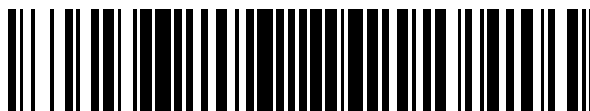


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 536**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 405/14** (2006.01)  
**A61K 38/05** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/444** (2006.01)  
**C07K 5/062** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2014 PCT/GB2014/053009**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049546**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2014 E 14789590 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3052135**

54 Título: **Inhibidores de metalo-beta-lactamasa (MBL) que comprenden un resto quelante de cinc**

30 Prioridad:

**04.10.2013 GB 201317619**

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

**27.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RONGVED, PÅL;  
ÅSTRAND, OVE ALEXANDER HØGMOEN;  
BAYER, ANNETTE;  
LEIROS, HANNA-KIRSTI SCHRØDER;  
SAMUELSEN, ØRJAN;  
EDVARDSSEN, KINE SUSANN WADE y  
MUHAMMAD, ZEESHAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 691 536 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 metalo-beta-lactamasa (MBL) que comprenden un resto quelante de cinc

5 La presente invención se refiere a inhibidores de metalo-β-lactamasa (MBL) que comprenden un compuesto quelante de cinc, y su uso para mejorar la efectividad de un antibiótico de β-lactama frente a bacterias resistentes que producen un MBL. Los inhibidores comprenden un agente quelante de cinc covalentemente unido a un resto molecular que tiene afinidad por estructuras en la biología de la bacterias, y se puede usar en combinación con un antibiótico de β-lactama para la terapia de infección bacteriana en un organismo hospedador. El organismo  
10 hospedador puede ser cualquier organismo vivo que presente una invasión o infección no deseada por parte de un organismo diana. El organismo hospedador puede ser, de este modo, cualquier organismo vivo, aunque preferentemente es uno que comprenda células eucariotas, más preferentemente un animal de sangre caliente, por ejemplo un mamífero. El organismo hospedador puede ser, de este modo, cualquier organismo procariota, preferentemente una bacteria.

15 Las enfermedades infecciosas son la causa principal de muerte en el mundo y representan más de 13 millones de muertes anuales incluyendo dos tercios de toda la mortalidad infantil de menos de 5 años. Existe una seria preocupación con respecto a enfermedades infecciosas nuevas y re-emergentes, en las cuales existe carencia de terapias efectivas (informes de la Organización Mundial de la Salud 1999, 2012 y 2014). La resistencia antimicrobiana está aumentando y afecta a una gama muy amplia de enfermedades humanas incluyendo tuberculosis, cólera, malaria y SIDA. De particular interés es la preocupación por los patógenos humanos que desarrollan resistencia de multi-fármaco a antibióticos convencionales y se estima que el peligro de resistencia sobrepasa el del cáncer de útero (de Kraker MEA. *et al*, *PLoS Med.* 2011; e1001104). La introducción de nuevos derivados más potentes de antibióticos existentes proporciona únicamente soluciones temporales, ya que los mecanismos de resistencia existentes se adaptan rápidamente para acomodarse a los nuevos derivados (Theuretzbacher U. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2011;11:433-438). Aunque las bacterias Gram-positivo resistentes representan un peligro significativo, el surgimiento de cepas resistentes a multi-fármaco (MDR) de patógenos Gram-negativo tales como *Escherichia coli* es de especial preocupación. La resistencia pan o la resistencia extrema a fármacos son expresiones usadas actualmente para describir aislados clínicamente importantes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y Enterobacteriaceae que son resistentes a prácticamente todos los antibióticos (Patel *et al*, *Front. Microbiol.* 2013;4:48). Desafortunadamente existen pocos, si es que existen alguno, agentes antimicrobianos efectivos frente a las bacterias Gram-negativo en ensayos clínicos de fase 1 que aborden esta demanda crítica (Butler MS. *et al*, *J. Antibiotics* 2013;66:571-591).

35 Probablemente los mecanismos de resistencia a antibióticos más importantes en términos de distribución y relevancia clínica son las β-lactamasas (Bush K. *et al*, *Annu. Rev. Microbiol.* 2011;65:455-478). Las β-lactamasas son enzimas que hidrolizan los antibióticos de β-lactama que compromete la eficacia de nuestro grupo más grande de β-lactamas y la base de la quimioterapia antimicrobiana durante > 70 años. De manera clara, existe una demanda de inhibidores dirigidos contra estas clases de enzimas que restauren la actividad de sus sustratos - antibióticos que sean baratos, no tóxicos y normalmente efectivos. Los inhibidores de serina β-lactamasa (ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama) constituyen un éxito fenomenal en cuanto a la ampliación de la vida terapéutica de los antibióticos de β-lactama y también se emplean como herramientas de diagnóstico en laboratorios microbiológicos clínicos de todo el mundo. Por el contrario, no existe un inhibidor clínico disponible para las metalo-β-lactamasas (MBLs; Drawz *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:1835-1846). La última se ha convertido ahora en una de las familias clínicas más importantes de β-lactamasas que muestran diseminación global.

MBLs pertenecen a un gran grupo de proteínas que únicamente se encuentran en bacterias, y como las proteínas de unión a penicilina (PBP) tienen la capacidad de interactuar con las β-lactamas. Los ejemplos de PBPs y enzimas que se unen a β-lactamas son MBLs, proteína de tipo serina β-lactamasa (LACTB), D,D-transferasa, D-Ala(D,D)-carboxipeptidasa, las D-alanil-D-alanina dipeptidasas VanA, VanX, VanY y otras, tal y como se revisa por parte de E. *et al* en *FEMS Microbiol Rev* 32 (2008):234-258. Esta clase de proteínas únicamente se encuentra en la biología bacteriana. Los ejemplos de compuestos que tienen afinidad por PBPs son antibióticos de β-lactama. Las β-lactamas se han ligado históricamente a la quimioterapia antibacteriana e incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenems (Bush K. *et al*, *Annu. Rev. Microbiol.* 2011;65:455-478). El mecanismo de acción para los antibióticos de β-lactama es que se parecen al dipéptido pequeño D-Ala-D-Ala que las bacterias usan para reticular los peptidoglicanos en la pared bacteriana, enzimas que destruyen covalentemente que usan D-Ala-D-Ala como sus sustratos. Las β-lactamasas son el mecanismo de resistencia más prevalente y clínicamente importante de inactivación de β-lactamas por medio de hidrólisis. Se clasifican de acuerdo con los criterios de secuencia (clase A Ambler, B, C y D) y se pueden agrupar estructuralmente en dos super familias; las serina β-lactamasas (clase A, C y D) y MBLs (clase B). Al contrario que las serina-β-lactamasas, que se caracterizan por un resto de serina en el sitio activo, los MBL requieren cationes divalentes, normalmente cinc, como co-factor metálico de la actividad de la enzima (Palzkill T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013;91-404). Los MBL están surgiendo como la familia clínicamente más importante de β-lactamasas (Patel *et al.*, *Front. Microbiol.* 2013;4:48; Walsh *et al*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010;S8-S14) por los siguientes motivos:

65

(i) los genes de MBL adquiridos se asocian a elementos genéticos móviles que, con frecuencia, transportan otros genes resistentes como asociaciones de genes (asociados a elementos de IS e ISCR) y/o configuraciones de integrones que tienen como resultado aislados resistentes a multi-fármacos. En muchas partes del mundo, dichos elementos se observan comúnmente en patógenos clínicos importantes tales como *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, y varios genes de Enterobacteriaceae. Por tanto, la plasticidad y diseminación de estas asociaciones de genes de alta resistencia móvil compromete gravemente los regímenes terapéuticos actuales.

(ii) El espectro hidrolítico de MBL es una de las más amplias de todas las  $\beta$ -lactamasas e incluye casi todas las  $\beta$ -lactamas excepto las monobactamas (aztreonam). En consecuencia, los aislados clínicos que poseen MBL sin invariablemente resistentes a todos los antibióticos de  $\beta$ -lactama excepto para las monobactamas. Sin embargo, prácticamente todas las bacterias MBL positivo transportan  $\beta$ -lactamasas adicionales que pueden hidrolizar aztreonam y, por tanto, esta terapia no resulta recomendable.

Las MBL clínicamente más importantes, los grupos IMP-, VIM- y NDM, se encuentran ahora dispersados en una diversidad de especies Gram-negativo. En particular, las enzimas VIM y NDM han surgido como MBL dominantes. La diseminación global sin precedentes de los NDM destaca la enormidad del problema. Desde el primer informe en 2008, NDM se ha identificado en Australia, África, Norteamérica, Asia y muchos países de Europa (Johnson AP. *et al*, *J. Med. Microbiol.* 2013;62:499-513). De manera preocupante, NDM se encontró en numerosas especies Gram-negativo y en el medio ambiente (Walsh TR. *et al*, *Lancet Infect. Dis.* 2011;11:355-362).

Los inhibidores exitosos de las serina  $\beta$ -lactamasas de clase A se encuentran clínicamente disponibles, pero carecen de actividad inhibitoria frente a las MBL (Drawz SM. *et al*, *Clin. Microbiol. Rev.* 2010;23:160-201). Inspirado por el éxito comercial de paradigmático Augmentin (ácido clavulánico - un sustrato suicida para las serina  $\beta$ -lactamasas - y amoxicilina), diversos grupos ha centrado sus esfuerzos en enfoques similares para desarrollar inhibidores, pero aún ninguna molécula que combine potencia con actividad frente a dianas múltiples de MBL ha alcanzado los ensayos clínicos (Drawz SM. *et al*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014). Para tres MBL de mayor riesgo clínico - los grupos IMP, NDM y VIM - las mayoría de los inhibidores se presentan para IMP-1, mientras que se encontraron pocos inhibidores para VIM-2 y NDM. Para NDM, un producto fúngico natural, se ha identificado aspergilomarasmina A como inhibidor de MBL y ha mostrado actividad *in vivo* en modelos de ratón (King AM. *et al*. *Nature* 2014;510:503-506). Sin embargo, se requieren dosis relativamente elevadas de aspergilomarasmina A para revertir la resistencia de carbapenem. Otras opciones terapéuticas (Martinez, *Future Med. Chem.* 2012) incluyen el uso de terapia de tri- $\beta$ -lactama que incorpora monobactama; sin embargo, los MIC no son impresionantes y su actividad *in vivo* se ve gravemente comprometida por el inóculo bacteriano (Page *et al*,. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011).

Por tanto, existe una fuerte demanda clínica de un inhibidor de MBL. La mayoría de los inhibidores potentes de IMP-1 contienen tiol-carboxilato o un farmacóforo de dicarboxilato, mientras que entre los inhibidores de VIM-2, los tiocarboxilatos son los más dominantes. Los únicos inhibidores, que se dirigen a IMP-1 e IMP-2 simultáneamente, se encuentran entre estos motivos estructurales. Sin embargo, los derivados de ácido maleico recientemente caracterizados carecen de un espectro amplio de inhibición, es decir, muestran pobre inhibición frente a las enzimas del grupo NDM y VIM clínicamente importantes. No obstante, se han presentado ciertos inhibidores estructuralmente muy diferentes que se dirigen a VIM-2 en favor de IMP-1 (Weide *et al*, *Med. Chem. Lett.* 2010). Pocos estudios han evaluado la eficiencia inhibitoria en ensayos celulares completos extensivos e, incluso menos, la eficacia *in vivo* en modelos de animales. La mayoría de los inhibidores se basan en grupos de unión de cinc monodentados tales como un grupo tiol o carboxilato que forman complejos con los iones de cinc enzimáticamente ligados. Curiosamente, no se aporta información alguna sobre los grupos de unión a cinc bidentados típicos se aplican exitosamente en el diseño de inhibidores de otras metaloproteínas que contienen cinc tales como hidroxamatos - con excepción. La comparación de las estructuras disponibles revela que todos los inhibidores sustituyen al hidróxido de enlace en los MBL de cinc dinucleares por medio de un heteroátomo por ejemplo S o O.

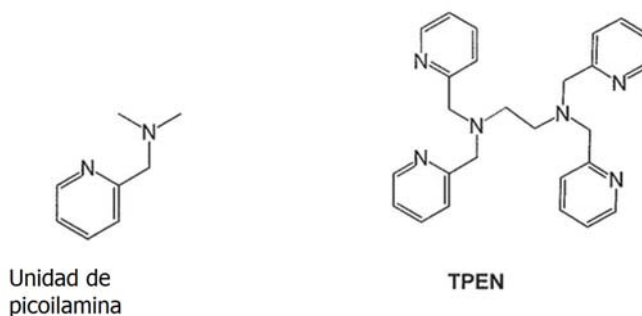
Las bacterias clínicamente importantes se conocen en la técnica anterior - véase por ejemplo Wikipedia [http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_clinically\\_important\\_bacteria](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_clinically_important_bacteria). Especialmente, *P. aeruginosa* provoca serios problemas debido a su resistencia a multifármacos conspicua. Por eso los denominados agentes de neutralización, por ejemplo sulbactama, ácido clavulánico y tazobactama que se usan como inhibidores  $\beta$ -lactamasa en general son eficaces frente a las serina  $\beta$ -lactamasa que tiene seria como centro activo, pero estos fármacos exhiben un efecto menor o nulo sobre MBL. Por lo tanto, la necesidad de inhibidores de MBL se está volviendo cada vez más importante. Los antibióticos de  $\beta$ -lactama importantes son las clases de penicilina, cefalosporina y carbapenem. Se han presentado muchos compuestos como poseedores de actividad inhibitoria de MBL. En el documento WO 98/117639, documento WO 97/30027, documento WO 98/40056, WO 98/39311 y WO 97/110225, se ha descrito una clase de derivados de  $\beta$ -tiopropionil-amino ácido como inhibidores frente a las MBL. Otra clase de compuestos que puede actuar como inhibidores de MBL son los tioésteres (Biol. Pharm. *Bull.* 1997, 20, 1136; FEMS Microbiology Letters 1997, 157, 171; Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 135; Chem. Commun. 1998, 1609; Biochem. 1,1998, 331, 703; documento WO 00/076962) y derivados de ácido succínico (documentos WO 01/030148 y WO 01/030149).

El uso de agentes quelantes metálicos frente a virus o bacterias se han descrito bien en la técnica anterior, por ejemplo en el documento de Patente WO 2011/63394, documento WO 2004/71425, documento WO 2006/109069,

documento WO 2001/60349, US 6.410.570, documento US 2003/0225155, WO 2006/43153 y WO 2006/43153. Los expertos en la técnica apreciarán la diversidad de sustancias descritas en la técnica anterior, capaces de formar quelatos con iones metálicos, y seleccionarán el agente quelante apropiado para las diferentes finalidades. Los ejemplos de agente quelantes que comprenden variaciones de grupos amino y grupos hidroxilo, por ejemplo 1,10-fenantrolina, clioquinol, 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinona (DMHP), 1,2-dietil-3-hidroxi-4-piridinona (DMHP), deferasirox, agentes quelantes que comprenden variaciones de grupos amino, grupos hidroxilo y grupos de ácido carboxílico, por ejemplo ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido etilenediamino-N,N'-diacético-N,N'-di-B-propiónico (EDPA), ácido dietilentriamino pentacético (DTPA), ácido trans-1,2-ciclohexano-diamino-N,N,N',N'-tetracético (CyDTA), camosina, dihidroxietilglicina (DHEG), 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-N,N,N',N'-tetraacético (DTPA-OH), ácido etilenediamino-N,N'-diacético (EDDA), ácido etilenediamino-N,N'-dipropiónico (EDDP), ácido N-hidroxi-etilenediamino-N,N',N'-triacético (EDTA-OH), ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamino-N,N'-diacético (HBED), ácido hexametileno-1,6-diaminotetracético (HDTA), ácido hidroxietiliminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), Metil-EDTA, ácido nitriloacético (NTA), ácido nitrilopropiónico (NTP), ácido trietilentetraminohexaacético (TTHA), ácido etilendimino-di(O-hidroxifenilacético) (EDDHA), ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), ácido trans-1,2-ciclohexanodiaminotetraacético (CDTA), N-(2-hidroxietil) etilendinitrilotriacético (HEDTA), N-(2-hidroxietil) iminodiacético (HEIDA), ácido cítrico, 7,19,30-trioxa-1,4,10,13,16,22,27,33-octaazabicyclo[11,11,11]pentatriacontano (O-Bistreno), penicilamina, agentes quelantes que también comprenden azufre o fósforo, por ejemplo dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido 2,3-dimercapto-1-propanesulfónico (DMPS), etilmaltol (EM), sal de potasio de ácido 4-(6-metoxi-8-quinaldinilaminosulfonil)benzoico (TFLZn), ditiozona, N-(6-metoxi-8-quinolil)-para-toluensulfonamida (TSQ), ácido etilendiamino-N,N'-bis(metilfosfónico) (EDDPO), ácido etilendiaminotetra(metilfosfónico) (EDTPO), ácido nitrilometilfosfónico (NTPO), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), deferoxamina, dimercaprol, ácido dimercaptosuccínico y ácido etidróico. Sin embargo, estos agentes quelantes se conocen en la técnica anterior, por ejemplo en Smith, R. M.; Martell, A. E. *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 2,0*; U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD, 1995, como agentes quelantes no selectivos con capacidad relativamente baja para discriminar entre los diferentes iones metálicos. Por tanto, pueden tener simultáneamente la capacidad de unirse a iones metálicos esenciales tales como cinc, hierro, cobre, níquel, cobalto, manganeso y otros iones metálicos esenciales en la mayoría de las enzimas de la naturaleza, por ejemplo en bacterias y mamíferos. Esta falta de selectividad puede conducir a una toxicidad no deseada y otros efectos biológicos cuando se tratan infecciones específicas por parte de un organismo diana en un organismo hospedador, por ejemplo, cuando resulta deseable afectar únicamente a microorganismos específicos al tiempo que el efecto toxicológico sobre el organismo hospedador u otras especies que no son diana para el tratamiento resulta bajo.

Un elemento clave necesario para la vida normal de una célula bacteriana es la homeostasis de cinc. Cinc es el segundo metal de transición más abundante en el cuerpo humano y es responsable de la función catalítica y la estabilidad estructural de más de 6000 enzimas y proteínas (Bertini et al., *Journal of Inorganic Biochemistry* 111 (2012) 150-156). Se ha observado que la manipulación de cinc libremente disponible en la célula afecta a una amplia gama de enfermedades y trastornos (Que et al, *J. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* 2008, 108, 1517-1549; Peterson, et al *Mol. Biol.* 2009, 388, 144-158; BarKalifa et al, *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 618, 15-2; Maret et al, *Mol. Med.* 2007, 13, 371-375). La concentración de especies de cinc libre varía en los tejidos biológicos dependiendo de la capacidad tamponadora del cinc. En la estirpes celulares PC12, HeLa y HT-29, así como en los cultivos primarios de miocitos cardíacos y neuronas in vitro, se ha determinado que la concentración de cinc libre es de aproximadamente 5 nM (Bozym et al, *Exp. Biol. Med.* 2010, 235, 741-750). Cinc es un metal blando, que se encuentra principalmente en la naturaleza como salferita o sulfito de cinc, con estado de oxidación Zn +2 (Emsley, J. "Zinc". *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements.*; Oxford University Press: Nueva York, 2001). Con el fin de formar quelatos de cinc de forma selectiva y con elevada eficacia, se requiere el uso de ligandos básicos blandos. El quelante de cinc lipófilo, N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil) etilendiamina (TPEN), se ha presentado por mostrar muchas actividades biológicas interesantes debido a sus propiedades quelantes de cinc así como su carácter lipófilo, que permite capacidad de penetración de la membrana celular (Donadelli Et al, *Cell. Biochem.* 2008: 104, 202-212). En la molécula TPEN, la capacidad de unión a cinc está basada en la unión de dos o más unidades de la unidad de picoilamina (véase Esquema 1).

## Esquema 1

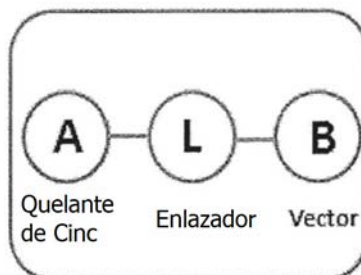


Otras tecnologías emplean ligandos basados en azufre, que también dan como resultado elevada selectividad para el cinc, en comparación con otros iones metálicos endógenos (Zhang et al, *Tetrahedron* 2013, 69, 15-21). La detección de cinc en bacterias se lleva a cabo por medio de reguladores de diferentes familias, incluyendo SmtB/ArsR, MerR, TetR, MarR y la familia Fur (Napolitano et al, *Journal of Bacteriology* 2012, págs. 2426-2436). Las estructuras de rayos-X de MBL indican un ion de cinc fuertemente ligado al sitio activo, y con frecuencia las estructuras revelan dos átomos de Zn en el sitio catalítico, uno ligado fuertemente u otro de forma más débil (Palzkill T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013:91-404). Las subclase B1 es la familia de MBL más grande, incluyendo la mayoría de las enzimas tales como IMP, VIM y NDM. Las enzimas B1 caracterizan un motivo de unión a Zn (II) conservado y existen dos Zn<sup>2+</sup> en el sitio activo de las enzimas B1, con Zn1 ligado por tres residuos His y Zn2 por una His, una Cys y una Asp. Además, existe agua de enlace o ligando de hidróxido entre los dos iones de Zn, que se piensa que es el nucleófilo que hidroliza el sustrato, por ejemplo antibiótico de β-lactama. Los iones de Zn son esenciales para la actividad de las enzimas. En algunas realizaciones, los inhibidores de MBL contienen un grupo de enlace de Zn (II) que puede interaccionar con el(los) ion(es) metálico(s) central(es) de manera fuerte. En la técnica anterior, los quelantes cinc se han descrito como inhibidores de múltiples enfermedades de forma simultánea, por ejemplo en los documentos WO 2006/117660, WO 2001/60349 o US 6,410,570). Los quelantes de cinc también se han sugerido como agentes antibacterianos, por ejemplo en el documento WO 2009/140215, como inhibidores de la formación de biopelículas, por ejemplo en los documentos WO 2011/63394 y WO 2009/155088, o como agente antivíricos, por ejemplo en los documentos WO 2004/71425 y WO 2006/43153. Las dianas dependientes de cinc bacterianas atractivas implicadas en los mecanismos de resistencia se conocen en la técnica anterior por estar inhibidas por agentes quelantes de cinc. Tres ejemplos son el sistema Zur de captación de cinc bacteriano con regulación intensa (Ellison *et al* en PLOS ONE 8 (2013), e75389), biopelículas (Conrady *et al*, PNAS (2008) 105 (49), 19456-19461) y la peptidasa HmrA en MRSA. Todos estas dianas están inhibidas por los quelantes de cinc del estado de la técnica tales como TPEN, EDTA o las fenantrolinas. Sin embargo, estos agentes no poseen afinidad específica por la biología bacteriana, y también son tóxicos para los mamíferos. Otro ejemplo de maquinarias vitales dependientes de cinc el uso bacteriano de las bombas de descarga (Nikaido, et al., *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2012) 340-363), que se adaptan a la mayoría de los antibióticos modernos y sustratos, eliminándolos de la célula bacteriana. Otro ejemplo el desacetilasa LpxC dependiente de cinc (Liang et al, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 6954-6966). Otro ejemplo es la función ribosómica bacteriana altamente dependiente de cinc (Graham *et al*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) pp. 18377-18389). La última usa 8 átomos de cinc sobre la unidad ribosómica 70S.

