usa en el presente documento, ya se use solo o como parte de otro grupo, significa grupos alquilo saturados, cíclicos. El término cicloalquilo C₃₋₆ significa un grupo cicloalquilo que tiene 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.
- 50 El término “heterocicloalquilo”, tal como se usa en el presente documento, ya se use solo o como parte de otro grupo, representa un alquilo cíclico, que tiene al menos un átomo de O, S y/o N que interrumpe la estructura de anillo carbocíclico tal como grupos tetrahidrofurano, tetrahidropirano, piperidino, piperazino, morfolino y pirrolidino.
- 55
- 60
- 65

El término "arilo" tal como se usa en el presente documento, ya se use solo o como parte de otro grupo, significa un sistema de anillo carbocíclico mono-, bicíclico o multicíclico que tiene uno, dos o más anillos aromáticos y se ejemplifica mediante fenilo, naftilo, 1,2-dihidronaftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, fluorenilo, indanilo, indenilo y similares.

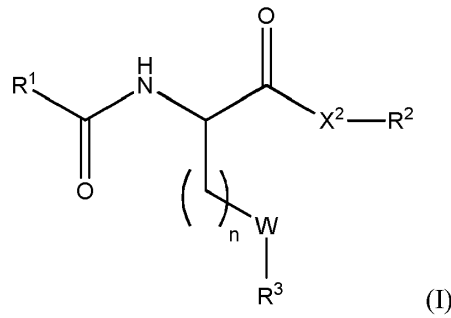
5 El término "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, ya se use solo o como parte de otro grupo, representa un "arilo" tal como se definió anteriormente, que tiene al menos un O, S y/o N que interrumpe la estructura de anillo carbocíclico, tal como pirídilo, furilo, pirrolilo, tienilo, isotiazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, pirimidilo, quinolilo, isoquinolilo, isobenzofurilo, benzotienilo, pirazolilo, indolilo, isoindolilo, purinilo, carbazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, benzotiazolilo o benzoxazolilo.

10 El término "opcionalmente sustituido" tal como se usa en el presente documento significa que el grupo o átomo al que se hace referencia no está sustituido o está sustituido con otro grupo (diferente).

15 II. Compuestos de la divulgación

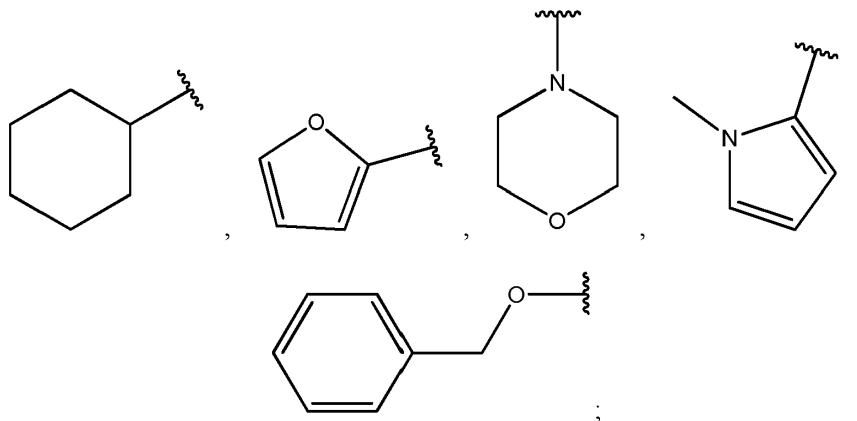
Tal como se ha indicado anteriormente, los experimentos de enzimología *in vitro* dados a conocer en el presente documento revelaron que derivados de aminoácidos α -sustituidos de fórmula (I) son, en una realización de la divulgación, inhibidores de PAD1, PAD2 y/o PAD4. Los compuestos de la presente divulgación son, en una realización de la divulgación, útiles para tratar enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD).

20 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a compuestos de fórmula I:



25 en la que:

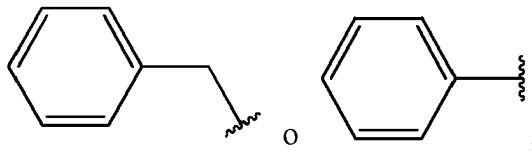
R¹ es



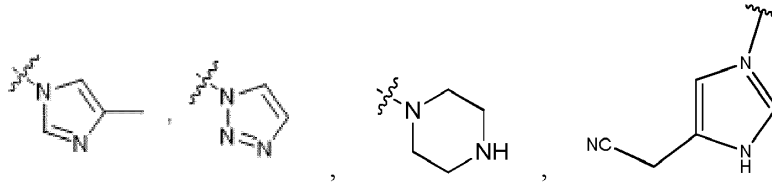
35 X² es O o NH;

R² es CH₃,

n es 0 o 1;

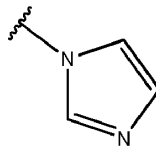


R³ es



5

o



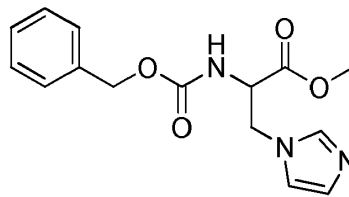
10

;y W es -CH₂- o -C(O);

o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato de los mismos un o estereoisómero de los mismos,

15

en los que el compuesto de fórmula I no es

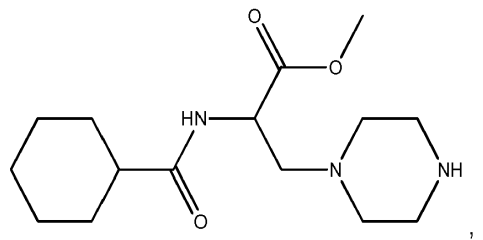


20

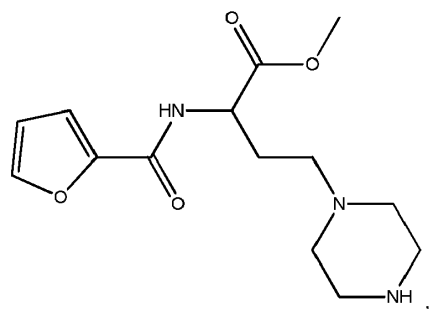
En una realización adicional de la divulgación, X² es O. En otra realización, X² es N.

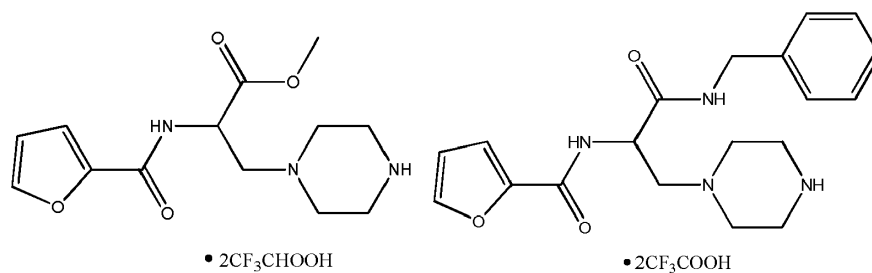
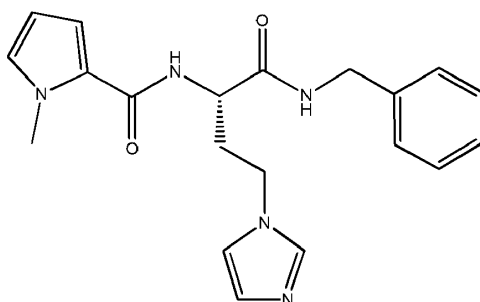
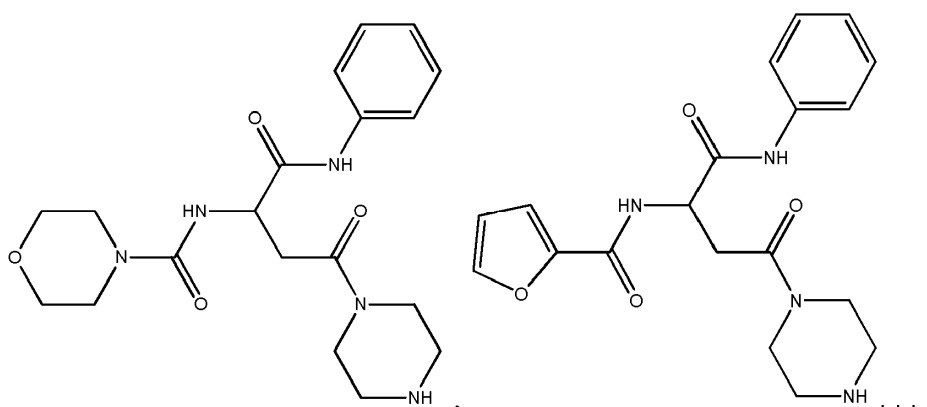
En una realización de la divulgación, n es 0 y W es -CH₂-. En otra realización, n es 1 y W es -C(O)-.

En realización de la divulgación, el compuesto de fórmula I es:



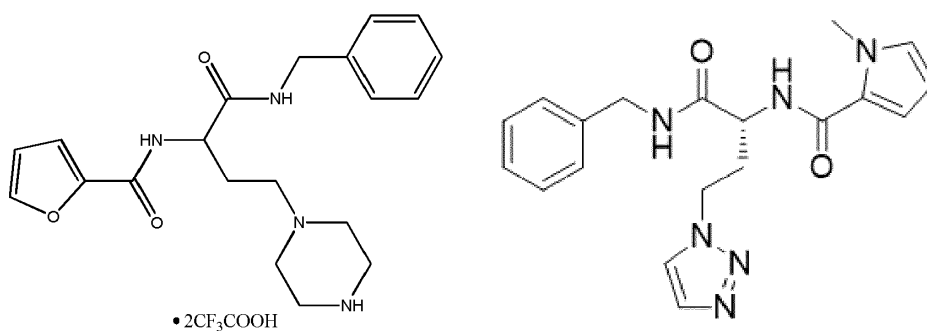
25



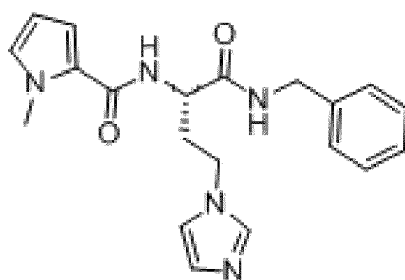


• 2CF₃COOH

• 2CF₃COOH



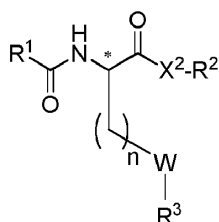
• 2CF₃COOH



En una realización adicional, los compuestos de fórmula I son sales de adición de ácido. En una realización adicional, la sal de ácido es una sal de ácido trifluoroacético. En otra realización, la sal de ácido es una sal de ácido clorhídrico. La preparación de sales de los compuestos de la solicitud puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, una disolución de un ácido adecuado, por ejemplo, ácido trifluoroacético en un disolvente adecuado, por ejemplo, diclorometano puede añadirse gota a gota a una cantidad adecuada de una disolución de un compuesto de fórmula I en un disolvente adecuado, por ejemplo, diclorometano a una temperatura adecuada, por ejemplo, a de
10 alrededor de -20°C a alrededor de 20°C , o alrededor de 0°C , la mezcla de reacción agitarse durante un tiempo de alrededor de 0,1 horas a alrededor de 24 horas, o alrededor de una hora, la temperatura aumentarse hasta una temperatura de alrededor de 0°C a alrededor de 50°C , o alrededor de temperatura ambiente, y la mezcla de reacción agitarse durante un tiempo para la conversión de los reactantes a la sal del compuesto de fórmula I para avanzar en un grado suficiente, por ejemplo, de alrededor de 0,1 horas a alrededor de 24 horas, o alrededor de una hora.

15 Los compuestos de fórmula (I) tienen al menos un estereocentro tal como se indica mediante "*" en la fórmula a continuación



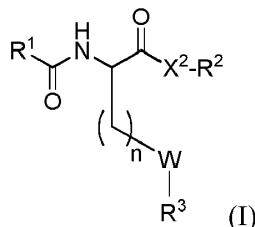
20 En una realización, el "*" indica el enantiómero "S". En otra realización, el "*" indica el enantiómero "R".

20

II. Composiciones de la solicitud

La presente solicitud incluye también una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de fórmula I:

25



en la que las variables $\text{R}^1\text{-R}^3$, X^2 , W y n se define tal como anteriormente en cada realización, y

30

un portador farmacéuticamente aceptable.

Dichos compuestos de fórmula I se formulan de manera adecuada para dar composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*.

35

Los compuestos de la divulgación pueden formularse para su administración a un sujeto en una variedad de formas dependiendo de la vía de administración seleccionada, tal como entenderán los expertos en la técnica. Un compuesto de la solicitud puede administrarse, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, rectal, por parches, por bombas o transdérmica, y las composiciones farmacéuticas formuladas correspondientemente. La administración parenteral incluye modos de administración intravenosos, intraperitoneales, subcutáneos, intramusculares, transepiteliales, nasales, intrapulmonares, intratecales, rectales y tópicos. La administración parenteral puede ser mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo seleccionado. Procedimientos y componentes convencionales para la selección y preparación de composiciones adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2000 – 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999.

45

Un compuesto de la divulgación puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o puede encerrarse en cápsulas de gelatina de envuelta dura o blanda, o puede comprimirse para dar comprimidos, o puede incorporarse directamente con la comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el compuesto puede incorporarse con un excipiente y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Las formas de dosificación orales incluyen también formulaciones de liberación modificada, por ejemplo, de liberación inmediata

50

y de liberación temporizada. Los ejemplos de formulaciones de liberación modificada incluyen, por ejemplo, liberación sostenida (SR), liberación prolongada (ER, XR o XL), liberación en el tiempo o liberación temporizada, liberación controlada (CR) o liberación continua (CR o Contin), empleadas, por ejemplo, en forma de un comprimido recubierto, un dispositivo de administración osmótico, una cápsula recubierta, una microesfera microencapsulada, una partícula aglomerada, por ejemplo, como partículas de tipo tamiz molecular, o un haz de fibras permeables huecas finas, o fibras permeables huecas cortadas, aglomeradas o mantenidas en un paquete fibroso. Las composiciones de liberación temporizada pueden formularse, por ejemplo, liposomas o aquellas en las que el compuesto activo está protegido con recubrimientos degradables de manera diferencial, tal como mediante microencapsulación, múltiples recubrimientos, etc. Los sistemas de administración de liposomas incluyen, por ejemplo, vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

También es posible liofilizar los compuestos de la divulgación y usar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección.

Un compuesto de la divulgación también puede administrarse por vía parenteral. Pueden prepararse disoluciones de un compuesto de la solicitud en agua mezclado de manera adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, DMSO y mezclas de los mismos con o sin alcohol, y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. Un experto en la técnica conocería cómo preparar formulaciones adecuadas.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersión o disoluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma tiene que ser estéril y tiene que ser fluida en el grado de que exista una capacidad de aplicación mediante jeringa fácil.

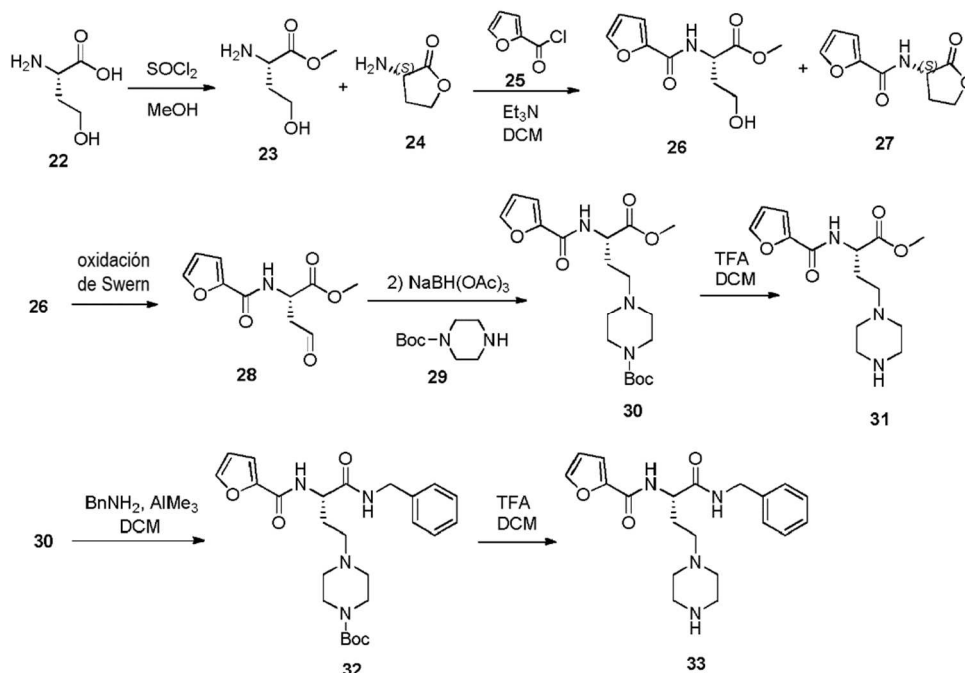
Las composiciones para administración nasal pueden formularse de manera conveniente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones en aerosol comprenden normalmente una disolución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso fisiológicamente aceptable y se presenta habitualmente en cantidades únicas o multidosis en forma estéril en un recipiente sellado, que puede tomar la forma de un cartucho o una recarga para su uso con un dispositivo de atomización. Alternativamente, el recipiente sellado puede ser un dispositivo de dispensación unitario tal como un inhalador nasal de dosis única o un dispensador de aerosol equipado con una válvula de medición que está previsto para su desecho tras el uso. Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador de aerosol, contendrá un propelente que puede ser un gas comprimido tal como aire comprimido o un propelente orgánico tal como fluoroclorohidrocarburo. Las formas de dosificación en aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bomba.

Las composiciones adecuadas para la administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar y pastillas, en las que el principio activo está formulado con un portador tal como azúcar, goma arábiga, tragacanto, o gelatina y glicerina. Las composiciones para administración rectal están de manera conveniente en forma de supositorios que contienen una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao.

Los compuestos de la divulgación también pueden administrarse mediante el uso de anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos de la solicitud también acoplarse con polímeros solubles como portadores de fármacos seleccionables como diana. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituido con residuos palmitoilo. Además, los compuestos de la solicitud pueden estar acoplados a una clase de polímeros biodegradables útiles a la hora de conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliepilson-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque anfipáticos o reticulados de hidrogeles.

Los compuestos de la divulgación pueden usarse solos o en combinación con otros agentes conocidos útiles para tratar enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD tales como PAD2 y PAD4. Cuando se usan en combinación con otros agentes útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados caracterizados por o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD tales como PAD2 y PAD4, es una realización que los compuestos de la solicitud se administran de manera contemporánea con aquellos agentes. Tal como se usa en el presente documento, "administración contemporánea" de dos sustancias a un sujeto significa proporcionar cada una de las dos sustancias de modo que ambas sean biológicamente activas en el individuo al mismo tiempo. Los detalles exactos de la administración dependerán de las farmacocinéticas de las dos sustancias en presencia una de la otra, y pueden incluir administrar las dos sustancias en el plazo de unas pocas horas entre sí, o incluso administrar una sustancia en el plazo de 24 horas de administración de la otra, si las farmacocinéticas son adecuadas. El diseño de regímenes de dosificación adecuados es rutinario para un experto en la técnica. En realizaciones particulares, dos sustancias se administrarán de manera sustancialmente simultánea, es decir, en el plazo de minutos entre sí, o en una única

Esquema 1

**Ejemplo 1: Éster metílico de homoserina (23) y homoserina lactona (24)**

5 Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (10,1 mmol) a un recipiente de reacción enfriado con hielo que contenía MeOH (10 ml) en condiciones anhidras, y la disolución resultante se agitó durante 10 min. Se añadió L-homoserina (22) (4,22 mmol) y se agitó la disolución resultante a 0°C durante 30 min, seguido de calentamiento hasta TA y agitación durante la noche. El disolvente se eliminó a vacío para dar una mezcla 2,3:1 de las sales de hidrocloreto de la lactona 24 y el éster metílico de homoserina 23. Compuesto 23: ¹H RMN (MeOH-d₄) 4,19 (dd, J = 5,14, 7,40 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,72 - 3,81 (m, 2H), 2,13 - 2,23 (m, 1H), 2,01 - 2,12 (m, 1H). Compuesto 24: ¹H RMN (400 MHz, MeOH-d₄) 4,50 - 4,58 (m, 1H), 4,31 - 4,43 (m, 2H), 2,69 - 2,79 (m, 1H), 2,34 (qd, J = 9,03, 11,71 Hz, 1H).

