

**Título****DERIVADOS DE 1,3,4-OXADIAZOL COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE  
HISTONA DESACETILASA 6**

\*\*\*\*\*

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inhibidores selectivos a base de oxadiazol de la histona desacetilasa 6 (HDAC6) y usos de los mismos en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

**Estado de la técnica de la invención**

El material genético de las células eucariotas está organizado en una estructura compleja y dinámica formada por ADN y proteína, la cromatina. Los principales componentes proteicos de la cromatina son las histonas, proteínas básicas que interactúan con el ADN que forma la unidad estructural básica de la cromatina, el nucleosoma, el primer nivel de compactación cromosómica dentro del núcleo. La interacción entre los residuos básicos de las histonas y los residuos ácidos del ADN es crucial para determinar la compactación del nucleosoma y la correspondiente accesibilidad del ADN a los complejos moleculares que regulan la replicación y la transcripción. En esta interacción influye principalmente el grado de acetilación de las histonas. La desacetilación de los residuos de lisina N-terminal de la histona permite la protonación del grupo amina, que al tener una carga positiva, interactúa con las cargas negativas contenidas en el ADN. Dicha interacción se produce en un estado más compacto de la cromatina, lo que implica el silenciamiento de la expresión génica. Por el contrario, la acetilación de los mismos residuos impide la formación de enlaces iónicos, lo que produce una forma menos compacta de cromatina que permite una

mayor exposición del ADN y la interacción con complejos macromoleculares que activan la transcripción génica.

El grado de acetilación de las histonas está regulado por el equilibrio de actividad de dos clases de enzimas: las histona acetil transferasas (histona acetil-transferasas HAT) y las histona desacetilasas (histona desacetilasas HDAC). Una alteración de este delicado equilibrio puede llevar a una pérdida de la homeostasis celular, comúnmente hallado en diversas enfermedades humanas, que incluyen cáncer, trastornos neurológicos, inflamación y enfermedades autoinmunes.

Las histona desacetilasas se han clasificado así porque catalizan de forma reversible la desacetilación de los grupos amina de los residuos de lisina N-terminal de las histonas. Posteriormente, se ha descubierto que existe un gran número de sustratos de estas enzimas, ya que su actividad también se debe a proteínas no histonas que son sustratos de las enzimas HAT que contienen N-acetil-lisina, tales como factores de transcripción, enzimas de reparación del ADN y otras proteínas del núcleo y del citoplasma.

La clase HDAC humana consiste en 18 enzimas, divididas en dos grupos: HDAC dependientes de zinc y HDAC dependientes de NAD, también conocidas como sirtuinas (clase III). Las HDAC dependientes de zinc se distribuyen a su vez en cuatro clases: 1) Clase I, que incluye las HDAC1, 2, 3 y 8, isoenzimas ubicuas localizadas principalmente en el núcleo; 2) Clase IIa, que incluye las HDAC4, 5, 7 y 9, isoenzimas localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma; 3) Clase IIb, que incluye las HDAC6 y HDAC10, localizadas principalmente en el citoplasma y 4) Clase IV, que incluye únicamente la HDAC11. A diferencia de las HDAC de clase I, clase IIa y IIb tienen una expresión específica de tejido.

Mediante la regulación de la expresión génica y la acción sobre las histonas y los factores de transcripción, estas enzimas intervienen en una miríada de funciones celulares. Además, al actuar sobre otros muchos sustratos proteicos, estas enzimas, al igual que las fosfatasas, intervienen en muchos otros procesos, como la transducción de señales y el reordenamiento del citoesqueleto.

En las últimas décadas, las HDAC se han convertido en una diana terapéutica muy estudiada. Se han sintetizado varios inhibidores de las HDAC, algunos de los cuales se encuentran actualmente en ensayos clínicos avanzados y cuatro de ellas se han aprobado para diferentes tipos de cáncer: Vorinostat y Romidepsin para el linfoma cutáneo de células T (CTLC), Belinostat para el linfoma periférico de células T (PTLC) y Panobinostat para el mieloma múltiple. Estos inhibidores pueden interactuar con diferentes isoformas de HDAC.

A pesar de su eficacia clínica, el uso de paninhibidores, por tanto no selectivos para una sola isoforma, está limitado por su toxicidad y efectos secundarios observados tanto en modelos preclínicos como, lo que es más importante, en ensayos clínicos. De ahí la necesidad de desarrollar inhibidores de HDAC con un mejor perfil farmacológico y ventana terapéutica (relación eficacia/toxicidad).

Por consiguiente, la atención de la comunidad científica se ha centrado en la síntesis y el estudio de inhibidores selectivos para isoformas individuales de HDAC, con el objetivo de desarrollar moléculas con mejores capacidades farmacológicas.

Por lo tanto, el uso de inhibidores de la HDAC puede ser una importante herramienta terapéutica o diagnóstico para patologías causadas por la expresión génica, tales como trastornos inflamatorios, diabetes, complicaciones de la diabetes, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL), rechazo de trasplantes de órganos, patologías autoinmunes, infecciones protozoarias, cánceres,

etc. Además, la alteración de la actividad de las HDAC también se ha correlacionado con la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia (CIPN) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), la neuropatía periférica hereditaria más común. Los inhibidores selectivos para una familia de HDAC o para una isoforma específica, especialmente HDAC6, pueden ser particularmente útiles para tratar patologías relacionadas con trastornos proliferativos y acumulación de proteínas, trastornos del sistema inmunitario y enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, tales como accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer, NPIQ y CMT.

Especialmente para HDAC6, se han identificado diferentes sustratos, tales como  $\alpha$ -tubulina, Hsp90 (proteína de choque térmico 90), cortactina,  $\beta$ -catenina. La modulación de la acetilación de estas proteínas por HDAC6 se ha correlacionado con varios procesos importantes, tales como la respuesta inmunitaria (Kozikowski, J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078), la regulación de la dinámica de los microtúbulos, incluida la migración celular, interacción célula-célula (Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824), transporte axonal y regeneración axonal (Rossaert y Van Den Bosch, Brain Research, 2020, 1733, 146692).

Además, HDAC6 participa en el proceso de catabolismo de las proteínas degradadas a través del complejo conocido como agresoma: HDAC6 es capaz de unir proteínas poliubiquitinadas y dineína, de este modo se activa una clase de liberación de proteínas desnaturalizadas a lo largo de los microtúbulos hasta el agresoma (Kawaguchi et al., Cell (2003) 115 (6), 727-738).

La alteración de esta actividad citoprotectora de HDAC6 se ha correlacionado con diversas patologías neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson

(Outerio et al., Science (2007), 317 (5837), 516-519) y enfermedad de Huntington (Dompierre et al., J. Neurosci. (2007), 27(13), 3571-3583), en las que la acumulación de proteínas degradadas es una característica patológica común.

La participación de HDAC6 en la dinámica de los microtúbulos y en la eliminación de proteínas mal plegadas se ha correlacionado con déficits de transporte axonal, comúnmente observados en neuropatías periféricas tanto de origen genético como inducidas por quimioterapia. (Krukowski et al., Pain, 2017, 158(6), 1126-1137)

Además, HDAC6 participa en la regulación de muchas proteínas oncológicas, especialmente en tumores hematológicos, tales como varios tipos de leucemia (Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905) y mieloma múltiple (Hideshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572). La regulación de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina por HDAC6 puede estar implicada en la aparición de metástasis, en la que la motilidad celular desempeña un papel importante (Sakamoto et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824).

En la última década se han sintetizado y estudiado varios inhibidores selectivos de HDAC6. Algunos de ellos se encuentran todavía en fase de desarrollo preclínico activo y dos de ellos, a saber, Ricolinostat y Citarinostat, están actualmente en fase de investigación clínica.

La mayoría de los inhibidores selectivos de la HDAC6 pertenecen a la clase de los hidroxamatos. El grupo hidroxamato tiene la importante función de unir el ion  $Zn^{++}$  en el sitio activo de la enzima. No obstante, se asocia cierto nivel de toxicidad y genotoxicidad a este resto, probablemente debido a su capacidad de unión inespecífica al metal y a su tendencia a liberar hidroxilamina (Kozikowski, ChemMedChem. 2016 enero; 11(1): 15-21).

Por lo tanto, existe la necesidad de inhibidores de HDAC que se dirijan selectivamente a una HDAC en particular, tal como HDAC6.

Los documentos WO2022/029041, WO2022/013728, WO2021/127643, WO2020/212479, WO2019/166824 y WO2022/049496 divulgan compuestos que inhiben selectivamente la actividad de HDAC6 y usos de los mismos en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

### **Síntesis de la invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos inhibidores de la histona desacetilasa 6 (HDAC6).

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente una nueva clase de derivados de 1,3,4-oxadiazol que garantizan la potencia frente a HDAC6 junto con la selectividad sobre las otras isoformas y la estabilidad metabólica.

Estos compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos modulados por dicha HDAC6.

### **Definiciones**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, anotaciones y demás terminología científica utilizada en la presente tienen el significado comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que se refiere esta descripción. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente para mayor claridad y/o para facilitar la referencia; por lo tanto, la inclusión de tales definiciones no se debe interpretar que representan una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

El término "halógeno" se refiere en la presente a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I).

El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" en la presente se refiere a un hidrocarburo ramificado o lineal que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Algunos ejemplos de grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen, pero sin limitación metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, ter-butilo, n-pentilo, n-hexilo.

El término "arilo" se refiere en la presente a los sistemas de anillos aromáticos monocarbocíclicos y policarbocíclicos (i), en los que los anillos carbocíclicos individuales de los sistemas de anillos policarbocíclicos pueden estar fusionados o unidos entre sí por un enlace simple. Los grupos arilo adecuados incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y bifenilo.

El término "ariloxi" se refiere en la presente al grupo O-arilo, en donde "arilo" es como se definió anteriormente.

El término "alcoxi" se refiere en la presente al grupo O-alquilo, en donde "alquilo" es como se definió anteriormente.

El término "tioalcoxi" se refiere en la presente al grupo S-alquilo, en donde "alquilo" es como se definió anteriormente. El grupo tioalcoxi preferido es tioetoxi (-SEt) o tiometoxi (-SMe), y aún con más preferencia es tiometoxi. En otra realización, el grupo tioalcoxi se refiere a un grupo alquilo en el que una de las unidades hidrocarbonadas no terminales de la cadena alquilo se reemplaza con un átomo de azufre.