Sin embargo, en estas descripciones, no existe recomendación alguna sobre el modo de obtener efectos selectivos de la terapia de formación de quelatos de cinc en las especies diana, mientras que un organismo hospedador se ve afectado en un nivel suficientemente bajo para evitar cuestiones relativas a, por ejemplo, toxicidad. De este modo, existe una demanda médica de agentes quelantes de cinc con baja toxicidad en un organismo hospedador, mientras que también tengan un efecto sobre el organismo diana.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que en una biblioteca sintetizada de compuestos novedosos, los inhibidores candidatos principales afectan a las cepas bacterianas resistentes que albergan MBL. Los compuestos principales muestran valores de EC<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar frente a algunas de las cepas bacterianas clínicamente más relevantes, que albergan algunos de los MBL más importantes. Los candidatos principales contienen tres elementos estructurales centrales (véase Esquema 2) en una estructura no descrita previamente en la técnica anterior:

## Esquema 2



El Resto A es cualquier grupo hidrófilo, de Zn(II) selectivo. La expresión "que forma quelatos" se refiere a al término griego "quelos" que indica una unión de pinza de cangrejo a un objeto por medio de al menos dos puntos de contacto. Por tanto, el agente quelante en química se puede definir como un resto molecular:



(II)

en el que m es un número entero de 2 a 10;

cada grupo C es un grupo funcional que puede ser igual o diferente que tiene propiedades de base de Lewis y que posee al menos un heteroátomo seleccionado entre N, S, S o P capaz de donar electrones a un ácido de Lewis, M, que en la presente invención es un átomo de cinc;

$R_c$  es una unidad que se une a los grupos C que puede contener hasta 50 átomos, y que transporta un grupo funcional  $R_L$ ; y

$R_L$  comprende una unión covalente al enlazador L en la estructura A-L-B definida en la presente memoria.

El resto L es un enlazador o enlace que une covalentemente A y B. El enlazador L puede opcionalmente tener grupos de ligando que soportan grupos quelantes de Zn(II).

El resto B puede ser un grupo que interacciona con estructuras biológicas encontradas en bacterias, por ejemplo, puede ser específico frente a MBL, DD-transferasas, u otras enzimas no encontradas en la biología humana y, de este modo, que tienen menos toxicidad para los humanos, o pueden facilitar el transporte sobre las membranas bacterianas.

Más específicamente, B puede ser un resto químico que tiene afinidad por las estructura biológicas encontradas en las células procariotas tales como bacterias, o en virus o parásitos. Al mismo tiempo, el resto B tiene una afinidad suficientemente baja por las estructuras biológicas encontradas en organismos que comprenden células eucariotas, por ejemplo en mamíferos, especialmente mamíferos superiores como seres humanos, con el fin de no inducir efectos no deseados tales como signos de toxicidad.

Por tanto, en una realización, el resto B puede ser un resto molecular encontrado en bacterias pero no en el organismo del hospedador. Los ejemplos de dichos restos son peptidoglicanos que únicamente se encuentran en bacterias. Comprenden cadenas lineales de dos amino azúcares alternantes, *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc). Cada MurNAc está ligado a una cadena de amino ácido corta (4 a 5 residuos). Estas cadenas de amino ácidos constan de bloques estructurales que no se encuentran en la biología de los mamíferos, con frecuencia con la configuración R de la funcionalidad de amino ácido, que corresponde a la configuración D de las moléculas que comprenden una funcionalidad de  $\alpha$ -amino ácido. El siguiente listado de bloques estructurales puede estar presente en el resto B, tal y como se usa en la presente invención: L-lisina, L-alanina, ácido D- o L-glutámico, D-glutamina, ácido *meso*-diaminopimélico, ácido D-2,3-diamino propanoico, D-alanina y otros amino ácidos con configuración D, los D-amino ácidos no están presentes en proteínas y no se encuentran en organismos eucariotas. Por tanto, en una realización, el resto B puede ser una estructura que comprende cualquier combinación de bloques estructurales listados anteriormente o moléculas que imitan dicha estructura. Un ejemplo de compuesto que imita un tripéptido que comprende amino ácidos con configuración D es aspergilomarasmina, que se describe en la técnica anterior, por ejemplo por parte de Mikami *et al*, Agricultural and Biological Chemistry (1983), 47(11): 2693-5. Se prefieren las combinaciones de amino ácidos con configuración D, por ejemplo las combinaciones de ácido D-glutámico, D-glutamina, ácido *meso*-diaminopimélico y D-alanina. Otras combinaciones de amino ácidos que se pueden usar son combinaciones de D-alanina, por ejemplo el bloque estructural D-Alanina-D-Alanina como tal o un derivado del mismo tal como glicil-L- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -pimelil-D-Alanina-D-Alanina. En cualquiera de estas estructuras, el resto de ácido carboxílico en los bloques estructurales de amino ácido puede estar sustituido por grupos funcionales isoelectrónicos tales como ácido borónico,  $-B(OH)_2$ , ácido fosfórico,  $-P(=O)(OH)_2$ , o ácido sulfónico,  $-SO_3H$ . El ácido carboxílico o cualquiera de estos grupos funcionales isoelectrónicos también se puede esterificar. El Resto B

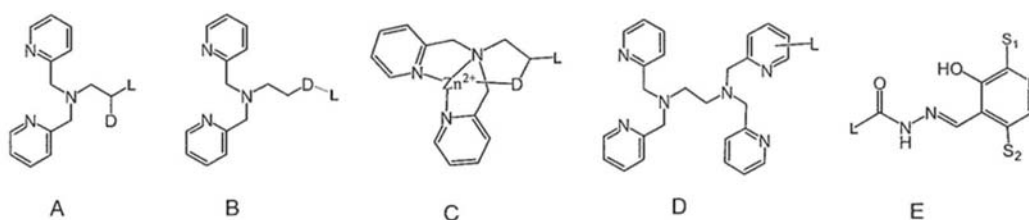
también puede ser un sustrato para cualquiera de las enzimas que usan las estructuras de estos bloques estructurales como sustrato en el proceso de construcción de la membrana o la pared bacteriana, por ejemplo D,D-transferasa que usa D-Ala-D-Ala.

- 5 En otra realización, el resto B puede comprender una unidad estructural de  $\beta$ -lactama que tiene afinidad por una gran número de proteínas que únicamente se encuentran en las bacterias, denominadas proteínas que se unen a penicilina (PBP). Los ejemplos de PBP y MBL, proteína de tipo serina  $\beta$ -lactamasa (LACTB), D,D-transferasa, D-Ala(D,D)-carboxipeptidasa, las D-Alanil-D-alanina Dipeptidasas VanA, VanX, VanY y otras, tal y como se revisa por parte de Sauvage *et al en* FEMS Microbiol Rev 32 (2008) 234-258. Otros miembros de esta clase de proteínas pueden facilitar el transporte sobre las membranas bacterianas. Esta clase de proteínas únicamente se encuentra en la biología bacteriana, no en la biología de los mamíferos, y es una clase apropiada de dianas para el resto molecular B en las estructuras de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de compuestos que tiene afinidad por PBP son antibióticos de  $\beta$ -lactama. Por tanto, derivados de penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactamas son ejemplos de restos moleculares que se pueden usar como resto B en la invención. Estas clases representan clases grandes de agentes antibióticos en el mercado, y muchos bloques estructurales en su proceso sintético se encuentran comercialmente disponibles para su uso en la estructura A-L-B de la presente invención.

Como se ha indicado anteriormente, un ejemplo de un sustrato de DD-transferasa, útil como unidad de resto B es D-Ala-D-Ala, que se usa como bloque estructural para la síntesis de pared bacteriana. Los agentes antibacterianos son moléculas que tienen una interacción selectiva con estructuras biológicas encontradas en bacterias, y no en la biología humana; por ejemplo, las penicilinas imitan D-Ala-D-Ala y, de este modo, actúan como antagonista para DD-transferasa. Además, los antibióticos de  $\beta$ -lactamas son sustratos para MBL. Por tanto, el resto B puede ser cualquier sustrato para estructuras biológicas bacterianas. Los ejemplos del resto B incluyen: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, ácido clavulánico, sulbactama, tazobactama, monobactamas (por ejemplo aztreonam), derivados de tiopropionil-amino ácido, tioésteres, derivados de ácido succínico y derivados de ácido maleico.

La unidad A de unión de cinc comprende al menos una función quelante de metal lipófilo con selectividad por el cinc. De acuerdo con la presente invención, el resto molecular A es el resto que comprende dos unidades 2-piridil-metilo, indicadas como dipicoil (véase Esquema 3, A, B) con un átomo D de donante adyacente que contribuye a la estabilización de la unidad de dipicoil quelante de cinc (Esquema 3, A-C). El resto A también puede comprender más de dos unidades de 2-piridil-metilo, por ejemplo un derivado de TPEN novedoso. TPEN, como se ha definido anteriormente, se ha usado ampliamente en muchas aplicaciones biológicas en la técnica anterior. TPEN tiene cuatro unidades de 2-piridil-metilo, que dan lugar a una capacidad quelante de cinc más fuerte. Un derivado de TPEN tal como se muestra en el Esquema 3D, con un enlace covalente a un grupo enlazador L, no se conoce en la técnica anterior y es una parte de la presente invención. El Esquema 3E muestra un ejemplo adicional de un resto A quelante apropiado.

**Esquema 3**



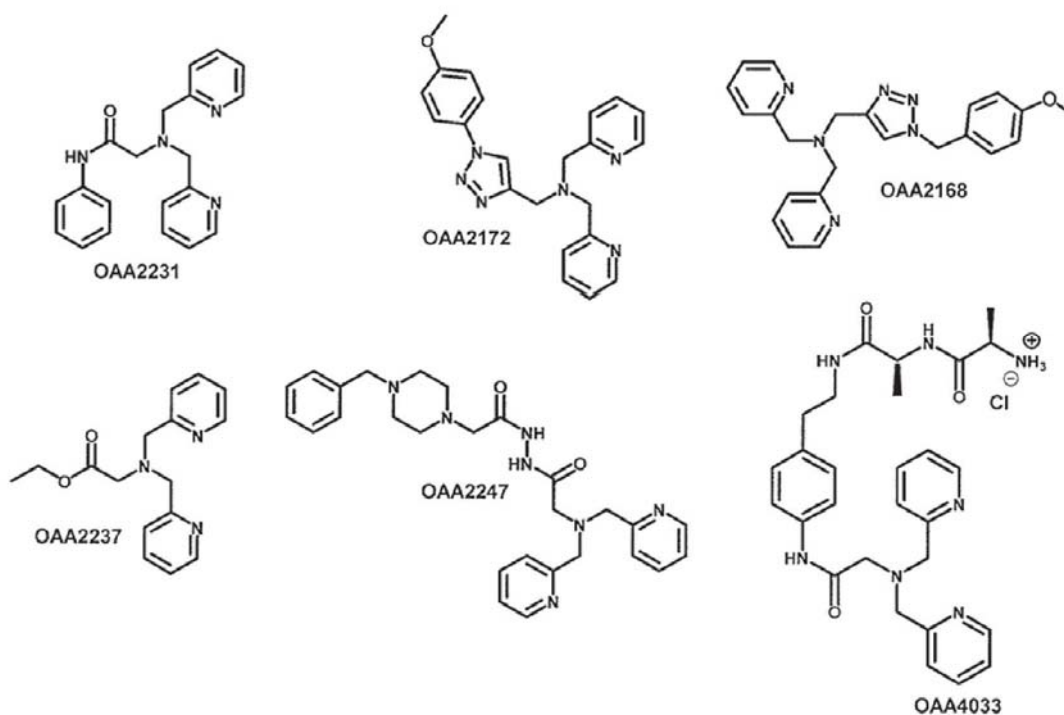
40 D un átomo donante de electrones, L un enlazador como se define en la presente memoria; S<sub>1</sub> H o un grupo alquilo, S<sub>2</sub> H, alcoxi inferior o un grupo hidroxilo; E CH o N.

45 Para tener una interacción fuerte con átomos de cinc esenciales necesarios para que los MBL funcionen de manera apropiada, la función quelante de cinc preferida necesita tener una constante de disociación K<sub>d</sub> con cinc lo más baja posible. La constante de disociación es el inverso de la constante K<sub>f</sub> de formación de complejo metálico de forma que K<sub>d</sub> 1/K<sub>f</sub>. En la presente invención, el valor de K<sub>d</sub> es en general preferentemente menor de 1 x 10<sup>-5</sup> M, incluso más preferentemente menor de 1 x 10<sup>-8</sup> M, aún más preferentemente menor de 20 x 10<sup>-10</sup> M o menor de 1 x 10<sup>-10</sup> M. En general, las unidades de dipicoil del Esquema 3A y B tiene K<sub>d</sub> con cinc dentro del intervalo de 1-10 x 10<sup>-10</sup> M (Åstrand, *et al*, Tetrahedron 69 (2013) 8645-8654). El TPEN de quelante de cinc lipófilo que penetra en la célula tiene una constante de disociación (K<sub>d</sub>) con cinc de 0,26 x 10<sup>-15</sup> M (Makhov, *et al*, Cell Death Differ. 2008, 15, 1745).

55 El resto de o-hidroxibencilideno-hidrazida (Esquema 3E) también se pueden usar en la presente invención, y también se presenta en la técnica anterior por tener propiedades quelantes de cinc con valores de K<sub>d</sub> dentro del intervalo de 1-30 x 10<sup>-10</sup> M (Putt, *et al*, Nat. Chem. Biol. 2006, 2, 543; Charkoudian, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 12424; Hsu, *et al*, ACS Comb. Sci. 2012, 14, 44).

En Ganta, *et al*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 1618-1622, se ha presentado un grupo de compuestos, que tienen un grupo hidroxamato como resto quelante de cinc en el mismo resto molecular como grupo con afinidad por MBL. Sin embargo, de acuerdo con Smith, R. M.; Martell, A. E. *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 2,0*; U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD, 1995, se presenta que la constante de disociación de formación de complejos de hidroxamato está en el intervalo de  $10^{-4}$ , que es cinco órdenes de magnitud mayor que lo mostrado para las dipicoilaminas. Además, el grupo hidroxamato es un grupo quelante no selectivo, que también demuestra la unión de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  y muchos otros iones metálicos, haciendo que los ligandos de hidroxamato sean menos específicos, y más susceptibles de interacción con la biología humana, lo que conduce a mayor toxicidad para los humanos. Los ligandos basados en unidades de 2-piridil-metilo demuestran una selectividad marcadamente elevada para cinc y cadmio (Xu, et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 601), no siendo el último un ion metálico natural en los sistemas biológicos. También se sugiere que los agentes quelantes de cinc en la técnica anterior actúan como inhibidores de MBL, en el documento WO 2012/088283, se sugiere a las tiazolidinas y compuestos análogos como inhibidores de MBL junto con beta lactamas. El uso del grupo de dipicoilamina en los quelantes de cinc no se menciona en el presente documento. Sin embargo, estos agentes también tienen constantes de disociación con cinc que son significativamente más elevadas que el intervalo nanomolar. Asimismo, no se encontró ningún valor de  $IC_{50}$  por debajo del intervalo micromolar en los ensayos de MBL en el documento WO 2012/088383. La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objetivo que se encuentra fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines exclusivamente informativos. Cada uno de los Esquemas 4-6 siguientes se proporciona exclusivamente con fines ilustrativos y de descripción de una parte de la invención. Por tanto, los miembros de la biblioteca de compuestos sintetizados hasta ahora, se ejemplifican, en los Esquemas 4 -6.

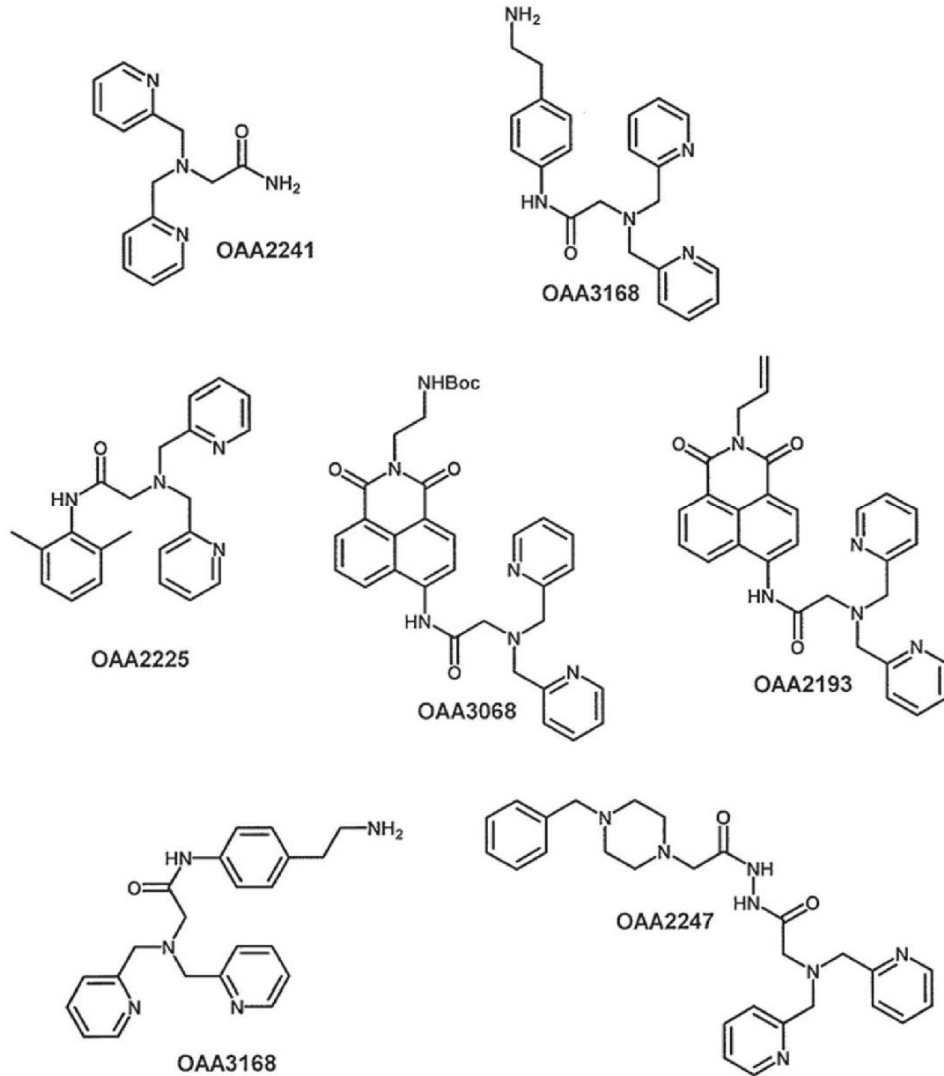
#### Esquema 4

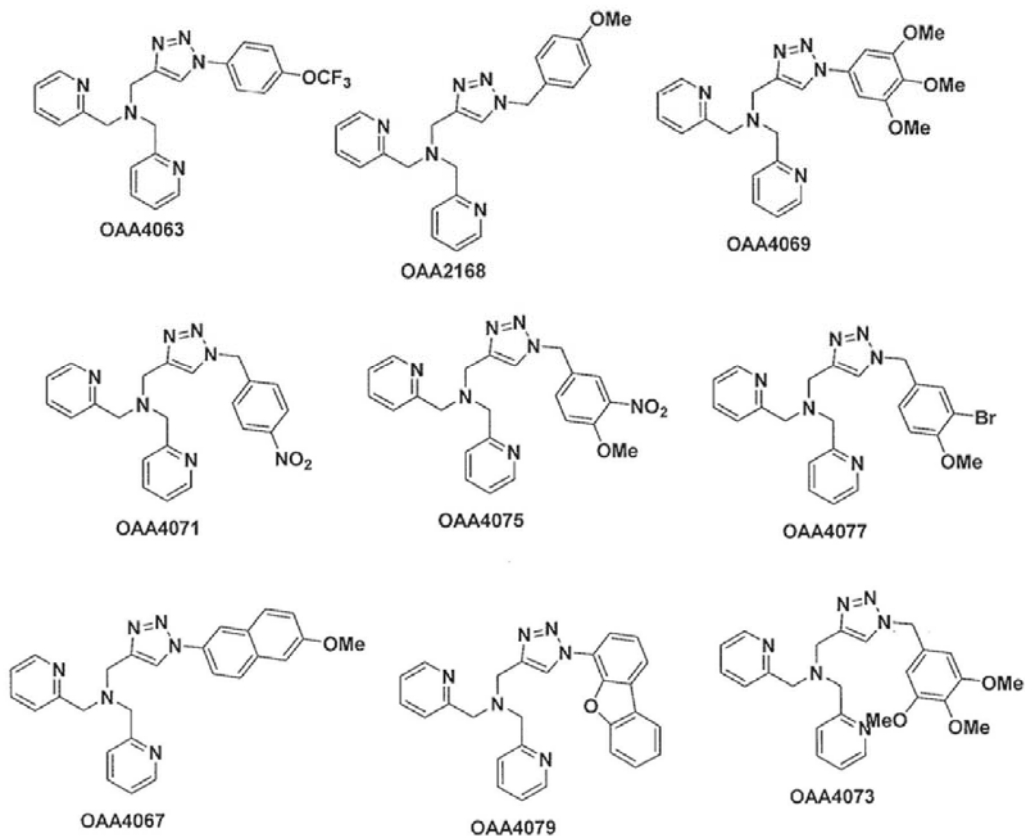


25



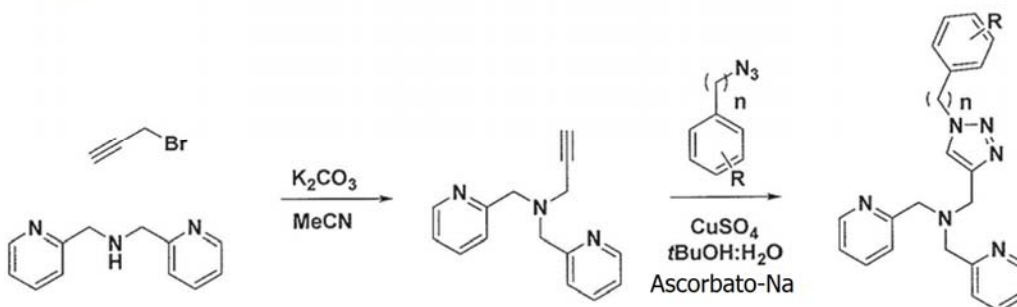
Esquema 5



**Esquema 6**

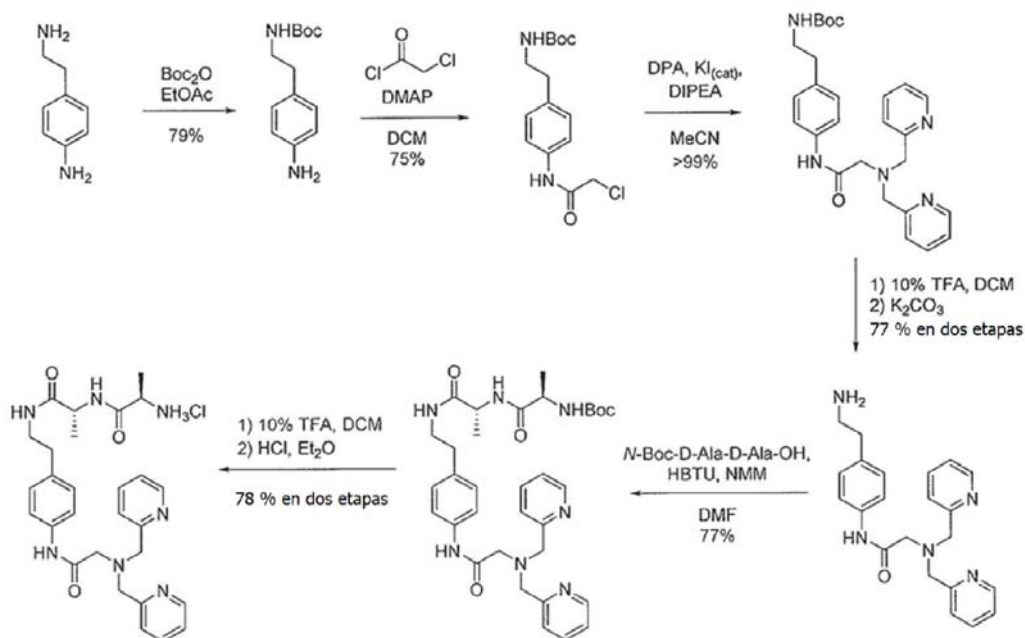
Todas las moléculas ejemplificadas tienen un constante de disociación  $K_d$  con cinc menor de  $1 \times 10^{-10}$  M.