Ejemplo 2: (S)-N-(2-Oxotetrahydrofuran-3-il)furan-2-carboxamida-lactona (27) y hidroxiéster de 2-(furan-2-carboxamido)-4-hidroxibutanoato de (S)-metilo (26).

15 Se añadió cloruro de 2-furoilo (4,22 mmol) a una disolución enfriada con hielo de la mezcla 2,3:1 sin purificar (662 mg) y DIPEA (12,7 mmol) en DCM (25 ml). La disolución resultante se agitó en hielo durante 5 min, seguido de agitación durante la noche a TA. El producto se extrajo en EtOAc, se sometió a tratamiento final y se concentró para proporcionar la amida bruta como mezcla de la lactona y el éster hidroxílico (769 mg). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc en DCM) dio 27 (314 mg) y 26 (319 mg) puros. Compuesto 27: ¹H RMN (400 MHz, MeOH-d₄) 7,66 - 7,71 (m, 1H), 7,16 (dd, J = 0,75, 3,51 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,78 - 4,85 (m, 1H), 4,50 (td, J = 1,76, 9,03 Hz, 1H), 4,35 (ddd, J = 6,65, 9,03, 10,42 Hz, 1H), 2,60 (dddd, J = 1,88, 6,71, 9,00, 12,27 Hz, 1H), 2,36 - 2,50 (m, 1H). Compuesto 26: ¹H RMN (400 MHz, MeOH-d₄) 7,67 - 7,72 (m, 1H), 7,16 (d, J = 3,51 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,74 (dd, J = 4,77, 8,78 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,61 - 3,74 (m, 2H), 2,17 (ddt, J = 5,27, 8,66, 13,93 Hz, 1H), 1,97 - 2,09 (m, 1H).

Ejemplo 3: 4-(3-(Furan-2-carboxamido)-4-metoxi-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo (28).

30 Se añadió DMSO (3,0 mmol) a lo largo de 5 min a una disolución fría (-78°C) de cloruro de oxalilo (1,52 mmol) en DCM anhidro (2 ml) y se agitó a -78°C durante 15 min. Se añadió una disolución de 2-(furan-2-carboxamido)-4-hidroxibutanoato de (S)-metilo 26 (1,01 mmol) en DCM anhidro (5 ml) y se agitó la mezcla de reacción a -78°C durante 15 min. Se añadió Et₃N (5,0 mmol) a lo largo de 5 min, entonces se calentó hasta TA a lo largo de 20 min. El producto se extrajo con DCM, se sometió a tratamiento final, se concentró y se purificó mediante el sistema Isolera (EtOAc/hexano) para obtener el aldehído 28 (86%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 9,77 (s, 1H), 7,48 (dd, J = 0,75, 1,51 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 7,53 Hz, 1H), 7,12 - 7,17 (m, 1H), 6,51 (dd, J = 1,63, 3,39 Hz, 1H), 4,99 - 5,08 (m, 1H), 3,74 - 3,85 (m, 3H), 3,11 - 3,33 (m, 2H).

Ejemplo 4: 4-(3-(Furan-2-carboxamido)-4-metoxi-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo (30).

Se añadió NaBH(OAc)₃ (1,29 mmol) a una disolución de 2-(furan-2-carboxamido)-4-oxobutanoato de (S)-metilo (28) (0,86 mmol) y piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (29) (0,96 mmol) en 1,2-dicloroetano anhidro (15 ml), seguido de 2 gotas de ácido acético glacial. Tras agitar la mezcla de reacción a TA durante 2 h, el producto se extrajo en EtOAc, se sometió a tratamiento final y se purificó mediante el sistema Isolera de Biotage™ (EtOAc en hexano) para obtener el compuesto 30 (90%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,76 (d, J = 6,53 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 0,75, 1,76 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 0,75, 3,51 Hz, 1H), 6,52 (dd, J = 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,73 - 4,84 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,51 (t, J = 4,77 Hz, 4H), 2,35 - 2,62 (m, 6H), 2,08 - 2,20 (m, 1H), 1,92 - 2,07 (m, 1H), 1,43 - 1,52 (m, 9H).

Ejemplo 5: 2-(Furan-2-carboxamido)-4-(piperazin-1-il)butanoato de (S)-metilo (31 o KP-31).

Se añadió TFA (0,20 ml, 2,6 mmol) a una disolución enfriada con hielo de 4-(3-(furan-2-carboxamido)-4-metoxi-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 30 (0,071 mmol) en DCM anhidro (2 ml). La mezcla de reacción se agitó en hielo durante 10 min, entonces a TA durante 2 h. La evaporación del disolvente y TFA a vacío seguido de purificación en fase inversa (Isolera, 5% de EtOH – de 95% agua – 0,05% de TFA) dio un producto semipurificado. Este compuesto se liofilizó, se disolvió en MeOH y se hizo pasar a través de una columna de intercambio catiónico y se eluyó con NH₃-MeOH 2 M, y la purificación adicional mediante el sistema Isolera de Biotage™ seguida de liofilización dio el compuesto del título 31. ¹H RMN (MeOH-d₄) 7,92 (s, 0,4H, NH de amida parcialmente intercambiado), 7,73 (s, 1H), 7,15 (d, J = 3,26 Hz, 1H), 6,62 (dd, J = 1,63, 3,39 Hz, 1H), 4,67 (dd, J = 4,89, 7,15 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 2,88 - 2,98 (m, 4H), 2,38 - 2,64 (m, 6H), 2,14 - 2,26 (m, 1H), 1,99 (dt, J = 6,68, 13,99 Hz, 1H).

Ejemplo 6: 4-(4-(Bencilamino)-3-(furan-2-carboxamido)-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo (32).

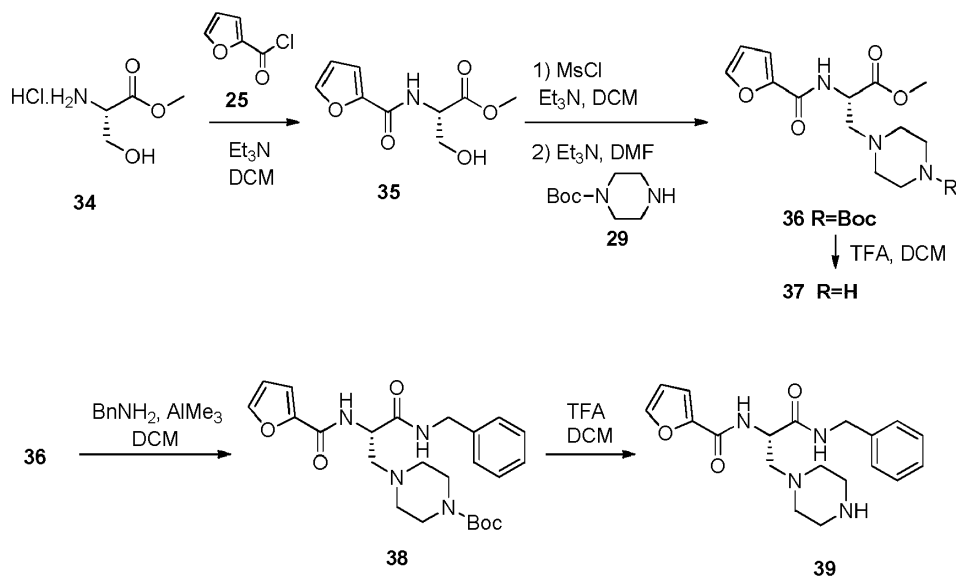
Se añadió trimetilaluminio (2 M en tolueno, 0,38 mmol) a una disolución de bencilamina (0,37 mmol) en DCM anhidro (1 ml) a TA y la mezcla resultante se agitó durante 15 min. Se añadió una disolución de 4-(3-(furan-2-carboxamido)-4-metoxi-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 30 (0,12 mmol) en DCM anhidro a TA durante 3,5 h entonces NaOH (ac.) (1 M, 1 ml). El producto se extrajo con DCM y se purificó mediante Isolera de Biotage™ (EtOAc en hexano) para obtener el producto deseado 32 (64%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,64 (d, J = 6,53 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 1,00 Hz, 1H), 7,22 - 7,40 (m, 6H), 7,12 (d, J = 3,51 Hz, 1H), 6,52 (dd, J = 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,65 - 4,74 (m, 1H), 4,47 - 4,56 (m, 1H), 4,38 - 4,46 (m, 1H), 3,38 (s a., 4H), 2,56 - 2,67 (m, 1H), 2,33 - 2,51 (m, 3H), 2,14 - 2,31 (m, 3H), 1,91 (ddt, J = 3,73, 7,40, 14,74 Hz, 1H), 1,47 (s, 9H).

Ejemplo 7: (S)-N-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(piperazin-1-il)butan-2-il)furan-2-carboxamida (33 o KP-228).

Se añadió TFA (3,9 mmol) a una disolución enfriada con hielo de 4-(4-(bencilamino)-3-(furan-2-carboxamido)-4-oxobutil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 32 (0,072 mmol) en DCM anhidro (2 ml). La mezcla de reacción se agitó en hielo durante 5 min, entonces a TA durante 1,5 h. El producto se extrajo en DCM y la purificación mediante fase inversa usando Isolera (30 g de Biotage RP-18 plus Samplet®, gradiente 5-95% de MeOH-0,1% de TFA en agua) seguido de liofilización dio el compuesto 33 (58%). ¹H RMN (MeOH-d₄) 7,72 (d, J = 1,00 Hz, 1H), 7,29 - 7,36 (m, 4H), 7,22 - 7,28 (m, 1H), 7,19 (d, J = 3,51 Hz, 1H), 6,63 (dd, J = 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,70 (dd, J = 5,52, 7,78 Hz, 1H), 4,37 - 4,47 (m, 2H), 2,84 - 3,02 (m, 4H), 2,67 - 2,83 (m, 2H), 2,22 (dt, J = 6,87, 13,11 Hz, 1H), 1,96 - 2,09 (m, 1H). ¹⁹F RMN (377 MHz, MeOH-d₄) -77,1.

Los ejemplos 8-12 se refieren a los compuestos y la numeración tal como se encuentran en el esquema 2:

Esquema 2

5 **Ejemplo 8: 2-(Furan-2-carboxamido)-3-hidroxiopropanoato de (S)-metilo (35).**

Se añadió cloruro de 2-furoilo 25 (6,58 mmol) de una manera gota a gota a una disolución enfriada con hielo de hidrocloreuro de éster metílico de L-serina 34 (6,48 mmol) y Et₃N (19,5 mmol) en DCM (30 ml). La disolución resultante se agitó en hielo durante 15 min, entonces durante 18 h a TA. El producto se extrajo en DCM, se sometió a tratamiento final y se purificó en un sistema Isolera (EtOAc en DCM) lo que dio una pequeña cantidad de producto diacilado (34,5 mg) junto con el compuesto deseado 35 (840,2 mg, 61%). ¹H RMN (400 MHz, MeOH-d₄) δ 7,71 (d, J= 1,00 Hz, 1H), 7,18 (d, J= 3,51 Hz, 1H), 6,62 (dd, J= 1,63, 3,39 Hz, 1H), 4,71 (t, J= 4,27 Hz, 1H), 3,97 - 4,03 (m, 1H), 3,89 - 3,95 (m, 1H), 3,78 (s, 3H).

15 **Ejemplo 9: 4-(2-(Furan-2-carboxamido)-3-metoxi-3-oxopropil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo (36).**

Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,16 mmol) de una manera gota a gota a una disolución enfriada con hielo de 2-(furan-2-carboxamido)-3-hidroxiopropanoato de (S)-metilo 35 (1,01 mmol) y Et₃N (1,15 mmol) en DCM (5 ml). La disolución resultante se agitó a 0°C durante 1 h, y se añadieron piperazina-1-carboxilato de terc-butilo 29 (1,18 mmol) y Et₃N (2,3 mmol) y la reacción se agitó en hielo durante 40 min y se continuó agitando a TA durante 17 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se añadió DMF (3 ml) y se calentó la mezcla de reacción a 70°C durante 4 h. El producto se extrajo en EtOAc, se sometió a tratamiento final y se purificó mediante Isolera (25 g de columna Silicycle más 2 g de carga seca de sílice, el 40-80% de EtOAc en hexano) lo que dio el compuesto 36 (63%). ¹H RMN (CDCl₃) 7,45 - 7,53 (m, 1H), 7,08 - 7,21 (m, 2H), 6,52 (dd, J= 1,76, 3,51 Hz, 1H), 4,74 (c, J= 6,53 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,42 (t, J= 5,02 Hz, 4H), 2,79 - 2,91 (m, 2H), 2,40 - 2,53 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

25 **Ejemplo 10: 2-(Furan-2-carboxamido)-3-(piperazin-1-il)propanoato de (S)-metilo (37 o KP-225)).**

Se añadió TFA (2,6 mmol) a una disolución enfriada con hielo de 4-(2-(furan-2-carboxamido)-3-metoxi-3-oxopropil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 36 (0,073 mmol) en DCM anhidro (2 ml). La mezcla de reacción se agitó en hielo durante 15 min, entonces a TA durante 1 h. La evaporación del disolvente y TFA a vacío seguida de purificación en fase inversa (Isolera) dio un producto que no era puro (elución con el frente de disolvente usando el 5% de EtOH - el 95% de agua - el 0,05% de TFA). La trituración con éter y la liofilización dieron el compuesto 37 (34 mg, 91%). ¹H RMN (MeOH-d₄) δ 7,71 (d, J= 1,00 Hz, 1H), 7,17 (d, J= 3,51 Hz, 1H), 6,62 (dd, J= 1,63, 3,39 Hz, 1H), 4,83 - 4,87 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,22 (t, J= 4,89 Hz, 4H), 2,95 - 3,07 (m, 2H), 2,86 - 2,95 (m, 2H), 2,76 - 2,86 (m, 2H); ¹⁹F RMN (377 MHz, MeOH-d₄) - 77,1.

30 **Ejemplo 11: 4-(3-(Bencilamino)-2-(furan-2-carboxamido)-3-oxopropil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 38.**

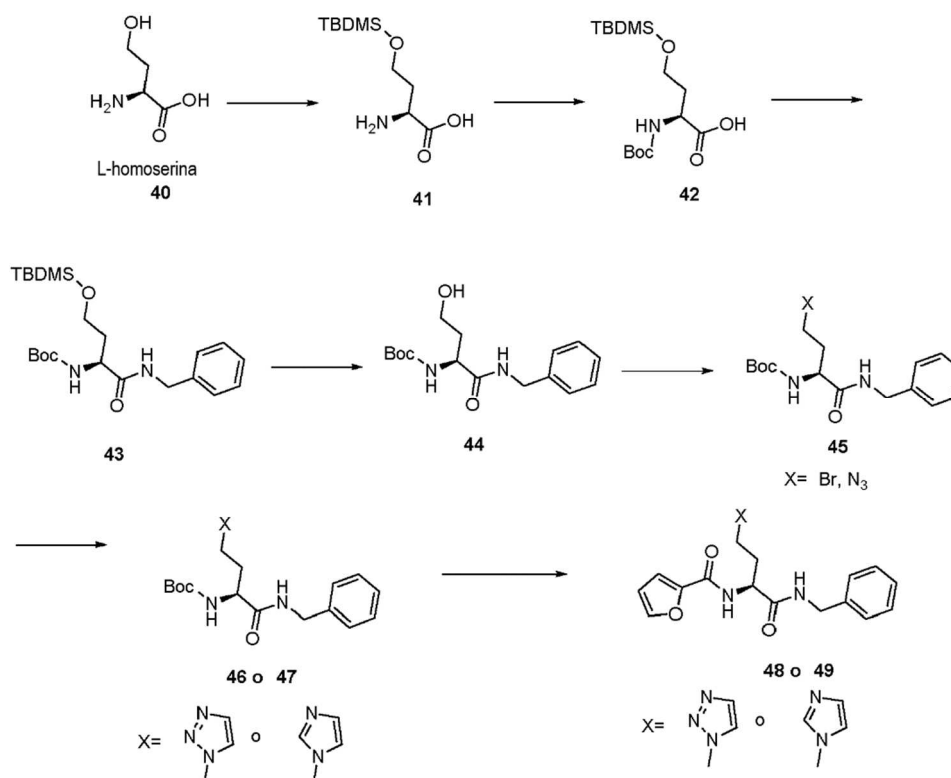
Se añadió Me₃Al (2 M en tolueno, 0,38 mmol) a un disolución de bencilamina (0,37 mmol) en DCM anhidro (1 ml) a TA y la mezcla resultante se agitó durante 15 min. Se añadió una disolución de usando 4-(2-(furan-2-carboxamido)-3-metoxi-3-oxopropil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 36 (0,12 mmol) en DCM anhidro (1,5 ml, más enjuagado con 2 × 1 ml) a TA durante 3,5 h. Se añadió lentamente NaOH_(ac) (1 M, 1 ml) durante las primeras 5 gotas y entonces más rápidamente seguido de agua (1 ml). El producto se extrajo con DCM, se sometió a tratamiento final y se trituró con EtOAc al 15% en hexano para dar 38 como un sólido blanco (71%). ¹H RMN (CDCl₃) 8,12 (s a., 1H), 7,47 - 7,49

(m, 1H), 7,44 (d, $J = 5,52$ Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,28 - 7,32 (m, 3H), 7,11 (d, $J = 3,51$ Hz, 1H), 6,50 (dd, $J = 1,76$, 3,51 Hz, 1H), 4,62 (dd, $J = 6,40$, 14,43 Hz, 1H), 4,52 (ddd, $J = 3,89$, 5,83, 10,10 Hz, 1H), 4,35 (dd, $J = 4,77$, 14,56 Hz, 1H), 3,28 (s a., 4H), 2,89 (dd, $J = 4,02$, 12,55 Hz, 1H), 2,70 (s a., 2H), 2,51 - 2,58 (m, 1H), 2,30 - 2,37 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

5 **Ejemplo 12: (S)-N-(1-(Bencilamino)-1-oxo-3-(piperazin-1-il)propan-2-il)furan-2-carboxamida (S5) (39 o KP-227).**

Se añadió TFA (0,25 ml, 3,3 mmol) a una disolución enfriada con hielo de 4-(3-(bencilamino)-2-(furan-2-carboxamido)-3-oxopropil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc-butilo 38 (0,079 mmol) en DCM anhidro (2 ml). La mezcla de reacción se agitó en hielo durante 10 min, entonces a TA durante 2 h. El producto se extrajo en DCM, se sometió a tratamiento final y se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa en un Isolera de Biotage™ (30 g de Biotage RP-18 plus Samplet®, gradiente del 5-95% de MeOH-0,1% de TFA en agua) seguido de liofilización lo que dio el compuesto 38 (56%). ^1H RMN (400 MHz, MeOH- d_4) δ ppm 8,68 (d, $J = 5,02$ Hz, 1H), 7,71 (dd, $J = 0,75$, 1,76 Hz, 1H), 7,33 (d, $J = 4,52$ Hz, 4H), 7,22 - 7,30 (m, 1H), 7,16 - 7,20 (m, 1H), 6,62 (dd, $J = 1,76$, 3,51 Hz, 1H), 4,74 (t, $J = 7,28$ Hz, 1H), 4,45 - 4,55 (m, 1H), 4,30 - 4,39 (m, 1H), 3,05 - 3,18 (m, 4H), 2,86 - 2,93 (m, 1H), 2,79 - 2,85 (m, 1H), 2,73 - 2,79 (m, 4H); ^{19}F RMN (377 MHz, MeOH- d_4) -77,1.