El término "halogenado" se refiere en la presente a la sustitución con halógeno, es decir, cualquiera de los grupos alquilo, alcoxi, tioalcoxi anteriores puede estar total o parcialmente sustituido con un átomo de halógeno. Con preferencia, el átomo de halógeno es F o Cl, y con más preferencia es F.

El término "cicloalquilo" se refiere en la presente a un anillo de hidrocarburo saturado o insaturado, que con preferencia tiene de 3 a 10 átomos de carbono. Ejemplos de

cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "arilalquilo" se refiere en la presente a un radical arilo como se define en la presente, unido a un radical alquilo como se define en la presente. Un ejemplo de arilalquilo es el bencilo.

El término "deuterado" se refiere en la presente a la sustitución por deuterio, en otras palabras, los átomos de hidrógeno se pueden reemplazar parcial o totalmente con deuterio.

El término "heterociclo" se refiere en la presente a un anillo monocíclico de 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, saturado o insaturado, formado por átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El anillo heterocíclico se puede unir a cualquier heteroátomo o átomo de carbono, siempre que la unión produzca la creación de una estructura estable. El término también incluye cualquier sistema bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores esté fusionado a un arilo o a otro heterociclo. Cuando el anillo heterocíclico es un anillo heterocíclico aromático, se puede definir como un "anillo heteroaromático".

El término "anillo insaturado" se refiere en la presente a un anillo parcial o totalmente insaturado. Por ejemplo, un anillo monocíclico insaturado C<sub>6</sub> se refiere al ciclohexeno, ciclohexadieno y benceno.

El término "sustituido" se refiere en la presente a la mono o poli sustitución con un sustituyente definido (o indefinido) siempre que esta sustitución única o múltiple esté químicamente permitida.

El término "excipiente fisiológicamente aceptable" en la presente se refiere a una sustancia que carece de efecto farmacológico propio y que no produce reacciones adversas cuando se administra a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, sexta edición de 2009, que se incorpora en la presente por referencia.

El término "sales farmacéuticamente aceptables o sus derivados" se refiere a aquellas sales o derivados que poseen la eficacia biológica y las propiedades del compuesto salificado o derivado y que no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales inorgánicas u orgánicas; algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación: carbonato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, sulfato de hidrógeno, citrato, maleato, fumarato, trifluoroacetato, 2-naftalensulfonato y para-toluensulfonato. Se puede hallar más información sobre sales farmacéuticamente aceptables en Handbook of pharmaceutical salts, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008, incorporado en la presente por referencia. Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen los ésteres, los éteres y los N-óxidos.

Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben entender como términos abiertos (que significan "que incluyen, pero sin limitación") y se deben considerar como un soporte también para términos tal como "consiste esencialmente en", "que consiste esencialmente en", "consiste en" o "que consiste en".

Los términos "consiste esencialmente en", "consiste esencialmente en" se deben entender como términos semicerrados, lo que significa que no se incluye ningún otro

ingrediente que afecte a las características novedosas de la invención (por tanto, pueden incluirse excipientes opcionales).

Los términos "consiste en", "que consiste en" se deben entender como términos cerrados.

El término "isómeros" se refiere a estereoisómeros (o isómeros espaciales), es decir, diastereoisómeros y enantiómeros.

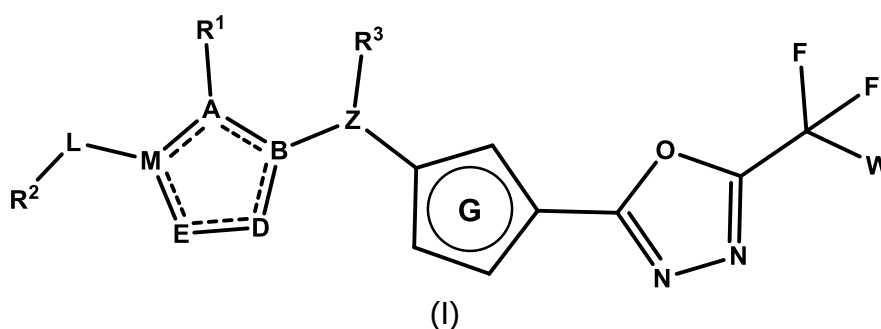
El término "profármacos" se refiere a derivados farmacológicamente inactivos, que pueden sufrir una transformación metabólica in vivo para suministrar un compuesto activo incluido en la fórmula general de esta invención. Se conocen muchos profármacos diferentes en la técnica (Prodrug approach: an effective solution to overcome side-effects, Patil S.J., Shirote P.J., International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences, 2011,1-13; Carbamate Prodrug Concept for Hydroxamate HDAC Inhibitors, Jung, Manfred et al., ChemMedChem, 2011, 1193-1198).

### **Descripción de la invención**

Los inventores han descubierto experimentalmente que esta nueva clase de compuestos, caracterizados por la presencia del resto 2-(difluorometil)- o 2-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol y por dos anillos centrales pentaheterocíclicos, presenta una actividad inhibidora elevada y selectiva contra la enzima HDAC6 e inesperadamente muestra una potente actividad inhibidora de HDAC6 en varias líneas celulares.

Los compuestos de la presente invención mostraron una citotoxicidad muy baja, lo que los hizo adecuados para un uso crónico.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables:



en donde:

W = H o F, con preferencia H;

G es un anillo heteroaromático de 8 miembros que consiste en átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, S y Se, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi, o tioalcoxi, sus derivados halogenados, o halógeno, o hidroxilo; con la condición de que se excluyan los siguientes anillos heteroaromáticos de 8 miembros:

- un anillo que consiste en átomos de carbono y 2 heteroátomos en donde 1 heteroátomo es N; y
- un anillo que consiste en átomos de carbono y 3 átomos de nitrógeno;

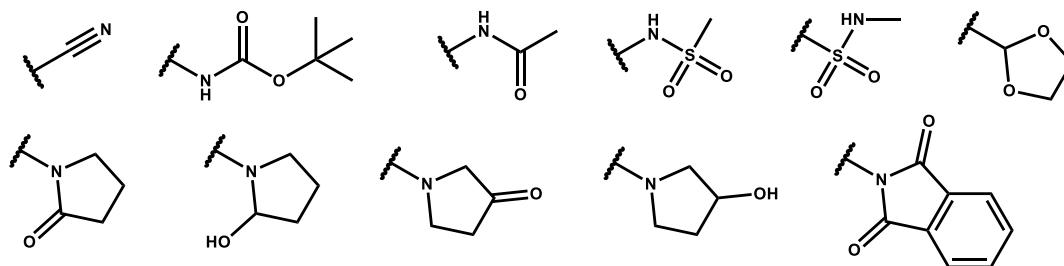
Z = alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, alcoxi o tioalcoxi, que incluye sus derivados halogenados o deuterados, -S-, -O-, -NH-;

R<sup>3</sup> está ausente cuando Z = -S-, -O-, -NH-;

Cuando Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, alcoxi o tioalcoxi, que incluye sus derivados halogenados o deuterados, entonces R<sup>3</sup> = H, D, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, no sustituido o sustituido con:

- hidroxilo, carbonilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, ariloxi o tioalcoxi, o sus derivados halogenados;
- halógeno;
- amina primaria, secundaria o terciaria, sustituida con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o sus derivados halogenados;

- fenilo, piridilo, tiofenilo, furano o pirrol, no sustituido o sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi, tioalcoxi o sus derivados halogenados, o halógeno;
- las siguientes subestructuras o sus derivados halogenados:



A = C, N, O, S;

B = C, N;

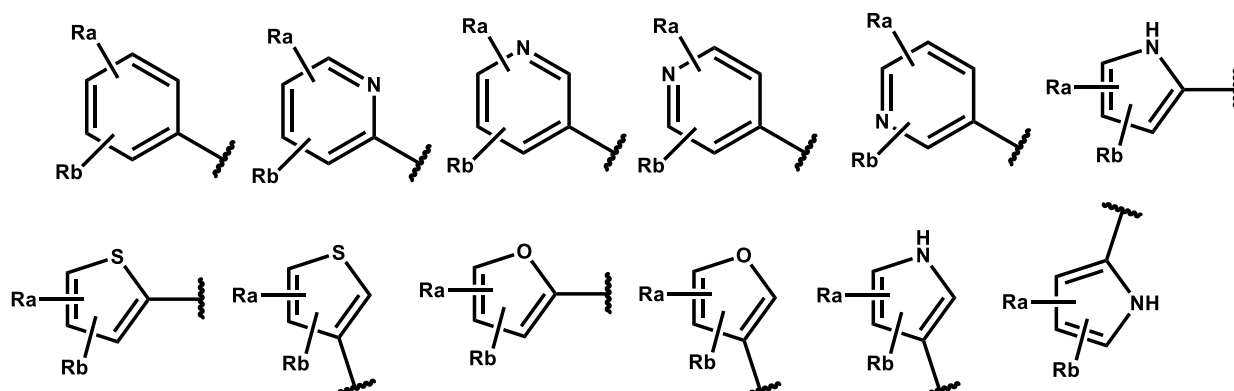
D = CHR<sup>5</sup>, NR<sup>5</sup>, O, o S;

E = CHR<sup>5</sup>, NR<sup>5</sup>, O, o S;

M = C, N;

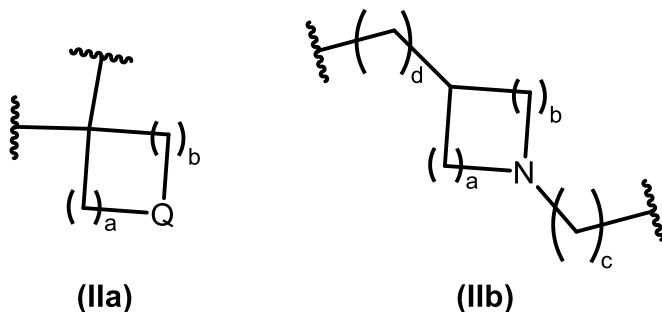
R<sup>5</sup> está de modo independiente ausente, -H, halógeno, =O, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi o tioalcoxi, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, o sus derivados halogenados, opcionalmente sustituido con carbonilo o carboxi, o