5 Un proceso general de preparación para algunos miembros de biblioteca se ejemplifica en el Esquema 7:

**Esquema 7**

Se preparó una realización preferida de la invención, OAA4033 (Ejemplo 24), como se indica en el Esquema 8:

## Esquema 8



El compuesto OAA4033 (Ejemplo 24) es un ejemplo del núcleo de la presente invención, indicado esquemática y generalmente como A-L-B. El quelante de cinc es un resto dipicoilamina (A), el enlazador es un grupo carbonilamino-fenilo y el vector es un péptido D-Ala-D-Ala. Como alternativa a lo visto, el quelante de cinc se puede considerar como el resto dipicoilaminometil-carbonilamino (A), el enlazador como el grupo fenil-etilo y el vector (B) como péptido D-Ala-D-Ala.

5

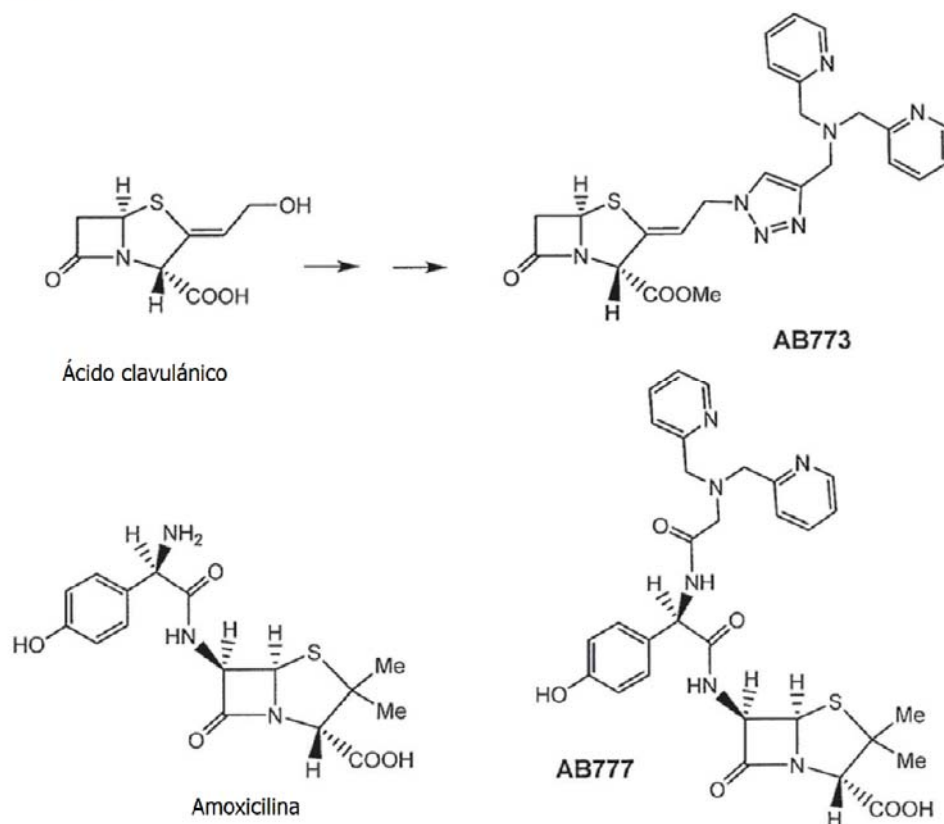
Como se ha indicado anteriormente, el mecanismo de todos los antibióticos de  $\beta$ -lactama es para imitar el bloque estructural D-Ala-D-Ala usado por la enzima bacteriana DD-transferasa en la síntesis de la pared celular bacteriana. Normalmente, los amino ácidos con estequiometría L se encuentran en la biología humana. Por tanto, el sustrato D-Ala-D-Ala bacteriano de dipéptido, tiene afinidad por la enzima bacteriana DD-transferasa.

10

Dos ejemplos especialmente preferidos de la invención, AB773 y AB777, se preparan a partir de los compuestos comerciales ácido clavulánico y amoxicilina, definidos como el vector B en la presente invención (véase Esquema 9):

15

## Esquema 9

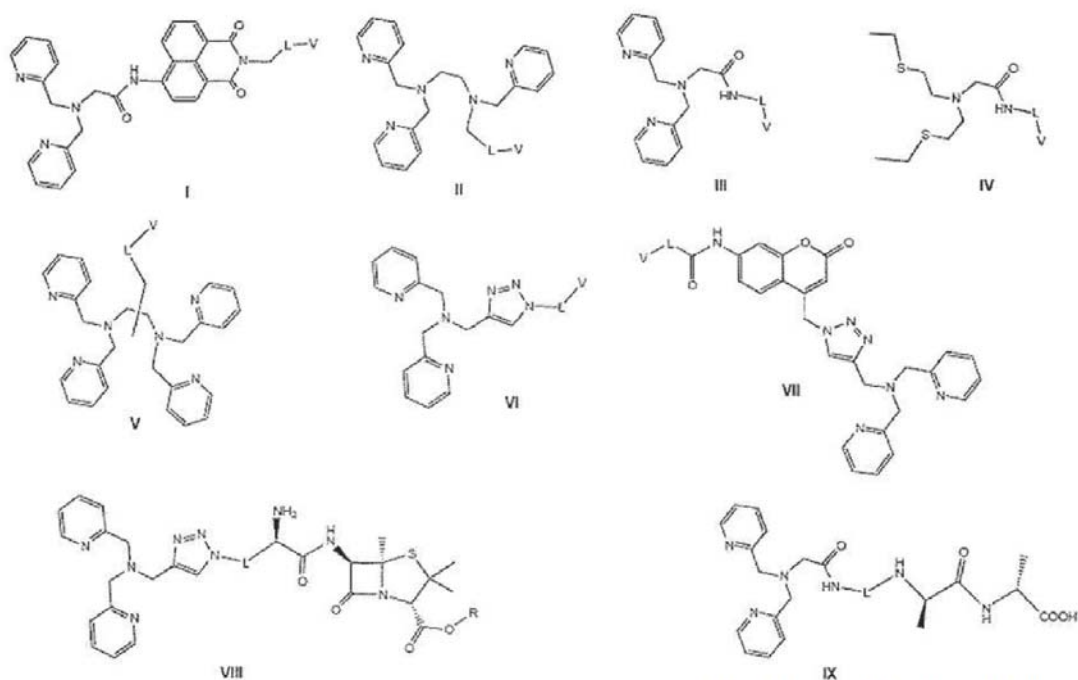


Las dos nuevas entidades, no sometidas a ensayo hasta ahora como inhibidores de MBL, muestran ahora valores prometedores de  $IC_{50}$ , por ejemplo para VIM-2 en comparación con los inhibidores de control. Los mismos inhibidores mostraron actividad en los ensayos tanto enzimáticos como de célula completa bacteriana con *E. coli* que alberga VIM-2. Los inhibidores más activos mostraron una actividad incluso mejor (sub- $\mu M$ ) frente a otros MBL tales como NDM-1 y GIM-1 y ensayos de células completas bacterianas con *E. coli* que alberga GIM-1. Los inhibidores mostraron un rendimiento prometedor en el ensayo de sinergia bacteriana con el antibiótico de  $\beta$ -lactama meropenem frente a aislados clínicos diferentes de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae* que albergan MBL diferentes (VIM-2, VIM-1 y NDM-1) proporcionando una evidencia de que estos tienen el potencial para ser usados como terapia de combinación de inhibidor de  $\beta$ -lactama- $\beta$ -lactamasa. Diversos candidatos de biblioteca mostraron actividad sinérgica con meropenem. Los inventores procedieron a combinar un fragmento de unión de cinc (fragmento A) con un resto molecular con afinidad por las unidades estructurales encontrada en biología bacteriana pero no encontrada en biología humana (fragmento B). El compuesto resultante (OAA4033, Ejemplo 24) muestra un rendimiento prometedor en todos los ensayos in vitro hasta ahora, y se comportó bien en el ensayo de sinergia con meropenem. Estos resultados apuntan en la dirección de una clase conceptualmente nueva de agentes antibacterianos.

Otros compuestos de acuerdo con la presente divulgación incluyen las estructuras del Esquema 10:

20

## Esquema 10



VIII  
Derivado de amoxicilina-quelante de cinc  
R = H o lipófilo, biodegradable como en piv-ampicilina

IX  
Derivado de amoxicilina-quelante de cinc con el bloque estructural bacteriano -D-Ala-D-Ala. Este vector también puede ser ácido -D-ala-láctico

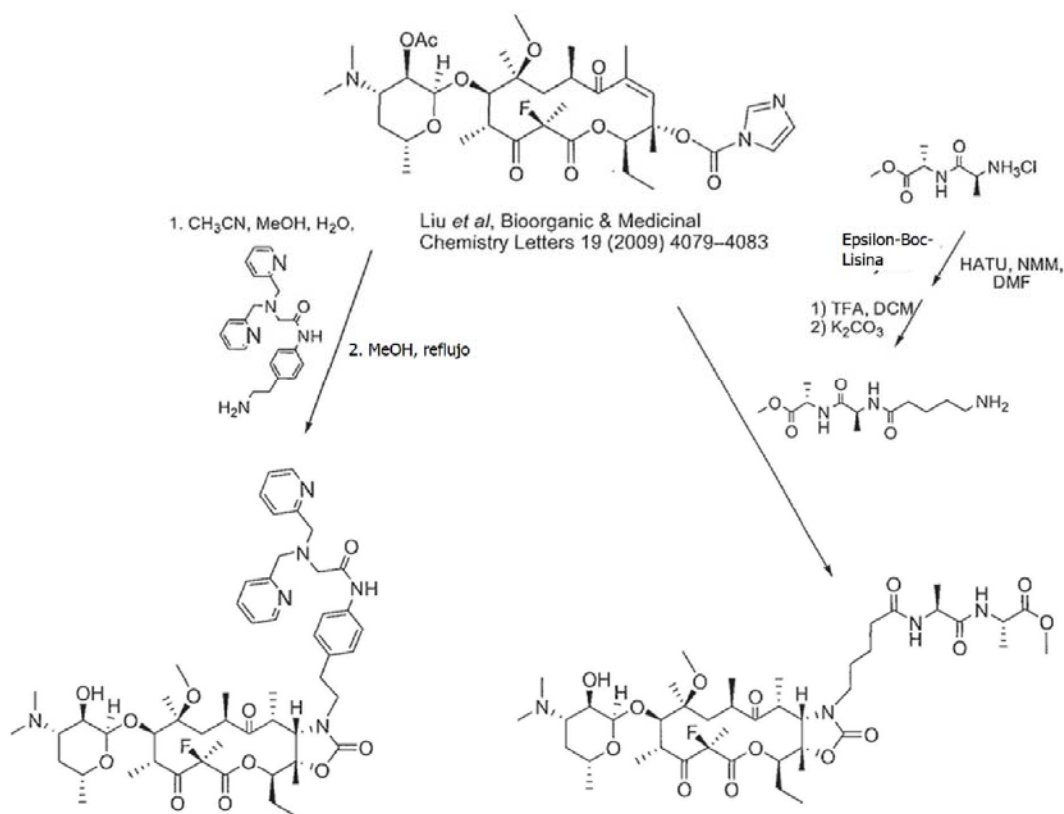
en la que L es un enlazador como se define en la presente memoria y V es un vector que corresponde al resto B como se define en la presente memoria.

5

Los macrólidos son un grupo de antibióticos cuya actividad parte de la presencia de un anillo de macrólido. Inhiben la biosíntesis de proteínas bacterianas a través de la unión al ribosoma bacteriano e inhiben la transferencia ribosómica de ARNt así como también la traslocación ribosómica. Como se ha señalado anteriormente, el ribosoma bacteriano es un ejemplo de proteína bacteriana que depende en gran medida de cinc. La química de los macrólidos se describe bien en la técnica anterior, por ejemplo por parte de Liu et al en *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 4079-4083. Los macrólidos y sus derivados son, de este modo, un ejemplo adicional del vector B que puede estar presente en las estructuras descritas en la presente memoria. Por ejemplo, el derivado de claritromicina activada con carbonil-imidazol (CDI) mostrado en el Esquema 11 se puede usar como material de partida para preparar un número de compuestos para su uso en la presente invención.

15

## Esquema 11



Otra clase de moléculas útiles como vector B en la presente invención incluye cloranfenicol y sus derivados. Cloranfenicol es un bacteriostático por medio de inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión al ribosoma de la proteína.

Tal como se entenderá, cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria se pueden proporcionar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden convertirse en una sal de los mismos, en particular en una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con un ácido o base orgánico o inorgánico. Los ácidos que se pueden usar para dicha finalidad incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido ascórbico. Las bases que se pueden usar para dicha finalidad incluyen hidróxidos de metal alcalino y alcalino-térreo, por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido potásico e hidróxido de cesio, y amoníaco y aminas orgánicas tales como dietilamina, trietilamina, etanolamina, dietanolamina, ciclohexilamina y dicitohexilamina. Los procedimientos para la formación de sales son convencionales en la técnica.

También se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención junto con al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones que comprenden los inhibidores de MBL se formulan preferentemente antes de la administración. Los principios activos de dichas composiciones pueden comprender de un 0,05 % a un 99 % en peso de la formulación. Las dosificaciones apropiadas pueden depender del modulador usado, la afección concreta a tratar, la edad y peso del paciente etc. y pueden determinarse de forma rutinaria por parte del facultativo experto de acuerdo con principios conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, las dosificaciones representativas pueden incluir de 1 a 200 o 1-100 mg/kg, por ejemplo de 5 a 70, 5-50, o de 10 a 70 o de 10 a 50 mg/kg.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que los ingredientes deben ser compatibles con otros ingredientes de la composición, así como fisiológicamente aceptables para el receptor. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden formularse de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica y ampliamente descritos en la bibliografía y pueden comprender cualquiera de los vehículos, diluyentes o excipientes conocidos. Pueden incluirse también otros ingredientes, de acuerdo con técnicas conocidas en la materia por ejemplo estabilizadores, conservantes, etc. Las formulaciones pueden estar en forma de disoluciones acuosas estériles y/o suspensiones de principios farmacéuticamente activos, aerosoles, pomadas y similares. Las

formulaciones también puede estar en forma de liberación retardada, por ejemplo micropartículas, nanopartículas, emulsiones, nanosuspensiones, partículas lipídicas o aceites. Además, un aspecto importante de la formulación de agentes antibacterianos está en la forma de las películas, parches o folios que tienen el inhibidor de MBL revestido sobre la superficie; éstos también se pueden usar en la presente invención.

5 La administración también puede ser cualquier método conocido en las técnicas medicinales, que incluyen administración oral, parenteral, tópica, subcutánea o mediante inhalación. El inhibidor de MBL o las formulaciones que comprenden el inhibidor de MBL pueden administrarse en una dosis individual o se pueden tomar a intervalos regulares por ejemplo una o dos veces al día, una vez cada 48 horas o una vez cada 72 horas. Las formulaciones retardadas se pueden tomar a intervalos más prolongados por ejemplo de 1 a 2 veces al mes o cada tres meses. La dosificación concreta de los compuestos activos a administrar, el número de dosis diarias o mensuales y la duración del tratamiento dependen de un número de factores, que incluye la edad del paciente y su peso. Las composiciones se pueden formular de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la bibliografía y pueden comprender cualquiera de los vehículos, diluyentes o excipientes conocidos. Por ejemplo las composiciones/formulaciones que se pueden usar en la presente invención que son apropiadas para administración parenteral pueden comprender de forma apropiada disoluciones acuosas estériles y/o suspensiones de principios farmacéuticamente activos que preferentemente se vuelven isotónicos con la sangre del receptor generalmente usando cloruro sódico, glicerina, glucosa, manitol, sorbitol y similares. Además, la composición puede contener cualquier número de adyuvantes, tales como tampones, conservantes, agentes dispersantes, agentes que favorecen el comienzo de la acción o la duración prolongada de la misma. Las composiciones/formulaciones apropiada para administración oral pueden estar en forma de polvo de reserva purificado estéril, preferentemente incorporados en un sobre o sobres que pueden contener cualquier número de adyuvantes tales como tampones, agentes conservantes, agentes que favorecen una liberación rápida o prolongada. Las composiciones/formulaciones para su uso en la presente invención apropiados para administración local o tópica pueden comprender un inhibidor de MBL mezclado con ingredientes apropiados conocidos tales como parafina, vaselina, cetanol, glicerol y similares, para formar pomadas o cremas.

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

### 30 Procedimientos generales

Todos los reactivos y disolventes usados son de calidad comercial y se usaron sin purificación adicional antes de su uso. Se registraron los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) en un espectrómetro Bruker AVII-400 MHz, DPX-300 MHz o a DPX-200 MHz. Se presentan las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en hertzios, y se presentan los desplazamientos químicos en partes por millón (ppm) con respecto a  $\text{CDCl}_3$  (7,26 ppm para  $^1\text{H}$  y 77,16 ppm para  $^{13}\text{C}$ ) y  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  (2,50 ppm para  $^1\text{H}$  y 39,52 ppm para  $^{13}\text{C}$ ). Se obtuvieron los espectros en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum BX serie FT-IR y únicamente se presentan los picos seleccionados. Todos los rendimientos están sin corregir.

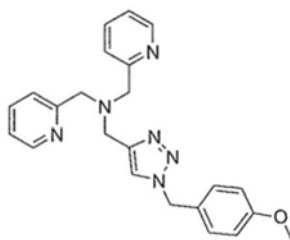
#### 40 Ejemplo 1 - Síntesis de *N,N'*-dipicolil-*N*-propagil amina.

Se diluyó *N,N'*-dipicolilamina (5,0 ml, 22,9 mmol, 1,0 eq.) en THF (55,7 ml, 700 mmol, 25 eq.) seguido de la adición de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (15,40 g, 111,4 mmol, 4,0 eq.) y bromuro de propagilo (4,34 ml 80 %, 39,0 mmol, 1,4 eq.). La mezcla se calentó a reflujo y se agitó intensamente y se dejó durante tres horas. A continuación se enfrió la suspensión rojo intenso hasta temperatura ambiente, se filtró usando un filtro de vidrio, se lavó el filtro con 2x20 ml de diclorometano y se concentraron las fases orgánicas combinadas a presión reducida hasta obtener un aceite de color rojo óxido. Se purificó el producto bruto usando cromatografía en columna y se eluyó el producto a partir de una columna de alúmina por medio de metanol en diclorometano (1-5 %) dando lugar a 5,55 g (86 %). RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  están de acuerdo con los resultados publicados.

#### 50 Ejemplo 2 - Procedimiento general para la síntesis de triazoles

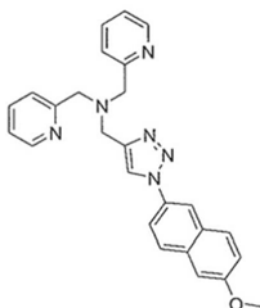
Se añadieron sulfato de cobre heptahidratado (250 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y (+)ascorbato de sodio (396 mg, 2,0 mmol, 2,0 eq.) en 2,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  simultáneamente a una disolución en agitación de alquino (1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de *t*BuOH. Posteriormente se añadió la disolución de azida (4,0 ml al 25 % en *t*BuOMe, 1,0 mmol, 1,0 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Posteriormente se añadió EDTA (293 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq) a la disolución en agitación y se dejó durante 60 minutos antes de diluir la mezcla con 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se ajustó el pH de la mezcla a  $>10$  con NaOH 1M. A continuación se extrajo la suspensión con 50 ml de EtOAc y 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y se concentraron a presión reducida para dar un aceite rojo oscuro/semisólido. Los productos brutos se purificaron usando cromatografía en columna por medio de elución en una columna de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neutra con 1-10 % de metanol en diclorometano.

**Ejemplo 3** - Preparación de 1-(1-(4-metoxibencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA2168)



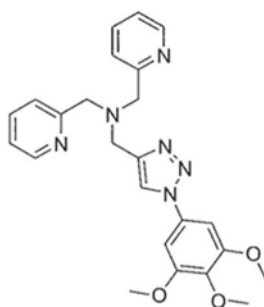
5 Rendimiento: 188 mg (49 %). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, cloroformo-d) δ 8,55-8,45 (m, 2H), 7,70-7,48 (m, 4H), 7,46 (s, 1H), 7,25-7,06 (m, 4H), 6,89 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,81 (s, 4H), 3,80 (s, 3H). HRMS *e/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O (M+1): 387,1928, observado 387,1927.

10 **Ejemplo 4** - Preparación de 1-(1-(6-metoxinaftalen-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2 ilmetil)metanamina (OAA4067).



15 Rendimiento: 286 mg (86 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,57 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 8,16 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,93-7,76 (m, 4H), 7,68 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,62 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,25-7,12 (m, 4H), 4,01 (s, 2H), 3,99-3,87 (m, 7H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,6, 149,3, 136,7, 134,4, 129,9, 128,7, 128,6, 123,6, 122,3, 120,5, 119,8, 118,6, 115,1, 106,0, 59,9, 55,6, 48,9. HRMS *e/z* calculado para C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O (M+H): 437,2084, observado 437,2086.

20 **Ejemplo 5** - Preparación de 1-(piridin-2-il)-*N*-((1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)metanamina (OAA4069).

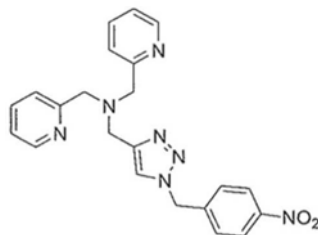


25 Rendimiento: 261 mg (78 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,56 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,66 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,58 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,23-7,08 (m, 2H), 6,94 (s, 2H), 3,98 (s, 2H), 3,94 (s, 6H), 3,91 (s, 4H), 3,89 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,3, 154,0, 149,3, 145,2, 138,4, 136,6, 133,2, 123,6, 122,2, 121,6, 98,7, 61,2, 59,9, 56,6, 48,7. HRMS *e/z* calculado para C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (M+H): 447,2139, observado 447,2143.

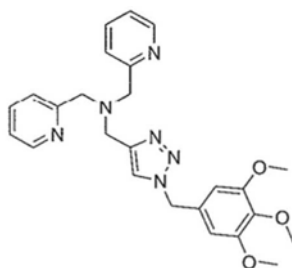
30



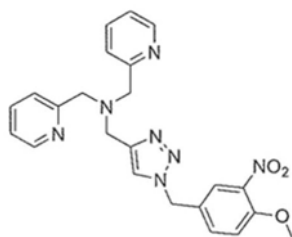
**Ejemplo 6** - Preparación de 1-(1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA4071).