Esquema 3



Los ejemplos 13 a 22 se refieren a los números y esquemas 3:

25 **Ejemplo 13: O-(Terc-butildimetilsilil)-L-homoserina (41).**

Se disolvieron L-homoserina (40) (1 g, 8,4 mmol) y DBU (8,8 mmol) en 20 ml de MeCN anhidro y se agitó a 0°C. Se disolvió cloruro de terc-butildimetilsililo (8,8 mmol) en 20 ml de MeCN y se añadió gota a gota a lo largo de 5 min. La mezcla de reacción se calentó hasta TA y se agitó durante la noche. Se formó un precipitado blanco y se lavó con MeCN (200 ml), $d\text{H}_2\text{O}$ fría (200 ml) y Et₂O (200 ml) y se secó a vacío para dar 41 como un polvo blanco (78%). ^1H RMN (CD₃OD) δ 3,87 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3,71-3,68 (m, 1H), 2,21-1,93 (m, 2H), 0,93(s, 9H), 0,12 (s, 6H).

30 **Ejemplo 14: N-(Terc-butoxicarbonil)-O-(terc-butildimetilsilil)-L-homoserina (42).**

Se disolvió el compuesto 41 (10,11 mmol) en una disolución de 50 ml de acetona:dH₂O 1:1. Se añadieron Et₃N (15,17 mmol) y Boc-anhídrido (11,12 mmol) a la reacción y se agitó a TA. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 95:5 hasta que se consumió completamente 41. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y la fase acuosa restante se acidificó hasta pH 2,0 con ácido cítrico al 10%. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x200 ml) y se secó sobre MgSO₄ para dar 42 como un sólido blanco viscoso (81%). ^1H RMN (CDCl₃): δ 5,92 (d, 1H, NH), 4,33, (c, 1H), 3,81 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 1,441 (s, 9H), 0,910 (s, 9H), 0,08 (d, $J = 4$ Hz, 6H).

Ejemplo 15: (S)-(1-(Bencilamino)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (43)

Se disolvió el compuesto **42** (8,16 mmol) en 15 ml de MeCN anhidro, a lo que se le añadieron DIPEA (24,47 mmol) y HATU (8,97 mmol) y se agitó a 4°C. Se añadió gota a gota bencilamina (8,97 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a 4°C durante 6 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en 15 ml de EtOAc, se extrajo con dH₂O (150 ml) y salmuera (150 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto se purificó entonces mediante cromatografía en sílice en un gradiente del 5-30% de EtOAc en hexanos para dar **43** como un aceite transparente (85%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,37 (m, 5H), 7,10 (d, 1H, NH), 6,20 (d, 1H, NH), 4,55 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,41 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 0,99 (s, 9H), 0,145 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo 16: (S)-(1-(Bencilamino)-4-hidroxi-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (44).

Se disolvió el compuesto **43** (2,67 mmol) en 10 ml de THF anhidro y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota TBAF (2,67 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 3:2 hasta que se consumió **43**. El disolvente de reacción se eliminó y el producto bruto restante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 10-80% en hexanos para dar **44** como un sólido blanco (82%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,59 (d, 1H, NH), 7,30-7,20 (m, 5H), 5,86 (d, 1H, NH), 4,38 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 1,98-1,69 (m, 2H), 1,40 (s, 9H).

Ejemplo 17: (S)-(1-(Bencilamino)-4-bromo-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (45a).

Se disolvieron el compuesto **44** (810,71 μmol) y tetrabromuro de carbono (1,22 mmol) en 10 ml de DCM anhidro y se agitó a 0°C. Se disolvió trifenilfosfina (1,22 mmol) en 5 ml de DCM anhidro y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a lo largo de un periodo de 5 min. La reacción se agitó a 0°C durante 10 min y entonces se permitió que se calentara hasta TA. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 3:7 hasta que se consumió **44**. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 10-40% en hexanos para dar **45a** como un polvo blanco (58%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,59 (d, 1H, NH), 7,22 (m, 5H), 6,09 (d, 1H, NH), 4,41 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 3,39 (m, 2H), 2,42-2,14 (m, 2H), 1,40 (s, 9H).

Ejemplo 18: (S)-(4-Azido-1-(bencilamino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (45b).

Se disolvió el compuesto **44** (5,67 mmol) en 5 ml de DCM anhidro y se agitó a 0°C. Se añadieron gota a gota DIPEA (17,02 mmol) y MsCl (6,24 mmol) y se agitó adicionalmente a 0°C hasta que se consumió **44**. El disolvente de reacción se evaporó entonces y se volvió a disolver el producto bruto en 30 ml de EtOAc y se lavó con NH₄Cl diluido (150 ml) y salmuera (150 ml) y se secó sobre MgSO₄. La fase orgánica se evaporó y el sólido amarillo resultante volvió a disolverse en 5 ml de DMF anhidra. Se añadió azida de sodio (4,0 eq) a la reacción y se agitó a 60°C durante 2,5 h. El disolvente de reacción se evaporó, el producto bruto se disolvió en EtOAc y se sometió a tratamiento final y se purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc:hexanos) para dar **45b** como un líquido viscoso (55%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,32-7,24 (m, 5H), 6,684 (ancho s, 1H, NH), 5,26 (d, 1H, NH), 4,40 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,21 (septuplete, 1H), 3,41 (m, 2H), 2,09-2,01 (m, 1H), 1,96-1,92 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).

Ejemplo 19: (S)-(1-(Bencilamino)-4-(1H-imidazol-1-il)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (46)

Se disolvió el compuesto **45a** (1,40 mmol) en 3 ml de DMF anhidra y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota una disolución de imidazol (3,50 mmol) y DIPEA (2,10 mmol) en DMF a una mezcla de bromuro y se agitó adicionalmente a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 9:1 hasta que se consumió **45a**. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en EtOAc (100 ml), se sometió a tratamiento final y se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-70% en hexanos y entonces en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar **46** como un sólido amarillo (76%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,17 (s, 1H), 7,32 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,21 (m, 5H), 6,87 (d, J = 4 Hz, 1H), 5,94 (d, 1H, NH), 4,38 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,22 (m, 1H), 3,97 (m, 2H) 2,24-1,99 (m, 2H), 1,43 (s, 9H).

Ejemplo 20: (S)-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)carbamato de terc-butilo (47).

A una suspensión de CuI (1,28 mmol) en 5 ml de THF anhidro, se le añadieron TEMED (1,28 mmol), Et₃N (1,28 mmol) y TMS-acetileno (6,45 mmol) y se agitó a TA. Se disolvió **45b** (2,58 mmol) en 10 ml de THF anhidro y se añadió inmediatamente a la mezcla de reacción y se permitió que se agitase a TA durante 18 h. La reacción se extinguió con dH₂O y se extrajo en 60 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó entonces con salmuera (150 ml) y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-60% en hexanos para dar un sólido blanco. El compuesto se disolvió en 10 ml de THF anhidro que contenía AcOH 1 M y se agitó a 0°C. Se añadió TBAF (470 μl, 1,62 mmol) y se permitió que la reacción se calentara hasta TA y se agitará durante 16 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-5% en DCM para dar **47** como un sólido blanco (75%). ¹H RMN

trató entonces con tres cloruros de acilo diferentes para dar los respectivos productos intermedios **5a-5c**. La desililación seguida de mesilación y sustitución directa con *N*-metilpiperazina dio los compuestos **8** (o KP-289), **9** (o KP-287) y **10** (o KP-295) con rendimientos que variaban desde el 25-30%.

5 **Ejemplo de referencia 23: O-(Terc-butildimetilsilil)-L-homoserina (2).**

Se disolvieron L-homoserina (1 g, 8,4 mmol) y DBU (1,32 ml, 8,8 mmol) en 20 ml de MeCN anhidro y se agitó a 0°C. Se disolvió cloruro de terc-butildimetilsililo (1,32 g, 8,8 mmol) en 20 ml de MeCN y se añadió gota a gota a lo largo de 5 min. La mezcla de reacción se calentó hasta TA y se agitó durante 16 h. Se formó un precipitado blanco y se lavó con MeCN (200 ml), H₂O fría (200 ml) y Et₂O (200 ml), y se secó a vacío para dar **2** como un polvo blanco (1,45 g, 78%). ¹H RMN (CD₃OD) δ 3,87 (t, J = 6 Hz, 2H), 3,71-3,68 (m, 1H), 2,21-1,93 (m, 2H), 0,93 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). ¹³C RMN (CD₃OD) δ 61,9, 54,7, 34,4, 26,4, -5,4; m.p: 148-153 °C.

15 **Ejemplo de referencia 24: N-((9[H]-Fluoren-9-il)metoxi) carbonil-O-(terc-butildimetilsilil)-L-homoserina (3).**

A una disolución de **2** (1,45 g, 6,2 mmol) en 100 ml de NaHCO₃ al 5% (p/v) en MeCN al 50%/H₂O, se le añadió Fmoc-O-succinimida (2,30 g, 6,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA y se monitorizó mediante TLC en EtOAc al 100% hasta que se observó consumo de **2**. El disolvente de reacción se eliminó a vacío y la suspensión restante se acidificó hasta pH 2,0 con ácido cítrico al 10%. La fase acuosa se extrajo en EtOAc (3 × 200 ml) y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 5-40% en hexanos para dar **3** como un semisólido blanco viscoso (2,41 g, 82%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,57 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,60 (t, J = 6 Hz, 2H), 7,39 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,30 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 6,15 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,21 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,82 (t, 2H), 2,18-2,05 (m, 2H), 0,91 (s, 9H), 0,09 (s, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 156,4, 143,9, 141,4, 127,8, 127,2, 125,2, 120,1, 67,3, 60,7, 53,1, 47,3, 33,5, 25,9, 18,3, -5,5.

25

Ejemplo de referencia 25: (S)-2-Amino-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-N-isopropilbutanamida (4).

Se disolvió el compuesto **3** (1,64 g, 3,6 mmol) en 5 ml de DMF anhidra, a lo que se le añadieron DIPEA (1,88 ml, 10,8 mmol) y HATU (1,51 g, 3,6 mmol) y se agitó a 4°C. Se añadió gota a gota isopropilamina (4,56 ml, 36,0 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a 4°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 7:3, hasta que se consiguió la desprotección completa de Fmoc. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto se disolvió en 15 ml de DCM, se lavó con H₂O (200 ml), salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-100% en hexanos para dar **4** como un aceite amarillo (0,39 g, 75%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,68 (m, 1H, NH), 6,15 (m, 1H, NH), 4,10 (m, 1H), 4,03 (septuplete, 1H), 3,75 (m, 2H), 1,97 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 1,13 (d, J = 6 Hz, 6H), 0,91 (s, 9H), 0,075 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 170,3, 59,5, 51,1, 40,6, 38,2, 30,7, 25,8, 22,2, 22,1, -5,4.

35

Ejemplo de referencia 26: (S)-N-(4-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)furan-2-carboxamida (5a).

40

Se disolvió el compuesto **4** (0,36 g, 1,46 mmol) en 5 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (762 µl, 4,38 mmol) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de 2-furoilcarbonilo (215 µl, 2,19 mmol) a la mezcla y se agitó adicionalmente a 0°C durante 3 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se disolvió en DCM (30 ml) y se extrajo con NaHCO₃ sat. (200 ml), H₂O (hasta que se neutralizó el pH) y salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-5% en DCM para dar **5a** como un semisólido viscoso amarillo (0,14 g, 49%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,77 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 4 Hz, 1H), 6,70 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,50 (s a, 1H, NH), 4,73 (m, 1H), 4,09 (septuplete, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 2,16 (m, 1H), 2,06 (m, 1H), 1,12 (d, J = 4 Hz, 6H), 0,93 (s, 9H), 0,105 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 158,3, 147,7, 144,1, 114,6, 112,2, 61,0, 51,7, 41,6, 34,4, 26,0, 22,6, 18,4, -5,3.

45

50

Ejemplo de referencia 27: (S)-N-(4-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)morfolina-4-carboxamida (5b).

Se disolvió el compuesto **4** (0,33 g, 1,20 mmol) en 5 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (1,05 ml, 6 mmol) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de morfolinacarbonilo (210 µl, 1,8 mmol) a la reacción a 0°C. La reacción se monitorizó según el procedimiento descrito para el compuesto **5a**. El compuesto diana **5b** se obtuvo como un semisólido blanco (0,245 g, 53%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,71 (s a, 1H, NH), 6,02 (m, 1H, NH), 4,41 (c, 1H), 4,04 (dc, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,67 (m, 4H), 3,37 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,92 (m, 1H), 1,15 (d, J = 4 Hz, 6H), 0,91 (s, 9H), 0,085 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 171,4, 157,5, 66,5, 61,4, 53,0, 44,5, 44,1, 35,3, 26,1, 22,8, 18,5, -5,1.

55

60

Ejemplo de referencia 28: (S)-N-(4-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)ciclohexanocarboxamida (5c).

Se disolvió el compuesto **4** (0,33 g, 1,20 mmol) en 5 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (1,05 ml, 6 mmol) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de ciclohexilcarbonilo (240 µl, 1,8 mmol) a 0°C. La reacción se

65

monitorizó según el procedimiento descrito para 5a para obtener el compuesto diana. El compuesto 5c se obtuvo como un sólido blanco (0,2 g, 45%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,61 (s a, 1H, NH), 5,85 (s a, 1H, NH), 4,40 (c, 1H), 4,05 (dc, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,77 (m, 1H), 3,33 (m, 4H), 2,03 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,59-1,54 (m, 6H), 1,12 (d, J = 4 Hz, 6H), 0,91 (s, 9H), 0,085 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 171,6, 157,3, 61,4 53,0 47,8 44,8 41,2 34,8 25,9 25,5 24,3, 22,6, 22,5, -5,3. p.f.: se descompone a 310°C..

Ejemplo de referencia 29: (S)-N-(4-Hidroxi-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il) furan-2-carboxamida (6a).

Se disolvió el compuesto 5a (0,14 g, 379,87 μmol) en 5 ml de THF anhidro, a lo que se le añadió TBAF (165 μl, 569,81 μmol) y se agitó la reacción a 0°C durante 30 min. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH al 0-10% en DCM para dar 6a como un semisólido viscoso amarillo (0,075 g, 81%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,53 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,45 (m, 1H, NH), 7,13 (d, 1H), 6,75 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 6,51 (m, 1H, NH), 4,75 (m, 1H), 4,08 (septuplete, 1H), 3,72 (m, 2H), 2,09 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,16 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo de referencia 30: (S)-N-(4-Hidroxi-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)morfolina-4-carboxamida (6b).

El compuesto 6b se sintetizó a partir de 5b (0,245 g, 632,11 μmol) siguiendo el procedimiento de reacción descrito para 6a. El compuesto 6b se proporcionó como un sólido blanco (0,103 g, 63%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,04 (d, 1H, NH), 5,75 (m, 1H, NH), 4,45 (septuplete, 1H), 4,21(s a, 1H, OH), 4,05 (m, 1H) 3,69 (m, 6H), 3,34 (m, 4H), 1,97 (m, 1H), 1,65 (m, 1H), 1,17 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 171,4, 157,5, 66,5, 61,4, 53,0, 44,5, 44,1, 35,3, 26,1, 22,8, 18,5, -5,1. p.f.: se descompone a 210°C.

Ejemplo de referencia 31: (S)-N-(4-Hidroxi-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il) ciclohexanocarboxamida (6c).

El compuesto 6c se sintetizó a partir de 5c (0,2 g, 519,98 μmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 6a. El compuesto 6c se proporcionó como un semisólido blanco (0,11 g, 78%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,61 (d, 1H, NH), 5,85 (d, 1H, NH), 4,40 (c, 1H), 4,05 (dc, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,77 (m, 1H), 3,33 (m, 4H), 2,03 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,59-1,54 (m, 6H), 1,12 (d, J = 4 Hz, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 171,6, 157,3, 61,40, 53,0, 47,8, 44,8, 41,2, 34,9, 25,9, 25,5, 24,3, 22,6.

Ejemplo de referencia 32: Procedimiento general para la preparación del L-R1-Hse-OMs correspondiente (7). El compuesto correspondiente 6a-6c (0,05 g) se disolvió en aproximadamente 5 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (3,0 eq) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (2.5 eq) a la reacción a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 95:5 hasta que se consumió el material de partida. El disolvente se evaporó y el producto bruto se disolvió en 10 ml de DCM, y se lavó con NH₄Cl diluido (150 ml), salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO₄. Se evaporó el disolvente para dar el mesilato correspondiente. Los productos intermedios se usaron inmediatamente para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Ejemplo de referencia 33: (S)-N-(1-(Isopropilamino)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-1-oxobutan-2-il)furan-2-carboxamida (8; KP-289).

Se disolvió el compuesto 7a (0,05 g, 182,93 μmol) en 2 ml de DMF anhidra y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota 1-metilpiperazina (18,15 μl, 163,62 μmol) a 0°C y se permitió que la reacción se calentara hasta 60°C y se agitará durante 2 h. Tras completarse la reacción, el disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en DCM (50 ml) y se lavó con H₂O (150 ml), salmuera (150 ml) y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 8 como un semisólido viscoso transparente (0,019 g, 25%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,89 (s a, 1H, NH), 7,49 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 4 Hz, 1H) 6,78 (m, 1H, NH), 6,52 (dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, 1H) 4,47 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,69 (m, 4H), 3,39 (m, 4H), 2,79 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,12 (s, 3H), 1,21 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo de referencia 34: (S)-N-(1-(Isopropilamino)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-1-oxobutan-2-il)morfolina-4-carboxamida (9; KP-287).

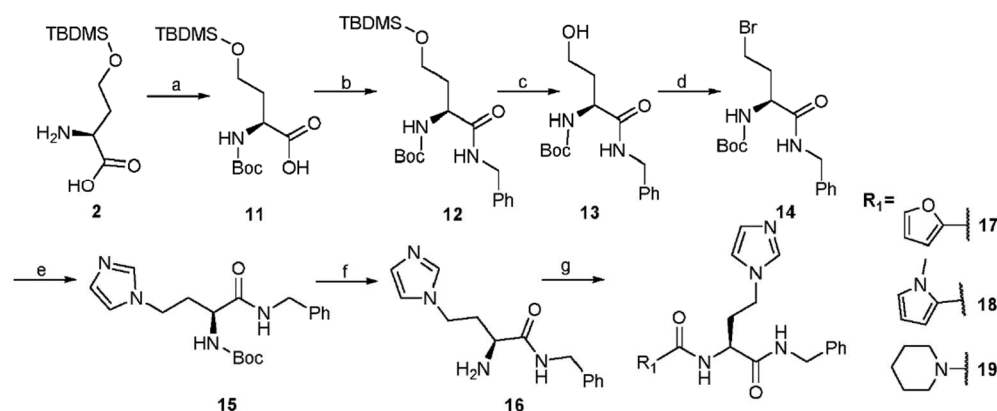
El compuesto 9 se sintetizó a partir de 7b (0,14 g, 243,85 μmol) siguiendo el protocolo de reacción descrito para 8. El compuesto 9 se obtuvo como un semisólido transparente viscoso (0,056 g, 27%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 4,68 (m, 1H), 4,06 (septuplete, 1H), 2,73 (m, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,37 (m, 8H), 1,12 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo de referencia 35: (S)-N-(1-(Isopropilamino)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-1-oxobutan-2-il)ciclohexanocarboxamida (10; KP-295).

El compuesto 10 (0,05 g, 80,4 μmol) se sintetizó a partir de 7c siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 8. El compuesto 10 se como un sólido blanco (0,006 g, 30%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,13 (d, 1H, NH), 4,54 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,125 (c, 2H), 2,85 (m, 1H), 2,17 (m, 1H), 2,14 (s, 3H), 1,91-1,37 (m, 10H), 1,23 (d, J = 4 Hz, 6H). P.F.: 418-420°C.