R<sup>5</sup> se selecciona entre las siguientes subestructuras:



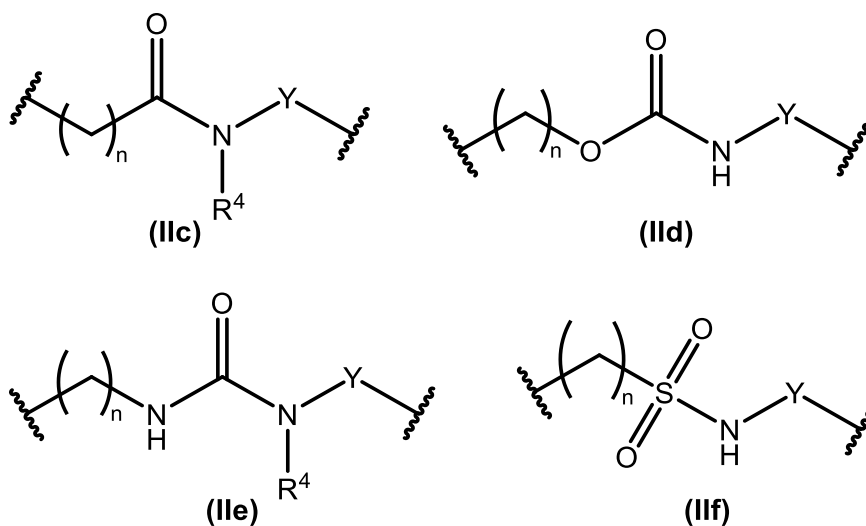
en donde Ra y Rb se seleccionan de modo independiente de H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi o tioalcoxi, o sus derivados halogenados;

L está ausente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi o tioalcoxi,  $-(CH_2)_m-CHR^4-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2)_m-CH(NHR^4)-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2)_m-NR^4-(CH_2)_o-$  o sus derivados halogenados;



en donde m y o son cada uno de modo independiente 0, 1 o 2; o

L se selecciona entre las siguientes subestructuras (IIa)-(IIf) y sus derivados halogenados:

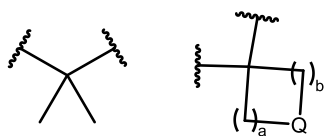


en donde a, b, c y d son de modo independiente 0, 1, 2, o 3 y a y b no puede ser 0 al mismo tiempo;

Q es CH<sub>2</sub>, NR<sup>4</sup> u O;

en donde n es 0, 1, o 2;

Y está ausente, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, o se selecciona entre las siguientes subestructuras y sus derivados halogenados:



en donde a, b y Q son como se definieron anteriormente;

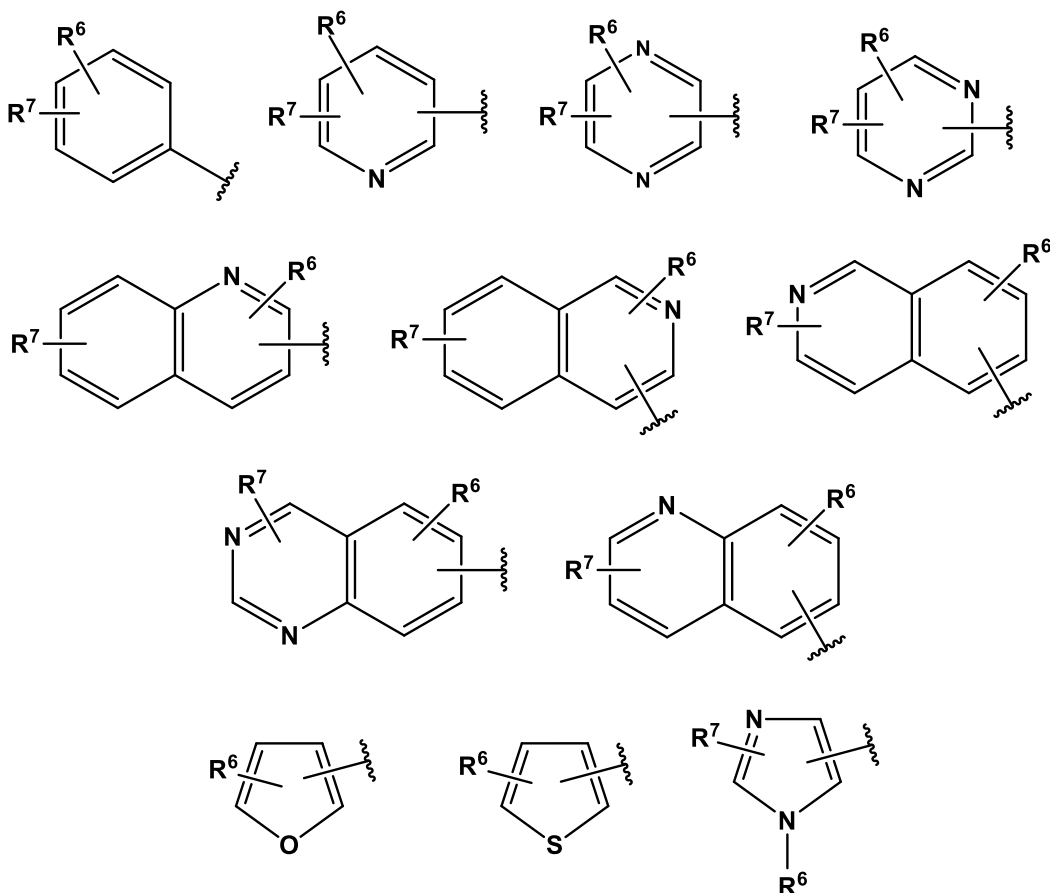
$R^4$  = H, alquilo  $C_1$ - $C_4$  no sustituido o sustituido con:

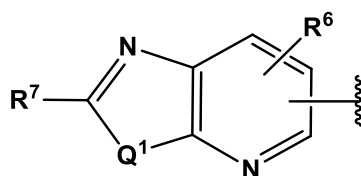
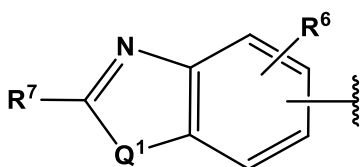
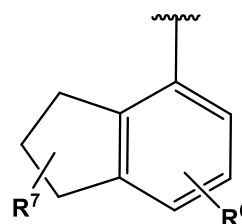
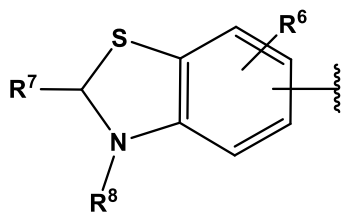
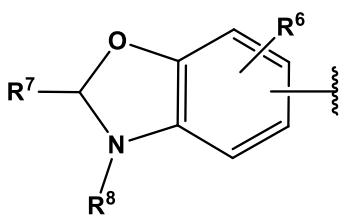
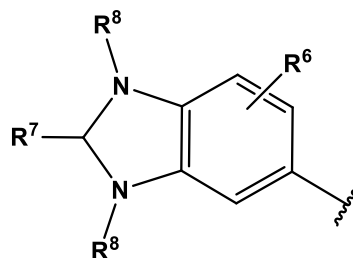
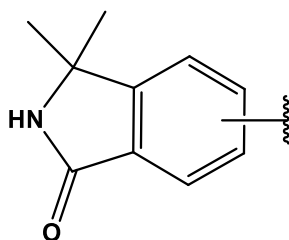
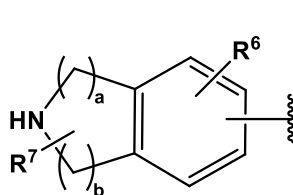
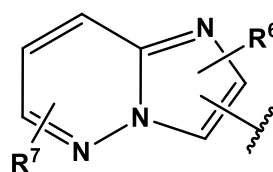
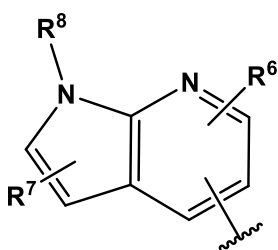
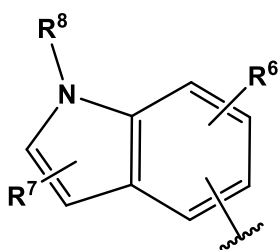
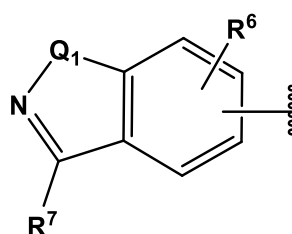
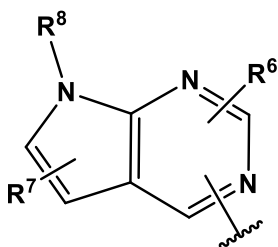
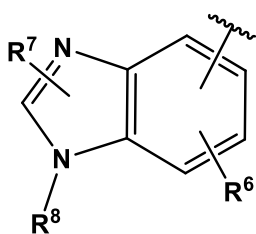
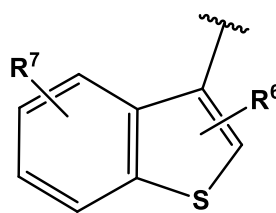
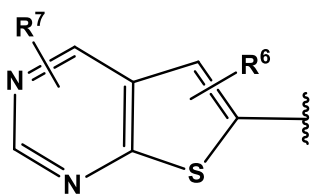
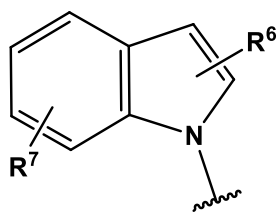
- halógeno
- fenilo, piridilo, tiofenilo, furano o pirrol, no sustituido o sustituido con alquilo  $C_1$ - $C_3$ , alcoxi, tioalcoxi o sus derivados halogenados, o halógeno;