- 5 Rendimiento: 176 mg (42 %). RMN 1H (400 MHz, Cloroformo-d)  $\delta$  8,55 (d,  $J = 4,8$  Hz, 2H), 8,21 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,90 (s, 1H), 7,69 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 7,58 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,41 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,24-7,12 (m, 2H), 5,64 (s, 2H), 4,01 (s, 2H), 3,95 (s, 4H). RMN 13C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  148,97, 141,92, 137,19, 128,74, 124,42, 124,10, 122,71, 59,01, 53,22, 48,73. HRMS  $m/z$  calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> (M+H): 416,1829, observado 416,1825.
- 10 **Ejemplo 7** - Preparación de 1-(piridin-2-il)-*N*-(piridin-2-ilmetil)-*N*-((1-(3,4,5-trimetoxibencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)metanamina (OAA4073).

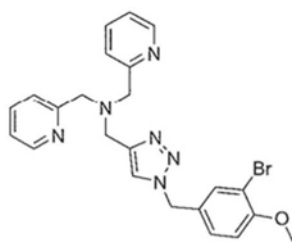


- 15 Rendimiento: 138 mg (30 %). RMN 1H (400 MHz, Cloroformo-d)  $\delta$  8,52 (d,  $J = 4,7$  Hz, 2H), 7,69-7,59 (m, 3H), 7,54 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,22-7,01 (m, 2H), 6,47 (s, 2H), 5,43 (s, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,90-3,81 (m, 7H), 3,80 (s, 6H). RMN 13C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  153,8, 152,3, 149,2, 139,4, 137,6, 136,7, 134,8, 130,5, 126,3, 123,6, 123,3, 123,1, 122,3, 111,8, 105,3, 103,3, 61,0, 59,5, 56,3, 54,4, 48,8. HRMS  $m/z$  calculado para C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (M+H): 461,2296, observado 461,2296.
- 20 **Ejemplo 8** - Preparación de 1-(1-(4-metoxi-3-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA4075).



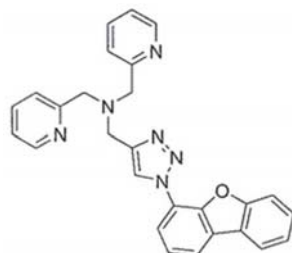
- 25 Rendimiento: 191 mg (43 %). RMN 1H (400 MHz, Cloroformo-d)  $\delta$  8,52 (d,  $J = 4,7$  Hz, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,64 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 7,59 (s, 1H), 7,53 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,45 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,19-7,10 (m, 2H), 7,07 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 5,49 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,88 (s, 2H), 3,82 (s, 4H). RMN 13C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159,2, 153,3, 149,3, 145,3, 139,7, 136,6, 133,9, 127,4, 125,4, 123,5, 123,1, 122,2, 114,5, 59,7, 56,9, 52,7, 48,7. HRMS  $m/z$  calculado para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> (M+H): 446,1935, observado 446,1940.
- 30

**Ejemplo 9** - Preparación de 1-(1-(3-bromo-4-metoxibencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA4077).



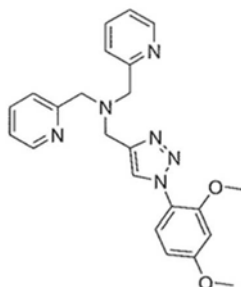
Rendimiento: 228 mg (48 %). HRMS *e/z* calculado para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Br (M+H): 479,1189, observado 479,1196.

- 5 Ejemplo 10 - Preparación de 1-(1-dibenzo[b,d]furan-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA4079).



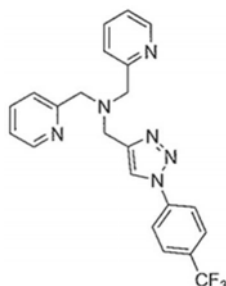
- 10 Rendimiento: 231 mg (52 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) ppm 8,69 (s, 1H), 8,57 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 8,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,01 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,76-7,62 (m, 5H), 7,61-7,39 (m, 4H), 7,16 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 4,08 (s, 2H), 3,99 (s, 4H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,3, 156,4, 149,3, 145,7, 145,1, 136,7, 128,3, 126,8, 124,2, 123,9, 123,7, 123,5, 122,7, 122,2, 121,2, 120,6, 119,9, 115,1, 112,2, 59,9, 49,0. HRMS *e/z* calculado para C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O (M+H): 447,1928, observado 447,1931.

- 15 Ejemplo 11 - Preparación de 1-(1-(2,4-dimetoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA4081).



- 20 Rendimiento: 112 mg (27 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,53 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,64 (dq, *J* = 11,2, 6,0, 4,3 Hz, 5H), 7,14 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 6,60 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,97 (s, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,87 (s, 3H), 3,82 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,3, 159,6, 152,8, 149,2, 143,7, 136,6, 126,7, 125,3, 123,4, 122,1, 120,4, 104,9, 99,8, 59,8, 56,1, 55,8, 49,0. HRMS *e/z* calculado para C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (M+H): 417,2034, observado 417,2033.
- 25 HRMS *e/z* calculado para C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (M+H): 417,2034, observado 417,2033.

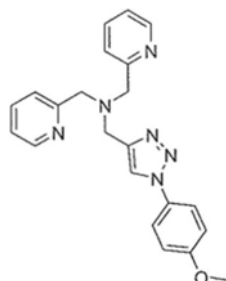
Ejemplo 12 - Preparación de 1-(piridin-2-il)-N-(piridin-2-ilmetil)-N-((1-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)metanamina (OAA4085).



30

Rendimiento: 208 mg (49 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,54 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 7,95 (s, 1H), 7,86 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,74 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,67 (t, *J* = 8,1 Hz, 3H), 7,62-7,50 (m, 3H), 7,21-7,07 (m, 2H), 3,98 (s, 2H), 3,90 (s, 4H). HRMS *e/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>F<sub>3</sub> (M+H): 425,1696, observado 425,1698.

- 5 Ejemplo 13 - Preparación de 1-(1-(4-metoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)metanamina (OAA2172).



- 10 Rendimiento: 167 mg (42 %). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, Cloroformo-d) δ 8,54 (d, *J* = 4,5 Hz, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,74-7,51 (m, 6H), 7,16 (dd, *J* = 8,5, 3,3 Hz, 2H), 7,07-6,93 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,86 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,1, 159,5, 149,4, 145,1, 136,9, 131,0, 123,8, 122,5, 121,8, 115,4, 115,1, 60,1, 56,0, 49,0. HRMS *e/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O (M+1): 387,1928, observado 387,1927.

- 15 Ejemplo 14 - Preparación de (4-aminofenil)carbamato de *terc*-butilo.

Se disolvió 4-(2-aminoetil)anilina (5,00 gramos, 36,7 mmol, 1,0 eq) en 50 ml de EtOAc y se colocó en un baño de agua. A la disolución en agitación rápida, se añadió gota a gota una mezcla de anhídrido de boc (8,25 gramos, 37,8 mmoles, 1,03 eq) en 50 ml de EtOAc. Tras la adición del anhídrido, la mezcla se volvió una suspensión blanca, la cual después de 4 horas se volvió una disolución amarillo claro. Se dejó la reacción durante la noche. Se concentró la mezcla bruta a presión reducida hasta un aceite amarillo claro, se diluyó con 10 ml de EtOAc caliente y se mezcló con 50 ml de heptano caliente. Se colocó la mezcla en un baño de hielo para facilitar la precipitación. Se filtraron los cristales blancos y se secó para dar 7,11 gramos (82 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6,82 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,47 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 4,82 (s, 2H), 3,02 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,47 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

- 25 Ejemplo 15 - Preparación de (4-(2-cloroacetamido)fenil)carbamato de *terc*-butilo.

Se disolvió (4-aminofenil)carbamato de *terc*-butilo preparado de acuerdo con el Ejemplo 14 (7,50 gramos, 31,7 mmol, 1,0 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió DMAP (6,23 g, 51,0 mmol, 1,6 eq) de una vez y se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos antes de añadir una disolución de cloruro de cloroacetilo (3,00 ml, 37,7 mmol, 1,2 eq) en 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gota a gota durante 20 minutos a la mezcla en agitación. Posteriormente se dejó la mezcla a 0 °C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 3 horas antes de concentrar a presión reducida. Se disolvió el residuo rojo pegajoso en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) y se lavó con ácido acético acuoso al 0,5 M (2 x 200 ml), NaHCO<sub>3</sub> acuoso 0,5 M (1 x 100 ml) y se secó sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro. Se filtró la disolución a través de un tapón de gel de sílice (4 cm x 5 cm de largo) usando acetato de etilo al 75 % en heptano para la elución. La retirada de los volátiles a presión reducida dio lugar a 7,46 g del compuesto del título (23,8 mmol, 75 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,21 (s, 1H), 7,49 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,14 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,84 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,23 (s, 2H), 3,18-2,99 (m, 2H), 2,74-2,56 (m, 2H), 1,36 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 164,4, 155,5, 136,5, 134,9, 128,9, 119,4, 77,4, 43,5, 41,5, 34,9, 28,2.

- 40 Ejemplo 16 - Preparación de (4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenil)carbamato de *terc*-butilo.

Se disolvió la α-cloro amida preparada en el Ejemplo 15 (7,44 g, 23,8 mmol, 1,0 eq.) y KI (2,37 g, 14,3 mmol, 0,6 eq.) en 500 ml de MeCN y se añadió DPA (5,2 ml, 28,9 mmol, 1,2 eq.) a la mezcla en agitación. Posteriormente se añadió DIPEA (40,5 ml, 0,233 mol, 9,7 eq.) y se calentó la mezcla a reflujo y se dejó durante 14 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se concentró la mezcla a presión reducida y se purificó haciendo pasar a través de un tapón de alúmina usando MeOH al 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para la elución. La retirada de los volátiles a presión reducida dio lugar al compuesto del título con un rendimiento cuantitativo. El material se usó sin purificación adicional. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 10,86 (s, 1H), 8,61 (d, *J* = 4,1 Hz, 2H), 7,70 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,61 (td, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 2H), 7,31-7,24 (m, 2H), 7,22-7,11 (m, 4H), 4,54 (s, 1H), 3,93 (s, 4H), 3,45 (s, 2H), 3,42-3,25 (m, 2H), 2,76 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,42 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,8, 158,2, 155,9, 149,5, 137,1, 136,7, 134,4, 129,2, 123,3, 122,6, 112,0, 79,2, 60,4, 58,8, 41,9, 35,7, 28,5.

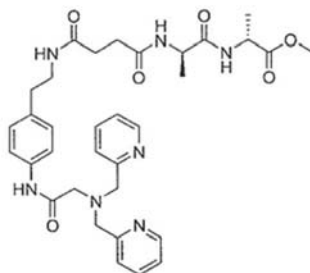
- 55 Ejemplo 17 - Preparación de *N*-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamida.

Se disolvió la amina protegida con boc preparada en el Ejemplo 16 (200 mg, 0,42 mmol) en 20 ml de DCM y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió posteriormente ácido trifluoroacético (2 ml) a la disolución en agitación durante el transcurso de 5 minutos. La mezcla se dejó a 0 °C durante 15 minutos antes de calentar a temperatura ambiente. La reacción se dejó durante dos horas adicionales a temperatura ambiente, concentrando después a presión reducida para obtener un aceite marrón. Se disolvió el material bruto en 30 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M y se extrajo con 3x20 ml de EtOAc. Se agruparon las fases orgánicas combinadas y se lavó con 50 ml de NaHCO<sub>2</sub> 0,5 M y a continuación se secó sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 155 mg del compuesto del título en forma de aceite marrón claro (98 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,53 (s, 1H), 8,64-8,41 (m, 2H), 7,75 (td, J = 7,6, 1,8 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,45 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,27 (ddd, J = 7,5, 4,9, 1,0 Hz, 2H), 7,15 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,41 (s, 2H), 2,73 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,58 (t, J = 7,1 Hz, 2H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 169,0, 158,4, 149,0, 136,7, 136,6, 135,3, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 59,4, 57,8, 43,7. HRMS e/z calculado para C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O: 375,2059, encontrado 376,2133(M+ H).

Ejemplo 18 - Preparación de ácido (4-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetil)amino)-4-oxobutanoico.

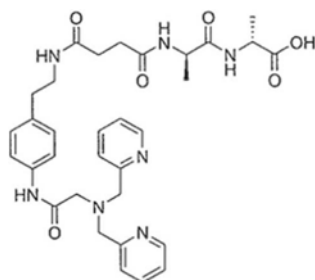
Se disolvió la amina preparada el Ejemplo 17 (100 mg, 0,27 mmol) en 10 ml de acetona y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Después, se añadió anhídrido succínico (27 mg, 0,27 mmol) de una vez a la disolución en agitación. Se retiró el baño de agua-hielo y se dejó la reacción en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla bruta se concentró a presión reducida y se suspendió en éter dietílico (10 ml). Se agitó la mezcla y se filtró el precipitado claro para proporcionar 36 mg del compuesto del título en forma de sólido amarillo claro (28 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,52 (s, 1H), 8,58 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 7,94 (s, 1H), 7,76 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,45 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,32-7,21 (m, 2H), 7,16 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,91 (s, 4H), 3,55-3,09 (m, 7H), 2,74-2,58 (m, 2H), 2,40 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,28 (t, J = 6,9 Hz, 2H), RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 173,84, 170,87, 169,02, 158,40, 149,01, 136,81, 136,67, 134,40, 128,89, 123,03, 122,39, 119,01, 59,42, 57,80, 40,32, 34,61, 30,15, 29,36. HRMS e/z calculado para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 475,2220, encontrado 476,2293(M+ H).

Ejemplo 19 - Preparación de ácido (4-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino) acetamido)fenetil)amino)-4-oxobutanoil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.



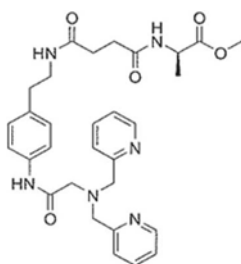
Se disolvió el ácido libre preparado en el Ejemplo 18 (0,250 g, 0,526 mmol) en DMF(2 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Posteriormente se añadieron clorhidrato de éster metílico de D-alanil-D-alanina (116 mg, 0,551 mmol, 1,05 equiv.) y HATU (211 mg, 0,555 mmol, 1,06 equiv), antes se añadió NMM (120 ul, 1,09 mmol, 2,1 equiv) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Se diluyó a continuación la mezcla con 50 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y se extrajo con 5 x 10 ml de EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas combinadas, se lavó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M nuevo (4 x 25 ml) y se secó sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. Esto proporcionó 0,159 mg del compuesto del título en forma de un semisólido claro (0,252 mmol, 48 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,53 (s, 1H), 8,63-8,49 (m, 2H), 8,25 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,92 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,80-7,70 (m, 2H), 7,63-7,55 (m, 2H), 7,52-7,38 (m, 2H), 7,33-7,23 (m, 2H), 7,19-7,06 (m, 2H), 4,36-4,15 (m, 2H), 3,90 (s, 4H), 3,59 (s, 3H), 3,41 (s, 2H), 3,26-3,13 (m, 2H), 2,69-2,58 (m, 2H), 2,29 (d, J = 10,0 Hz, 4H), 1,29 (d, J = 7,3 Hz, 3H), 1,19 (d, J = 7,1 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 172,9, 172,3, 171,3, 171,1, 169,0, 158,4, 149,0, 136,8, 136,7, 134,4, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 59,4, 57,8, 51,8, 47,6, 47,5, 40,20, 38,2, 34,6, 30,6, 17,9, 16,8. e/z calculado para C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>: 631, encontrado 632,3(M+ H).

Ejemplo 20 - Preparación de ácido metil (4-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino) acetamido)fenetil)amino)-4-oxobutanoil)-D-alanil-D-alanoico.



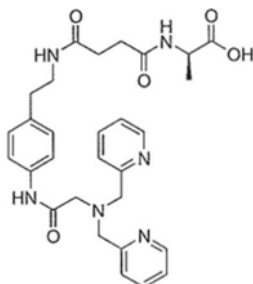
Se disolvió el éster preparado en el Ejemplo 19 (50 mg, 79  $\mu\text{mol}$ ) en THF (1 ml) enfriado a  $0^\circ\text{C}$  usando un baño de agua y hielo y agua (150  $\mu\text{l}$ ) y una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M (160  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{mol}$ ). Se agitó la reacción durante 2,5 horas hasta que TIC (5 % de MeOH en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , alúmina) indicó el consumo del éster. Se ajustó el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retiró el disolvente a presión reducida. Se disolvió la mezcla en etanol y se filtró para retirar las sales y se retiró el disolvente a presión reducida. Esto proporcionó 22 mg del compuesto del título en forma de un sólido verde claro (36  $\mu\text{mol}$ , 50 %). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10,56 (s, 1H), 8,65-8,40 (m, 2H), 8,23 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 8,02 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 7,81-7,67 (m, 2H), 7,63-7,55 (m, 2H), 7,51 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 7,48-7,43 (m, 2H), 7,33-7,23 (m, 2H), 7,20-7,10 (m, 2H), 4,15 (p,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 3,91 (s, 4H), 3,65 (p,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 3,42 (s, 2H), 3,22 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 2,67 (d,  $J = 13,0$  Hz, 2H), 2,40-2,23 (m, 4H), 1,22-1,11 (m, 6H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  173,7, 171,2, 171,1, 170,7, 169,1, 158,4, 149,0, 136,8, 136,7, 134,4, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 59,4, 57,8, 49,9, 48,5, 38,2, 34,6, 31,0, 30,9, 19,2, 18,0.  $e/z$  calculado para  $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_6$ : 617, encontrado 618,3(M+ H).

**Ejemplo 21** - Preparación de (4-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino) acetamido)fenetil)amino)-4-oxobutanoil)-D-alaninato de metilo.



Se disolvió el ácido libre preparado en el Ejemplo 18 (1,013 g, 2,13 mmol) en DMF (10 ml) y se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  en un baño de agua-hielo. Posteriormente se añadieron clorhidrato de éster metílico de D-alanil-metilo (315 mg, 2,26 mmol, 1,06 equiv.) y HATU (850 mg, 2,24 mmol, 1,05 equiv), antes de añadir NMM (500  $\mu\text{l}$ , 4,55 mmol, 2,14 equiv.) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Se diluyó a continuación la mezcla con 150 ml de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,5 M y se extrajo con 5 x 50 ml de EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas combinadas, se lavó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,5 M nuevo (100 ml), salmuera (2 x 100 ml) y se secó sobre  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , se filtró y se concentró a presión reducida. Esto proporcionó 1,00 g del compuesto del título en forma de un semisólido claro (1,78 mmol, 84%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10,53 (s, 1H), 8,62-8,53 (m, 2H), 8,26 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 7,88 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 7,80-7,67 (m, 2H), 7,59 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,50-7,37 (m, 2H), 7,35-7,21 (m, 2H), 7,19-7,10 (m, 2H), 4,24 (p,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 3,90 (s, 4H), 3,60 (s, 3H), 3,41 (s, 2H), 3,28-3,16 (m, 2H), 2,65 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,43-2,16 (m, 4H), 1,25 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3H), RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  173,2, 171,3, 171,0, 169,0, 158,4, 149,0, 136,8, 136,7, 134,4, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 59,4, 57,8, 51,7, 47,5, 38,2, 34,6, 30,6, 30,4, 16,9.  $e/z$  calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_5$ : 560, encontrado 561,3(M+ H).

**Ejemplo 22** - Preparación de ácido metil (4-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino) acetamido)fenetil)amino)-4-oxobutanoil)-D-alanoico.

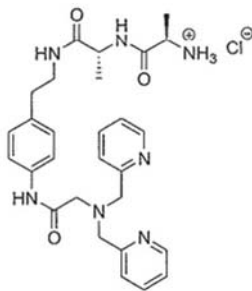


Se disolvió el éster preparado en el Ejemplo 21 (0,857 g, 1,53 mmol) en THF (15 ml) enfriado a 0°C usando un baño de agua y hielo y se añadió una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M (3,4 ml, 1,7 mmol). Se agitó la reacción durante 2,5 horas hasta que TIC (5 % de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, alúmina) indicó el consumo del material de partida. Se ajustó el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retiró el disolvente a presión reducida. Se disolvió la mezcla en un mínimo de etanol (3 ml) y se precipitó con acetona en exceso (40 ml). Se recogió el precipitado resultante por medio de filtración y se disolvió de nuevo en etanol nuevo. Tras la filtración para retirar la sales, se retiró el disolvente a presión reducida. Esto proporcionó 0,437 g del compuesto del título en forma de un sólido verde claro (0,799 mmol, 52%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,55 (s, 1H), 8,63-8,50 (m, 2H), 7,98 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,79-7,71 (m, 2H), 7,59 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 7,32-7,23 (m, 2H), 7,15 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,39 (s, 1H), 3,90 (s, 4H), 3,80 (p, J = 6,8 Hz, 1H), 3,41 (s, 2H), 3,29-3,14 (m, 2H), 2,64 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,36-2,20 (m, 4H), 1,15 (d, J = 6,8 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 174,3, 171,3, 169,9, 169,1, 158,4, 149,0, 136,8, 136,7, 134,4, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 59,4, 57,8, 50,0, 40,3, 34,6, 31,3, 31,2, 19,3. e/z calculado para C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 546, encontrado 547,3(M+ H).

**Ejemplo 23** - Preparación de ((R)-1-(((R)-1-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetilamino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butilo.

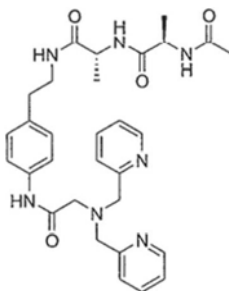
Se disolvió la amina libre preparada en el Ejemplo 16 (2,88 g, 7,67 mmol) en DMF(30 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Posteriormente se añadieron ácido N-boc-D-alanil-D-alaniloico (2,00 g, 7,68 mmol, 1,0 equiv.) y HBTU (2,92 g, 7,70 mmol, 1,0 equiv), antes de añadir NMM (1,70 ml, 15,5 mmol, 2,02 equiv.) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 15 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente en agitación durante 4,5 horas a temperatura ambiente. Se diluyó a continuación la mezcla con 200 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y se extrajo con 4 x 100 ml de EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas combinadas, se lavó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M nuevo (2 x 150 ml), salmuera (2 x 100 ml) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo oleoso marrón en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se purificó por medio de cromatografía en columna sobre alúmina neutra usando 1-2 % de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para la elución, esto proporcionó 3,66 g del compuesto del título en forma de un semisólido claro (5,92 mmol, 77 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,53 (s, 1H), 8,57 (ddd, J = 4,9, 1,8, 0,9 Hz, 2H), 7,90 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 7,82-7,67 (m, 3H), 7,64-7,53 (m, 2H), 7,50-7,37 (m, 2H), 7,34-7,23 (m, 2H), 7,19-7,10 (m, 2H), 6,98 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,29-4,11 (m, 1H), 3,90 (s, 5H), 3,41 (s, 2H), 3,30-3,13 (m, 2H), 2,68-2,58 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,15 (d, J = 7,0 Hz, 6H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 171,8, 169,0, 158,4, 149,0, 136,9, 136,7, 134,2, 128,9, 123,0, 122,4, 119,0, 78,1, 59,4, 57,8, 54,9, 49,8, 48,0, 40,2, 34,4, 28,1, 17,9.

**Ejemplo 24** - Preparación de cloruro de ((R)-1-(((R)-1-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetilamino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butilo (OAA4033).