Los ejemplos 36-45 se refieren a los compuestos y la numeración encontrados en el esquema 5:

Esquema 5



- 5 Reactivos y condiciones: (a) Boc₂O (1,1 eq), Et₃N (1,5 eq), MeCN:H₂O 50:50, TA, 4 h; (b) HATU (1,10 eq), DIPEA (3,0 eq), bencilamina (1,1 eq), DMF_(anh.), atm. de N₂, 0°C→TA, 16 h; (c) TBAF (1,0 eq), THF_(anh.), atm. de N₂, 0°C→TA, 2 h; (d) CBr₄ (1,5 eq), PPh₃ (1,5 eq), DCM_(anh.), atm. de N₂, 0°C→TA, 2,5 h; (e) imidazol (2,5 eq), DIPEA (1,5 eq), DMF_(anh.), atm. de N₂, 0°C→TA, 16 h; (f) TFA al 30%, DCM_(anh.), atm. de N₂, 0°C, 45 min; (g) para R₂COCl: DIPEA (3,0 eq), DCM_(anh.), atm. de N₂, 0°C, 4 h; para R₂COOH: HATU (1,1 eq), DIPEA (3,0 eq), MeCN_(anh.), atm. de N₂, 0°C→TA, 16 h.

10 Se obtuvieron inhibidores sustituidos con *N*-imidazol siguiendo el esquema 5, ya que intentos por sintetizar estos compuestos a partir de un producto intermedio de mesilato mostraron ser desfavorables y el subproducto γ -insaturado, β . La protección de amino del producto intermedio 2 se hizo con Boc en lugar de Fmoc debido a la inestabilidad del último en las condiciones de desililación usadas normalmente, y se proporcionó el producto intermedio 11. Se llevó a cabo acoplamiento en condiciones de HATU con bencilamina en lugar de isopropilamina debido a las dificultades presentadas durante la bromación en presencia de este grupo funcional y se proporcionó el producto intermedio 13. La desililación y bromación con tetrabromuro de carbono y trifenilfosfina dieron el producto intermedio 14. Las sustituciones de *N*-imidazol se optimizaron cuando se trató 1*H*-imidazol con un equivalente de DIPEA y se agitó durante una hora en DMF a 0°C y se añadió gota a gota al producto intermedio 14 para dar 15 en un rendimiento del 65%. El tratamiento de 15 con TFA dio amino 16 que se hizo reaccionar con tres cloruros de acilo y ácidos carboxílicos diferentes para dar los compuestos 17 (o KP-301), 18 (o KP-302) y 19 (o KP-303) en rendimientos del 25-35%.

Ejemplo 36: N-(Terc-butoxicarbonil)-O-(terc-butildimetilsilil)-L-homoserina (11).

25 Se disolvió el compuesto 2 (2,36 g, 10,11 mmol) en 50 ml de disolución de acetona:H₂O 1:1. Se añadieron Et₃N (2,12 ml, 15,17 mmol) y Boc-anhídrido (2,43 g, 11,12 mmol) a la reacción y se agitó a TA durante 6 h. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 95:5 hasta que se consumió completamente 2. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y la fase acuosa restante se acidificó hasta pH 2,0 con ácido cítrico al 10%. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml) y se secó sobre MgSO₄. El compuesto 11 se obtuvo como un aceite transparente viscoso (2,72 g, 81%). 1H RMN (CDCl₃) δ 5,92 (d, 1H, NH), 4,33 (c, 1H), 3,81 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 1,441 (s, 9H), 0,910 (s, 9H), 0,08 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo 37: (S)-(1-(Bencilamino)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (12).

35 Se disolvió el compuesto 11 (2,72 g, 8,16 mmol) en 15 ml de MeCN anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (4,26 ml, 24,47 mmol) y HATU (3,41 g, 8,97 mmol) y se agitó a 4°C. Se añadió gota a gota bencilamina (980,0 μ l, 8,97 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a 4°C durante 6 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en 15 ml de EtOAc y se extrajo con H₂O (150 ml), salmuera (150 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente del 5-30% de EtOAc en hexanos para dar 12 como un aceite transparente (2,29 g, 85%). 1H RMN (CDCl₃) δ 7,37 (m, 5H), 7,10 (d, 1H, NH), 6,20 (d, 1H, NH), 4,55 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,41 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 0,99 (s, 9H), 0,15 (d, J = 4 Hz, 6H).

Ejemplo 38: (S)-(1-(Bencilamino)-4-hidroxi-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (13).

45 Se disolvió el compuesto 12 (1,13 g, 2,67 mmol) en 10 ml de THF anhidro y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota TBAF (774,17 μ l, 2,67 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a 0°C durante 30 min. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 3:2 hasta que se consumió 12. El disolvente de reacción se eliminó y el producto bruto restante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 10-80% en hexanos

para dar 13 como un sólido blanco (0,680 g, 82%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,59 (d, 1H, NH), 7,30-7,20 (m, 5H), 5,86 (d, 1H, NH), 4,38 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 1,98-1,69 (m, 2H), 1,40 (s, 9H). P.F.: 330-333 °C.

Ejemplo 39: (S)-(1-(bencilamino)-4-bromo-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (14).

Se disolvieron el compuesto 13 (0,25 g, 810,71 μmol) y tetrabromuro de carbono (0,318 g, 1,22 mmol) en 10 ml DCM anhidro y se agitó a 0°C. Se disolvió trifenilfosfina (0,403 g, 1,22 mmol) en 5 ml de DCM anhidro y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a lo largo de un periodo de 5 min. La reacción se agitó a 0°C durante 10 min y entonces se permitió que se calentara hasta TA. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 3:7 hasta que se consumió 13. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 10-40% en hexanos para dar 14 como un polvo blanco (0,173 g, 58%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,59 (d, 1H, NH), 7,22 (m, 5H), 6,09 (d, 1H, NH), 4,41 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 3,39 (m, 2H), 2,42-2,14 (m, 2H), 1,40 (s, 9H). P.F.: 328-330°C.

Ejemplo 40: (S)-(1-(Bencilamino)-4-(1[H]-imidazol-1-il)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (15).

Se disolvió el compuesto 14 (0,52 g, 1,40 mmol) en 3 ml de DMF anhidra y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota una disolución de imidazol (0,238 g, 3,50 mmol) y DIPEA (365,94 μl, 2,10 mmol) en DMF a una mezcla de bromuro y se agitó adicionalmente a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 9:1 hasta que se consumió 14. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en EtOAc (100 ml) y se extrajo con H₂O (300 ml) y salmuera (300 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-70% en hexanos y entonces en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 15 como un semisólido amarillo (0,38 g, 76%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,17 (s, 1H), 7,32 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,21 (m, 5H), 6,87 (d, J = 4 Hz, 1H), 5,94 (d, 1H, NH), 4,38 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,22 (m, 1H), 3,97 (m, 2H), 2,24-1,99 (m, 2H), 1,43 (s, 9H).

Ejemplo 41: (S)-2-Amino-N-bencil-4-(1[H]-imidazol-1-il)butanamida (16).

Se disolvió el compuesto 15 (0,38 g, 1,40 mmol) en una disolución de DCM anhidro con TFA al 30% y se agitó a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en DCM:MeOH 95:5 hasta que se consumió 15. El disolvente de reacción se diluyó con tolueno y se evaporó a vacío para eliminar el TFA en exceso para dar 16 como un sólido cristalino amarillo (0,356 g, rendimiento cuantitativo).

Ejemplo 42: (S)-N-(1-(Bencilamino)-4-(1[H]-imidazol-1-il)-1-oxobutan-2-il)furan-2-carboxamida (17; KP-301). Se disolvió el compuesto 16 (0,095 g, 367,76 μmol) en 3 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (320,29 μl, 1,84 mmol) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de 2-furoilo (36,26 μl, 367,76 μmol) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 30 min y se permitió que se calentara hasta TA y se agitará durante 12 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se disolvió en 15 ml de EtOAc y se extrajo con NaHCO₃ sat. (200 ml), H₂O (hasta que se neutralizó el pH), salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-5% en DCM para dar 17 como un semisólido viscoso amarillo (0,025 g, 20%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,41 (d, J = 4 Hz, 2H), 7,69 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,28 (m, 5H), 7,09 (d, J = 4 Hz, 1H), 6,92 (d, 1H), 6,50 (dd, J = 4 Hz, 1H), 5,53 (d, 1H, NH), 4,72 (m, 1H), 4,40 (dd, J = 4 Hz, 2H), 3,97 (m, 2H), 2,24-1,99 (m, 2H).

Ejemplo 43: (S)-N-(1-(Bencilamino)-4-(1[H]-imidazol-1-il)-1-oxobutan-2-il)piperidina-1-carboxamida (18; KP-302).

Se disolvió el compuesto 16 (0,095 g, 367,7 μmol) en 3 ml de DCM anhidro, a lo que se le añadió DIPEA (320,29 μl, 1,84 mmol) y se agitó a 0°C. Se añadió gota a gota cloruro de 1-piperidinacarbonilo (46 μl, 367,76 μmol) a 0°C y se agitó a TA durante 4 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto se disolvió en 10 ml de EtOAc y se extrajo con H₂O (100 ml) y salmuera (100 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 18 como un semisólido blanco (0,120 g, 65%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,82 (s, 1H), 7,57 (d, 1H, NH), 7,33 (m, 5H), 6,59 (d, 1H, NH), 4,40 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,29 (m, 1H), 3,66 (m, 2H), 3,6 (m, 2H), 2,50 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 1,74 (p, 4H), 1,54 (m, 2H).

Ejemplo 44: (S)-N-(1-(Bencilamino)-4-(1[H]-imidazol-1-il)-1-oxobutan-2-il)-1-metil-1[H]-pirrol-2-carboxamida (19; KP-303).

Se disolvió ácido N-metilpirrol-2-carboxílico (0,046 g, 367,76 μmol) en 2 ml de DMF anhidra, a lo que se le añadieron DIPEA (320,29 μl, 1,84 mmol) y HATU (0,139 g, 367,76 μmol) y se agitó a 0°C durante 20 min. Se disolvió el compuesto 16 (0,095 g, 367,76 μmol) en 1 ml de DMF y se añadió a la mezcla de reacción y se agitó durante 1 h a 0°C y entonces se calentó hasta TA y se agitó durante 12 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto se disolvió en 50 ml de EtOAc y se extrajo con H₂O (100 ml) y salmuera (100 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-15% en DCM para dar 19 como un semisólido blanco (0,02 g, 27%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,18 (s, 1H), 7,53 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,34 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,27 (m, 5H), 7,08 (d, J = 4 Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,09 (d, 1H, NH), 5,54 (d, 1H), 4,63 (m, 1H),

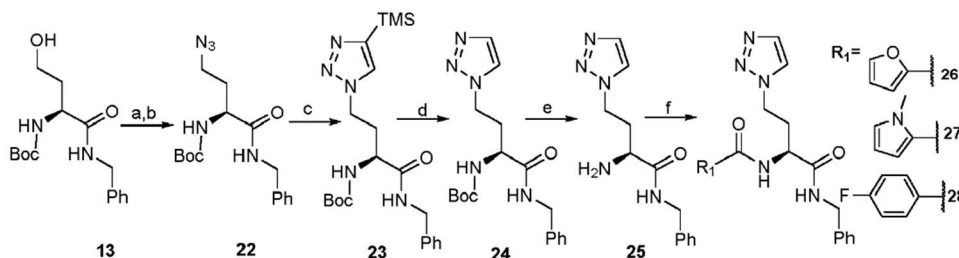
4,40 (dd, $J = 4$ Hz, 2H), 4,00 (m, 2H), 3,88 (s, 3H), 2,24-1,99 (m, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 179,4, 171,1, 162,2, 138,1, 128,8, 127,7, 127,6, 113,1, 107,7, 50,2, 43,62, 3,91, 34,3.

Ejemplo de referencia 45: (S)-N-(4-(1[H]-imidazol-1-il)-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)furan-2-carboxamida (20; KP-286).

Se preparó una disolución de imidazol (0,0536 g, 788,20 μmol) y DIPEA (0,0612 g, 472,92 μmol) en 2 ml de DMF anhidra y se agitó a TA durante 30 min. El compuesto 5a (0,1 g, 315,28 μmol) se disolvió en 1 ml de DMF anhidra y se añadió gota a gota a la mezcla antes de la agitación a 0°C. La reacción se monitorizó mediante TLC en EtOAc:hexanos 3:1 hasta que se consumió 5a. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en 50 ml de EtOAc y se lavó con H₂O (100 ml) y salmuera (100 ml), y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-100% en hexanos para dar 20 como un semisólido viscoso amarillo (0,025 g, 35%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,89 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,49 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,19 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,03 (d, 1H, NH), 6,78 (m, 1H, NH), 6,52 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,15 (d, 1H, NH), 4,59 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 4,08 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 1,18 (d, $J = 4$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 171,3, 161,3, 137,8, 133,1, 128,7, 128,1, 126,0, 120,6, 113,3, 111,8, 50,3, 43,2, 38,5, 35,8. (S)-N-(4-(4-(Cianometil)-1[H]-imidazol-1-il)-1-(isopropilamino)-1-oxobutan-2-il)furan-2-carboxamida (21). De manera similar, el compuesto 21 (KP-288) se sintetizó a partir de 6a (0,14 g, 213,3 μmol) siguiendo el procedimiento descrito para 20 para obtener el compuesto 21 como un semisólido amarillo parduzco (0,035 g, 27%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,55 (s, 1H), 7,17 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,07 (d, 1H, NH), 7,03 (m, $J = 4$ Hz, 1H), 6,54 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J = 4$ Hz, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,74 (m, 1H), 3,67 (s, 2H), 2,34 (m, 2H), 2,18 (m, 2H), 1,15 (d, $J = 4$ Hz, 6H).

Los ejemplos 46-52 se refieren a los compuestos y la numeración en el esquema 6:

Esquema 6



Reactivos y condiciones: a) MsCl (1,1 eq), DIPEA (3,0 eq), $\text{DCM}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , 0°C, 45 min; b) NaN_3 (4,0 eq), $\text{DMF}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , 60°C, 2,5 h; c) CuI (1,0 eq), TEMED (1,0 eq), Et₃N (1,0 eq), TMS-acetileno (2,5 eq), $\text{THF}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , TA, 18 h; d) TBAF (1,5 eq), $\text{THF}_{(\text{anh.})}$, AcOH al 10%, atm. de N_2 , 0°C → TA, 16 h; e) TFA al 30%, $\text{DCM}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , 0°C, 45 min; f) para R_2COCl : DIPEA (3,0 eq), $\text{DCM}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , 0°C, 4 h; para R_2COOH : HATU (1,1 eq), DIPEA (3,0 eq), $\text{ACN}_{(\text{anh.})}$, atm. de N_2 , 0°C → TA, 16 h.

La síntesis de los compuestos 26-28 se llevó a cabo usando el esquema 6, ya que las sustituciones directas de 1H,2,3- y 1H,2,4-triazolos con o bien un mesilato o bien un producto intermedio de bromo fueron insatisfactorias. El producto intermedio 13 se convirtió en producto intermedio de azida 22, en primer lugar mediante la activación del alcohol mediante mesilación, seguido del tratamiento con azida de sodio. La formación de 1H,2,3-triazol prosiguió con el tratamiento del producto intermedio 22 con TMS-acetileno en presencia de un catalizador de cobre para dar 23 en un rendimiento del 66%. El mecanismo de reacción para esta síntesis de triazol tiene lugar a través de un mecanismo de cicloadición de Huisgen modificada por Sharpless. La desilitación y descarbama dieron el producto intermedio 24 que se acopló con los cloruros de acilo y ácidos carboxílicos correspondientes para dar los compuestos 26 (o KP-314), 27 (o KP-313) y 28 (o KP-316) en rendimientos del 40-55%.

Ejemplo 46: (S)-(4-Azido-1-(bencilamino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (22).

Se disolvió el compuesto 13 (1,75 g, 5,67 mmol) en 5 ml de DCM anhidro y se agitó a 0°C. Se añadieron gota a gota DIPEA (2,97 ml, 17,02 mmol) y MsCl (483,16 μl , 6,24 mmol) y se agitó adicionalmente a 0°C hasta que se consumió 13. El disolvente de reacción se evaporó entonces y el producto bruto volvió a disolverse en 30 ml de EtOAc y se lavó con NH₄Cl diluido (150 ml) y salmuera (150 ml), y se secó sobre MgSO₄. La fase orgánica se evaporó y el sólido amarillo resultante volvió a disolverse en 5 ml de DMF anhidra. Se añadió azida de sodio (1,47 g, 22,61 mmol) a la reacción y se agitó a 60°C durante 2,5 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se disolvió en 30 ml de EtOAc y se lavó con H₂O (150 ml) y salmuera (150 ml), se secó sobre MgSO₄ y se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 10-60% en hexanos para dar 22 como un semisólido viscoso claro (1,04 g, 55%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,32-7,24 (m, 5H), 6,68 (s a, 1H, NH), 5,26 (d, 1H, NH), 4,40 (dd, $J = 4$ Hz, 2H), 4,21 (septuplete, 1H), 3,41 (m, 2H), 2,09-2,01 (m, 1H), 1,96-1,92 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).

Ejemplo 47: (S)-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(4-(trimetilsilil)-1[H]-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)carbamato de terc-butilo (23).

5 A una suspensión de CuI (0,245 mg, 1,28 mmol) en 5 ml de THF anhidro, se le añadieron TEMED (193 μ l, 1,28 mmol), Et3N (180 μ l, 1,28 mmol) y TMS-acetileno (918 μ l, 6,45 mmol) y se agitó a TA. Se disolvió el compuesto 22 (0,860 g, 2,58 mmol) en 10 ml de THF anhidro y se añadió inmediatamente a la mezcla de reacción y se permitió que se agitara a TA durante 18 h. La reacción se extinguió con H2O y se extrajo en 60 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó entonces con salmuera (150 ml) y se secó sobre MgSO4. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de EtOAc del 30-60% en hexanos para dar 23 como un semisólido blanco (0,430 g, 62%). 1H RMN (CDCl3) δ 7,57 (s, 1H), 7,51 (m, 1H, NH), 7,28-7,19 (m, 5H), 5,87 (d, 1H, NH), 4,47 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,39 (m, 2H), 4,30 (septuplete, 1H), 2,47-2,39 (m, 1H), 2,30-2,25 (m, 1H), 1,40 (s, 9H), 0,29 (s, 9H).

Ejemplo 48: (S)-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(1[H]-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)carbamato de terc-butilo (24).

15 Se disolvió el compuesto 23 (0,7 g, 1,62 mmol) en 10 ml de THF anhidro que contenía AcOH 1 M y se agitó a 0°C. Se añadió TBAF (470 μ l, 1,62 mmol) a 0°C y se permitió que la reacción se calentara hasta TA y se agitara durante 16 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-5% en DCM para dar 24 como un semisólido blanco (0,435 g, 75%). 1H RMN (CDCl3) δ 7,65 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,32-7,26 (m, 5H), 6,74 (s a, 1H, NH), 5,32 (d, 1H, NH), 4,47 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,43 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 2,47-2,240 (m, 1H), 2,33-2,26 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).

Ejemplo 49: (S)-2-Amino-N-bencil-4-(1[H]-1, 2,3-triazol-1-il)butanamida (25).

25 Se disolvió el compuesto 24 (0,430g, 1,196 mmol) en 10 ml de DCM anhidro con TFA al 30% y se agitó a 0°C durante 45 min. El disolvente de reacción se diluyó con tolueno y se evaporó para eliminar el TFA en exceso y proporcionar 25 un sólido viscoso amarillo. El producto bruto se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,620 g, rendimiento cuantitativo).

Ejemplo 50: (S)-N-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(1[H]-1,2,3-triazol-il)butan-2-il)furan-2-carboxamida (26; KP-314).