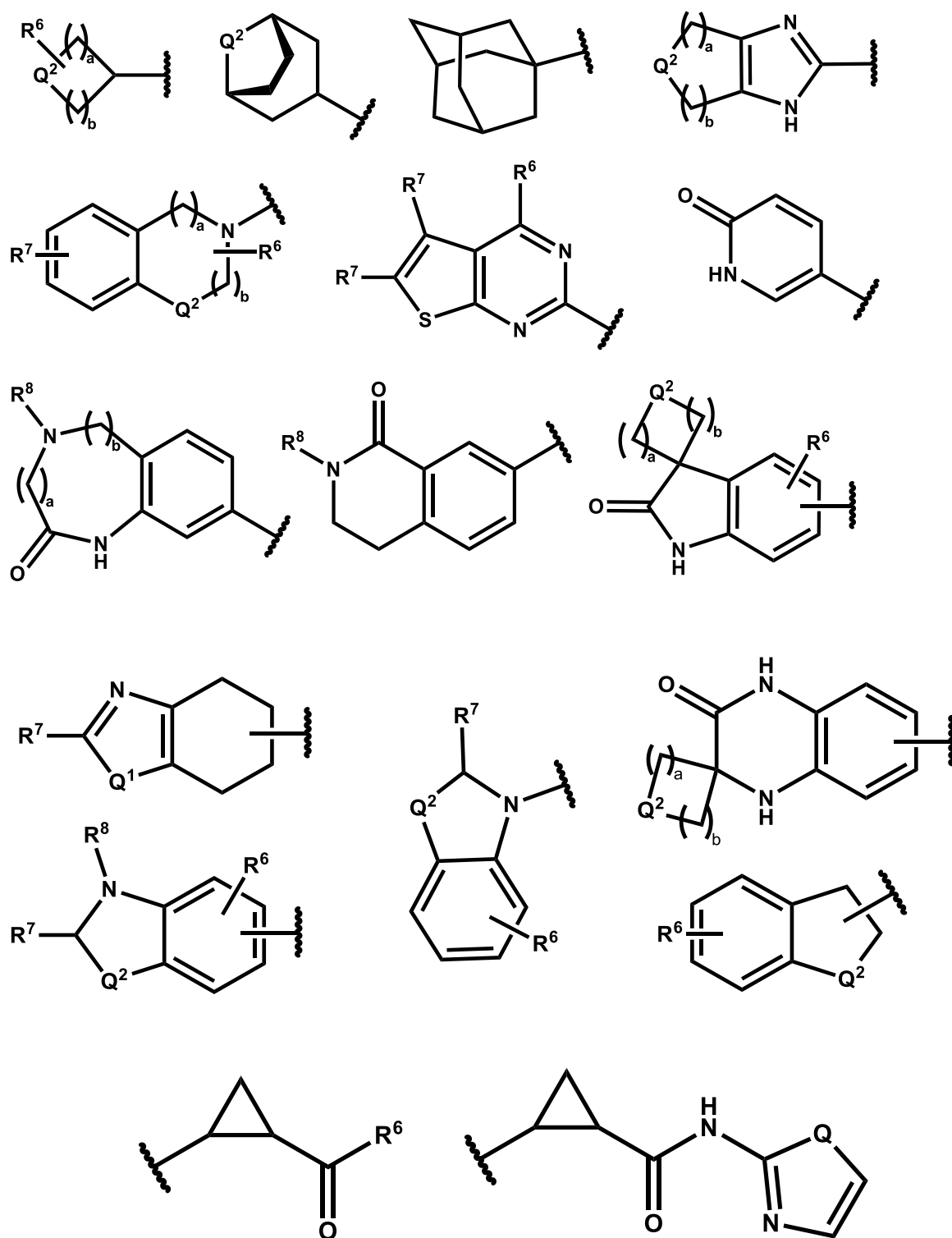
$R^1$  = ausente, -H, alquilo  $C_1$ - $C_6$  opcionalmente sustituido con -OH o -N( $C_1$ - $C_5$  alquil) $_2$ , o -L- $R^2$ ;

cuando  $R^1$  = -L- $R^2$ , la sustitución en M está ausente;

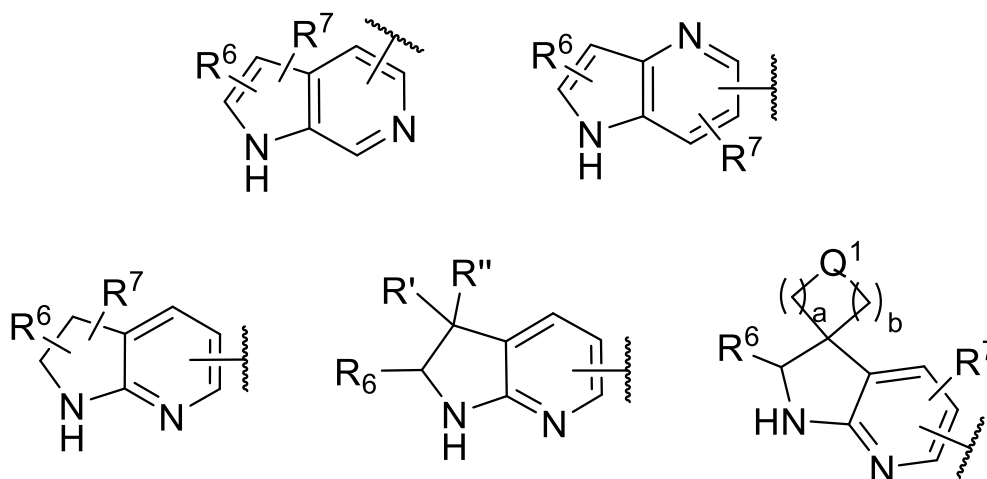
$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en:





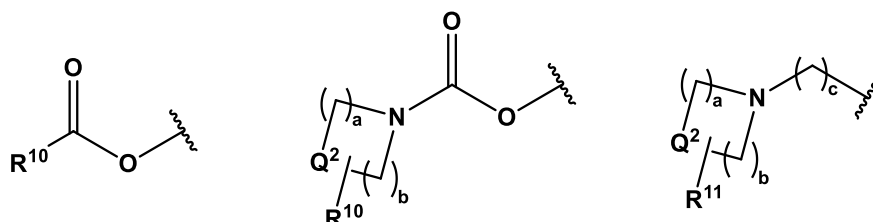


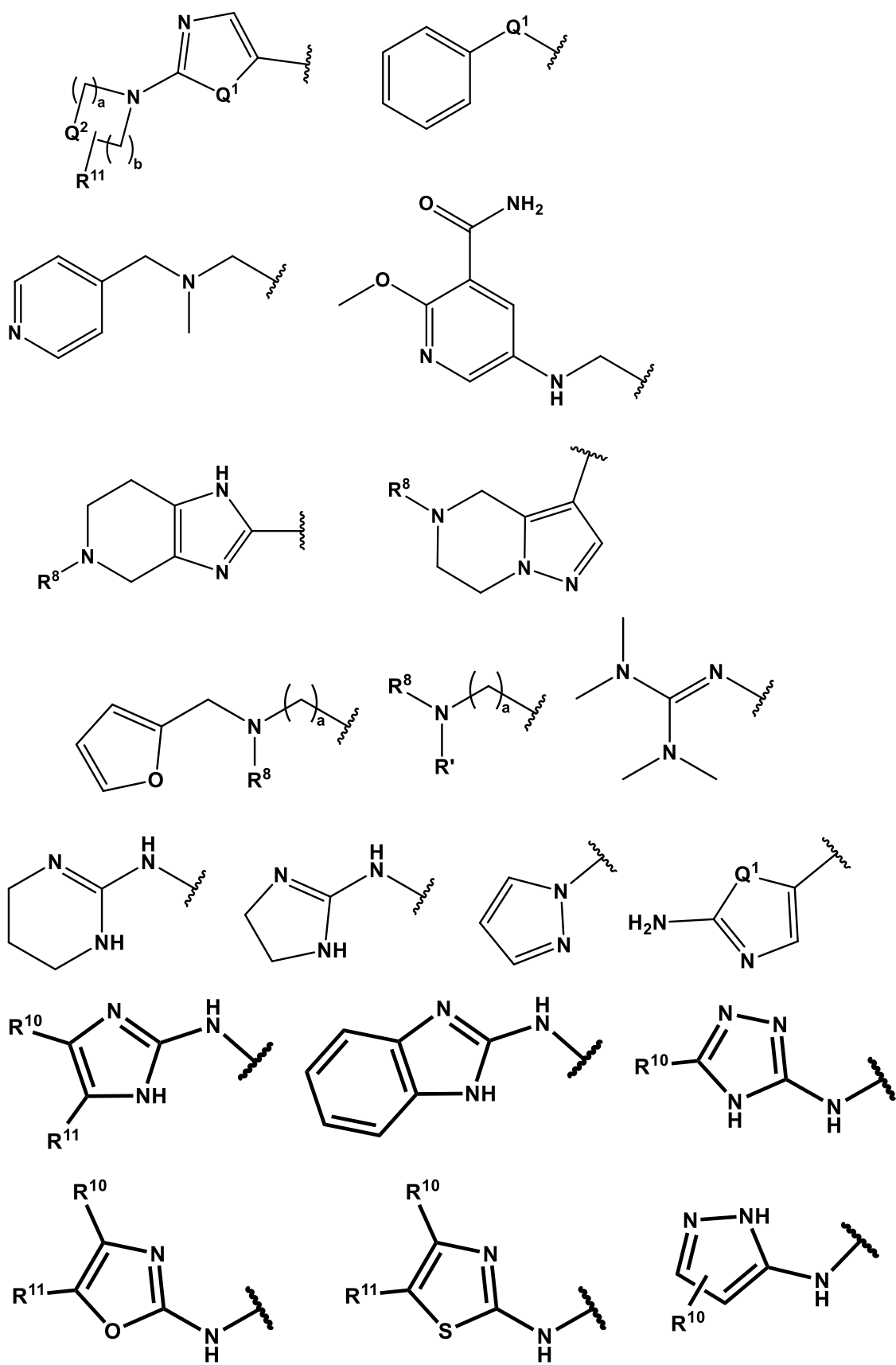
o  $R^2$  se selecciona del grupo que consiste en:



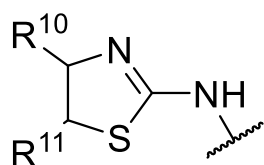
en donde  $R^6$  y  $R^7$  se seleccionan de modo independiente del grupo que comprende: - H, -D, -OH, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , alcoxi o tioalcoxi, cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados, halógeno,  $-(CH_2)_aNR'R''$ ,  $-NHR^8$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R^9$ ,  $-C(=NH)R^9$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $-Ph$ ,  $-SO_2-NR'R''$ ,  $=O$ ,  $=NR^8$ ,  $-SO_2$ -alquilo  $C_1$ - $C_4$ , o alquilo  $C_1$ - $C_4$  sustituido con  $-OH$ ; o

$R^6$  y  $R^7$  se seleccionan de modo independiente entre las siguientes subestructuras:

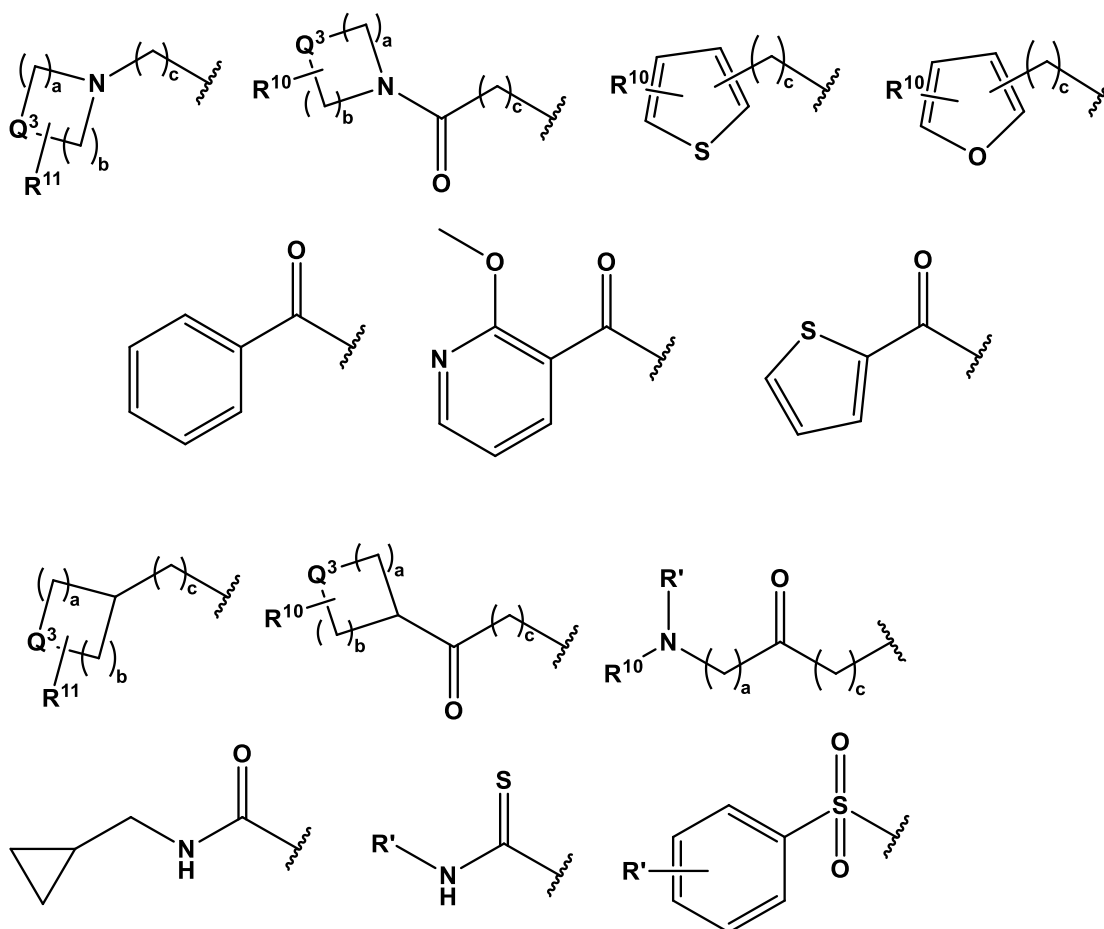




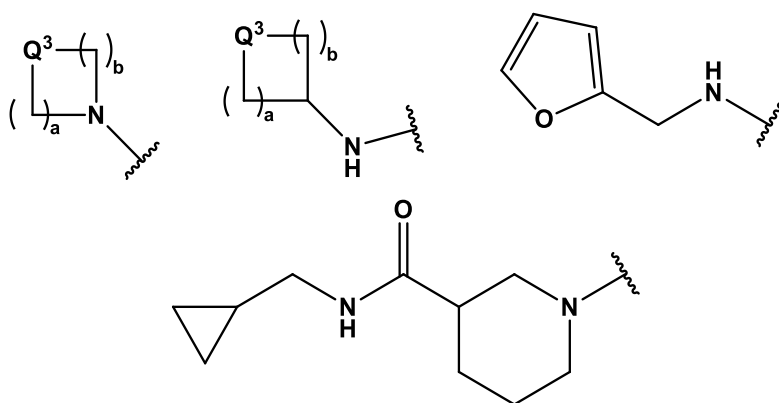
O



$R^8 = -H, -D, -OH$ , alquilo  $C_1-C_6$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$  o sus derivados halogenados,  $-(CH_2)_aNR'R''$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R^9$ ,  $-C(=NH)R^9$ ,  $-(CH_2)_aPh$ ,  $-(CH_2)_aPy$ ,  $-SO_2$ -alquilo  $C_1-C_4$  o  $R^8$  se selecciona entre las siguientes subestructuras:



$R^9 = -NR'R''$ , alquilo  $C_1-C_4$ , o sus derivados halogenados o  $R^9$  se selecciona entre las siguientes subestructuras:



$R^{10}$  y  $R^{11}$  se seleccionan de modo independiente de -H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados,  $-OR'$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R'$ , o halógeno;

$Q^1$  es  $CH_2$ , O, S,  $NR^8$ ;

$Q^2$  y  $Q^3$  son de modo independiente  $CR'R''$ ,  $CF_2$ , O, S,  $NR^8$ ;

$R'$  y  $R''$  son de modo independiente -H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados;

a, b, c, y  $R^8$  son como se definieron anteriormente.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde G se selecciona del grupo que consiste en tiofeno, pirrol, tetrazol, furano, 1,3,4-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, opcionalmente sustituido con halógeno, o hidroxilo.

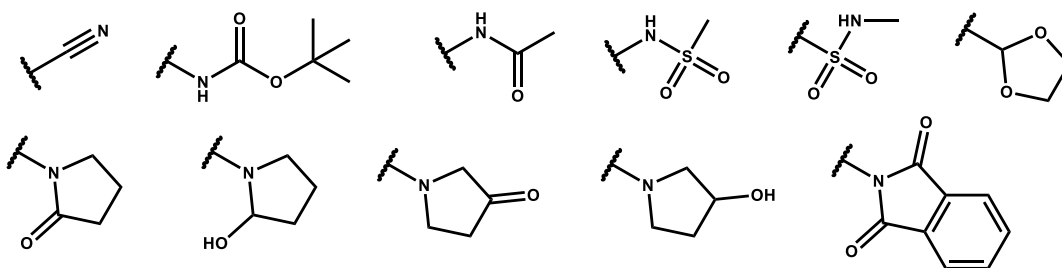
Con preferencia G se selecciona de tiofeno o furano, opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo.

Con más preferencia G se selecciona de tiofeno o furano, opcionalmente sustituido en position meta a 1,3,4-oxadiazol con Br, Cl o F o en la posición orto a 1,3,4-oxadiazol con Cl o F.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde Z es alquilo

C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, alcoxi o tioalcoxi, que incluye sus derivados halogenados o deuterados, y R<sup>3</sup> = H, D, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, no sustituido o sustituido con:

- hidroxilo, carbonilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, ariloxi o tioalcoxi, o sus derivados halogenados;
- halógeno;
- amina primaria, secundaria o terciaria, sustituida con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o sus derivados halogenados;
- fenilo, piridilo, tiofenilo, furano o pirrol, no sustituido o sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi, tioalcoxi o sus derivados halogenados, o halógeno;
- las siguientes subestructuras o sus derivados halogenados:

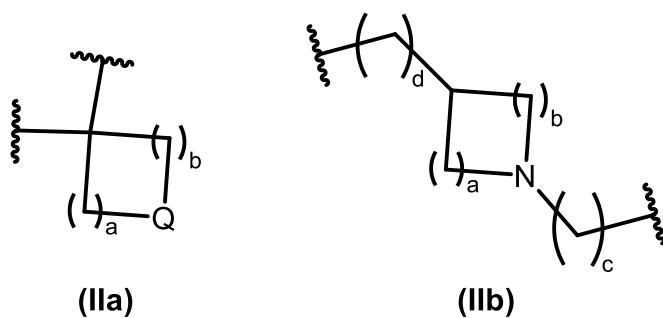


Con preferencia, Z es alquilo C<sub>1</sub> que incluye sus derivados halogenados o deuterados.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde L está ausente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CHR<sup>4</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH(NHR<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>4</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>- o sus derivados halogenados;

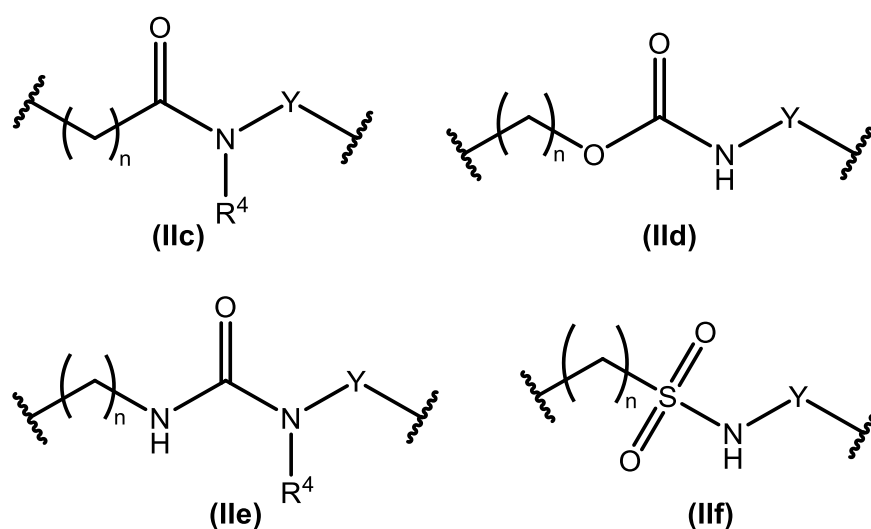
en donde m y o son cada uno de modo independiente 0, 1 o 2, con su suma no superior a 2; o