Se disolvió la amina protegida con boc preparada en el Ejemplo 23 (3,491 g, 5,65 mmol) en 26 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió posteriormente ácido trifluoroacético (6,5 ml, 84,9 mmol, 15,0 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6,5 ml) a la disolución en agitación durante el transcurso de 5 minutos. La mezcla se dejó a 0 °C durante 15 minutos antes de calentar a temperatura ambiente. Se dejó la reacción durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente antes de la adición rápida de TFA adicional (1 ml) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml). Tras agitar 1 h TLC (5 % de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, alúmina) indicó el consumo de carbamato y se retiraron los volátiles a presión reducida. Se disolvió el aceite marrón resultante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y se trató con HCl 2 M en Et<sub>2</sub>O (9 ml). Tras 30 minutos de agitación de la mezcla el aceite desapareció, se añadió éter adicional (100 ml) provocando la precipitación de un sólido color marrón claro y la valoración parcial del aceite. Se recogió el polvo fino claro por medio de filtración, se lavó con éter nuevo en exceso, y se secó a vacío para proporcionar 1,25 g del compuesto del título. El aceite pegajoso restante se lavó con éter, posteriormente se disolvió en etanol caliente, se transfirió a un matraz y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 1,35 g adicionales de un sólido marrón claro. En total, se aislaron 2,60 g del compuesto del título en forma de un sólido marrón claro (4,69 mmol, 83 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8,77 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 8,53 (td, J = 8,0, 1,4 Hz, 2H), 8,07 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,96 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 7,27 (s, 4H), 4,51 (s, 4H), 4,30-3,99 (m, 2H), 3,78 (s, 2H), 3,65-3,32 (m, 2H), 2,84 (hept., J = 6,7 Hz, 2H), 1,51 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,27 (d, J = 7,2 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ, 174,8, 170,9, 170,8, 152,7, 147,3, 142,0, 137,1, 134,7, 129,9, 127,5, 126,7, 122,1, 58,3, 57,1, 50,3, 49,2, 40,7, 34,4, 17,1, 16,9. HRMS e/z calculado para C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>: 518,2880, observado 518,2879.

**Ejemplo 25** - Preparación de (R)-2-acetamido-N-((R)-1-((4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida.



5 Se disolvió la amina protegida con boc preparada en el Ejemplo 23 (173 mg, 0,280 mmol) en 2,5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Posteriormente se añadió ácido trifluoroacético (330 ul, 4,30 mmol, 15,4 equiv) a la disolución en agitación durante el transcurso de 5 minutos. Se dejó la reacción a 0 °C durante 15 minutos antes de calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas, posteriormente se retiraron los volátiles a presión reducida. Se disolvió el aceite marrón resultante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) y se añadió Ac<sub>2</sub>O (60 ul, 0,634 mmol, 2,25 equiv.) y se agitó la reacción durante 18 horas. Se inactivó la reacción con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (5 ml). Tras 15 min de agitación, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con 3 x 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 78 mg del material bruto que se puede purificar adicionalmente por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

**Ejemplo 26** - Preparación de (4-(2-dibencilamino)acetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo.

20 Se disolvió (4-(2-cloroacetamido)fenetil)carbamato de terc-butilo (1,002 g, 3,20 mmol, 1,0 eq.) y KI (0,597g, 3,60 mmol, 1,25 eq.) en 350 ml de MeCN y se añadió dibencilamina (0,74 ml, 3,85 mmol, 1,2 eq.) a la mezcla en agitación. Posteriormente se añadió DIPEA (5,5 ml, 31,6 mmol, 9,87 eq.) y se calentó la mezcla a reflujo y se dejó durante 17 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía en columna sobre sílice. El producto se eluyó en acetato de etilo al 20-50% en heptano, dando lugar a 1030 mg (68 %) del compuesto del título. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 9,54 (s, 1H), 7,48 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 7,0 Hz, 4H), 7,34 (c, J = 7,2 Hz, 4H), 7,30-7,19 (m, 2H), 7,11 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,83 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 3,76 (s, 4H), 3,21 (s, 2H), 3,09 (c, J = 8,0, 5,6 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 8,4, 6,4 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 168,68 (s), 155,45 (s), 140,80 (s), 138,50 (s), 136,55 (s), 134,35 (s), 128,74 (d, J = 3,8 Hz), 128,27 (s), 127,95 (d, J = 19,4 Hz), 127,06 (s), 119,28 (s), 77,43 (s), 57,52 (s), 56,09 (s), 40,20 (s), 34,87 (s), 28,23 (s).

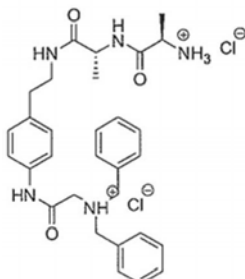
30 **Ejemplo 27** - Preparación de N-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-(dibencilamino)acetamida.

35 Se disolvió la amina protegida con boc preparada en el Ejemplo 26 (550 mg, 1,16 mmol, 1 eq) en 25 ml de DCM y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añadió posteriormente ácido trifluoroacético (6 ml, 78,35 mmol, 67,5 eq) gota a gota a la disolución en agitación durante el transcurso de 5 minutos. La mezcla de reacción se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de concentrar a presión reducida para obtener un aceite marrón claro. Se disolvió el material bruto en 25 ml de acetato de etilo y se extrajo con 50 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M. La fase acuosa se extrajo con 3x20 ml de acetato de etilo. Se agruparon las fases orgánicas combinadas y se lavó con 25 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y a continuación se secó sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 404 mg del compuesto del título en forma de aceite ligero claro (93 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 9,52 (s, 1H), 7,48-7,44 (m, 2H), 7,41 (d, J = 7,0 Hz, 4H), 7,34 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 7,29-7,21 (m, 2H), 7,15-7,07 (m, 2H), 3,75 (s, 4H), 3,20 (s, 2H), 2,72 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,57 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,34 (s, 2H).

**Ejemplo 28** - Preparación de ((R)-1-(((R)-1-((4-(2-(dibencilamino)acetamido)fenetil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butilo.

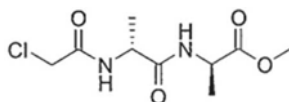
45 Se disolvió N-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-(dibencilamino)acetamida preparada en el Ejemplo 27 (0,404g, 1,017 mmol, 1 eq) en 4 ml de DMF. Se añadieron clorhidrato de D-alanil-D-alaninato de metilo (0,285g, 1,095 mmol, 1 eq) y HBTU (0,413g, 1,090 mmol, 1 eq) a la disolución en agitación y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-agua. Se añadió NMM (0,115 ml, 1,044 mmol, 1 eq) y se dejó la disolución en 30 minutos sobre un baño de hielo-agua y posteriormente 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 200 ml de agua y se extrajo con 3 x 50 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se agruparon y se lavaron con 25 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M y posteriormente se secaron con K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 498mg (80 %) RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 9,57 (s, 1H), 7,91 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,51-7,30 (m, 11H), 7,30-7,21 (m, 2H), 7,15-7,08 (m, 2H), 7,01 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 4,19 (p, J = 7,1 Hz, 1H), 3,93 (p, J = 7,3 Hz, 1H), 3,75 (s, 4H), 3,24 (m, 4H), 2,64 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,15 (dd, J = 7,0, 2,0 Hz, 6H).

**Ejemplo 29** - Preparación de (R)-2-(cloro-15-azanyl)-N-((R)-1-((4-(2-(dibencilcloro-15-azanyl)acetamido)fenetil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida.



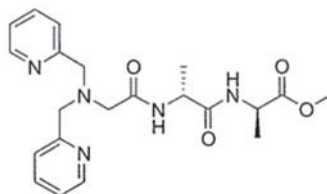
5 Se disolvió la amina protegida con boc preparada en el Ejemplo 28 (0,254g, 0,413 mmol, 1 eq) en 25 ml de DCM y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añadió TFA (2 ml, 26,12 mmol, 63 eq) en 25 ml de DCM y se añadió gota a gota a la disolución en agitación durante el transcurso de 5 minutos. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se concentró la solución a presión reducida. Se resolvió la masa en 5 ml de DCM seco y  
10 se añadió 1 ml de HCl 2 M en éter dietílico. Se formó un precipitado. La suspensión se filtró y se lavó con éter dietílico y se secó a presión reducida. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, óxido de deuterio) δ 7,46 (dd, J = 6,8, 2,9 Hz, 4H), 7,42-7,29 (m, 6H), 7,17-7,01 (m, 2H), 6,97-6,70 (m, 2H), 4,50 (s, 3H), 4,06 (q, J = 7,2 Hz, 1H), 3,93 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 3,87 (s, 2H), 3,43 (m, 1H), 3,22 (m, 1H), 2,78-2,42 (m, 1H), 1,36 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,11 (d, J = 7,2 Hz, 3H) RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ, 175,04, 171,09, 164,46, 137,52, 134,34, 132,09, 131,21, 130,16, 130,13, 130,01, 129,05, 122,49,  
15 60,54, 53,02, 50,56, 49,47, 40,89, 34,64, 17,33, 17,14.

**Ejemplo 30** - Preparación de (2-cloroacetil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.



20 Se disolvió ácido clorometil acético (112 mg, 1,19 mmol) en DMF(3 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añadieron posteriormente clorhidrato de éster D-alanil-D-alanina metílico (250 mg, 1,19 mmol) y HATU (452 mg, 1,19 mmol) antes de añadir NMM (288 µl, 2,62 mmol) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó  
25 posteriormente en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó a continuación con 300 ml de agua y se extrajo con 5 x 30 ml EtOAc. Se agruparon las fases orgánicas combinadas y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M (50 ml), HCl 0,1 M (50 ml) y salmuera (50 ml) antes de secar sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó posteriormente el material bruto por medio de cromatografía en columna usando SiO<sub>2</sub> como fase estacionaria y 50-100 % de EtOAc en heptano como eluyente. Esto proporcionó 274 mg del título en forma de un polvo blanco (92 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,41 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 8,34 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 4,43-4,18 (m, 2H), 4,09 (s, 2H), 3,62 (s, 3H), 3,30 (s, OH), 2,50 (s, 8H), 1,28 (d, J = 7,3 Hz, 3H), 1,22 (d, J = 7,0 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 172,8, 171,7, 165,3, 51,9, 48,0, 47,5, 42,5, 18,3, 16,8. HRMS e/z calculado para C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cl: 250,0720, encontrado 273,0616(M+ H).

35 **Ejemplo 31** - Preparación de bis(piridin-2-ilmetil)glicil-D-alanil-D-alaninato de metilo.



40 Se disolvió el α-cloro amida preparada en el Ejemplo 30 (200 mg, 0,80 mmol, 1,0 eq.) y KI (80 mg, 0,48 mmol, 0,6 eq.) en 200 ml de MeCN y se añadió DPA (173, 0,96 mmol, 1,2 eq.) a la mezcla en agitación. Posteriormente se añadió DIPEA (1,35 ml, 7,74 mmol, 9,7 eq.) y se calentó la mezcla a reflujo y se dejó durante 16 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía en columna. Se eluyó el producto usando 0-5 % de MeOH en DCM a partir de una columna de alúmina neutra, proporcionando 212 mg (64 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, Cloroformo-d) δ 9,37 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,74-8,40 (m, 2H), 7,63 (td, J = 7,7, 1,8 Hz, 2H), 7,31-7,25 (m, 2H), 7,23-7,13 (m, 3H), 4,54 (pd, J = 7,2, 3,3 Hz, 2H), 3,90 (d, J = 3,4 Hz, 4H), 3,69 (s, 3H), 3,40 (s, 2H), 1,49 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,30 (d, J = 7,2 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,2, 172,3, 171,8, 158,4,

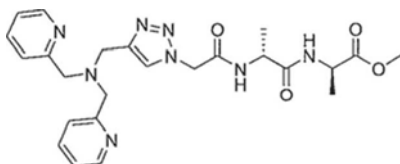


149,4, 136,7, 123,3, 122,6, 77,6, 77,2, 76,7, 60,4, 58,3, 52,5, 49,0, 48,1, 18,3, 17,5. HRMS *e/z* calculado para  $C_{21}H_{27}N_5O_4$ : 413,2063, encontrado 414,2134(M+ H).

Ejemplo 32 - Preparación de (2-azidoacetil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.

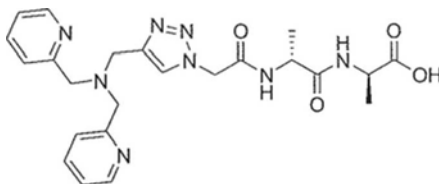
5 Se disolvió ácido 2-azidoacético (178  $\mu$ l, 2,38 mmol) en DMF(5 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añadieron posteriormente clorhidrato de éster *D*-alanil-*D*-alanina metílico (500 mg, 2,38 mmol) y HATU (904 mg, 2,38 mmol) antes de añadir NMM (576  $\mu$ l, 5,24 mmol) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó a continuación con 350 ml de agua y se extrajo con 5 x 50 ml de EtOAc. Se agruparon las fases orgánicas combinadas y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M (50 ml), HCl 0,1 M (50 ml) y salmuera (50 ml) antes de secar sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó posteriormente el material bruto por medio de cromatografía en columna usando SiO<sub>2</sub> como fase estacionaria y 50-100 % de EtOAc en heptano como eluyente. Esto proporcionó 520 mg del título en forma de un polvo blanco (85%). RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,46 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,33 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 4,35 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,26 (p, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,82 (s, 2H), 3,61 (s, 3H), 1,28 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H), 1,21 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, DMSO)  $\delta$  173,0, 171,9, 167,1, 52,0, 50,4, 47,8, 47,6, 18,4, 16,9.

Ejemplo 33 - Preparación de (2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetil)-*D*-alanil-*D*-alaninato de metilo.



25 Se añadieron sulfato de cobre (200 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de H<sub>2</sub>O y (+)ascorbato de sodio (396 mg, 2,0 mmol, 2,0 eq.) en 2,5 ml H<sub>2</sub>O simultáneamente a una disolución en agitación de alquino (237 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en 2,5 ml de *t*BuOH. Posteriormente se añadió la azida preparada en el Ejemplo 32 (257 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq) y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 16 horas. Posteriormente se añadió EDTA (293 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq) a la disolución en agitación y se dejó durante 60 minutos antes de diluir la mezcla con 50 ml de H<sub>2</sub>O y se ajustó el pH de la mezcla a >10 con NaOH 1M. La mezcla se extrajo con 2x50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentraron a presión reducida para dar un aceite rojo oscuro. Los productos brutos se purificaron usando cromatografía en columna por medio de elución de una columna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutra con 0-5 % de diclorometano para proporcionar 134 mg del compuesto del título en forma de aceite naranja claro (27 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,59 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,49 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 8,43 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,77 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,57 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,29-7,21 (m, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,42-4,21 (m, 2H), 3,77-3,70 (m, 6H), 3,62 (s, 3H), 1,31-1,21 (m, 6H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO)  $\delta$  172,8, 171,8, 165,0, 159,0, 148,8, 143,1, 136,5, 125,3, 122,5, 122,1, 58,7, 51,8, 51,4, 48,0, 47,9, 47,5, 31,3, 18,3, 16,8. HRMS *e/z* calculado para  $C_{24}H_{30}N_8O_4$ : 494,2390, encontrado 495,2463(M+ H).

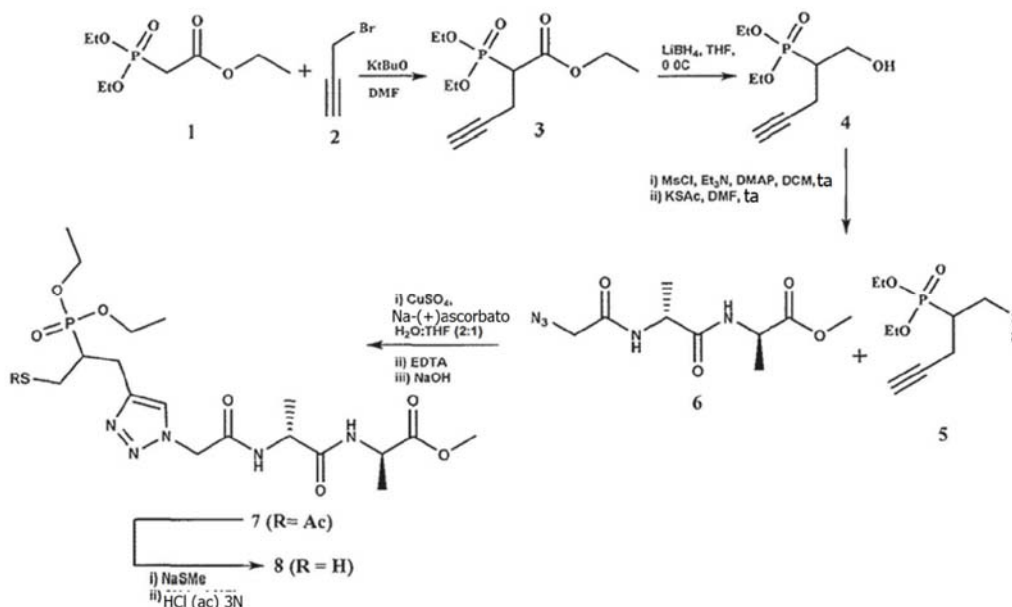
Ejemplo 34 - Preparación de ácido metil (2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetil)-*D*-alanil-*D*-alaninoico.



45 Se disolvió el éster preparado en el Ejemplo 33 (49 mg, 99  $\mu$ mol) en THF (1 ml) enfriado a 0°C usando un baño de agua y hielo y se añadió una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M (220  $\mu$ l, 0,110 mmol). Se agitó la reacción durante 2,5 horas hasta que TIC (5 % de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, alúmina) indicó el consumo del éster. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió en agua (5 ml). Se ajustó el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). A continuación, se retiró el disolvente de la fase acuosa a presión reducida y se disolvió el sólido resultante en etanol y se filtró para retirar las sales y se retiró el disolvente a presión reducida. Esto proporcionó 35 mg del compuesto del título en forma de un sólido verde claro (73  $\mu$ mol, 74 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,67 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,53-8,44 (m, 2H), 8,07 (s, 1H), 8,03-7,94 (m, 1H), 7,82-7,71 (m, 2H), 7,64-7,52 (m, 2H), 7,33-7,15 (m, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,33 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H), 4,09-3,89 (m, 1H), 3,80-3,65 (m, 6H), 1,29-1,14 (m, 6H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO)  $\delta$  170,9, 165,0, 159,0, 148,8, 143,1, 136,6, 125,3, 122,6, 122,1, 58,7, 51,5, 48,3, 48,0, 18,4, 18,0. *e/z* calculado para  $C_{23}H_{28}N_8O_4$ : 480, observado 481,3.

55

**Ejemplo 35** (Ejemplo de Referencia) - Preparación de (2-(4-(2-(dietoxifosforil)-3-mercaptopropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetil)alanilalaninato de metilo



5

Se agitó fosfonoacetato (1) (1 eq) en DMF seco (0,3ml/mmol) a 0 °C.

Se añadió terc-butóxido de potasio (0,7 eq) y se agitó la disolución a 0 °C hasta que se disolvió la base. Se añadió bromuro de propargilo (2) (0,7 eq) gota a gota a la mezcla de reacción, y se retiró el baño de hielo para permitir que la disolución alcanzara temperatura ambiente (ta). La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante al menos 18 horas. Se añadió una disolución de cloruro de litio (5 %) a la mezcla, y se extrajo el producto tres veces con éter dietílico, se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se filtró y se secó sobre con sulfato sódico (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el disolvente se retiró a vacío. El producto se purificó por medio de cromatografía instantánea usando acetato de etilo:hexano (60:40) como eluyente, para proporcionar un aceite amarillo.

15

Se disolvió borohidruro de litio (LiBH<sub>4</sub>) en THF seco (2ml/mmol) a 0 °C, y se añadió lentamente al fosfonoacetato alquilado (3) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, y posteriormente se irradió a 80 °C durante 10 minutos en microondas. Cuando la mezcla alcanzó temperatura ambiente, se añadió metanol lentamente, al tiempo que se agitaba, hasta neutralizar el exceso de LiBH<sub>4</sub>. Se acidificó la mezcla con ácido cítrico al 10 % y se extrajo el producto con éter dietílico, se lavó con disolución de salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró al vacío. El producto se purificó en forma de aceite incoloro, sobre cromatografía instantánea con acetato de etilo:acetona 90:10 como eluyente.

20

Se añadió trietilamina (1,05 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 20 %) a un matraz que contenía un derivado de alcohol (4) en diclorometano (DCM) (10ml/mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió lentamente sulfoncloruro de metano a la disolución y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se inactivó la parte bruta con 50 ml de NH<sub>4</sub>Cl acuoso y se extrajo con éter dietílico (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente.

30

El producto en bruto se disolvió en DCM (3ml/mmol). Se disolvió tioacetato de potasio en DMF, y se añadió al producto bruto. La mezcla de reacción se agitó durante una noche. Se retiró el disolvente a vacío, y el sólido marrón resultante se disolvió en 50 ml de NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo con éter dietílico (2x100) y se lavó con agua (2x100). Se secó la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío. El producto (5) se purificó en forma de aceite naranja, sobre cromatografía instantánea usando acetato de etilo:acetona (95:05). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,15 (m, 5H), 3,42 (m, 1H), 3,01 (s, 1H), 3,16 (m, 2H), 2,27 (dd, 2H), 2,33 (s, 3H), 1,34 (t, 6H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 195,03, 80,33, 70,91, 62,83, 62,18, 36,27, 34,87, 30,52, 27,60, 17,58, 16,43. HRMS: (ESI): (M+H)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>PS: 279,0817; observado 279,0814.

35

Se añadieron alquino (5), (1eq) y azida (6), (1,2 eq) en disolución de THF y se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron sulfato de cobre pentahidratado (1eq) en H<sub>2</sub>O y (+)ascorbato-sodio (2,5eq) en H<sub>2</sub>O a la mezcla de reacción gota a gota y posteriormente se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añade EDTA (1eq) a la disolución en agitación junto con NaOH 1 M para ajustar el pH >10. La mezcla de reacción se

40

extrajo posteriormente con EtOAc/DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $K_2CO_3$  y se concentraron a presión reducida. El producto bruto (7) se purificó por cromatografía en columna.

5 Se añade tiometóxido de sodio 2M (1eq) en metanol a (7), (1eq) a  $-20^\circ C$  en atmósfera de  $N_2$ . Se agita la mezcla durante 30 minutos a  $-20^\circ C$ . Se acidifica la mezcla resultante con HCl 3 N (ml) y se extrae con acetato de etilo (3x--ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre  $MgSO_4$ , se filtran y se concentran para dar el producto (8).

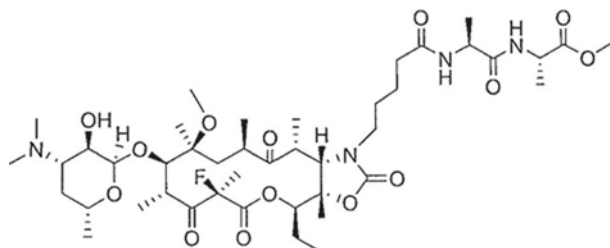
10 Ejemplo 36 (Ejemplo de Referencia) - Preparación de (6-((terc-butoxicarbonil)amino)hexanoil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.