30 Se disolvieron el compuesto 25 (0,305 g, 1,18 mmol) y DIPEA (614,63 μ l, 3,53 mmol) en 7 ml de DCM anhidro y se agitó a 0°C durante 45 min. Se añadió cloruro de 2-furoilo (116,31 μ l, 1,18 mmol) a la mezcla de reacción gota a gota a 0°C y se permitió que se agitara adicionalmente durante 10 min. Se permitió que la reacción se calentara hasta TA y se agitara a lo largo de 16 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se disolvió en 20 ml de EtOAc y se lavó con NaHCO3 sat. (200 ml), H2O (hasta que se neutralizó el pH), salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO4. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 26 como un semisólido viscoso marrón claro (75 mg, 45%). 1H RMN (CDCl3) δ 7,77 (m, 1H, NH), 7,70 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,56 (s, 1H), 7,49 (d, J = 4 Hz, 1H), 4,45 (s, 1H), 7,29-7,21 (m, 5H), 7,03 (dd, J = 7,2 Hz, J = 4 Hz, 1H), 6,48 (s a, 1H, NH), 4,70 (m, 1H), 4,49 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,45 (m, 2H), 2,38-2,33 (m, 1H), 2,43-2,36 (m, 1H). 13C RMN (CDCl3) δ 170,6, 157,9, 146,9, 143,8, 136,9, 129,2, 128,8, 126,7, 112,1, 111,1, 55,7, 46,8, 43,2, 30,1.

Ejemplo 51: (S)-N-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(1[H]-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)-1-metil-1[H]-pirrol-2-carboxamida (27; KP-313).

45 Se disolvió ácido N-metilpirrol-2-carboxílico (147,17 mg, 1,18 mmol) en 3 ml de DMF anhidra, a lo que se le añadieron HATU (491,95 mg, 1,29 mmol) y DIPEA (614,63 μ l, 3,53 mmol) y se agitó a 0°C durante 45 min. El compuesto 25 (0,305 g, 1,18 mmol) se disolvió en 2 ml de DMF y se añadió gota a gota a la mezcla a 0°C. Se permitió que la reacción se calentara hasta TA y se agitara durante 16 h. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto bruto resultante se disolvió en 30 ml de EtOAc y se lavó con H2O (200 ml) y salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO4. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 27 como un semisólido blanco (0,120 g, 62%). 1H RMN (CDCl3) δ 7,97 (s, 1H), 7,76 (d, J = 7 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,47 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,29-7,19 (m, 5H), 6,77 (d, J = 7 Hz, 1H, NH), 6,05 (d, J = 4 Hz, 1H), 5,30 (d, 1H, NH), 4,62 (septuplete, 1H), 4,52 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,40 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,91-2,79 (m, 1H), 1,83-1,67 (m, 1H).

Ejemplo de referencia 52: (S)-N-(1-(Bencilamino)-1-oxo-4-(1[H]-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)-4-fluorobenzamida (28; KP-316).

60 Se disolvió ácido p-fluorobenzoico (0,148 g, 1,0605 mmol), en 5 ml de DMF anhidra, a lo que se le añadieron HATU (403,24 mg, 1,065 mmol) y DIPEA (510 μ l, 2,892 mmol) y se agitó a 0°C durante 45 min. El compuesto 25 (0,250 g, 0,964 mmol) se disolvió en 2 ml de DMF y se añadió gota a gota a la mezcla a 0°C. Se permitió que la reacción se calentara hasta TA y se agitara durante 16 h. El disolvente de reacción se evaporó y el producto bruto resultante se disolvió en 30 ml de EtOAc y se lavó con H2O (200 ml), salmuera (200 ml), y se secó sobre MgSO4. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en sílice en un gradiente de MeOH del 0-10% en DCM para dar 28 como un sólido blanco (0,125 g, 62%). 1H RMN (CDCl3) δ 7,99 (t, 1H), 7,95 (t, 1H), 7,77 (td, 2H), 7,65 (d, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,27-7,19 (m, 5H), 7,01 (td, 2H), 4,79 (septuplete, 1H), 4,46 (dd, J = 4 Hz, 2H), 4,38 (d, 2H), 2,55-2,48 (m, 1H), 2,45-

2,39 (m, 1H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 170,9, 166,7, 163,7, 137,7, 129,7, 128,6, 127,5, 115,7, 115,4, 51,1, 46,9, 43,6, 33,3. ¹⁹F RMN (CDCl₃) δ -107,14 (s, 1F). P.F.: 180-185 °C.

Ejemplo 53: Inhibición de la actividad PAD.

Materiales: Se adquirieron PAD1, PAD2, PAD3 y PAD4 de fuentes comerciales. **Tampón de ensayo:** Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM. **Reactivo de color:** 1 volumen de reactivo A (diacetilmonoxima 80 mM, tiosemicarbazida 2 mM) y 3 volúmenes de reactivo B (el 17,35% v/v de H₃PO₄, el 33,7% v/v de H₂SO₄, y 0,765 mg/ml de sulfato de amonio-hierro (III)).

Los ensayos se realizaron a 37°C en presencia de cada inhibidor en el intervalo de concentración de 1 a 1000 μM de cada inhibidor sometido a prueba. El inhibidor (12,5 μl de disolución madre) se mezcló con una cantidad apropiada de disolución madre de sustrato (BAEE) y se incubó previamente a 37°C durante un periodo en el intervalo de 0-60 min. La reacción se inició mediante la adición de la enzima. Las muestras de reacción se incubaron durante un periodo en el intervalo de 0-60 min. Se añadió reactivo de color (en el intervalo de 50-300 μl/muestra) y se hicieron ebullición las muestras durante un periodo en el intervalo de 0-45 min en un baño de agua. Las muestras se enfriaron en hilo, se sometieron a vórtex y se centrifugaron. Se transfirieron alícuotas de 200 μl a la placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 530 nm y se calculó la actividad restante. Los resultados para los compuestos a modo de ejemplo de fórmula I se muestran en la Figura 3. La inhibición de PAD1 se muestra en la Figura 3A, mientras que la inhibición de PAD4 se muestra en la Figura 3B. Los datos de actividad restante se representaron gráficamente frente a la concentración de inhibidor y se ajustaron a la ecuación de dosis-respuesta para calcular la CI₅₀. Los resultados para PAD1 para los compuestos de fórmula I se muestran en la tabla 1. Los resultados para los compuestos de fórmula I se muestran en la Figura 4 y la tabla 2 para PAD2. Los resultados para los compuestos de fórmula I se muestran en la Figura 5 y las tablas 3 y 4, para PAD4. Los resultados para PAD1, PAD2 y PAD4 para los compuestos adicionales de fórmula I se muestran en la tabla 5.

Ejemplo 54: Inhibición de la actividad PAD (tabla 6).

Se adquirieron PAD1 y PAD4 humanas, y PAD2 de ratón de SignalChem (Richmond, BC). Se adquirieron éster etílico de benzoilarginina (BAEE), DTT, diacetilmonoxima, tiosemicarbazida y sulfato de amonio-hierro (III) de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). **Tampón de ensayo:** Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM. **Reactivo de color:** 1 volumen de reactivo A (diacetilmonoxima 80 mM, tiosemicarbazida 2 mM) y 3 volúmenes de reactivo B (el 17,35% v/v de H₃PO₄, el 33,7% v/v de H₂SO₄ y 0,765 mg/ml de sulfato de amonio-hierro (III)). Los valores de logP y pKa experimentales se obtuvieron usando ChemBioDraw Ultra v. 13.0.

Estos estudios de inhibición de hPAD1, hPAD4 y mPAD2 se realizaron a 37°C. Se usó tampón de ensayo que contenía DMSO al 5% para disolver y diluir todos los inhibidores sometidos a prueba. Las muestras de enzima y de disolución madre de sustrato se prepararon también en DMSO al 5%/tampón de ensayo. El inhibidor (12,5 μl de disolución madre) se mezcló con 25 μl de enzima y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 12,5 μl de sustrato 20 mM y se devolvieron las muestras al incubador (37°C) durante 30 min adicionales. La reacción control sin inhibidor contenía la misma cantidad de DMSO que las muestras de inhibición. La concentración final de hPAD1, hPAD4 en la mezcla de reacción era de 50 nM y la de PAD2 era 100 nM. La concentración de sustrato era de 5 mM. Los inhibidores se sometieron a prueba a 0,1, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mM. Tras la incubación de 30 min con sustrato, se añadió el reactivo de color (200 μl/muestra). Las muestras se hicieron ebullición durante 15 min en un baño de agua, se enfriaron en hielo, se sometieron a vórtex y se centrifugaron brevemente. Se transfirieron alícuotas de 200 μl a la placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 530 nm.

Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos con hPAD1, mPAD2 y hPAD4 y se calcularon las constantes de inhibición para los compuestos junto con valores de logP y pKa experimentales (tabla 6). Las sustituciones en los aminoácidos de cadena lateral así como los grupos en los extremos amino- y carboxilo-terminales influyeron en las actividades inhibitoras de los inhibidores PAD sintetizados. Los compuestos **KP-301**, **KP-302**, **KP-303**, **KP-287** mostraron actividad frente a las PAD ($K_i > 200$ -500 μM). Los compuestos **KP-286**, **KP-288** portaban el radical furoilo N-terminal, la isopropilamina C-terminal y los imidazoles sustituidos correspondientes. **KP-286** mostró una eficacia inhibitora de más de 5 veces para hPAD4 en comparación con hPAD1 y mPAD2 lo que sugiere especificidad y selectividad frente a esta isozima. **KP-288** mostró una eficacia inhibitora de al menos 3 veces frente a hPAD1 en comparación con otras isozimas. El imidazol sustituido **KP-302** y el triazol **KP-314** mostraron actividades frente a las PAD ($K_i < 200$ μM) con una selectividad de al menos 2 veces frente a mPAD2 en comparación con hPAD1 y hPAD4.

Se llevó a cabo un análisis SAR para interpretar los resultados de los datos de inhibición para dilucidar los efectos de las cadenas laterales sobre la inhibición global así como su implicación en la selectividad y especificidad frente a las isozimas sometidas a prueba (tabla 7). La selectividad se evaluó calculando las relaciones de inhibición entre cada isozima, para cada isozima, sugiriendo las relaciones mayores de 2 veces selectividad.

Ejemplo 55: Estudios sobre el modelo de ratón MOG-EAE.

El modelo de ratón MOG-EAE se ha usado tradicionalmente como modelo animal autoinmune de la enfermedad esclerosis múltiple en humano.⁵¹ Se usó un modelo de ratón MOG-EAE (ratones C57BL/6, n=11) para investigar la eficacia de los compuestos de la solicitud. Los ratones recibieron una dosis en el intervalo de 1-150 mg/kg del compuesto de prueba *q.d. (i.p.)*.

5 Tratamiento y monitorización: Los compuestos de la divulgación se prepararon en PBS, se esterilizaron con filtro y se administraron diariamente por medio de inyección IP. Los ratones en el grupo control recibieron PBS. El tratamiento se inició cuando los ratones alcanzaron una puntuación de 2 o 2,5 (13-16 días tras la inmunización) y continuó hasta el día 60. El peso y las puntuaciones se registraron periódicamente. Las puntuaciones se asignaron según las directrices proporcionadas en SOP R-04 (UHN ARC). Tras concluirse el experimento, se retiró tejido (cerebro, médula espinal e hígado) para su análisis adicional. La Figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de dos compuestos de la divulgación en un modelo de ratón *in vivo*, EAE, para estudiar la eficacia de los inhibidores de PAD. La Figura 7 muestra los niveles de PAD2 y citrulinación en corteza cerebral de ratón, correspondientes al estudio en la Figura 6. Las imágenes muestran la sección transversal coronal de la corteza cerebral teñida con anticuerpo de PAD2 y anticuerpo de citrulina. El tejido se recogió de ratones sanos y afectados por EAE. Los ratones EAE se trataron con o bien PBS, KP-302 o bien KP-305. El anticuerpo secundario presenta coloración marrón. Los puntos de color azul son tinción de fondo. Se muestra la misma área del cerebro en cada espécimen teñido con PAD2 o citrulina.

20 **Ejemplo 56: Estudios sobre el modelo de ratón MOG-EAE (figuras 8-12).**

Un estudio con compuesto 18 (etiquetado KP-302) se llevó a cabo en modelos animales EAE (Fig. 8). A los ratones hembra C57BL/6 (n= 7) EAE inducidos con péptido glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) se les inyectó una disolución 10 mg/ml (dosis de 1 mg por ratón) de KP-302 tras 12 días de inmunización. Sus puntuaciones de EAE se midieron y compararon con el grupo control (PBS, n = 5) para analizar los efectos de KP-302 sobre la regeneración de la función motora. Hay una disminución significativa en las puntuaciones de EAE en el grupo de tratamiento en comparación con PBS a lo largo del transcurso de tratamiento, lo que sugiere que KP-302 tiene potencial en el restablecimiento de las funciones motoras en modelos de enfermedad.

30 Se realizaron estudios en animales según un protocolo revisado y aprobado por el Comité de cuidado animal en el Toronto General Hospital, University Health Network. El almacenamiento, la manipulación y el uso de toxina Pertussis fueron aprobados por el Comité de bioseguridad de la UHN y por la Agencia de salud pública de Canadá. El péptido MOG se adquirió de Stanford Pan Facility. La toxina Pertussis se obtuvo de LIST Biologicals como polvo liofilizado libre de sal. El adyuvante de Freund incompleto (IFA) (DIFCO, cat. 263910) y *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (DIFCO, 231141) se adquirieron de BD Biosciences, Canadá.

35 Se adquirieron ratones hembra de siete semanas de edad (C57BL/6) de Jackson Laboratories (NY, EE. UU.). Los animales se alojaron en la instalación del Animal Resource Center (UHN, Toronto) y se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura reguladas. El alimento y el agua estaban disponibles a voluntad. Se indujo encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) en ratones de 8 semanas de edad mediante inmunización con péptido glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG₃₃₋₅₅) emulsionado en adyuvante de Freund completo (100 µg de MOG por ratón por medio de inyección subcutánea) seguido de la administración intraperitoneal de toxina Pertussis (PTX) (400 ng por ratón). La inyección de PTX se repitió 48 horas tras la inmunización inicial. Los ratones se monitorizaron diariamente para los síntomas de EAE. Los síntomas empezaron a desarrollarse 8-14 días tras la inmunización. Se pesaron los ratones y se asignaron puntuaciones de EAE cada día. El tratamiento se inició una vez que los animales alcanzaron una puntuación de 2 (cola flácida y paresia sueva de al menos una extremidad posterior).

45 Se preparó KP-302 en 1x PBS estéril pH 7,4, se esterilizó con filtro y se administró diariamente por medio de inyección intraperitoneal. La dosis de KP-302 era de 1 mg por ratón. Los ratones control recibieron el mismo volumen de PBS. Los órganos recogidos se procesaron y se tiñeron en el TCP (Toronto Center for Fenogenomics, Toronto, ON). Los tejidos de cerebro y médula espinal se tiñeron con Luxol Fast Blue (LFB) y hematoxilina y eosina (H&E). El tejido de cerebro se tiñó también con anticuerpo frente a PAD2, PAD4, citrulina y células T (CD3+ve).

50 Los portaobjetos se digitalizaron usando el escáner de fondo claro ScanScope XT (Aperio Technologies) a un aumento máximo de 20x. Las imágenes se vieron y analizaron con el visualizador de imágenes libres ImageScope (Aperio Technologies). Los análisis cuantitativos de las lesiones cerebrales se realizaron usando el algoritmo Positive Pixel Count incluido en el programa ImageScope. La inspección visual de los portaobjetos permitió la evaluación del tipo de lesiones que afectan al tejido del SNC. El grado de inflamación se determinó calculando la relación del área afectada con respecto al área total de la sección transversal de tejido por espécimen. El algoritmo Positive Pixel Count se usó para cuantificar la cantidad de una mancha específica presente en la imagen escaneada. Los parámetros de color (tono y saturación) se especificaron para el análisis de tejido teñido con CD3 +ve. Los intervalos de intensidad se dejaron a los valores por defecto.

65 En primer lugar, las áreas inflamadas se seleccionaron manualmente y el número de píxeles positivos correspondientes a la tinción apropiada se obtuvo usando el algoritmo Positive Pixel Count. El área total del tejido se seleccionó cuidadosamente excluyendo espacios huecos (sistemas ventriculares) y se calculó el área. El número de

células teñidas por unidad de área (μm^2) se calculó basándose en el área de píxeles, el área promedio de las células teñidas (tomadas aleatoriamente, medidas y promediadas).

5 La Figura 9 son micrográficos que muestran el cerebelo de ratones sanos (A) y afectados con EAE (B y C). Los animales control de EAE recibieron PBS y a los animales tratados con fármaco se les inyectó (i.p.) 1 mg por ratón de KP-302 diariamente. Las flechas apuntan a lesiones (manguitos perivasculares) formadas en el cerebelo de ratones enfermos. Los ratones que recibieron PBS tenían un número mayor de lesiones más pronunciadas en comparación con los ratones tratados con KP-302. Se observó a menudo que al área del tracto olfativo lateral (Figura D-F) estaba afectada por lesiones. (E) Se muestra una lesión y leptomeningitis linfocítica en ratón tratado con PBS. Las áreas correspondientes (indicadas mediante flechas) ratón sano y tratado con KP-302 están claras. Leucoencefalitis perivascular, inflamación linfocítica y neutrófila a lo largo de cápsula interna. (G) Control sano, (H) control con PBS, (I) tratado con KP-302. Aumento 20x. La barra de escala indica 100 μm . Aumento 20x (visualizador ImageScope).

15 La Figura 10 muestra la inmunohistoquímica de cerebros de ratones afectados por EAE. El tejido se sondeó con anticuerpo CD3+ve para detectar linfocitos T en el SNC de ratones sanos y enfermos. Los animales enfermos se trataron con PBS o KP-302.

20 La Figura 11 muestra tinción con CD3 +ve para linfocitos de células T. Se muestra la inflamación en el cerebelo (A - C) y a lo largo de la cápsula interna (D - F). La inflamación tal como se indica mediante el número de células T infiltrantes era en general más grave en los ratones que recibieron PBS. El tejido recogido de ratones tratados con KP-302 mostró lesiones más suaves y las células T dispersadas no se asociaron claramente con ninguna lesión específica. Aumento 20x (visualizador ImageScope)

25 La Figura 12 muestra células PAD2-positivas y células citrulina-positivas tal como se cuantificaron para tejido cerebral de ratones sanos, control de EAE (PBS) y tratados para EAE (KP-302).

30 Aunque la presente solicitud se ha descrito con referencia a lo que se considera en el presente documento que con los ejemplos preferidos, debe entenderse que el alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado por las realizaciones preferidas expuestas en los ejemplos, sino que se le debe dar la interpretación más amplia consistente con la descripción en su conjunto.

35 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad en el mismo grado que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se hubiese indicado específica e individualmente que se incorpora mediante referencia en su totalidad. Cuando se encuentre que un término en la presente solicitud se define de manera diferente en un documento incorporado en el presente documento mediante referencia, la definición proporcionada en el presente documento debe servir como definición para el término.