10 Se disolvió ácido boc-6-aminohexanoico en un disolvente apropiado, por ejemplo DMF o DCM y se enfrió a  $0^\circ C$  en un baño de hielo-agua. Se añadieron posteriormente clorhidrato de éster D-alanil-D-alanina metílico y HATU antes de añadir NMM (576  $\mu l$ , 5,24 mmol) a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó a continuación con de agua y se extrajo con 5 x 50 ml de EtOAc. Se agruparon las fases orgánicas combinadas y se lavó con  $NaHCO_3$  0,5 M (50 ml), HCl 0,1 M (50 ml) y salmuera (50 ml) antes de secar sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó posteriormente por cromatografía en columna instantánea.

20 Ejemplo 37 (Ejemplo de Referencia) - Preparación de (6-aminohexanoil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.

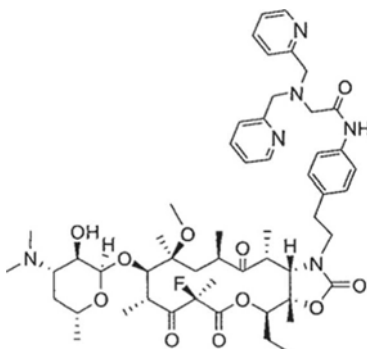
25 Se disuelve la boc-amina descrita en el Ejemplo 36 en un disolvente apropiado por ejemplo DCM y se enfía a  $0^\circ C$  en un baño de hielo antes de añadir 5-50 equivalente de TFA a la mezcla. Se agita la mezcla a  $0^\circ C$  durante 30 minutos y posteriormente se 4-24 horas a temperatura ambiente antes de concentrar a presión reducida. Se resdisuelve posteriormente el material bruto en DCM y se extrae con disolución de  $K_2CO_3$  0,5 M 3x50 ml. La fase orgánica después se seca sobre  $MgSO_4$ , se filtra y se concentra. Si el compuesto no está suficientemente puro, se somete a cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

30 Ejemplo 38 (Ejemplo de Referencia) - Preparación de (6-((3aS,4R,7R,9R,10R,13R,15R,15aR)-10-(((2S,3R,4S,6R)-3-acetoxi-4-(dimetilamino)-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-11-metoxi-3a,4,7,9,11,13,15-heptametil-2,6,8,14-tetraoxododecahidro-2H-[1]oxacicotetradecino[4,3-d]oxazol-1(4H)-il)hexanoil)-D-alanil-D-alaninato de metilo.



35 Se suspende 2'-O-acetil-10,11-dideshidro-11-desoxy-12-O-(1H-1imidazoilcarbonil)-3-O-descladinosil-3-oxo-6-O-metil-eritromicina A en una mezcla apropiada de disolvente, por ejemplo agua:MeCN junto con (6-aminohexanoil)-D-alanil-D-alaninato de metilo tal y como se prepara en el Ejemplo 37. La mezcla se calienta a  $50^\circ C$  durante 12 -72 horas. Se diluye la mezcla bruta con 5 % de  $KH_2PO_4$  y EtOAc y se extrae. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre  $MgSO_4$ , se filtra y se concentra a presión reducida. Se purifica el material por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

45 Ejemplo 39 - Preparación de acetato de (2S,3R,4S,6R)-2-(((3aS,4R,7R,9R,10R,13R,15R,15aR)-1-(4-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)fenetil)-11-metoxi-3a,4,7,9,11,13,15-heptametil-2,6,8,14-tetraoxotetradecahidro-2H-[1]oxacicotetradecino[4,3-d]oxazol-10-il)oxi)-4-(dimetilamino)-6-metiltetrahidro-2H-piran-3-ilo.



Se suspende 2'-O-acetil-10,11-dideshidro-11-desoxy-12-O-(1*H*-1-imidazoilcarbonil)-3-O-descladinosil-3-oxo-6-O-metil-eritromicina A en una mezcla apropiada de disolvente, por ejemplo agua:MeCN junto con *N*-(4-(2-aminoetil)fenil)-2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamida. La mezcla se calienta a 50 °C durante 12 -72 horas. Se diluye la mezcla bruta con 5 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y EtOAc y se extrae. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra a presión reducida. Se purifica el material por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

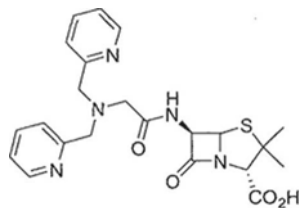
**Ejemplo 40** - Preparación de ácido (2*S*,5*S*,6*R*)-6-(2-cloroacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.

Se disuelve ácido (+)-6-aminopenicilánico en una mezcla de agua y acetona y se enfría a 0 °C en un baño de hielo. Se añade carbonato de potasio y se agita la mezcla durante 5-10 minutos a 0 °C. Se añade posteriormente cloruro de cloroacetilo gota a gota a la mezcla en agitación y se deja la mezcla a 0 °C - temperatura ambiente durante 4-48 horas hasta completar la reacción. Se retira la acetona a presión reducida y se acidifica la mezcla. Se aísla el producto bien por medio de filtración de un precipitado o se recoge por medio de extracción de la fase acuosa ácida con un disolvente orgánico apropiado. Si la purificación adicional resulta necesaria, se recrystaliza el compuesto o se purifica por medio de cromatografía en columna.

**Ejemplo 41** - Preparación de ácido (6*S*,7*R*)-3-(acetoximetil)-7-(2-cloroacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.

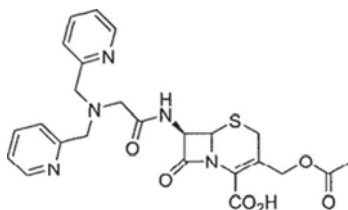
Se disuelve ácido 7-aminocefalosporánico en una mezcla de agua y acetona y se enfría a 0 °C en un baño de hielo. Se añade carbonato de potasio y se agita la mezcla durante 5-10 minutos a 0 °C. Se añade posteriormente cloruro de cloroacetilo gota a gota a la mezcla en agitación y se deja la mezcla a 0 °C - temperatura ambiente durante 4-48 horas hasta completar la reacción. Se retira la acetona a presión reducida y se acidifica la mezcla. Se aísla el producto bien por medio de filtración de un precipitado o se recoge por medio de extracción de la fase acuosa ácida con un disolvente orgánico apropiado. Si la purificación adicional resulta necesaria, se recrystaliza el compuesto o se purifica por medio de cromatografía en columna.

**Ejemplo 42** - Preparación de ácido (2*S*,5*S*,6*R*)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



Se disuelve la alfa-cloro amida preparada previamente en acetonitrilo u otro disolvente orgánico apropiado. Se añade una base basada en amina por ejemplo trietilamina o diisopropilamina (1-20 eq) junto con KI y dipicolilamina. Se agita la mezcla a 1-72 horas a 25-100 °C hasta completar la reacción. Se purifica la mezcla bruta por medio de cromatografía en columna o recrystalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

**Ejemplo 43** - Preparación de ácido (6*S*,7*R*)-3-((acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



Se disuelve la alfa-cloro amida preparada previamente en acetonitrilo u otro disolvente orgánico apropiado. Se añade una base basada en amina por ejemplo trietilamina o diisopropilamina (1-20 eq) junto con KI y dipicolilamina. Se agita la mezcla a 1-72 horas a 25-100 °C hasta completar la reacción. Se purifica la mezcla bruta por medio de cromatografía en columna o recrystalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

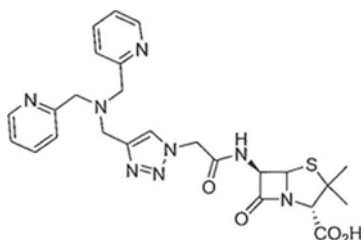
**Ejemplo 44** - Preparación de ácido (2*S*,5*S*,6*R*)-6-(2-azidoacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.

Se disolvió ácido 2-azidoacético en DMF y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Posteriormente se añadieron ácido (+)-6-aminopenicilánico y un agente de acoplamiento apropiado por ejemplo HATU, EDC, a continuación se extrae CDI antes de añadir NMM a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente durante 72 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó posteriormente por cromatografía en columna instantánea o recristalización.

Ejemplo 45 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-azidoacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.

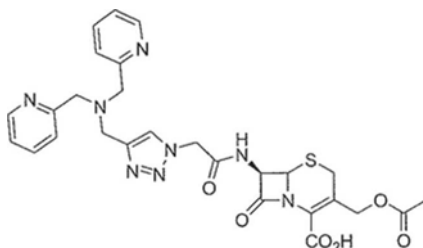
Se disolvió ácido 2-azidoacético en DMF y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añadieron posteriormente ácido 7-aminocefalosporánico y un agente de acoplamiento apropiado por ejemplo HATU, EDC, a continuación se extrae CDI antes de añadir NMM a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente durante 72 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó posteriormente por cromatografía en columna instantánea o recristalización.

Ejemplo 46 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



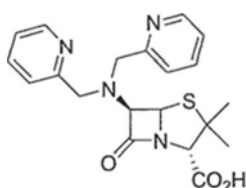
Se disuelve ácido (2S,5S,6R)-6-(2-azidoacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico y dipicolil-propargilamina en una mezcla de agua y terc-butanol. Se disuelven acetato de cobre o sulfato de cobre y (+)ascorbato de sodio, cada uno, en agua y se añaden simultáneamente gota a gota a la mezcla en agitación. Posteriormente se deja la mezcla durante 2-7 días a temperatura ambiente o hasta completar la reacción. A continuación la mezcla se concentra a presión reducida y se purifica usando cromatografía o recristalización.

Ejemplo 47 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



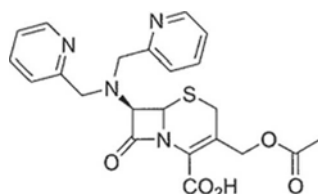
Se disuelve ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-azidoacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico y dipicolil-propargilamina en una mezcla de agua y terc-butanol. Se disuelven acetato de cobre o sulfato de cobre y (+)ascorbato de sodio, cada uno, en agua y se añaden simultáneamente gota a gota a la mezcla en agitación. Posteriormente se deja la mezcla durante 2-7 días a temperatura ambiente o hasta completar la reacción. A continuación la mezcla se concentra a presión reducida y se purifica usando cromatografía o recristalización.

Ejemplo 48 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



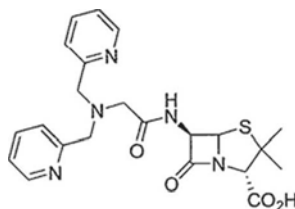
- Se prepara el compuesto del título bien mediante alquilación de ácido (+)-6-aminopenicilánico con clorhidrato de 2-clorometil piridina en un disolvente orgánico con una base añadida o bien mediante alquilación reductora con 2-piridincarboxaldehído en un disolvente apropiado por ejemplo etanol bien con NaB(CN)<sub>3</sub>H añadido junto con el aldehído o bien con NaBH<sub>4</sub> añadido tras haberse consumido todo el material de partida. Se purifican posteriormente los productos brutos por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

Ejemplo 49 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



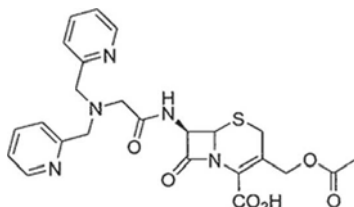
- Se prepara el compuesto del título bien mediante alquilación de ácido 7-aminocefalosporánico con clorhidrato de 2-clorometil piridina en un disolvente orgánico con una base añadida o bien mediante alquilación reductora con 2-piridincarboxaldehído en un disolvente apropiado por ejemplo etanol bien con NaB(CN)<sub>3</sub>H añadido junto con el aldehído o bien con NaBH<sub>4</sub> añadido tras haberse consumido todo el material de partida. Se purifican posteriormente los productos brutos por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

Ejemplo 50 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



- Se disuelve el éster de bis(piridin-2-ilmetil)glicinato de metilo en H<sub>2</sub>O y disolución de KOH 5 M. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se ajusta el pH a 7 con HCl 1 M. Se concentra la disolución a presión reducida hasta obtener un sólido pegajoso naranja claro y se lavó con etanol absoluto caliente. Posteriormente, se concentra el etanol combinado a presión reducida hasta obtener un aceite marrón y se usa sin purificación en la etapa siguiente. Se mezcla ácido (+)-6-aminopenicilánico con el ácido bruto, N-metil morfolina, HOBT y etanol absoluto y se enfría a 10 °C. A continuación se añade EDC a la disolución en agitación. A continuación se calienta a temperatura ambiente y se agita durante cuatro horas. La mezcla se concentra a presión reducida, de diluye con H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentra. Se purifica el producto bruto por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

Ejemplo 51 - Preparación de ácido (6S,7R) -3-((acetoximetil) -7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



- Se disuelve el éster de bis(piridin-2-ilmetil)glicinato de metilo en H<sub>2</sub>O y disolución de KOH 5 M. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se ajusta el pH a 7 con HCl 1 M. Se concentra la disolución a presión reducida hasta obtener un sólido pegajoso naranja claro y se lavó con etanol absoluto caliente. Posteriormente, se concentra el etanol combinado a presión reducida hasta obtener un aceite marrón y se usa sin purificación en la etapa siguiente. Se mezcla ácido 7-aminocefalosporánico con el ácido bruto, N-metil morfolina, HOBT y etanol absoluto y se enfría a 10 °C. A continuación se añade EDC a la disolución en agitación. A continuación se calienta a temperatura ambiente y se agita durante cuatro horas. La mezcla se concentra a presión reducida, de diluye con

H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentra. Se purifica el producto bruto por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

Ejemplo 52 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

Se enfría una disolución de ácido (+)-6-aminopenicilánico en metanol a 0 °C en un baño de hielo y se añade lentamente bien SOCl<sub>2</sub>, (COCl)<sub>2</sub>, TMS-CHN<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Se deja que la reacción se complete antes de concentrar a presión reducida. Se purifica el éster resultante por medio de extracción, recristalización o cromatografía en columna o se usa sin purificación adicional en las siguientes reacciones.

Ejemplo 53 - Preparación de (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

Se enfría una disolución de ácido 7-aminocefalosporánico en metanol a 0 °C en un baño de hielo y se añade lentamente bien SOCl<sub>2</sub>, (COCl)<sub>2</sub>, TMS-CHN<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Se deja que la reacción se complete antes de concentrar a presión reducida. Se purifica el éster resultante por medio de extracción, recristalización o cromatografía en columna o se usa sin purificación adicional en las siguientes reacciones.

Ejemplo 54 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(2-azidoacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

Se disolvió ácido 2-azidoacético en DMF y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añaden posteriormente (2S,5S,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo y un agente de acoplamiento apropiado por ejemplo HATU, EDC, CDI antes de añadir NMM a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente durante 72 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó posteriormente por cromatografía en columna instantánea o recristalización.

Ejemplo 55 - Preparación de (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-azidoacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

Se disolvió ácido 2-azidoacético en DMF y se enfrió a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se añaden posteriormente (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo y un agente de acoplamiento apropiado por ejemplo HATU, EDC, CDI antes de añadir NMM a la mezcla en agitación. Se dejó la mezcla en el baño de agua-hielo durante 30 minutos antes de calentar lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se dejó posteriormente durante 72 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó posteriormente por cromatografía en columna instantánea o recristalización.

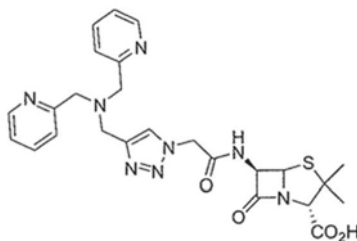
Ejemplo 56 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(2-azidoacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo y dipicolil-propagilamina en una mezcla de agua y terc-butanol. Se disuelven acetato de cobre o sulfato de cobre y (+)ascorbato de sodio, cada uno, en agua y se añaden simultáneamente gota a gota a la mezcla en agitación. Posteriormente se deja la mezcla durante 2-7 días a temperatura ambiente o hasta completar la reacción. A continuación la mezcla se concentra a presión reducida y se purifica usando cromatografía o recristalización.

Ejemplo 57 - Preparación de (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

Se disolvió (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-azidoacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo y dipicolil-propagilamina en una mezcla de agua y terc-butanol. Se disuelven acetato de cobre o sulfato de cobre y (+)ascorbato de sodio, cada uno, en agua y se añaden simultáneamente gota a gota a la mezcla en agitación. Posteriormente se deja la mezcla durante 2-7 días a temperatura ambiente o hasta completar la reacción. A continuación la mezcla se concentra a presión reducida y se purifica usando cromatografía o recristalización.

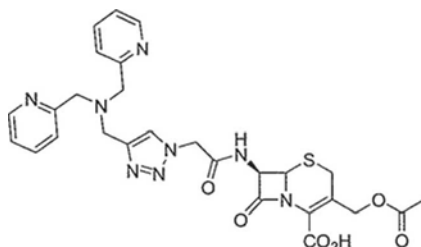
Ejemplo 58 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en

5 THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando

10 Ejemplo 59 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



15 Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(4-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]-2-octen-2-carboxilato de metilo en

20 THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando

25 Ejemplo 60 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(2-cloroacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

30 Se disuelve (2S,5S,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en una mezcla de agua y acetona y se enfría a 0 °C en un baño de hielo. Se añade carbonato de potasio y se agita la mezcla durante 5-10 minutos a 0 °C. Se añade posteriormente cloruro de cloroacetilo gota a gota a la mezcla en agitación y se deja la mezcla a 0 °C - temperatura ambiente durante 4-48 horas hasta completar la reacción. Se retira la acetona a presión reducida y se acidifica la mezcla. Se aísla el producto bien por medio de filtración de un precipitado o se recoge por medio de extracción de la fase acuosa ácida con un disolvente orgánico apropiado. Si la purificación adicional resulta necesaria, se recrystaliza el compuesto o se purifica por medio de cromatografía en

35 Ejemplo 61 - Preparación de (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-cloroacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

40 Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo en una mezcla de agua y acetona y se enfría a 0 °C en un baño de hielo. Se añade carbonato de potasio y se agita la mezcla durante 5-10 minutos a 0 °C. Se añade posteriormente cloruro de cloroacetilo gota a gota a la mezcla en agitación y se deja la mezcla a 0 °C - temperatura ambiente durante 4-48 horas hasta completar la reacción. Se retira la acetona a presión reducida y se acidifica la mezcla. Se aísla el producto bien por medio de filtración de un precipitado o se recoge por medio de extracción de la fase acuosa ácida con un disolvente orgánico apropiado. Si la purificación adicional resulta necesaria, se recrystaliza el compuesto o se purifica por medio de cromatografía en

45 columna.



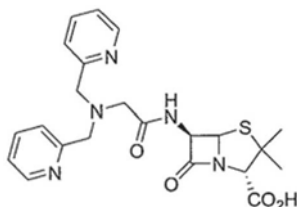
Ejemplo 62 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

5 Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(2-cloroacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en acetonitrilo u otro disolvente orgánico apropiado. Se añade una base basada en amina por ejemplo trietilamina o diisopropiletilamina (1-20 eq) junto con KI y dipicoilamina. Se agita la mezcla a 1-72 horas a 25-100 °C hasta completar la reacción. Se purifica la mezcla bruta por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

10 Ejemplo 63 - Preparación de (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

15 Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-cloroacetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo en acetonitrilo u otro disolvente orgánico apropiado. Se añade una base basada en amina por ejemplo trietilamina o diisopropiletilamina (1-20 eq) junto con KI y dipicoilamina. Se agita la mezcla a 1-72 horas a 25-100 °C hasta completar la reacción. Se purifica la mezcla bruta por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

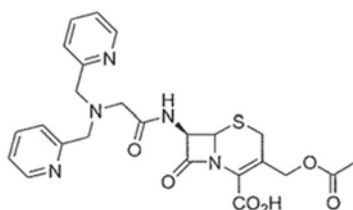
20 Ejemplo 64 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



25 Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en

30 THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

Ejemplo 65 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



35 Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo en

40 THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

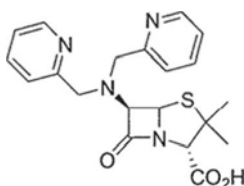
45 Ejemplo 66 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

50 Se prepara el compuesto del título bien mediante alquilación de (2S, 5S, 6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo con clorhidrato de 2-clorometil piridina en un disolvente orgánico con una base añadida o bien mediante alquilación reductora con 2-piridincarboxaldehído en un disolvente apropiado por ejemplo etanol bien con NaB(CN)<sub>3</sub>H añadido junto con el aldehído o bien con NaBH<sub>4</sub> añadido tras haberse consumido todo el material de partida. Se purifican posteriormente los productos brutos por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

Ejemplo 67 - Preparación de (6S,7R)-3-((acetoximetil)-7-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

Se prepara el compuesto del título bien mediante alquilación de (6S, 7R)-3-(acetoximetil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo con clorhidrato de 2-clorometil piridina en un disolvente orgánico con una base añadida o bien mediante alquilación reductora con 2-piridincarboxaldehído en un disolvente apropiado por ejemplo etanol bien con NaB(CN)<sub>3</sub>H añadido junto con el aldehído o bien con NaBH<sub>4</sub> añadido tras haberse consumido todo el material de partida. Se purifican posteriormente los productos brutos por medio de cromatografía en columna o recristalización a partir de un mezcla apropiada de disolventes.

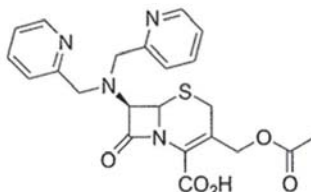
Ejemplo 68 - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en

THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

Ejemplo 69 - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo en THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

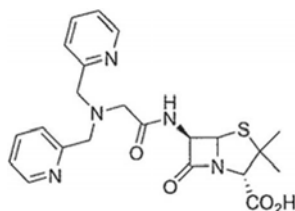
Ejemplo 70 - Preparación de (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo.

Se disuelve el éster de bis(piridin-2-ilmetil)glicinato de metilo en H<sub>2</sub>O y disolución de KOH 5 M. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se ajusta el pH a 7 con HCl 1 M. Se concentra la disolución a presión reducida hasta obtener un sólido pegajoso naranja claro y se lavó con etanol absoluto caliente. Posteriormente, se concentra el etanol combinado a presión reducida hasta obtener un aceite marrón y se usa sin purificación en la etapa siguiente. Se mezcla (2S,5S,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo con el ácido bruto, N-metil morfolina, HOBT y etanol absoluto y se enfría a 10 °C. A continuación se añade EDC a la disolución en agitación. A continuación se calienta a temperatura ambiente y se agita durante cuatro horas. La mezcla se concentra a presión reducida, de diluye con H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentra. Se purifica el producto bruto por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

Ejemplo 71 - Preparación de (6S,7R)-3-((acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo.

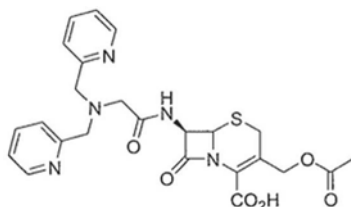
Se disuelve el éster de bis(piridin-2-ilmetil)glicinato de metilo en H<sub>2</sub>O y disolución de KOH 5 M. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se ajusta el pH a 7 con HCl 1 M. Se concentra la disolución a presión reducida hasta obtener un sólido pegajoso naranja claro y se lavó con etanol absoluto caliente. Posteriormente, se concentra el etanol combinado a presión reducida hasta obtener un aceite marrón y se usa sin purificación en la etapa siguiente. Se mezcla (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo con el ácido bruto, N-metil morfolina, HOBT y etanol absoluto y se enfría a 10 °C. A continuación se añade EDC a la disolución en agitación. A continuación se calienta a temperatura ambiente y se agita durante cuatro horas. La mezcla se concentra a presión reducida, se diluye con H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentra. Se purifica el producto bruto por medio de cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

**Ejemplo 72** - Preparación de ácido (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico.



Se disuelve (2S,5S,6R)-6-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilato de metilo en THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

**Ejemplo 73** - Preparación de ácido (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico.



Se disuelve (6S,7R)-3-(acetoximetil)-7-(2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)acetamido)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de metilo en THF (1 ml) enfriado a 0 °C usando un baño de agua y hielo y se mezcla con una disolución acuosa de hidróxido de litio 0,5 M. La reacción se agita durante 1-48 horas hasta que se completó. Se ajusta el pH de la disolución a 7 usando HCl 0,1 M y se retira el disolvente a presión reducida. Se disuelve la mezcla en etanol absoluto y se filtra para retirar las sales y se retira el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto final bien usando recristalización a partir de un disolvente apropiado o mezcla de disolventes o bien por medio de cromatografía.