Tabla 1. Constante de inhibición K_i de PAD1, PAD2 y PAD4 para KP-224 y KP-226 (compuesto 31) determinada.

| Código | $K_i \pm$ error estándar (μM) | | |
|--------|--|----------------|----------------|
| | PAD1 | PAD2 | PAD4 |
| KP-224 | 64,0 \pm 4,2 | 21,3 \pm 3,4 | 35,2 \pm 7,0 |
| KP-226 | 64,6 \pm 7,6 | 19,7 \pm 2,0 | 27,6 \pm 8,1 |

40

Tabla 2 Actividad restante de PAD2 en presencia de inhibidores de PAD.

| | Actividad restante (%) | |
|-----------------------|-------------------------|----------------|
| | [I] = 100 μM | [I] = 1 mM |
| KP-225 (compuesto 37) | 86,6 \pm 3,0 | 70,8 \pm 1,7 |
| KP-227 (compuesto 39) | 63,7 \pm 0,6 | 68,2 \pm 2,3 |
| KP-228 (compuesto 33) | 58,6 \pm 3,6 | 31,8 \pm 4,9 |
| KP-229 | 54,0 \pm 2,7 | 63,3 \pm 2,0 |
| KP-230 | 55,1 \pm 0,5 | 33,5 \pm 0,4 |
| KP-231 | 44,4 \pm 0,5 | 45,5 \pm 1,1 |

Tabla 3. Actividad restante de PAD4 en presencia de inhibidores de PAD.

| | Actividad restante (%) | |
|--------|-------------------------|----------------|
| | [I] = 100 μM | [I] = 1 mM |
| KP-224 | 97,2 \pm 0,8 | 76,0 \pm 1,2 |

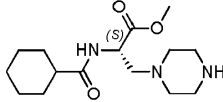
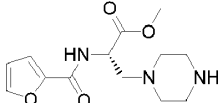
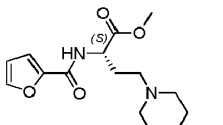
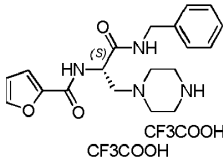
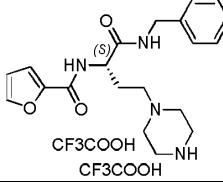
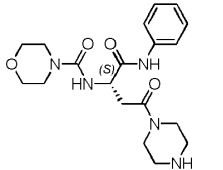
45

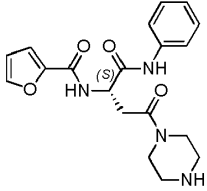
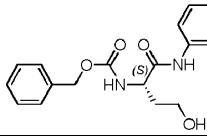
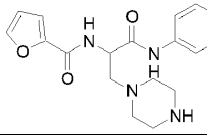
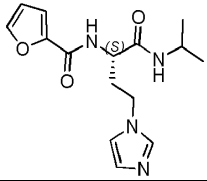
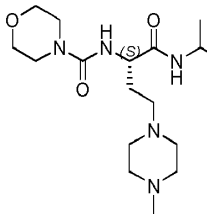
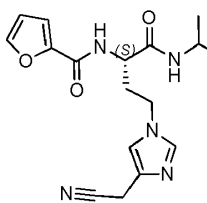
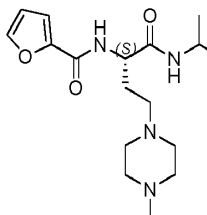
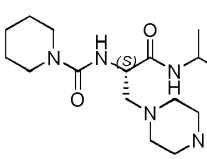
| | Actividad restante (%) | |
|-----------------------|------------------------|-----------------|
| | [I] = 100 μ M | [I] = 1 mM |
| KP-226 (compuesto 31) | 66,3 \pm 4,7 | 100,0 \pm 3,6 |

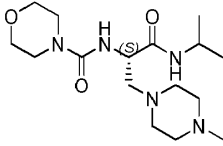
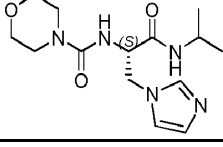
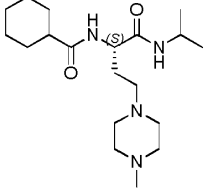
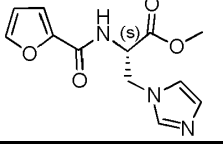
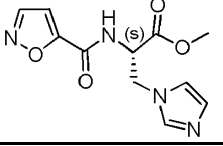
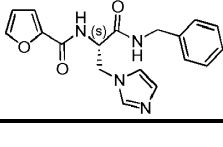
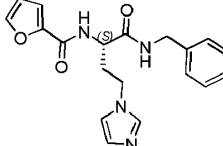
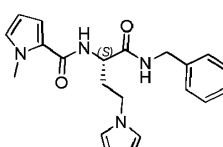
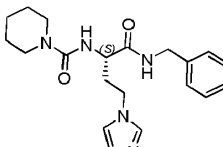
Tabla 4. Actividad restante de PAD4 en presencia de inhibidores de PAD.

| | Actividad restante (%) | |
|-----------------------|------------------------|-----------------|
| | [I] = 100 μ M | [I] = 1 mM |
| KP-225 (compuesto 37) | 78,7 \pm 9,5 | 62,2 \pm 2,7 |
| KP-227 (compuesto 39) | 100,0 \pm 1,3 | 82,2 \pm 2,4 |
| KP-228 (compuesto 33) | 96,4 \pm 10,4 | 82,1 \pm 7,2 |
| KP-229 | 100,0 \pm 5,5 | 100,0 \pm 2,6 |
| KP-230 | 96,9 \pm 7,6 | 82,4 \pm 1,7 |
| KP-231 | 100,4 \pm 4,6 | 82,3 \pm 3,7 |

Tabla 5 Actividad para PAD1, PAD2, PAD4

| Estructura | Código KP | PAD1 $K_i \pm$ error estándar (μ M) | PAD2 $K_i \pm$ error estándar (μ M) | PAD4 $K_i \pm$ error estándar (μ M) |
|---|-----------|--|--|--|
|  | KP-224 | | | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-225 | | | |
|  | KP-226 | | 286 \pm 27 | |
|  | KP-227 | | | |
|  | KP-228 | | | |
|  | KP-229 | | | |

| Estructura | Código KP | PAD1 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD2 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD4 $K_i \pm$ error estándar (μM) |
|---|-----------|--|---|---|
|  | KP-230 | | | |
|  | KP-231 | | | |
|  | KP-257 | | | |
|  | KP-286 | 2495 \pm 1785 | 554 \pm 93 | 714 \pm 100 |
|  | KP-287 | Algo de inhibición pero no se calculó la CI_{50} - sin K_i | 600 \pm 1332 | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-288 | 914 \pm 59 | 176 \pm 62 | 591 \pm 77 |
|  | KP-289 | | 1786 \pm 2420 | 488 \pm 47 |
|  | KP-290 | | | Sin inhibición hasta 10 mM |

| Estructura | Código KP | PAD1 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD2 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD4 $K_i \pm$ error estándar (μM) |
|---|-----------|---|---|---|
|  | KP-291 | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-292 | | | ~14940 |
|  | KP-295 | | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-298 | 782 \pm 384 | 662 \pm 210 | 1238 \pm 1393 |
|  | KP-299 | No soluble - no sometido a prueba | No soluble - no sometido a prueba | No soluble - no sometido a prueba |
|  | KP-300 | Sin inhibición hasta 10 mM | 739 \pm 339 | 1068 \pm 427 |
|  | KP-301 | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-302 | 402 \pm 98 | 60 \pm 12 | 180 \pm 12 |
|  | KP-303 | 392 \pm 72 | 1387 \pm 270 | 220 \pm 35 |

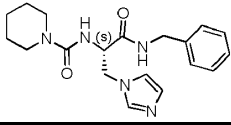
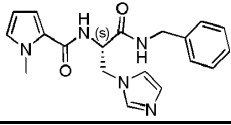
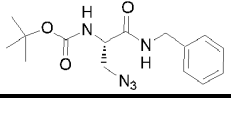
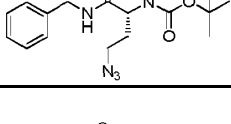
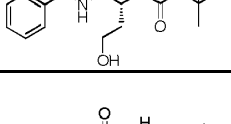
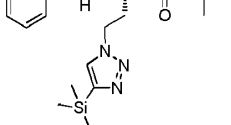
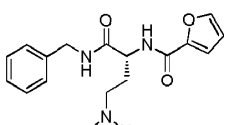
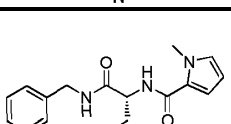
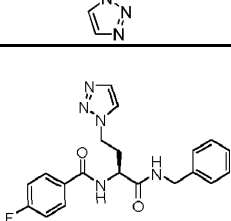

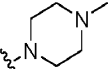





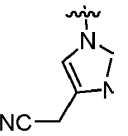



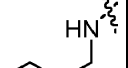


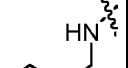


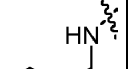
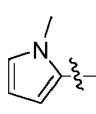
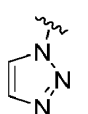
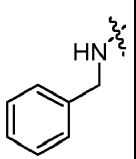
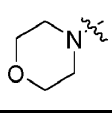
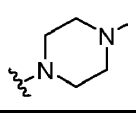
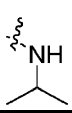
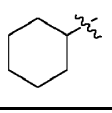
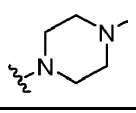
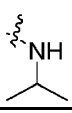
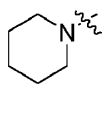
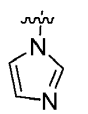
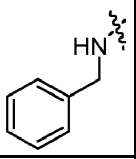
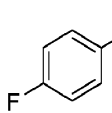
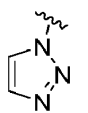
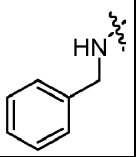
| Estructura | Código KP | PAD1 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD2 $K_i \pm$ error estándar (μM) | PAD4 $K_i \pm$ error estándar (μM) |
|---|-----------|---|---|---|
|  | KP-304 | | 5300 \pm 7830 | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-305 | 147 \pm 52 | 58 \pm 5 | 75 \pm 9 |
|  | KP-306 | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-310 | 3430 \pm 1941 | 1429 \pm 186 | 1453 \pm 187 |
|  | KP-311 | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM | Sin inhibición hasta 10 mM |
|  | KP-312 | | | |
|  | KP-313 | 1086 \pm 499 | 282 \pm 86 | 2823 \pm 1804 |
|  | KP-314 | 112 \pm 17 | 71 \pm 18 | 64 \pm 28 |
|  | KP-316 | 77690 \pm 91480 | Algo de inhibición, pero no puede calcularse la CI_{50} - sin K_i | Algo de inhibición, pero no puede calcularse la CI_{50} - sin K_i |

Tabla 6. Cinéticas de inhibición de enzima para los compuestos no covalentes *hPAD1*, *mPAD2* y *hPAD4* y Cl_{50} de ensayos de toxicidad de células CHO para inhibidores no covalentes sintetizados.

| # | K_i (μM) | | | Cl_{50} de células CHO (μM) | pKa de cadena lateral predicha | logP predicho |
|--------|-------------------------|-----------------|-------------------|--|--------------------------------|---------------|
| | <i>hPAD1</i> | <i>mPAD2</i> | <i>hPAD4</i> | | | |
| KP-289 | N/D | 1838 \pm 2421 | 488 \pm 47 | >2000 | 6,1, 5,8 | -0,69 |
| KP-287 | >10,000 | >10,000 | >10,000 | >2000 | 6,1, 5,8 | -1,45 |
| KP-295 | N/D | > 10,000 | > 10,000 | N/D | 6,1, 5,8 | 0,78 |
| KP-286 | 964 \pm 689 | 554 \pm 93 | 88 \pm 29 | 546 \pm 136 | 7,2 | -1,11 |
| KP-301 | >10,000 | >10,000 | >10,000 | N/D | 7,2 | -0,04 |
| KP-303 | 151 \pm 27 | 1388 \pm 269 | 220 \pm 35 | >2000 | 7,2 | 0,32 |
| KP-302 | 155 \pm 38 | 60 \pm 12 | 180 \pm 12 | >2000 | 7,2 | 0,13 |
| KP-288 | 353 \pm 23 | 1001 \pm 876 | 591 \pm 77 | >2000 | 8,6 | -0,71 |
| KP-314 | 112 \pm 17 | 71 \pm 18 | 64 \pm 28 | N/D | 13,3 | 0,53 |
| KP-313 | 1,086 \pm 499 | 282 \pm 86 | 2,823 \pm 1,804 | N/D | 13,3 | 0,37 |
| KP-316 | > 10,000 | N/D | N/D | N/D | 13,3 | 1,91 |

Tabla 7. Tabla de SAR para inhibidores no covalentes novedosos frente a enzimas PAD.

| # | R ₁ | R ₂ | R ₃ | <i>hPAD1</i> | <i>mPAD2</i> | <i>hPAD4</i> |
|--------|---|---|---|------------------------|-------------------------|------------------------|
| KP-289 |  |  |  | N/D | 0,3 (PAD4) | 3,7 (PAD2) |
| KP-286 |  |  |  | 0,6 (PAD2) 0,1 (PAD 4) | 1,7 (PAD 2) 0,2 (PAD 4) | 11 (PAD1) 6,3 (PAD2) |
| KP-288 |  |  |  | 2,8 (PAD2) 1,6 (PAD4) | 0,4 (PAD 1) 0,6 (PAD4) | 0,6 (PAD 1) 1,7 (PAD2) |
| KP-301 |  |  |  | N/D | N/D | N/D |
| KP-313 |  |  |  | 0,3 (PAD2) 2,6 (PAD4) | 3,9 (PAD 1) 10 (PAD4) | 0,4 (PAD 1) 0,1 (PAD2) |
| KP-302 |  |  |  | 0,4 (PAD2) 1,2 (PAD4) | 2,6 (PAD 1) 3 (PAD4) | 0,9 (PAD1) 0,3 (PAD2) |

| # | R ₁ | R ₂ | R ₃ | hPAD1 | mPAD2 | hPAD4 |
|--------|--|--|--|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| KP-314 |  |  |  | 0,6 (PAD2) 0,6 (PAD4) | 1,6 (PAD1) 1,1 (PAD4) | 1,8 (PAD1) 1,1 (PAD2) |
| KP-287 |  |  |  | N/D | N/D | N/D |
| KP-295 |  |  |  | N/D | N/D | N/D |
| KP-303 |  |  |  | 9,2 (PAD2) 1,5 (PAD4) | 0,1 (PAD1) 0,2 (PAD4) | 0,7 (PAD 1) 6,3 (PAD2) |
| KP-316 |  |  |  | N/D | N/D | N/D |

Las siguientes publicaciones se incorporan por la presente mediante referencia

- 5 1. Popescu, B. F.; Lucchinetti, C. F. Pathology of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 2012, 7, 185-217.
2. Dutta, R.; Trapp, B. D. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007, 68(2), S22-S31.
- 10 3. Noseworthy, J.H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999, 399, A40-A47.
4. Aluord, E.C. Acute disseminated encephalomyelitis and allergic encephalopathies. En Vinken P.I., Bruyan G.W. *Handbook of clinical neurology*, Nueva York, NY, Elsevier. 1970, 9, 560-571.
- 15 5. Hashim, G.A.; Wood, D.D.; Moscarello, M.A. Myelin lipophilin induced demyelinating diseases of the central nervous system. *Neurochem. Res.* 1980, 5, 1117-1115.
6. Sospedra, M.; Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23, 683-747.
- 20 7. Lebar, R.; Lubetzki, C.; Vincent, C.; Lombrail, P.; Boutry, J.M. The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin. Exp. Immunol.* 1986, 66(2), 423-434.
8. Bahreini, S.A.; Jabalameli, M.R.; Saadatnia, M.; Zahednasab, H. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility. *J. Neuroimmunol.* 2010, 229, 5-15.
- 25 9. Steinman, L.; Zamvil, S.S. Multiple sclerosis in need of a critical reappraisal. *Med. Hypothesis.* 2006, 54, 99-106.
10. Lopez-Diego, R. S.; Weiner, H. L. Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis - a multifaceted adversary. *Nature Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 909-925.
- 30 11. Weinstock-Guttman, B.; Jacobs, L. D. What is new in the treatment of multiple sclerosis. *Drugs* 2000, 59, 401-410.
- 35 12. Quirke, A.M.; Fisher, B.A.; Kinloch, A.J.; Venables, P.J. Citrullination of autoantigens: upstream of TNF α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011, 585(23), 3681-3688.

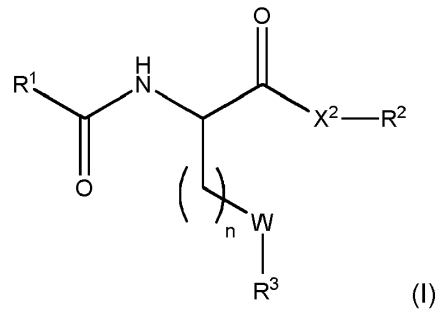
13. Lange, S.; Gögel, S.; Leung, K.Y.; Vernay, B.; Nicholas, A.P.; Causey, C.P.; Thompson, P.R.; Greene, N.D.; Ferretti, P. Protein deiminases: new players in the developmentally regulated loss of neural regenerative ability. *Dev. Biol.* 2011, 355(2), 205-214.
- 5 14. Kidd, B.A.; Ho, P.P.; Sharpe, O.; Zhao, X.; Tomooka, B.H.; Kanter, J.L.; Steinman, L.; Robinson, W.H. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 10, R119.
- 10 15. Harauz, G.; Musse, A.A. A tale of two citrullines--structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochem. Res.* 2007, 32, 137-158.
- 15 16. Moscarello, M.A.; Wood, D.D.; Ackerley, C.; Boulias, C. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J. Clin. Invest.* 1994, 94, 146-154.
17. Wood, D.D.; Bilbao, J.M.; O'Connors, P.; Moscarello, M.A. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann. Neurol.* 1996, 40, 18-24.
- 20 18. Brady, G.W.; Fein, D.B.; Wood, D.D.; Moscarello, M.A. The interaction of basic proteins from normal and multiple sclerosis myelin with phosphatidylglycerol vesicles. *FEBS Lett.* 1981, 125, 159-160.
19. Brady, G.W.; Murthy, N.S.; Fein, D.B.; Wood, D.D.; Moscarello, M.A. The effect of basic myelin protein on multilayer membrane formation. *Biophys. J.* 1981, 34(2), 345-350.
- 25 20. Boggs, J.M.; Wood, D.D.; Moscarello, M.A. Hydrophobic and electrostatic interactions of myelin basic proteins with lipid. Participation of N-terminal and C-terminal portions. *Biochemistry* 1981, 20(5), 1065-1073.
- 30 21. Epand, R.M.; Moscarello, M.A.; Zierenberg, B.; Vail, W.J. The folded conformation of the encephalitogenic protein of the human brain. *Biochemistry* 1974, 13, 1264-1267.
22. Deber, C.M.; Hughes, D.W.; Fraser, P.E.; Pawagi, A.B.; Moscarello, M.A. Binding of human normal and multiple sclerosis-derived myelin basic protein to phospholipid vesicles: effects on membrane head group and bilayer regions. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 245(2), 455-463.
- 35 23. Carrillo-Vico, A.; Leech, M.D.; Anderton, S.M. Contribution of myelin autoantigen citrullination to T cell autoaggression in the central nervous system. *J. Immunol.* 2010, 184 (6), 2839-2846.
- 40 24. Rajmakers, R.; Vogelzangs, J.; Croxford, J.L.; Wesseling, P.; van Venrooij, W.J.; Pruijn, G.J. Citrullination of central nervous system proteins during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Comp. Neurol.* 2005, 486(3), 243-253.
25. Gyorgy, B.; Toth, E.; Tarcsa, E.; Falus, A.; Buzas, E. I. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2006, 38 (10), 1662-1677.
- 45 26. Curis, E.; Nicolis, I.; Moinard, C.; Osowska, S.; Zerrouk, N.; Benazeth, S.; Cynober, L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005, 29 (3), 177-205.
27. Vossenaar, E.R.; Zendman, A.J.; van Venrooij, W.J.; Pruijn, G.J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003, 25(11), 1106-1118.
- 50 28. Anzilotti, C.; Pratesi, F.; Tommasi, C.; Migliorini, P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2010, 9(3), 158-160.
29. Anzilotti, C.; Pratesi, F.; Tommasi, C.; Migliorini, P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2010, 9(3), 158-160.
- 55 30. Chirivi, R. G. S.; van Rosmale, J. W. G.; Jenniskens, G. J.; Pruijn, G. J.; Raats, J. M.-H. itrullination: A trget for disease intervention in multiple sclerosis and other inflammatory disorders. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2-13, 4, 3.
- 60 31. Carrillo-Vico, A.; Leech, M.D.; Anderton, S.M. Contribution of myelin autoantigen citrullination to T cell autoaggression in the central nervous system. *J. Immunol.* 2010, 184(6), 2839-2846.
- 65 32. Musse, A.A.; Harauz, G. Molecular "negativity" may underlie multiple sclerosis: role of the myelin basic protein family in the pathogenesis of MS. *Int. Rev. Neurobiol.* 2007, 79, 149-172.

33. Deraos, G.; Chatzantoni, K.; Matsoukas, M.T.; Tselios, T.; Deraos, S.; Katsara, M.; Papathanasopoulos, P.; Vynios, D.; Apostolopoulos, V.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. Citrullination of linear and cyclic altered peptide ligands from myelin basic protein (MBP(87-99)) epitope elicits a Th1 polarized response by T cells isolated from multiple sclerosis patients: implications in triggering disease. *J. Med. Chem.* 2008, 51(24), 7834-7842.
- 5 34. Moscarello, M. A.; Lei, H.; Mastronardi, F. G.; Winer, S.; Tsui, H.; Li, Z.; Ackerley, C.; Zhang, L.; Rajimakers, R.; Wood, D. D. Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis. Model. Mech.* 2013, 6(2), 467-478.
- 10 35. Moscarello, M. A.; Lei, H.; Mastronardi, F. G.; Winer, S.; Tsui, H.; Li, Z.; Ackerley, C.; Zhang, L.; Rajimakers, R.; Wood, D. D. Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis. Model. Mech.* 2013, 6(2), 467-478.
- 15 36. Suzuki, A.; Yamada, R.; Yamamoto, K. Citrullination by Peptidylarginine Deiminase in Rheumatoid Arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007, 1108, 323-339.
37. Arita, K.; Hashimoto, H.; Shimizu, T.; Nakashima, K.; Yamada, M.; Sato, M. Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2004, 11, 777-783.
- 20 38. Knuckley, B.; Luo, Y.; Thomson, P. R. Profiling protein arginine deiminase 4 (PAD4): A novel screen to identify PAD4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16(2), 739-745.
39. Luo, Y.; Knuckley, B.; Lee, Y. H.; Stallcup, M. R.; Thomson, P. R. A fluoroacetamide-based inactivator of protein arginine deiminase 4: design, synthesis, and in vitro and in vivo evaluation. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 1092-1093.
- 25 40. Bello, A. M.; Poduch, E.; Wei, L.; Moscarello, M.; Kotra, L. P. Interrogation of the active site of protein arginine deiminase (PAD) using designer probes. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013, 4 (2), 249-253.
- 30 41. Ishigami, A. *et al.* Importance of research on peptidylarginine deiminase and citrullinated proteins in age-related disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2010, 10 Suppl. 1, S53-S58.
42. Gould, R. M. *et al.* Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J. Neurochem.* 2000, 75, 1834-1844.
- 35 43. Moscarello, M. A. *et al.* Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. *J. Neurochem.* 2002, 81, 335-343.
44. Bartzokis, G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2004, 25, 5-18.
- 40 45. Tian, J. *et al.* Relationships between arteriosclerosis, cerebral amyloid angiopathy and myelin loss from cerebral cortical white matter in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004, 30, 46-56.
- 45 46. Asaga, H. *et al.* Protein deimination in the rat brain: generation of citulline-containing proteins in cerebrum perfused with oxygen-deprived media. *Biomed. Res.* 2000, 21, 197-205.
47. Asaga, H. *et al.* Protein deimination in the rat brain after kainite administration: citulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci. Lett.* 2001, 299, 5-8.
- 50 48. Asaga, H. *et al.* Increased and type II specific expression of peptidylarginine deiminase in activated-microglia but not hyperplastic astrocytes following kainic acid-evoked neurodegeneration in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 2002, 326, 129-132.
- 55 49. Shimada, N. *et al.* Developmental and age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 2010, 88,798-806.
50. Moscarello, M. A. *et al.* Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis. Model. Mech.* 2013, 6, 467-478.
- 60 51. Wei, L. *et al.* Novel Inhibitors of Protein Arginine Deiminase with Potential Activity in Multiple Sclerosis Animal Model. *J. Med. Chem.* 2013, 56 (4), 1715-1722.
- 65 52. Acharya, N. K. *et al.* Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease. *J. Autoimmun.* 2012, 38, 369-380.

53. Ishigami, A. *et al.* Abnormal accumulation of citullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 2005, 80, 120-128.
- 5 54. Akiyama, K. *et al.* Localization of peptidylarginine deiminase type II in a stage-specific immature oligodendrocyte from rat cerebral hemisphere. *Neurosci. Lett.* 1999, 274, 53-55.
55. Lamensa JWE, Moscarello MA. Deimination of Human Myelin Basic Protein by a Peptidylarginine Deiminase from Bovine Brain. *J Neurochem* 1993; 61 : 987-996
- 10 56. Sambandam T, Belousova M, Accaviti-Lope MA, Blanquicett C, Geurcello V, Raijmakers R, Nicholas AP. Increased peptidylarginine deiminase type II in hypoxic astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1324-1329
- 15 57. Guerrin M, Ishigami A, Mechin M-C, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J.* 2003, 370, 167-174.
- 20 58. Akiyama K, Inoue K, Senshu T. Immunocytochemical demonstration of skeletal muscle type peptidylarginine deiminase in various rat tissues. *Cell Biol Int Rep* 1990; 14: 267-273
59. Dekan, Z.; Vetter, I.; Daly, N. L.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. alpha-Conotoxin Iml incorporating stable cystathionine bridges maintains full potency and identical three dimensional structure. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 15866-15869.
- 25 60. Nakamura, T.; Noguchi, T.; Kobayashi, H.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y. Mono- and dihydroxylated metabolites of thalidomide: synthesis and TNF-alpha production inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 2006, 54, 1709-1714.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula I:

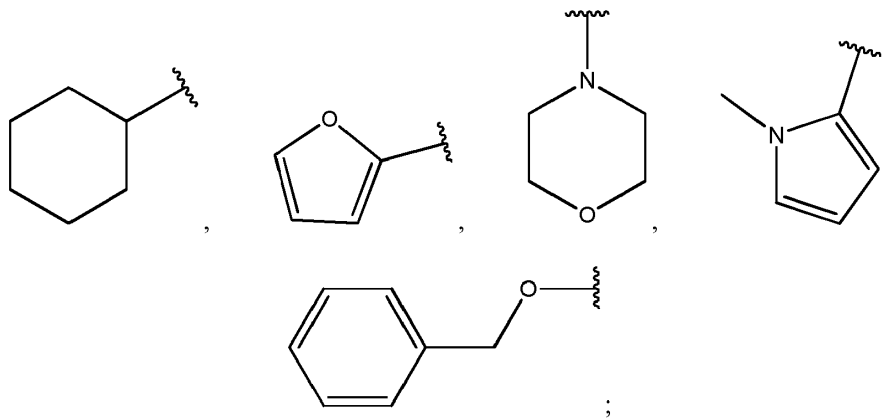


5

en la que:

R¹ es

10



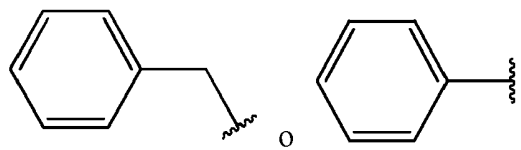
15

X² es O o NH;

R² es CH₃,

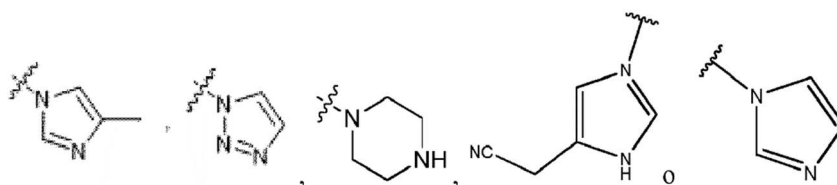
n es 0 o 1;

20



R³ es

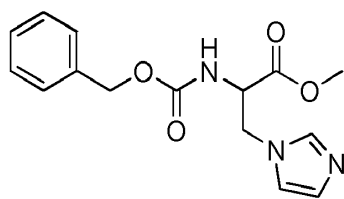
25



;y W es -CH₂- o -C(O)-;

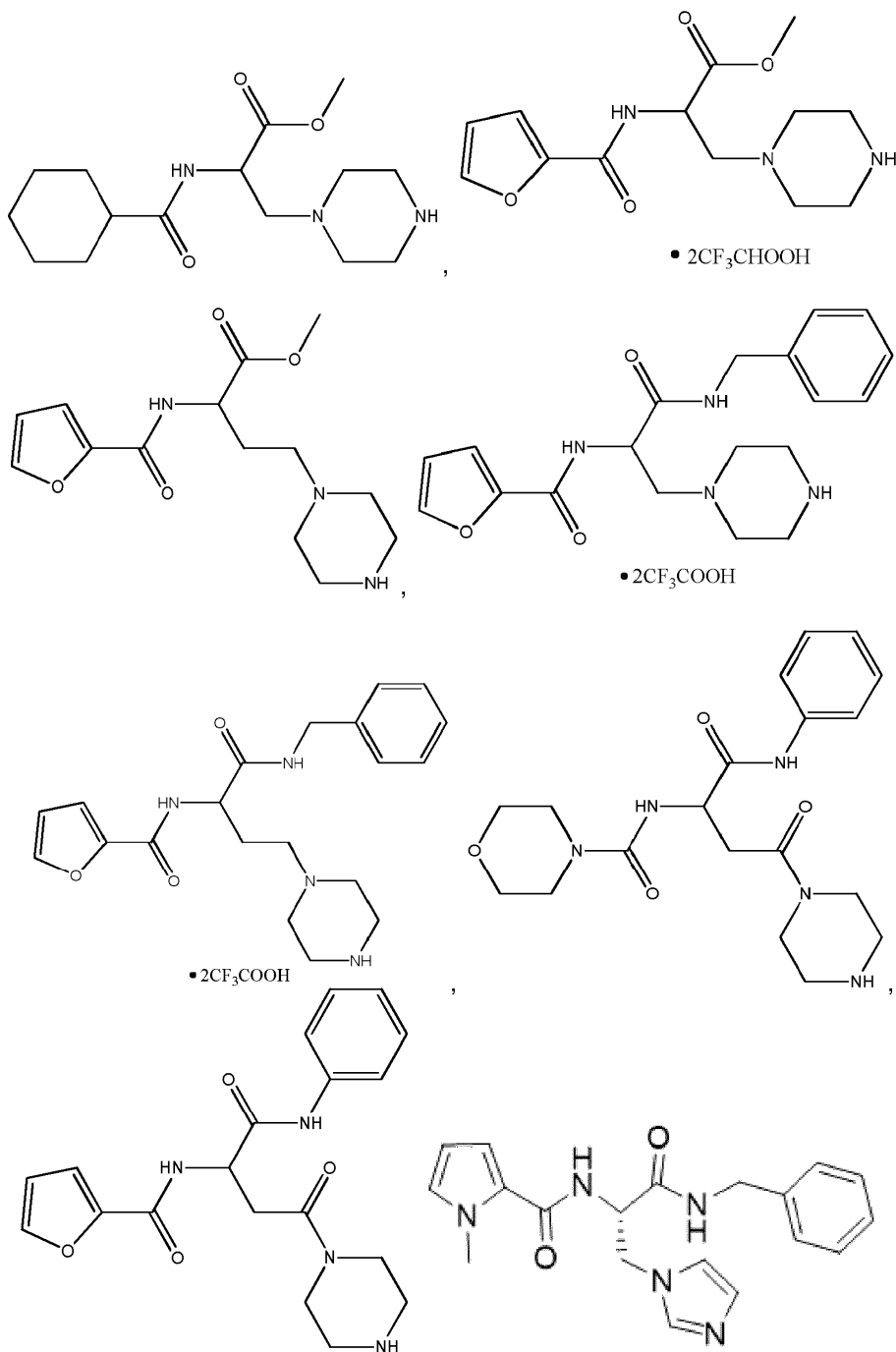
30

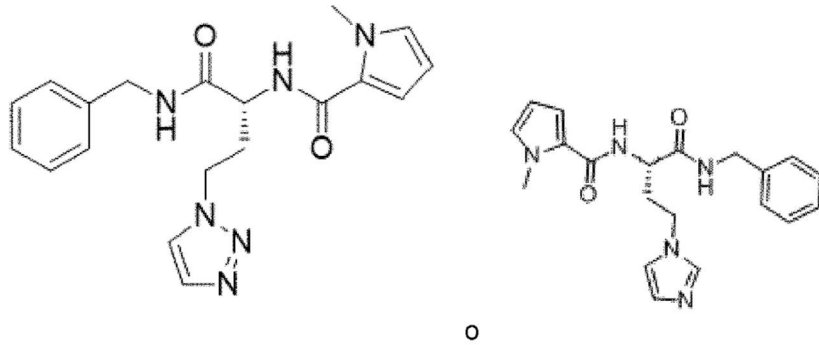
o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato de los mismos o un estereoisómero de los mismos, no siendo el compuesto de fórmula I



2.- El compuesto según la reivindicación 1, en el que n es 0 y W es -CH₂-, o n es 1 y W es -C(O)-.

5 3.- El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, siendo el compuesto de fórmula I:





- 4.- El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal de ácido clorhídrico o una sal de ácido trifluoroacético.
- 5
- 5.- Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 6.- Una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula I tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados **caracterizados por** o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD), seleccionándose las enfermedades, los trastornos o los estados **caracterizados por** o asociados con la hipercitrulinación de proteínas mediante enzimas PAD de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, tembladera, psoriasis y enfermedad de Creutzfeld-Jacob, preferiblemente esclerosis múltiple.
- 10
- 15