**Ejemplo 74** - Determinación de los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos frente a MBL purificados

**Protocolo general para la determinación de valores de IC<sub>50</sub>**

**Tampones:** A: HEPES 50mM pH 7,2, ZnCl<sub>2</sub> 100µM  
B: HEPES 50mM pH 7.2, ZnCl<sub>2</sub> 100µM y Albúmina de Suero Bovino de 400µg/ml (BSA)

**Equipo:** Lector de 96 pocillos SpectraMax  
placas de 96 pocillos  
Cubetas  
Plásticos generales: tubos de dilución, Eppendorfs etc.

**Método:**

**Inhibidores:**

- Disuelto en 100 % de DMSO a una concentración de 10 mM
- Disolver el inhibidor en el tampón A a una concentración de 25 % de DMSO. Se puede tolerar no más de 2,5 % de DMSO en el ensayo. 100 % de DMSO (10 mM); 25 % de DMSO (0,25 mM); 2,5 % de DMSO (2,5 mM)
- Preparar una serie de dilución de 2 veces del inhibidor. Se deberían realizar al menos 8

diluciones. Véase el ejemplo de la tabla 1

Sustrato del gen indicador (nitrocefina):

- a. Diluir una pequeña cantidad de nitrocefina en 1 ml de DMSO
- b. Añadir 990µl de tampón A + 10µl de nitrocefina a una cubeta.
- c. Medir el OD inicial a una absorbancia específica para el sustrato
- d. Añadir enzima purificada a la cubeta y permitir que se complete la hidrólisis (cuanto más concentrada está la enzima más rápido suceder la hidrólisis)
- e. Medir el OD final
- f. Calcular la concentración de sustrato:  $[(OD \text{ final} - OD \text{ inicial}) \times \text{factor de dilución}] / \Delta\epsilon$  ( $\Delta\epsilon$  Nitrocefina 17400)
- g. Diluir la nitrocefina a 100 µM en tampón A

Enzima: Diluir la enzima purificada en tampón B hasta una concentración de 10 nM.

- Ensayo:
- a. Establecer los ajustes y la temperatura en el Spectramax/software:
    - I. Parámetros cinéticos
    - II.  $\lambda$ : 482
    - III. Tiempo: 20 min
    - IV. Intervalo: 2-5 s.
    - V. Mezclar antes de la 1ª lectura: 5 s.
    - VI. Temp.: 25°C
  - b. Añadir 30 µl de tampón A, 10 µl de enzima purificada (concentración final 1 nM) y 10 µl de inhibidor a los pocillos de ensayo (duplicados para cada concentración de inhibidor). También incluir un control negativo. Los pocillos sin inhibidor añadido, justo 40 µl de tampón A. Véase ilustración en la Tabla 1.
  - c. Incubar la placa en el lector durante 5 min.
  - d. Añadir 50 µl de nitrocefina (concentración final 50 µM) a los pocillos de ensayo. Esto debería hacerse rápido - preferentemente con una pipeta de multicanal electrónica.
  - e. Comenzar las lecturas de forma inmediata.

Determinar: la velocidad inicial ( $V_0$ ) para cada concentración de inhibidor y calcular  $IC_{50}$ .

Tabla 1 - Series de dilución de inhibidor (todos los valores en µM)

[Reserva]	2500	1250	625	312,5	156,25	78,125	39,0625	19,53125
[pocillo]	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	1,953125
[Reserva]	9,76563	4,88282	2,44141	0	9,76563	4,88282	2,44141	0
[pocillo]	0,976563	0,488282	0,244141	0	0,976563	0,488282	0,244141	0

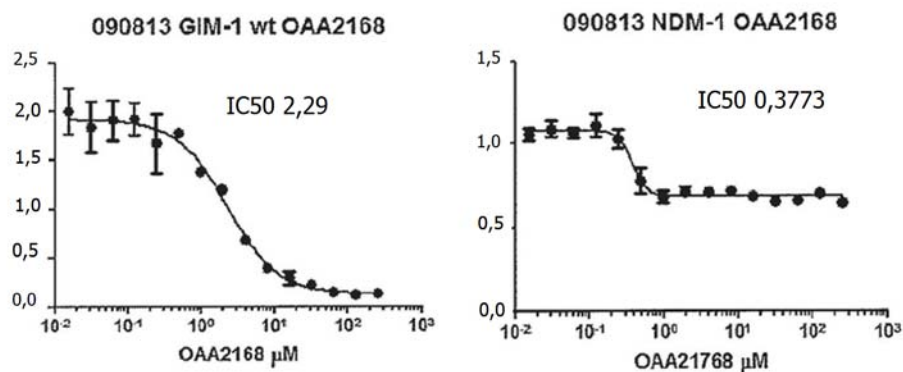
5

Resultados:

Los resultados de la determinación de  $IC_{50}$  se presentan en la Tabla 2. Los ejemplos de curvas inhibitoras se muestran en las Figuras siguientes:

10

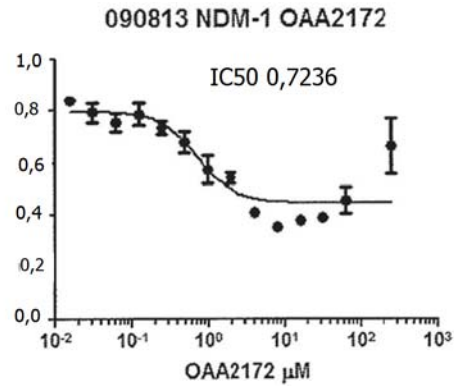
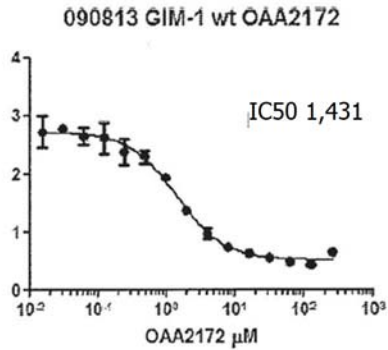
A. Compuesto del Ejemplo 3



15

B. Compuesto del Ejemplo 13

OAA2172



5 C. Compuesto del Ejemplo 24

OAA4033

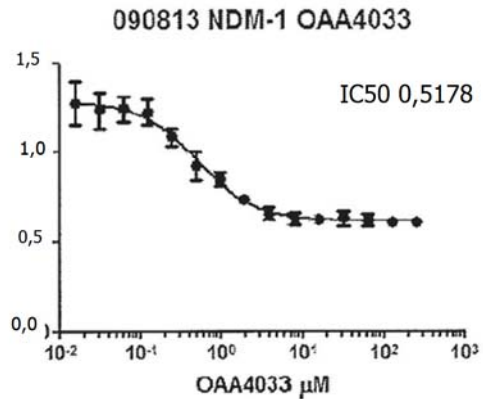
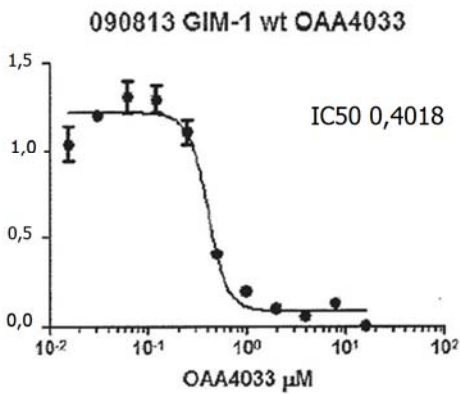


Tabla 2: Valores  $IC_{50}$  para los compuestos seleccionados y compuesto de referencia (TPEN)<sup>A</sup>.

Compuesto del Ejemplo	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) NDM-1	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) VIM-2	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) GIM-1
TPEN	ND	0,30	0,61
Ejemplo 3	0,38	19,76	2,26
Ejemplo 13	0,72	24,9	1,43
Ejemplo 24	0,52	22,8	0,40
Ejemplo 5	NA	11,46	0,79
Ejemplo 6	NA	40,9	0,71
Ejemplo 7	NA	18,69	0,14
Ejemplo 8	1,06	14,82	1,03
Ejemplo 9	0,60	19,03	3,15
Ejemplo 11	NA	12,23	0,86
Ejemplo 12	NA	12,86	1,10

ND<sup>A</sup>: no determinado; NA: el experimento se llevó a cabo, pero no se obtuvo curva de  $IC_{50}$  apropiada.

## ES 2 691 536 T3

Los resultados muestran que los compuestos inhiben los tres MBL purificados en el intervalo de  $\mu\text{M}$  (VIM-2) y sub- $\mu\text{M}$  (NDM-1 y GIM-1).

Ejemplo 77: Resultados de la actividad inhibidora de MBL en células de *E. coli* creadas que expresan MBL.

5

*Protocolo general para la determinación de la actividad inhibidora de células de E. coli que expresan MBL*

Tampones:      Tampón A: HEPES 50mM pH 7,2,  $\text{ZnCl}_2$  100 $\mu\text{M}$   
Equipo:        Lector de 96 pocillos SpectraMax  
                  placas de 96 pocillos  
                  Cubetas  
                  Plásticos generales: tubos de dilución,  
                  Eppendorfs etc.

Método:

10

Día 1:

1. Colocar en placas LB las células bacterianas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de canamicina

15

Día 2:

1. Inocular 2-4 colonias en 100 ml de LB con 50  $\mu\text{g/ml}$  canamicina
2. Incubar durante la noche a 37 °C con agitación

20

Día 3:

Inhibidor:

25

- a. Pesar una pequeña cantidad de inhibidor (~5 mg) en un tubo de Eppendorf.
- b. Diluir el inhibidor con tampón A o tampón A con 25 % de DMSO hasta una concentración de 100 mM

Sustrato del gen indicador (nitrocefina)

30

- a. Diluir una pequeña cantidad de nitrocefina en 1 ml de DMSO
- b. Añadir 990  $\mu\text{l}$  de tampón A + 10 $\mu\text{l}$  de nitrocefina a una cubeta.
- c. Medir OD inicial a una absorbancia de 482
- d. Añadir enzima MBL purificada a la cubeta y dejar que la hidrólisis se complete
- e. Medir el OD final
- f. Calcular la concentración de sustrato:  $[(\text{OD Inicial} - \text{OD Final}) \times \text{factor de dilución}]/\Delta\epsilon$
- g. Diluir la nitrocefina hasta 3,2 mM en tampón a o  $\text{H}_2\text{O}$

35

Cultivo nocturno:

40

- a. Diluir el cultivo nocturno hasta  $\text{OD}_{600}$  1 en caldo LB

Ensayo:

45

- a. Transferir 50  $\mu\text{l}$  de LB con IPTG 0,8 mM (concentración final de 0,4 mM en el ensayo) a cada pocillo
- b. Añadir 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor/control positivo (concentración final de 500/1000  $\mu\text{M}$  en el ensayo) a los pocillos seleccionados
- c. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de cultivo nocturno ( $\text{OD}_{600}$  1) a cada pocillo
- d. Incubar en el lector de placas a 37 °C durante 20 minutos con agitación
- e. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de nitrocefina (3,2 mM) a los pocillos seleccionados con una pipeta de multicanal
- f. Incubar la placa en el lector de placas durante 3 horas, medir la hidrólisis de nitrocefina a  $A_{482}$  cada minuto, con agitación entre medias
- g. Medir el punto final a  $A_{600}$  para comprobar como el inhibidor solo afecta a la proliferación bacteriana
- h. Centrifugar la placa a 2800 rpm durante 10 min, y transferir 50  $\mu\text{l}$  a pocillos limpios
- i. Medir el punto final a  $A_{482}$

55

Resultados:

Los resultados que muestran la inhibición de VIM-2 y GIM-1 expresados en *E. coli* se presentan en la Tabla 3.

60

Tabla 3: Inhibición (%) de MBL en experimento con células completas con VIM-2 y GIM-1. Las células fueron *E. coli* SNO3 que contenían el vector pET26b-bla<sub>VIM-2</sub> o pET26b-bla<sub>GIM-1</sub>. Se usaron sustancias de ensayo a una concentración de 250 µM.

Compuesto	% de inhibición de VIM-2	% de inhibición de GIM-1
Ejemplo 3	74,05	15,65
Ejemplo 13	82,05	20,55
Ejemplo 24	98,25	69,20
Ejemplo 5	73,75	14,40
Ejemplo 6	82,10	20,65
Ejemplo 7	75,35	12,50
Ejemplo 8	82,95	22,20
Ejemplo 9	84,20	14,75
Ejemplo 11	75,10	16,50
Ejemplo 12	64,25	15,70

5 Los resultados muestran que los compuestos son capaces de pasar a través de la membrana externa de *E. coli* e inhibir los MBL ubicados en el espacio periplásmico. Se aprecia un grado variable de inhibición entre los compuestos y la actividad inhibitor fue la más fuerte frente a VIM-2 en comparación con GIM-1.

10 Ejemplo 78 - Resultados del método de dilución de microcaldo para evaluación del efecto sinérgico de los compuestos con meropenem

*Protocolo general para el método de dilución de microcaldo para evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos o el efecto sinérgico de la combinación compuesto-antibiótico*

15 *Preparación de las bacterias*

Día 1:

- 20 • Colocar en placas cepa(s) bacteriana(s) en medio apropiado:
  - Bacterias Gram-negativo con ESBL o carbapenemasas: placas de agar verdes con 100 mg/ml de ampicilina
  - Bacterias Gram-negativo sin β-lactamasas: placas de agar verdes
  - Bacterias Gram-positivo (*Staphylococci* y *Enterococci*): placas de agar de sangre
- 25 • Incubar durante la noche a 37°C

Día 2:

*Preparar el inóculo bacteriano:*

- 30 • Preparar una suspensión de McFarland 0,5 M de bacterias en 0.85 % de NaCl. (Se debería usar en 15 minutos a partir de la preparación).
  - 35 ◦ Diluir la suspensión de McFarland 0,5 M 1:100 en caldo MH. Comprobar el inóculo mediante dilución de la suspensión bacteriana preparada 1:100 (10 µl de suspensión bacteriana + 990 µl de 0,85 % de NaCl). Colocar en placa 10 µl de la disolución sobre placas de agar MH (x2). Incubar durante la noche a 37°C, contar la colonias y calcular UFC finales/ml inóculo en la placa multiplicando el número medio de colonias por 10000 y dividiendo entre 2. El inóculo final debería estar entre 3-7x10<sup>5</sup> UFC/ml.
  - 40 • Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana preparada a cada pocillo en la placa de microvaloración excepto el control negativo.

*Preparación de los compuestos/antibióticos*

- 45 • Calcular el intervalo-concentración deseado y el volumen de los compuestos/antibióticos en el ensayo. Para los antibióticos, esto depende del MIC con respecto meropenem de las cepas bacterianas objeto de ensayo. Diluir la disolución de reserva en caldo MH. Preparar diluciones posteriores de 2 veces en caldo

## ES 2 691 536 T3

MH de las concentraciones deseadas si se ha de someter a ensayo un intervalo de concentración (recuérdese el factor de dilución extra en la placa de ensayo). Siempre incluir un volumen extra para el uso de la pipeta. Tener presente que las disoluciones de reserva están preparadas en tampones que tienen un efecto sobre la proliferación bacteriana (por ejemplo DMSO).

5

### *Ensayo:*

- Determinar el MIC de los compuestos/antibióticos solos:

10                   ◦ Añadir 25 µl de cada concentración de compuesto/antibiótico a la fila 2-11 (concentración más elevada en la fila 2)

◦ Añadir 25 µl de caldo MH a la fila 2-11

◦ Añadir 50 µl de caldo MH a la fila 12 (control positivo)

◦ Añadir 100 µl de caldo MH a la fila 1

15                   ◦ Añadir 50 µl de suspensión bacteriana a la fila 2-12.

- Determinar el MIC de los antibióticos + compuestos:

20                   ◦ Añadir 25 µl de cada concentración de antibiótico a la fila 2-11 (concentración más elevada en la fila 2)

◦ Añadir 25 µl de compuesto a la fila 2-11

◦ Añadir 50 µl de caldo MH a la fila 12 (control positivo)

◦ Añadir 100 µl de caldo MH a la fila 1

25                   ◦ Añadir 50 µl de suspensión bacteriana a la fila 2-12.

- Incubar la placa durante 20 horas a 37°C y determinar el MIC en presencia y ausencia del inhibidor.

### Resultados:

30 La Tabla 4 muestra la concentración mínima de inhibidor (MIC) de meropenem frente a los aislados clínicos Gram-negativo, tanto para MBL positivos como negativos, en presencia y ausencia de los compuestos.



Tabla 4: Concentración mínima inhibidora de meropenem (MEM) (MIC, mg/l) frente a aislados bacterianos clínicos en ausencia y presencia de compuestos inhibidores MBL a 125µM<sup>A</sup>.

Nº. Ref.	K34-7	50692172	K66-45	A3-81	K71-77	50639799	50808021	50732159	50739467	MIC (mg/l)	
										gen MBL	Especie
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>		
	VIM-2	NDM-1	NDM-1	VIM-1	NDM-1	VIM-1	Negativo	Negativo	Negativo		
MEM	32-64	32-128	32-64	64-256	1-4	8-16	128	32	0,5		
MEM+ Ej. 24	≤1	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,064	≤0,064	128-256	32	0,5		
MEM+ Ej. 12	16	16	8	32	1-2	2	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 13	8-16	4-8	1-2	16	0,25-0,5	0,5	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 9	4-8	32	4	32	0,5	2-4	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 6	4	8-16	1	3216	0,125	0,5-1	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 33	2	2	≤0,5	8	≤0,064-0,064	0,25	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 30	32	32	32	64	2	16	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 19	32	64	8-16	64	2	2	ND	ND	ND		
MEM+ Ej. 31	16	16	8-16	32	0,5-1	2	ND	ND	ND		
MEM+TPEN	1	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,064	≤0,064	64	≤0,064	1		
MEM+Captoprilo	32	32-64	64	64-128	2-4	16	ND	ND	ND		

ND<sup>A</sup>: no determinado

En resumen, el éxito principal OAA4033 (Ejemplo 24) y diversos de los candidatos de los inventores muestran una potenciación sinérgica fuerte de meropenem que restablece la actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas clínicas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. que producen MBL. El efecto sinérgico fue independiente de la especie. No se apreció efecto sinérgico alguno con OAA4033 (Ejemplo 24) y OAA4085 (Ejemplo 12) en cepas clínicas MBL-negativo, lo que indica que el efecto es específico para los aislados que producen MBL. El ensayo de la actividad antimicrobiana intrínseca de los compuestos mostró que todos tenían un MIC  $\geq 1000 \mu\text{M}$ , excluyendo la actividad antimicrobiana intrínseca de los compuestos. Como cabía esperar, también se apreció la actividad sinérgica con meropenem y TPEN. Debería apreciarse que TPEN para algunos aislados mostró una actividad antimicrobiana intrínseca (MIC  $250 \mu\text{M}$ - $1000 \mu\text{M}$ ) justo por encima de la concentración sometida a ensayo ( $125 \mu\text{M}$ ) en el ensayo. No se apreciaron efectos sinérgicos con captoprilo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un ser humano o mamífero no humano, comprendiendo dicho método la administración de dicho compuesto en combinación con (bien simultáneamente, por separado o secuencialmente) de un antibiótico de  $\beta$ -lactama, en el que dicho compuesto es un compuesto de Fórmula I:



10 en donde:

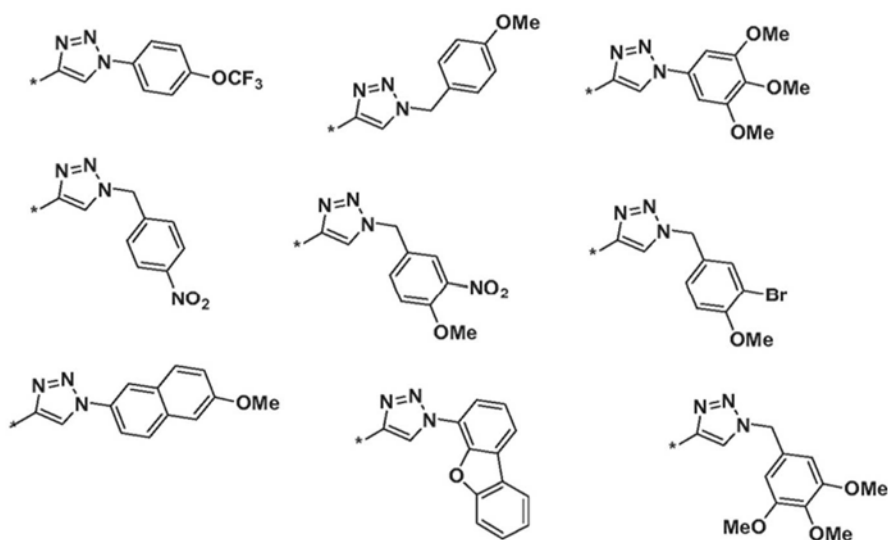
A representa un resto quelante hidrófilo que es selectivo para los iones  $Zn^{2+}$  que procede de picroilamina y comprende dos o más unidades de 2-piridil-metilo; y en el que

Y:

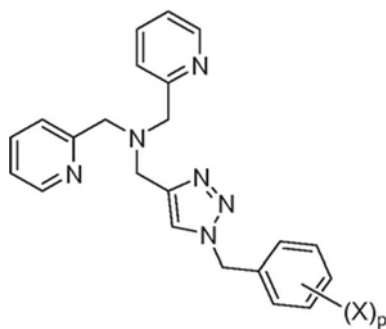
15 a) L es un enlace o un enlazador; y  
B es un vector que está seleccionado entre:

- 20 i) una estructura que comprende uno o más de los grupos siguientes: L-lisina, L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, D-glutamina, ácido *meso*-diaminopimélico, ácido D-2,3-diamino propanoico, D-alanina o cualquier otro amino ácido que tenga la configuración D;  
ii) un agente antibacteriano o un antibiótico; y  
iii) un macrólido;

25 <sup>o</sup>  
b) -L-B comprende una de las siguientes estructuras (en la que \* indica el punto de unión de L al resto A):



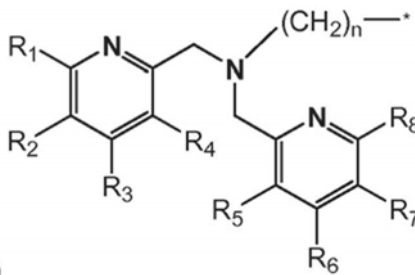
30 o en el que dicho compuesto I es un compuesto de Fórmula II:



(II)

en la que p es un número entero de 0 a 4, preferiblemente 1, 2 o 3, por ejemplo, 1 o 2;  
 cada X se selecciona independientemente entre alquilo C<sub>1-3</sub> (por ejemplo, metilo), alcoxi C<sub>1-3</sub> (por ejemplo,  
 5 metoxi), -NO<sub>2</sub>, halógeno (por ejemplo F, Cl, o Br) y haloalquilo C<sub>1-3</sub> (por ejemplo CF<sub>3</sub>), o  
 donde dos grupos adyacentes X, junto con los átomos de anillo que intervienen, forman un anillo heterocíclico o  
 carbocíclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un anillo benzofuranilo o fenilo opcionalmente sustituido);  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 2. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que A comprende un grupo de fórmula III:



(III)

en el que

15 R<sub>1</sub> a R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> (preferentemente alquilo C<sub>1-3</sub>, por  
 ejemplo, metilo), -OR' (en la que R' es H o alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente alquilo C<sub>1-3</sub>, por ejemplo, metilo), -NR''<sub>2</sub>  
 (en la que cada R'' es independientemente H o alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente alquilo C<sub>1-3</sub>, por ejemplo, metilo) o  
 20 en la que dos o más pares de grupos adyacentes seleccionados entre R<sub>1</sub> a R<sub>8</sub> junto con los átomos de anillo que  
 intervienen forman un anillo heterocíclico o carbocíclico, opcionalmente sustituido, preferentemente uno que  
 contiene 5 o 6 átomos de anillo, por ejemplo un anillo heteroarilo o arilo opcionalmente sustituido (cualquier de  
 los sustituyentes opcionales puede estar seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, halógeno, nitro, ciano, amina  
 y amina sustituida);

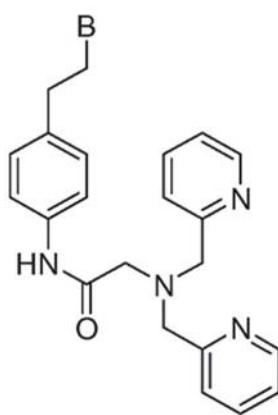
n es 0 o un número entero de 1 a 4, preferiblemente 0, 1 o 2; y

25 \* indica el punto de unión del grupo A al enlazador, L;

preferentemente en el que en la fórmula III cada uno de R<sub>1</sub> a R<sub>8</sub> es hidrógeno, y/o en el que en la fórmula III n es  
 1.

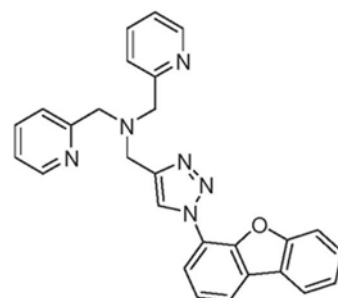
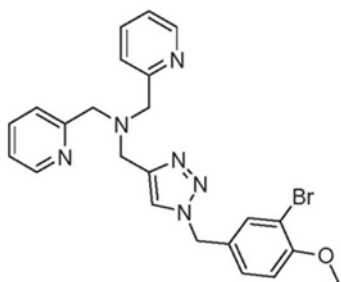
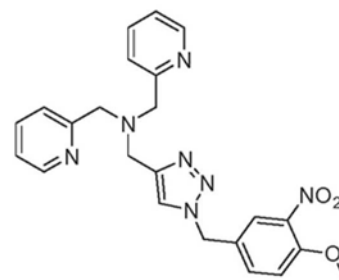
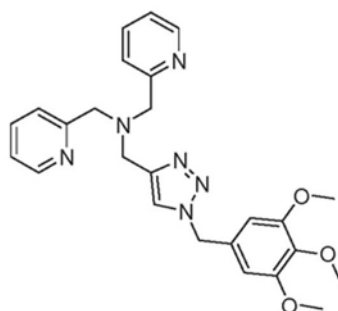
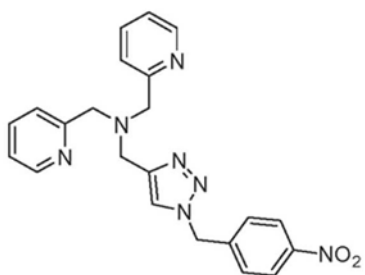
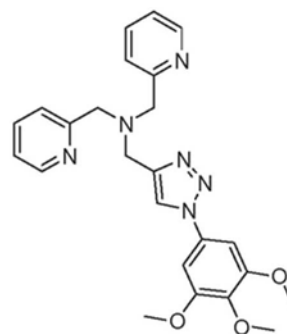
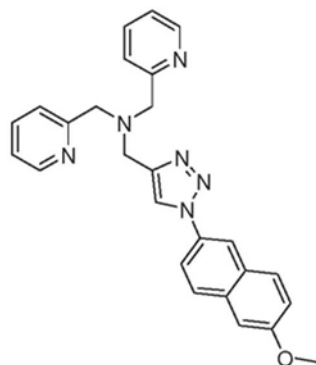
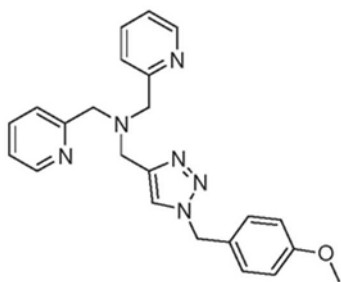
30 3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el enlazador L es un grupo orgánico  
 que comprende una cadena de hasta 50 átomos entre su punto de unión al resto A y su punto de unión al resto B;  
 preferentemente en el que el enlazador L es una cadena de alquileno (preferentemente un alquileno C<sub>1-6</sub>)  
 opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados entre alquilo C<sub>1-3</sub>, -Oalquilo C<sub>1-3</sub> y -OR' (en la que R'  
 es H o alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente alquilo C<sub>1-3</sub>, por ejemplo, metilo); y en la que uno o más grupos -CH<sub>2</sub>- (por  
 35 ejemplo, todos los grupos -CH<sub>2</sub>-) de la cadena de alquileno pueden estar sustituido por un grupo seleccionado  
 independientemente entre -O-, -CO-, -NR''- (en la que cada R'' es independientemente H o alquilo C<sub>1-6</sub>,  
 preferentemente alquilo C<sub>1-3</sub>, por ejemplo, metilo) y un anillo heterocíclico o carbocíclico opcionalmente sustituido  
 (incluyendo anillos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y anillos condensados; cualquier sustituyente opcional puede  
 estar seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, halógeno, nitro, ciano, amina y amina sustituida), preferentemente  
 40 en el que dicho enlazador está interrumpido por un anillo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido,  
 preferentemente un anillo triazol o fenilo opcionalmente sustituido;  
 más preferentemente en el que el enlazador L comprende uno o más átomos donantes de electrones capaces de  
 formar quelatos con un átomo de cinc, por ejemplo uno o más átomos capaces de contribuir a la capacidad quelante  
 de metal del grupo A, preferentemente en el que dichos átomos donantes de electrones son átomos de oxígeno o  
 45 nitrógeno, por ejemplo, en el que dichos átomos se proporcionan en la cadena principal del enlazador o dentro de  
 uno o más estructuras de anillo de sustitución o interrupción.

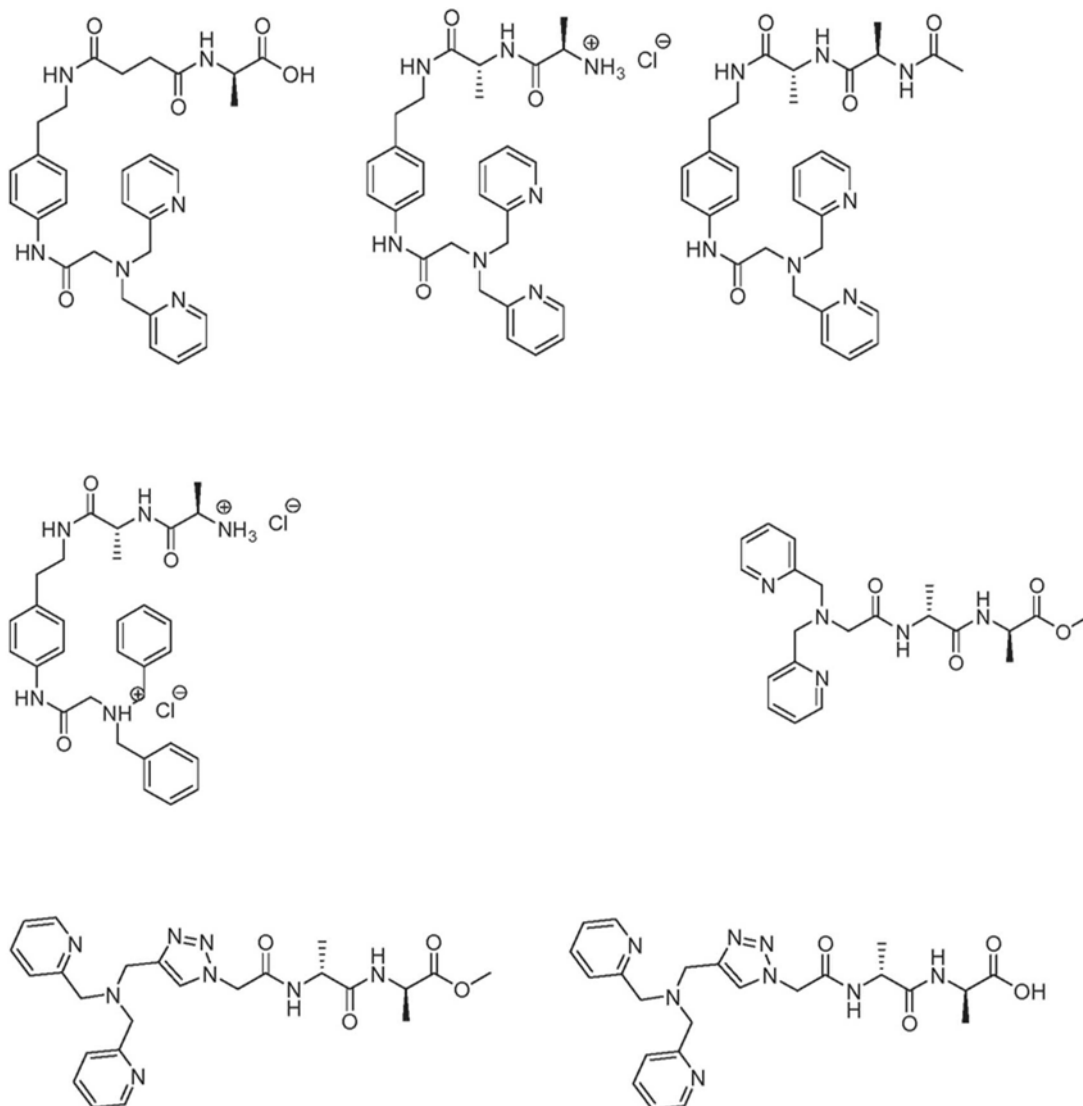
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector B es una estructura que comprende una combinación de amino ácidos que tienen la configuración D, por ejemplo una estructura que comprende uno o más de las siguientes: ácido D-glutámico, D-glutamina, ácido meso-diaminopimérico y D-alanina, preferentemente en el que el vector B es -D-Ala-D-Ala o ácido -D-Ala-D-láctico; o
- 5 en el que el vector B es un antibiótico de  $\beta$ -lactama, preferentemente en el que B está seleccionado entre el grupo que consiste en penicilinas (por ejemplo, amoxicilina), cefalosporinas, monobactamas, carbapenems, ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama monobactamas (por ejemplo aztreonama), imipenem, derivados de tiopropionil-amino ácido, tioésteres, derivados de ácido succínico y derivados de ácido maleico, más preferentemente en el que dicha  $\beta$ -lactama es una penicilina, por ejemplo amoxicilina, piv-amoxicilina, ampicilina, piv-ampicilina o ácido clavulánico; o
- 10 en el que el vector B comprende una  $\beta$ -lactama que tiene afinidad por proteínas que se unen a penicilina (PBP), por ejemplo una PBP seleccionada entre el grupo que consiste en MBL, proteína de tipo serina beta-lactamasa (LACTB), D,D-transferasa, D-Ala(D,D)-carboxipeptidasa y las D-alanil-D-alanina dipeptidasa VanA, VanX y VanY; o
- 15 en el que el vector B es cloranfenicol.
5. Un compuesto para su uso como se define en la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es de fórmula III:



(III)

- 20 en el que B es un vector como se define en las reivindicación 1 o 4, preferentemente una estructura que comprende uno o más de los siguientes grupos: L-lisina, L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, D-glutamina, ácido meso-diaminopimérico, ácido D-2,3-diamino propanoico, D-alanina o cualquier otro amino ácido que tenga la configuración D;
- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
6. Un compuesto para su uso como se define en la reivindicación 1 que está seleccionado entre los siguientes compuestos:



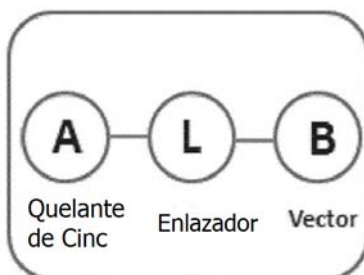


o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la infección está asociada a bacterias Gram positivo o Gram negativo (preferentemente bacterias Gram negativo) que son resistentes a uno o más antibióticos, por ejemplo antibiótico de  $\beta$ -lactama, preferentemente en el que dichas bacterias comprenden metalo- $\beta$ -lactamasas, más preferentemente en el que dichas bacterias Gram negativo incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae*.
- 10 9. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto y el antibiótico de  $\beta$ -lactama se proporcionan en la misma formulación o en el que el compuesto y el antibiótico de  $\beta$ -lactama se proporcionan en formulaciones diferentes.
- 15 10. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 junto con un antibiótico de  $\beta$ -lactama.
- 20 11. Un kit que comprende:
- (i) un primer recipiente que contiene un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7; y
- 25 (ii) un segundo recipiente que contiene un antibiótico de  $\beta$ -lactama.

12. Un compuesto para su uso, formulación farmacéutica o kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 a 11, en el que dicho antibiótico de  $\beta$ -lactama está seleccionado entre los siguientes: penamas, cefems, monobactamas, penems, carbapenems y clavamas, preferentemente entre penamas, cefamas y carbapenems, preferentemente en el que el antibiótico de  $\beta$ -lactama es penicilina G, metilicina, una cefalosporina (por ejemplo, cefaloridina o nitrocefina), una cefamicina, aztreonama, faropenem, imipenem o ácido clavulánico.

13. Un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



10

en donde:

A representa un resto quelante hidrófilo que es selectivo para los iones  $Zn^{2+}$  que procede de picroilamina y comprende dos o más unidades de 2-piridil-metilo; y

Y:

15

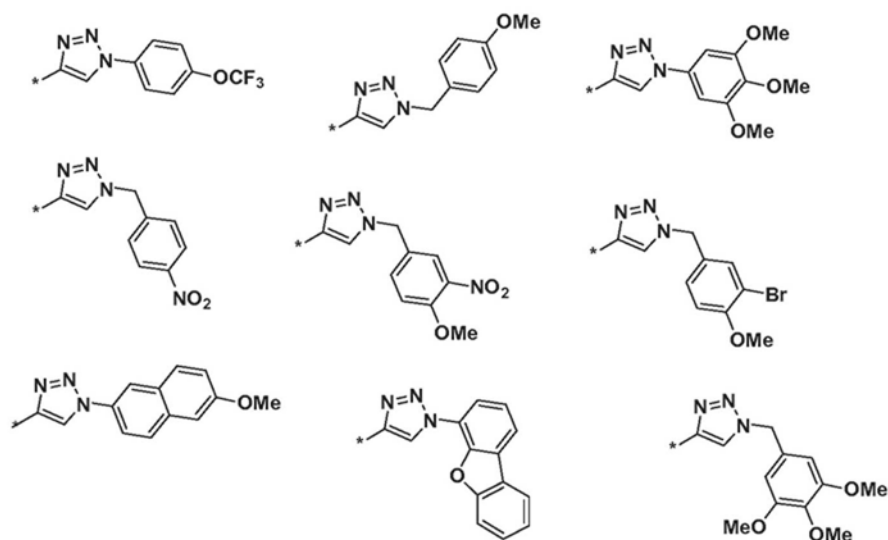
a) L es un enlace o un enlazador; y  
B es un vector que está seleccionado entre:

20

- i) una estructura que comprende uno o más de los grupos siguientes: L-lisina, L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, D-glutamina, ácido *meso*-diaminopimélico, ácido D-2,3-diamino propanoico, D-alanina o cualquier otro amino ácido que tenga la configuración D;
- ii) un agente antibacteriano o un antibiótico; y
- iii) un macrólido

25

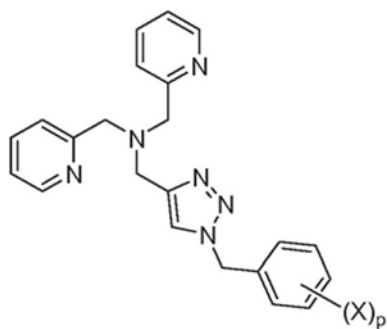
o  
b) -L-B comprende una de las siguientes estructuras (en la que \* indica el punto de unión de L al resto A):



30

o en el que dicho compuesto I es un compuesto de Fórmula II:

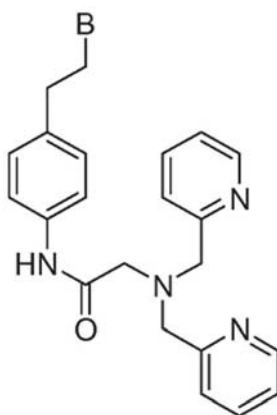




(II)

- 5 en la que p es un número entero de 1 a 4, preferiblemente 1, 2 o 3, por ejemplo, 1 o 2;  
 cada X se selecciona independientemente entre alquilo C<sub>1-3</sub> (por ejemplo, metilo), alcoxi C<sub>1-3</sub> (por ejemplo,  
 metoxi), -NO<sub>2</sub>, halógeno (por ejemplo F, Cl, o Br) y haloalquilo C<sub>1-3</sub> (por ejemplo CF<sub>3</sub>);  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

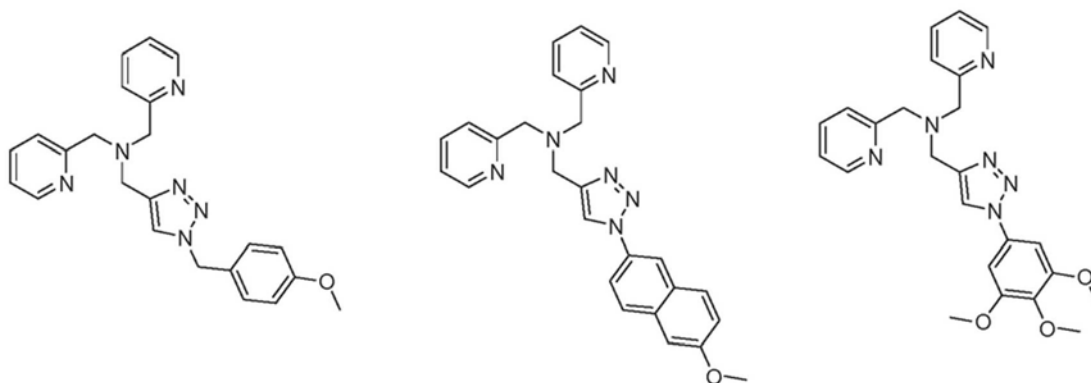
- 10 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en la que A, L y B son tal como se definen en una cualquiera  
 de las reivindicaciones 2 a 4; o  
 en el que dicho compuesto es de fórmula III:

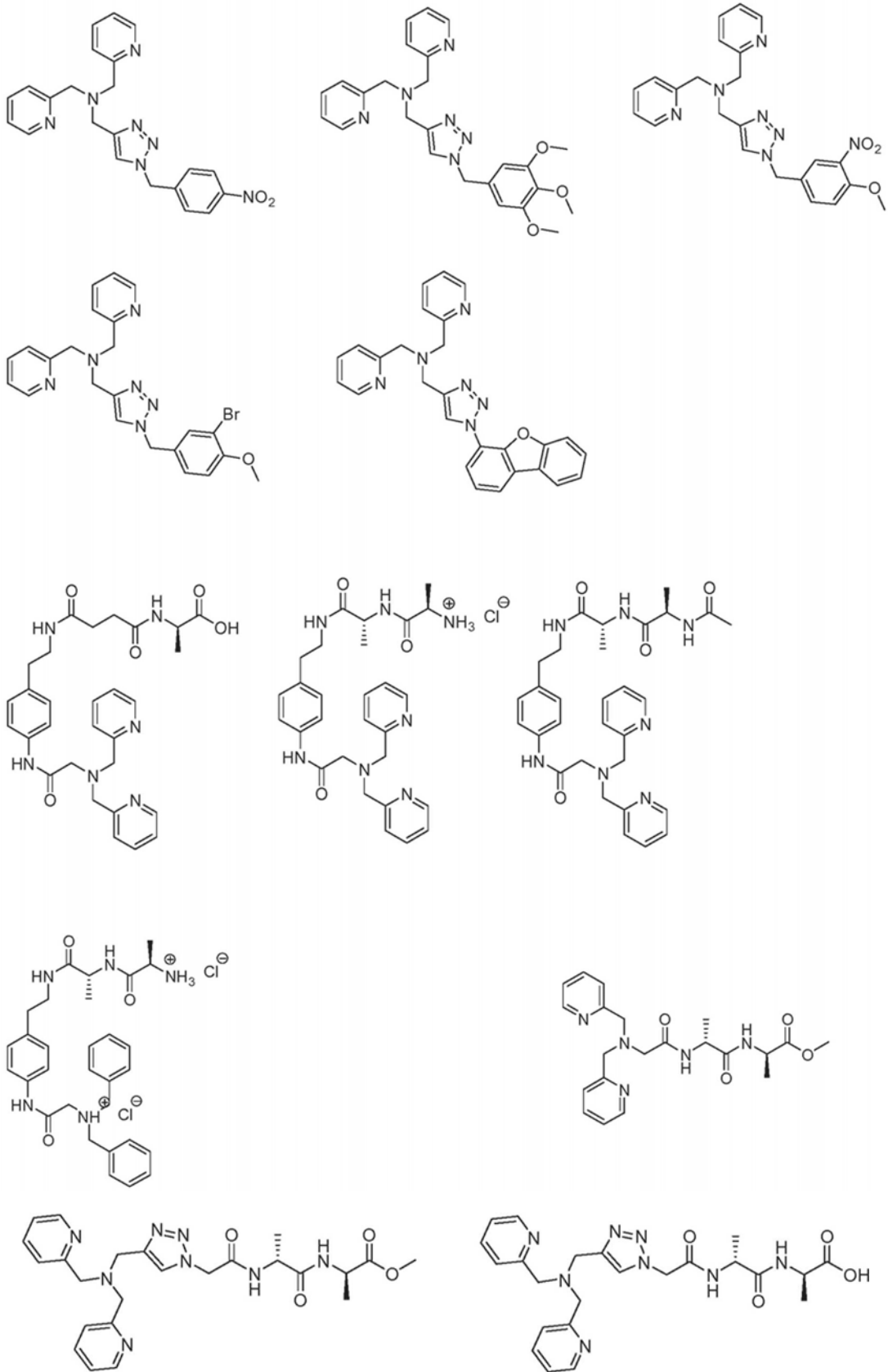


(III)

- 15 en el que B es un vector como se define en las reivindicación 1 o 4, preferentemente una estructura que comprende  
 uno o más de los siguientes grupos: L-lisina, L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, D-glutamina, ácido  
*meso*-diaminopimérico, ácido D-2,3-diamino propanoico, D-alanina o cualquier otro amino ácido que tenga la  
 configuración D;  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 20 15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho compuesto se selecciona entre los siguientes  
 compuestos:





5 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.