FIGURA 1

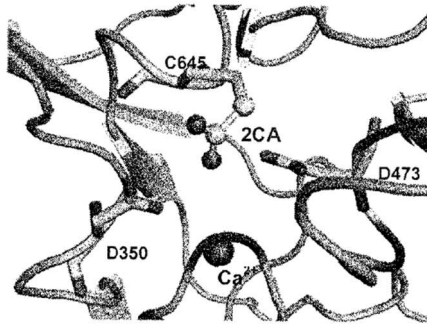


FIGURA 2

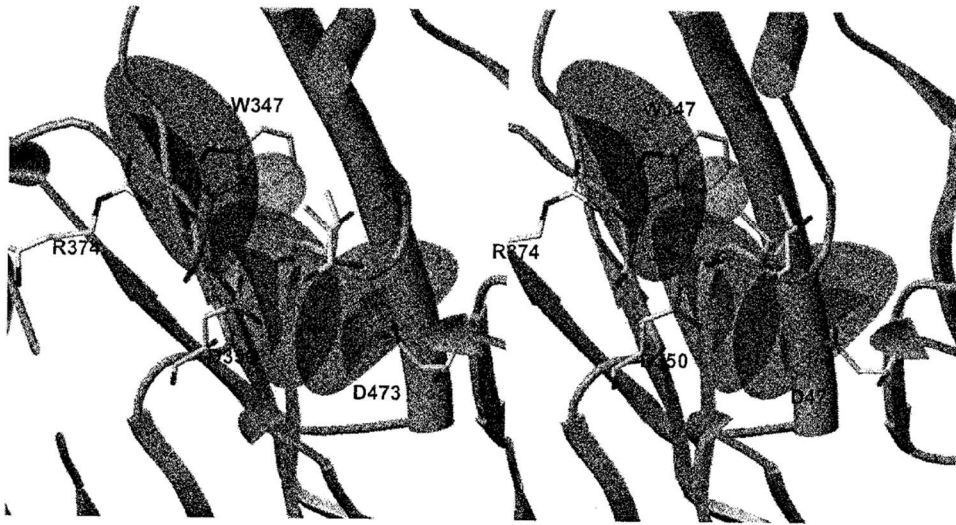


FIGURA 3

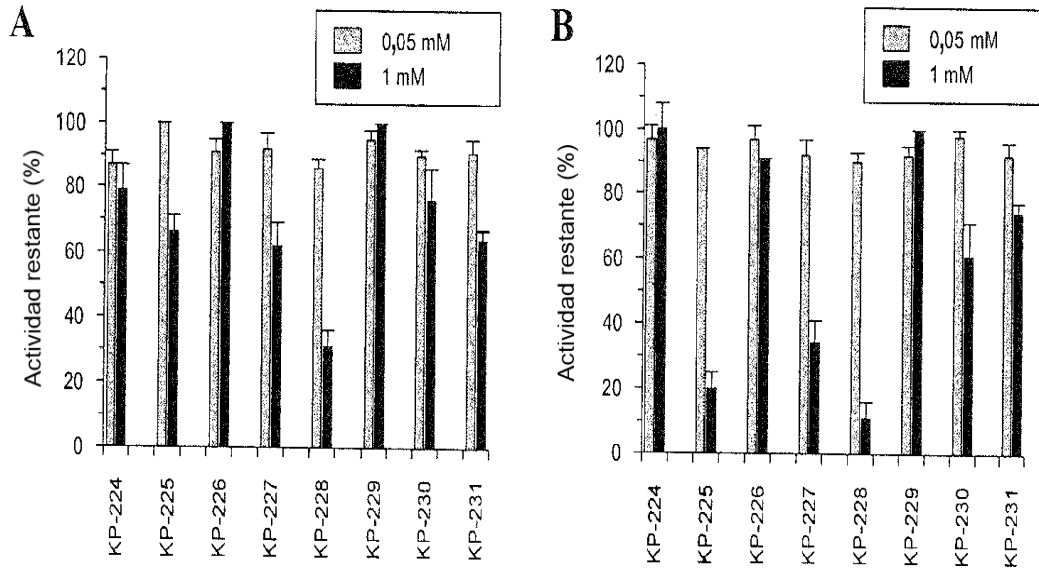


FIGURA 4

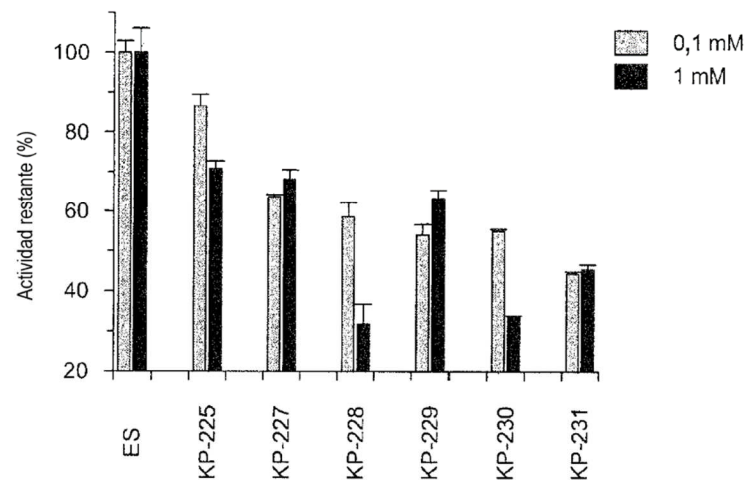


FIGURA 5

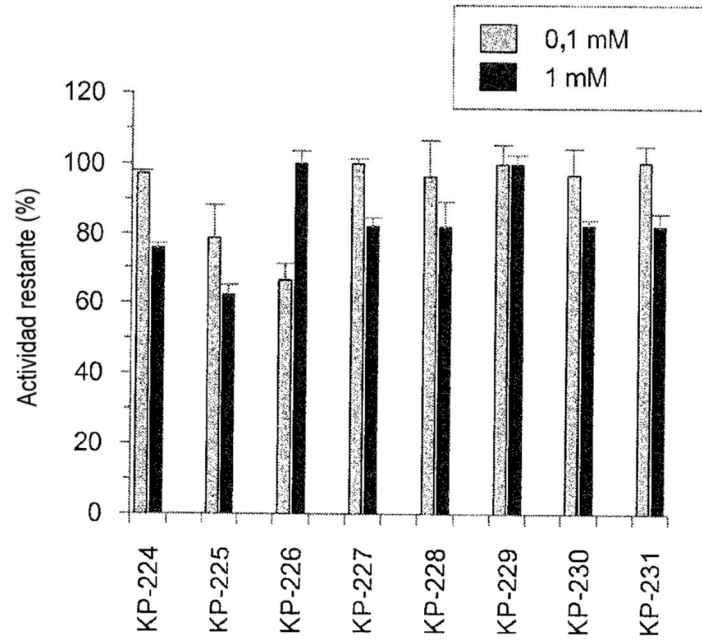


FIGURA 6

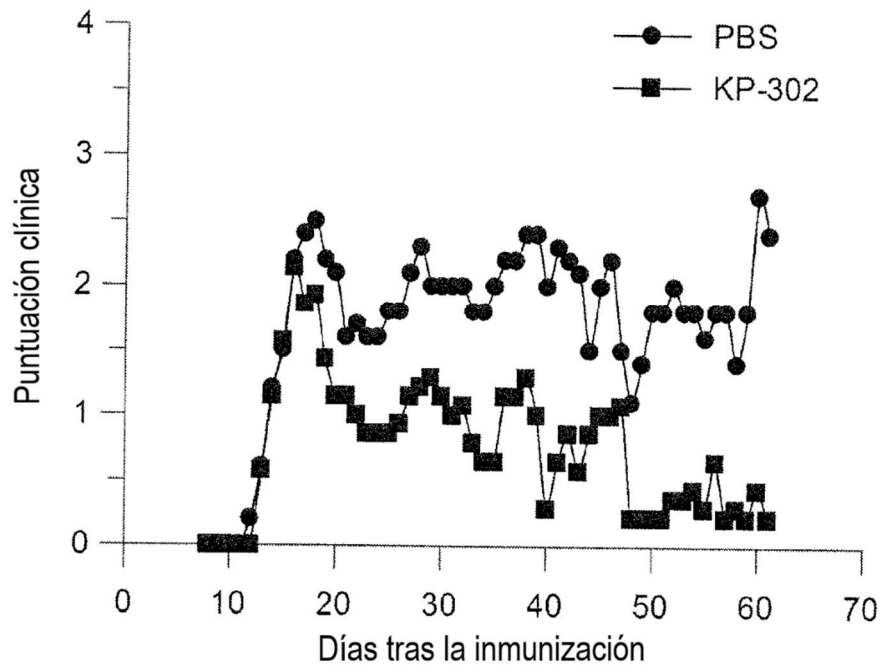
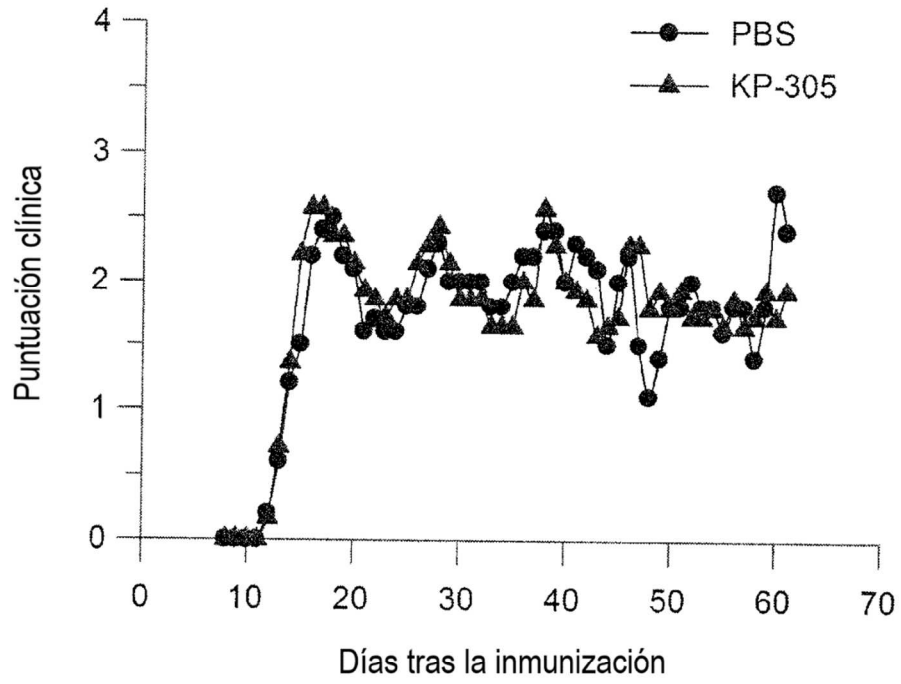


FIGURA 7

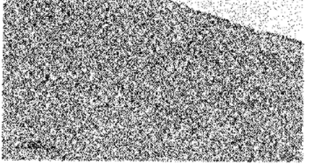
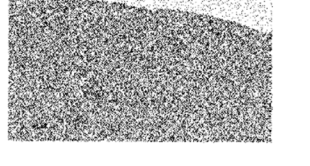
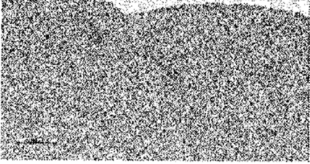
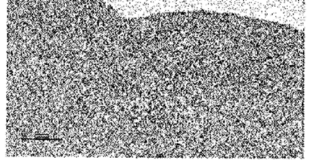
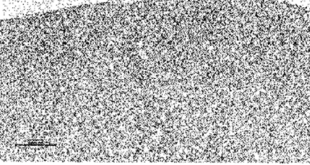
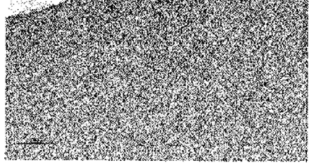

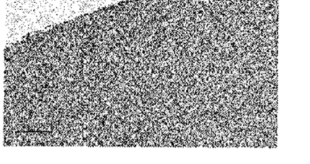
| Tratamiento | Tinción de PAD2 | Tinción de citrulina | Resultados |
|------------------------|--|---|---|
| Ratones sanos |  |  | Niveles de PAD2 y citrulinación normales. |
| Tratamiento con PBS |  |  | Mayor cantidad de PAD2 y citrulina |
| Tratamiento con KP-302 |  |  | Niveles muy reducidos de PAD2 y citrulina |
| Tratamiento con KP-305 |  |  | Niveles muy reducidos de PAD2 y citrulina |

FIGURA 8

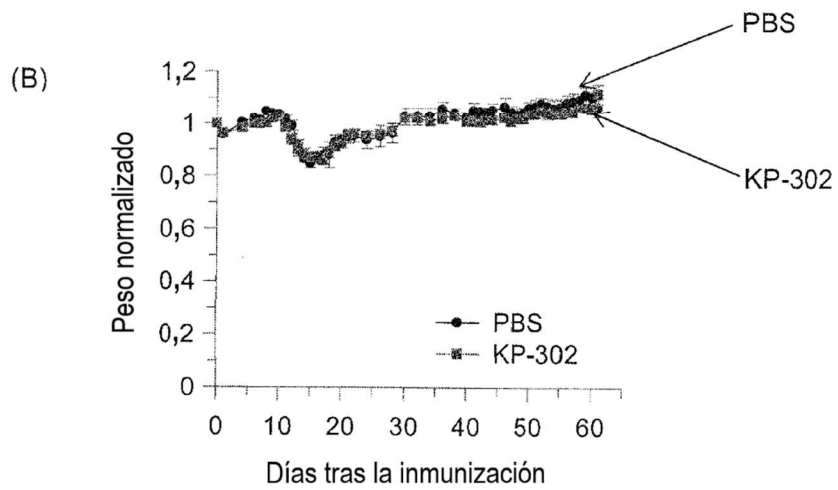
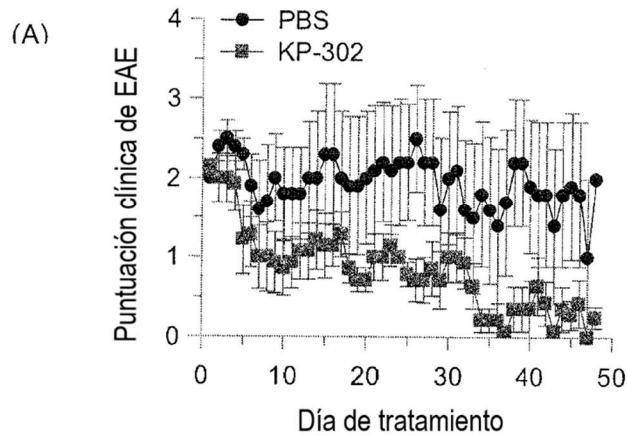
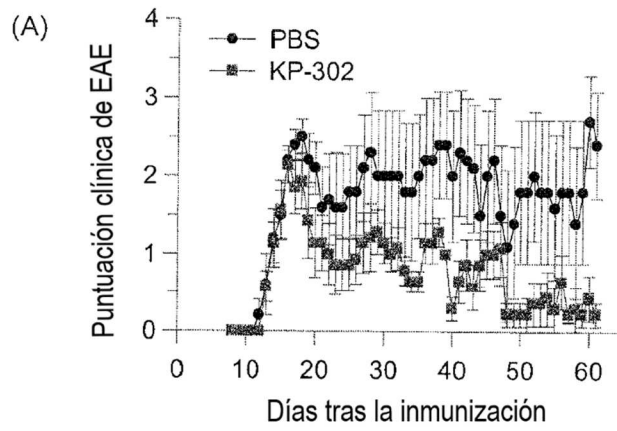


FIGURA 8 (CONTINUACIÓN)

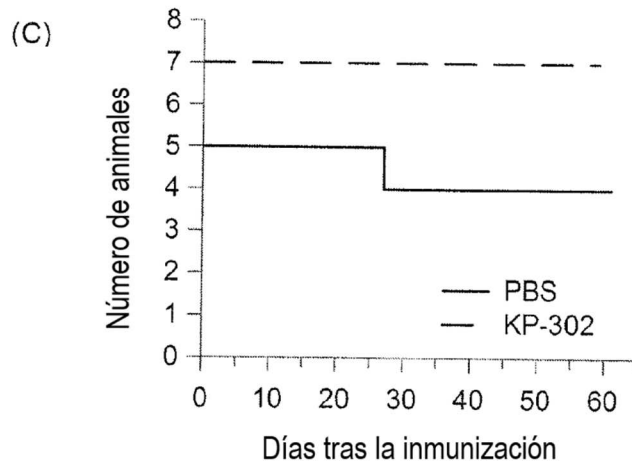
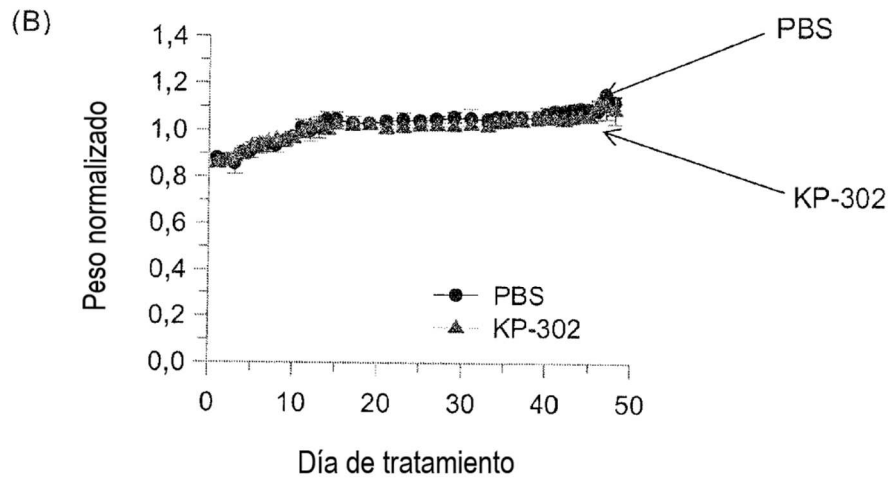


FIGURA 9

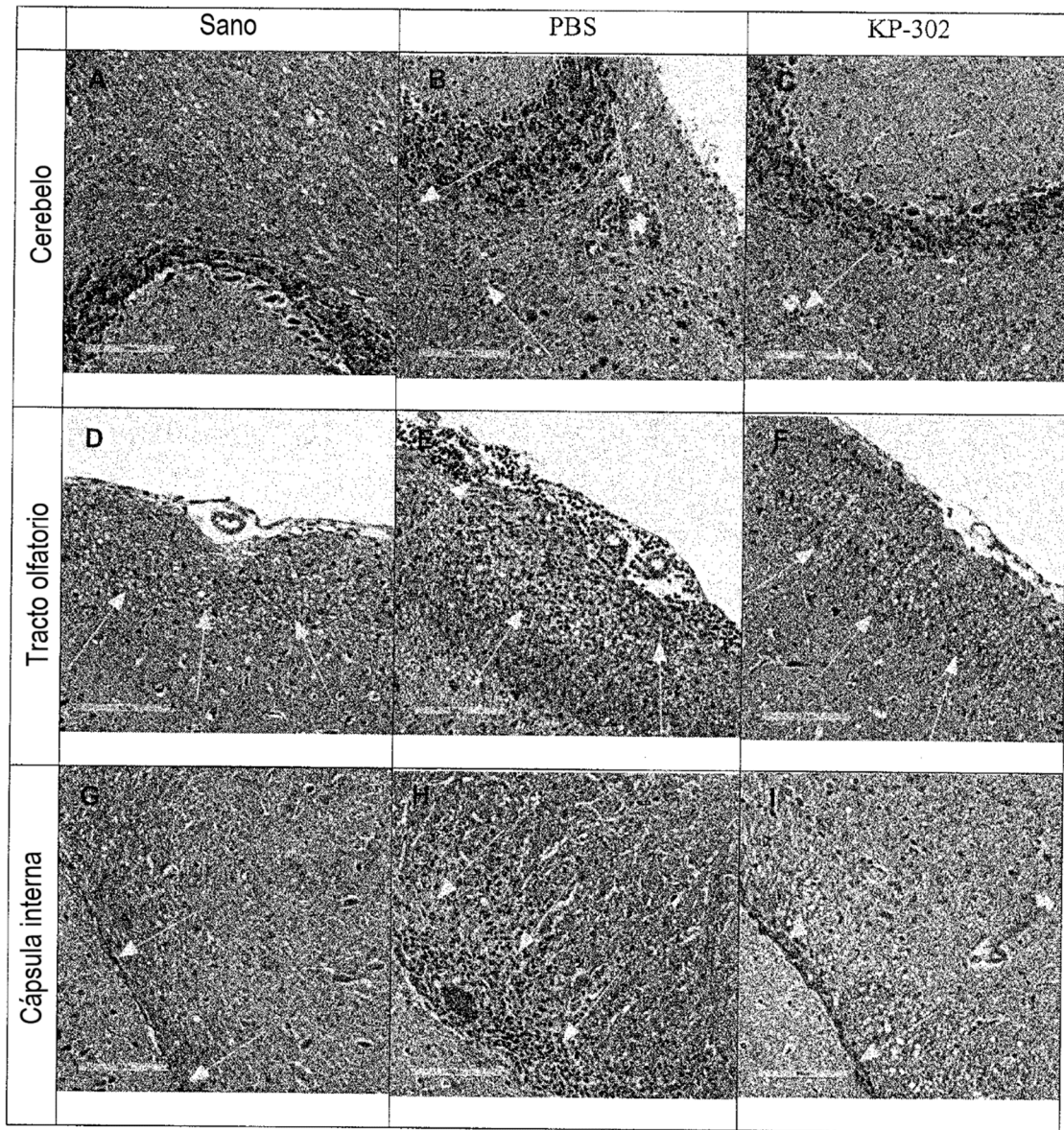


FIGURA 10

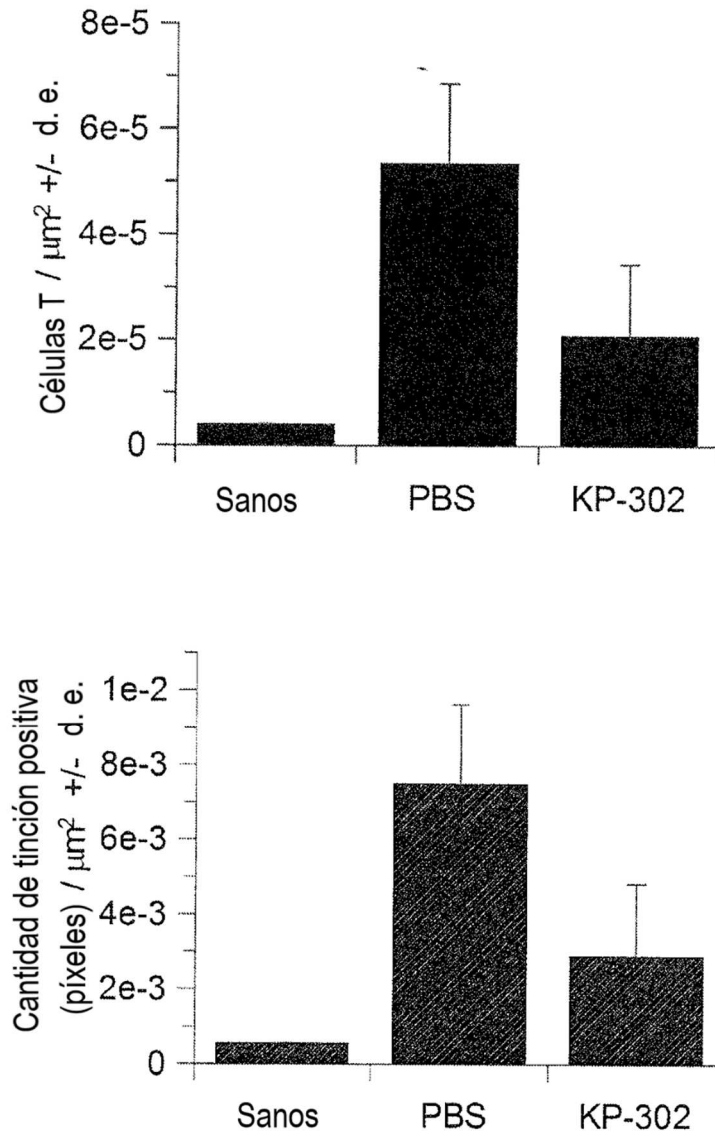


FIGURA 11

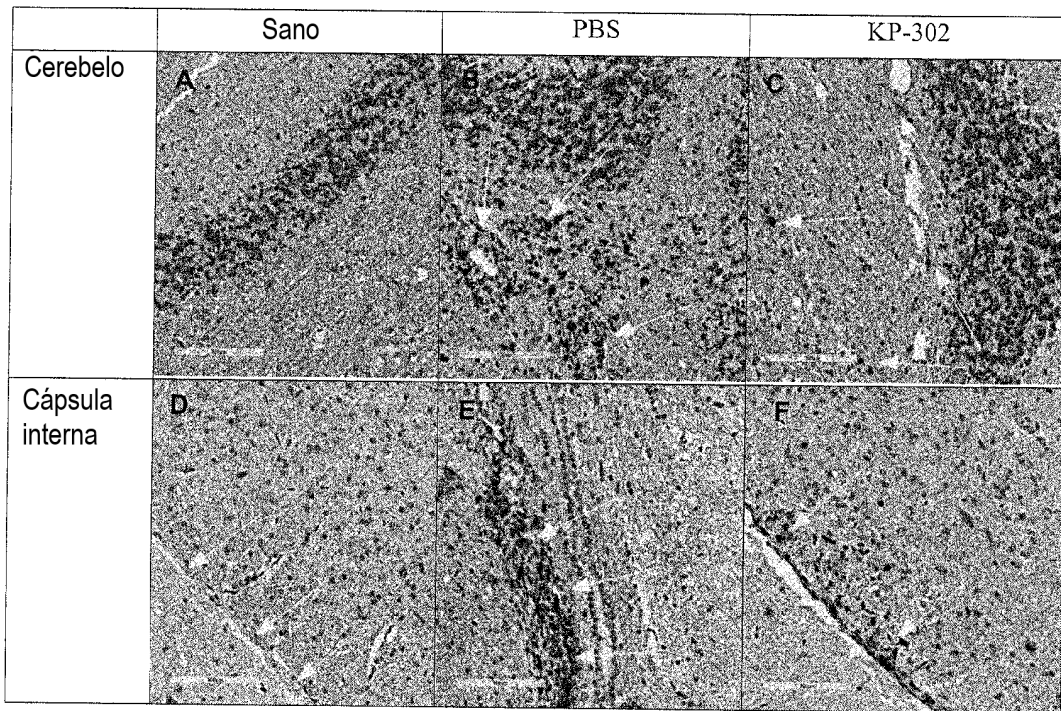


FIGURA 12