L se selecciona entre las siguientes subestructuras (IIa)-(IIf) y sus derivados halogenados:



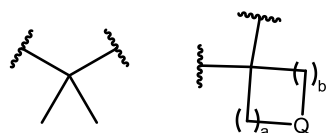
en donde a y b son de modo independiente 0, 1, 2, o 3 y a y b no puede ser 0 al mismo tiempo; c y d son de modo independiente 0, 1 o 2, con su suma no superior a 2;

Q es CH<sub>2</sub>, NR<sup>4</sup> u O;



en donde n es 0 o 1;

Y está ausente, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, o se selecciona entre las siguientes subestructuras y sus derivados halogenados:

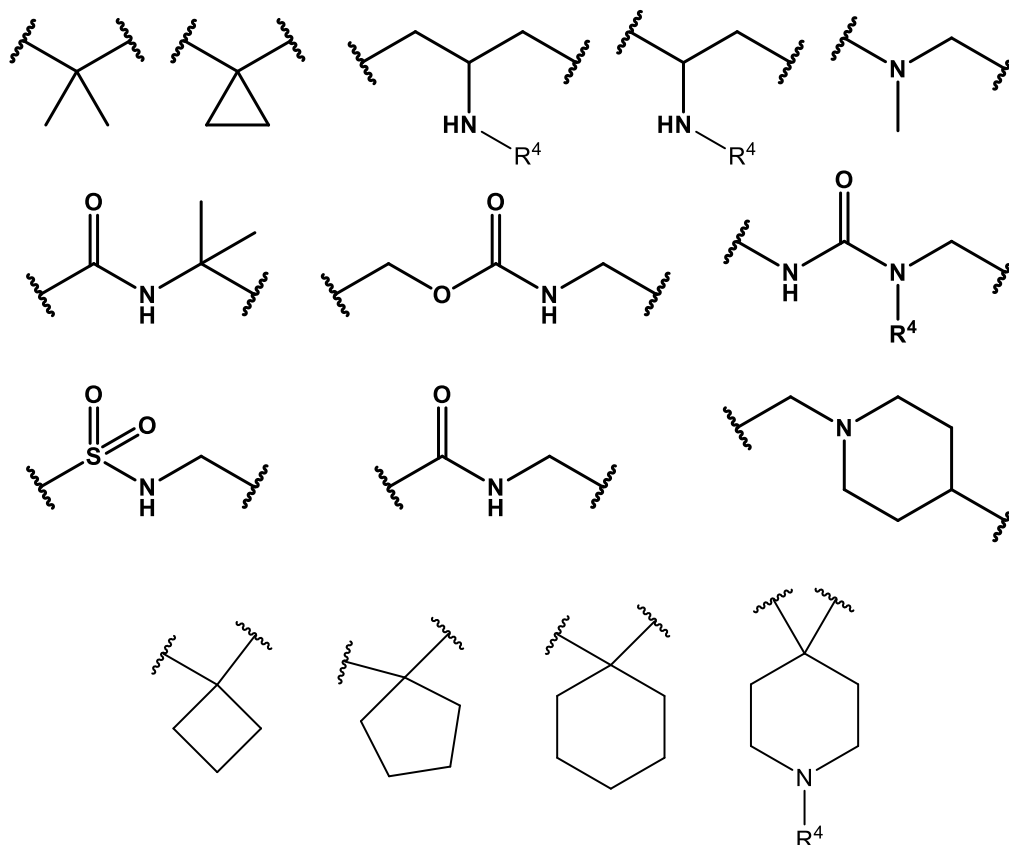


en donde a, b y Q son como se definieron anteriormente;

R<sup>4</sup> = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> no sustituido o sustituido con:

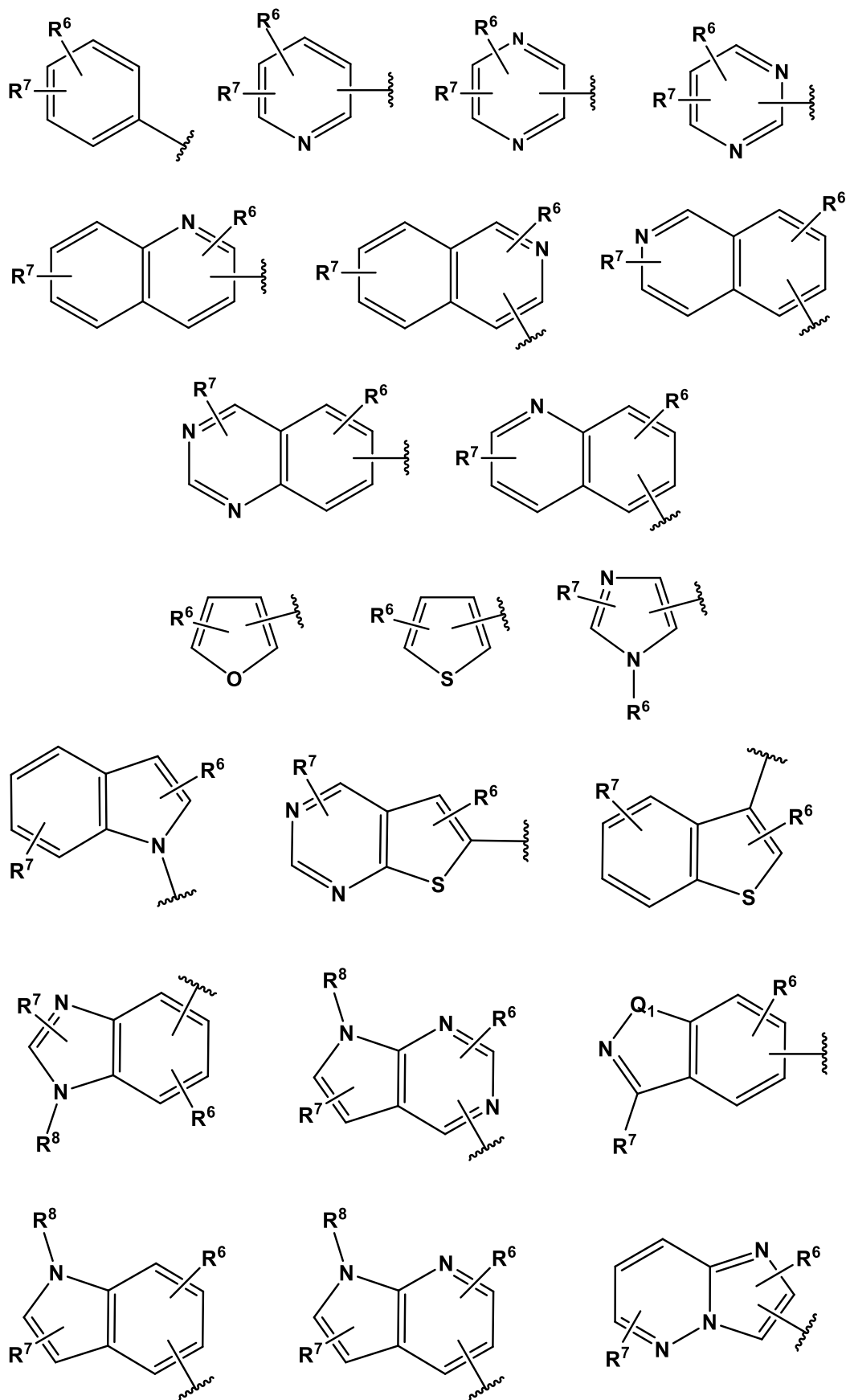
- halógeno
- fenilo, piridilo, tiofenilo, furano o pirrol, no sustituido o sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi, tioalcoxi o sus derivados halogenados, o halógeno.

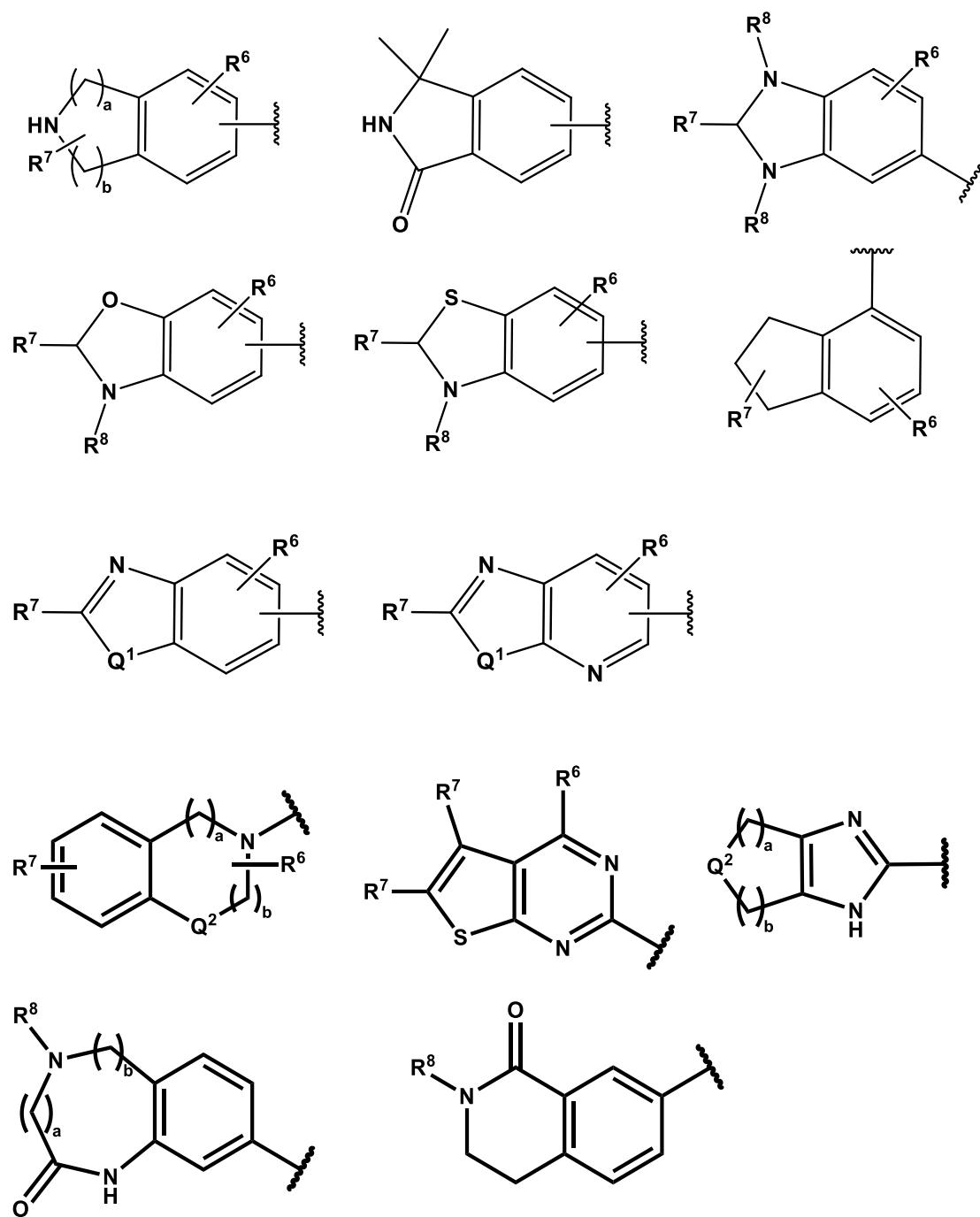
En una realización preferida adicional, L está ausente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-, -NH-, -CH<sub>2</sub>NH-, o -CH<sub>2</sub>O-; o L se selecciona entre las siguientes subestructuras:

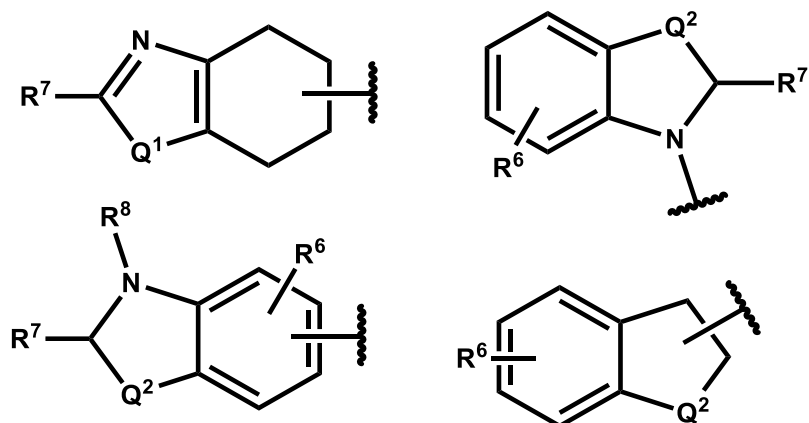


en donde R<sup>4</sup> = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde R<sup>2</sup> se selecciona entre las siguientes subestructuras:

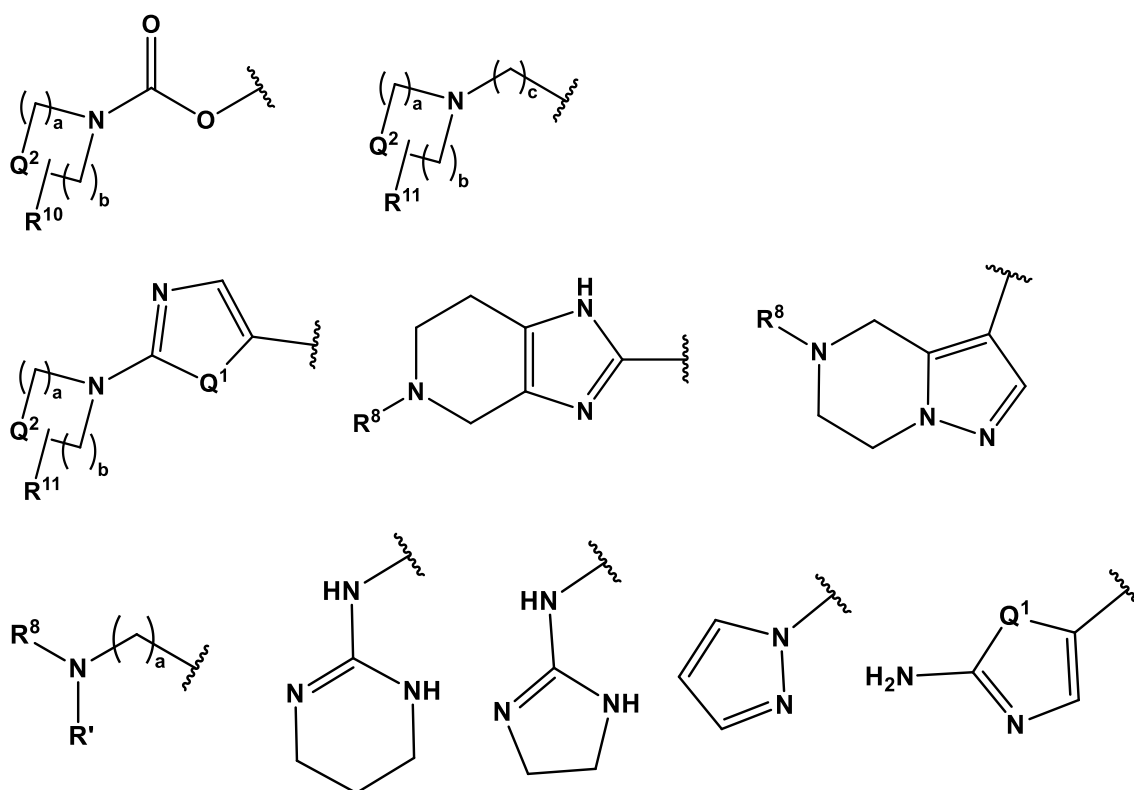


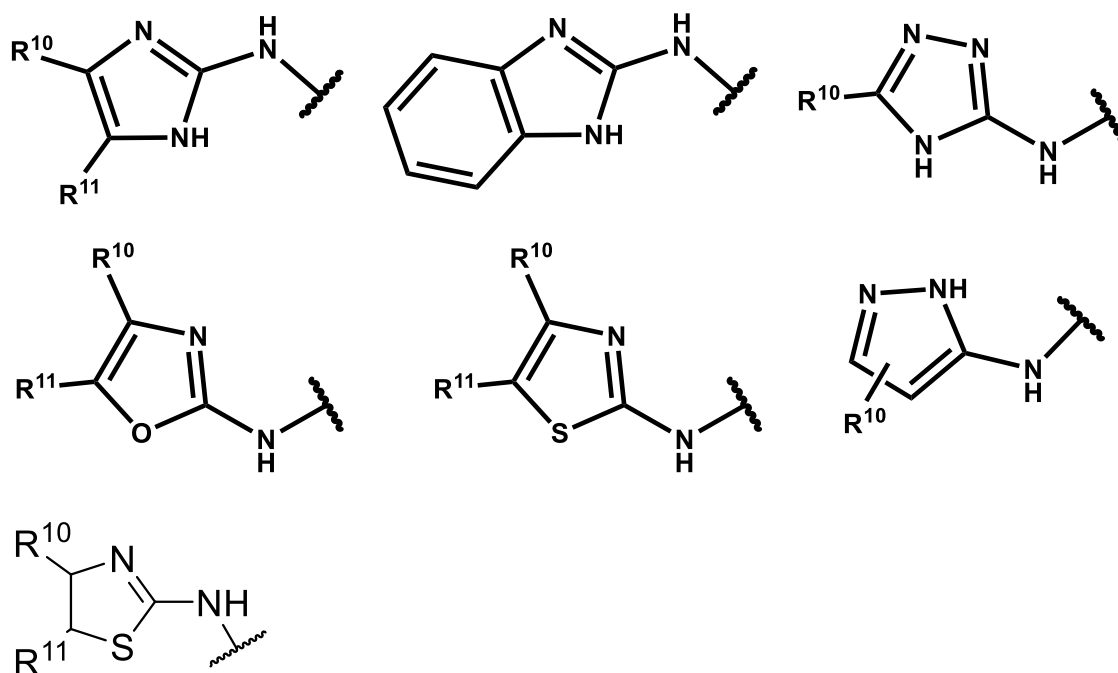




en donde R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan de modo independiente del grupo que comprende: - H, -D, -OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi o tioalcoxi, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o sus derivados halogenados, halógeno, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NR'R'', -NHR<sup>8</sup>, -C(=O)R<sup>9</sup>, -NO<sub>2</sub>, -Ph, -SO<sub>2</sub>-NR'R'', =O, =NR<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o -CH<sub>2</sub>OH, o

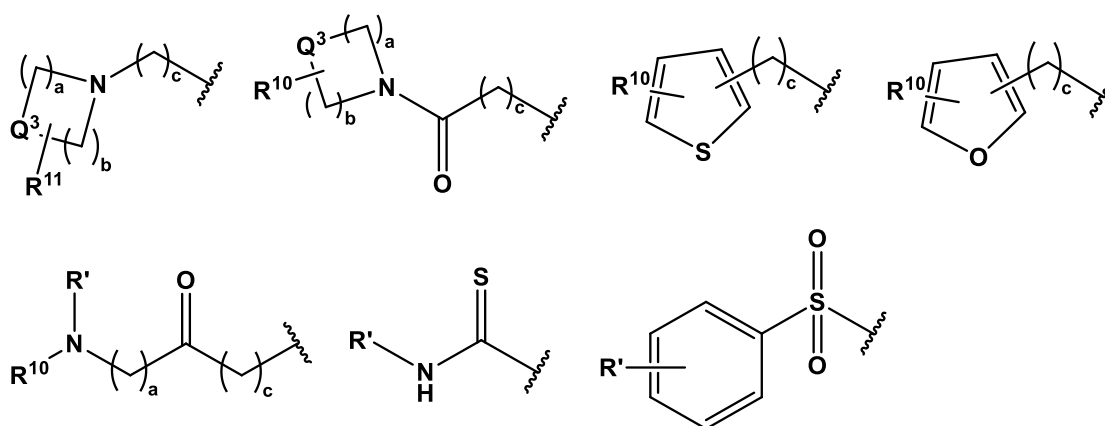
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan de modo independiente entre las siguientes subestructuras:



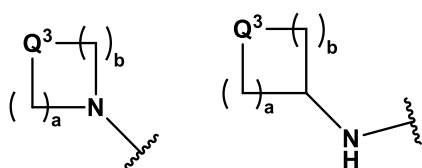


0

$R^8 = -H, -D, -OH$ , alquilo  $C_1-C_6$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$  o sus derivados halogenados,  $-(CH_2)_aNR'R''$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R^9$ ,  $-C(=NH)R^9$ ,  $-SO_2$ -alquilo  $C_1-C_4$  o  $R^8$  se selecciona entre las siguientes subestructuras:



$R^9 = -NR'R''$ , alquilo  $C_1-C_4$ , o sus derivados halogenados o se selecciona entre las siguientes subestructuras:



$R^{10}$  y  $R^{11}$  se seleccionan de modo independiente de -H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados, -OR', -C(=O)OR', -C(=O)R', o halógeno;

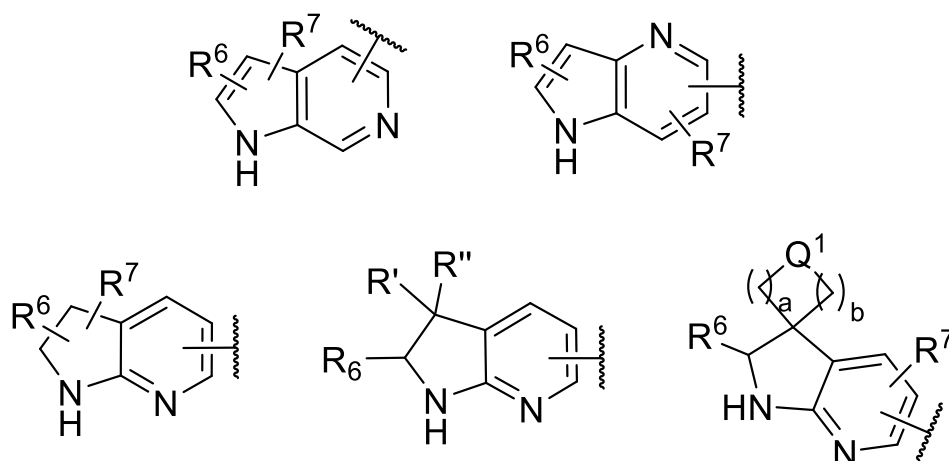
$Q^1$  es  $CH_2$ , O, S,  $NR^8$ ;

$Q^2$  y  $Q^3$  son de modo independiente  $CR'R''$ ,  $CF_2$ , O, S,  $NR^8$ ;

$R'$  y  $R''$  son de modo independiente -H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados;

a, b, c, y  $R^8$  son como se definieron anteriormente.

En una realización preferida adicional,  $R^2$  se selecciona entre las siguientes subestructuras:



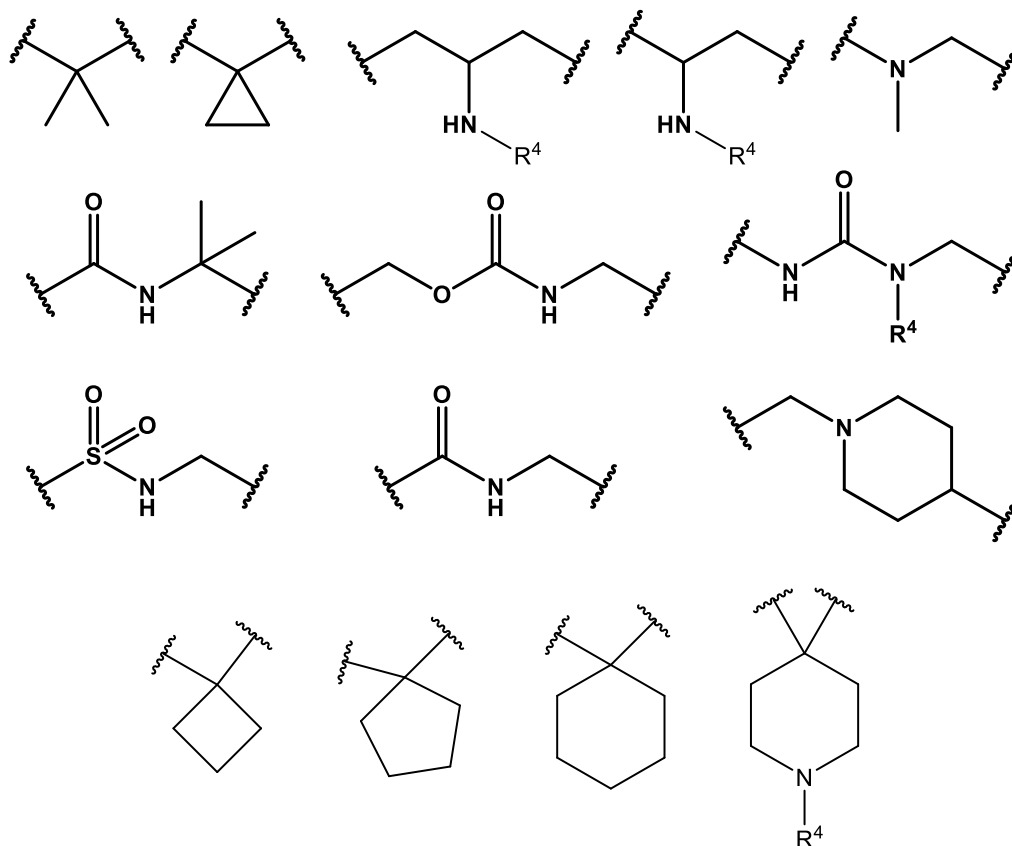
en donde  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R'$ ,  $R''$ , a, b, y  $Q^1$  son como se definieron anteriormente.

En una realización preferida, el anillo ABDEM se selecciona del grupo que consiste en 1,2,3-triazol, tetrazol, imidazol, pirazol, 1,3,4-tiadiazol y 1,3,4-oxadiazol.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde  $B = N$ , y A, D, E y M se seleccionan de modo independiente de C o N.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula (I) y sus sales, isómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables, en donde D y E se seleccionan de modo independiente de C, N u O;

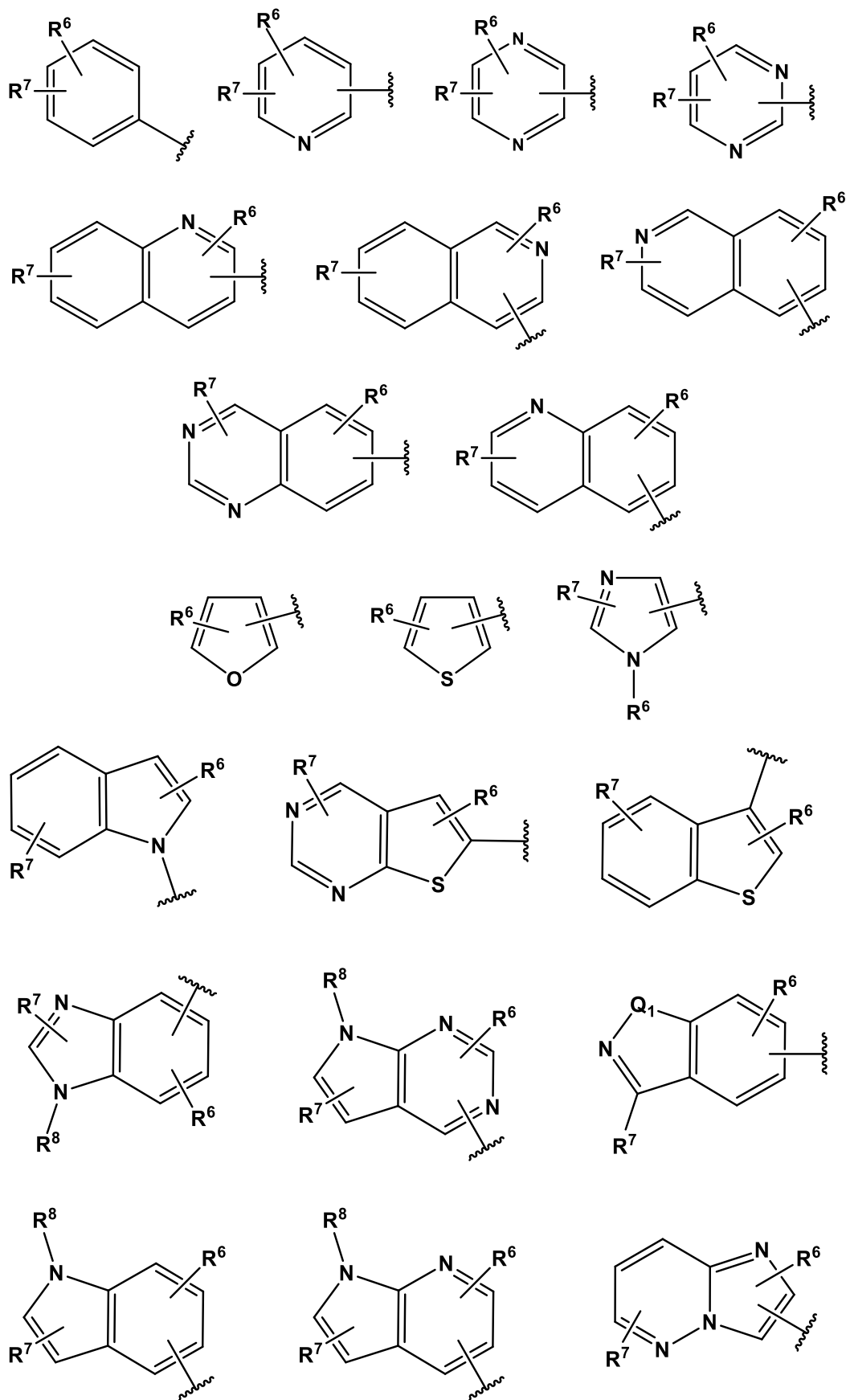
L = ausente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-, o L se selecciona de -NH-, -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>O-  
; o L se selecciona entre las siguientes subestructuras:

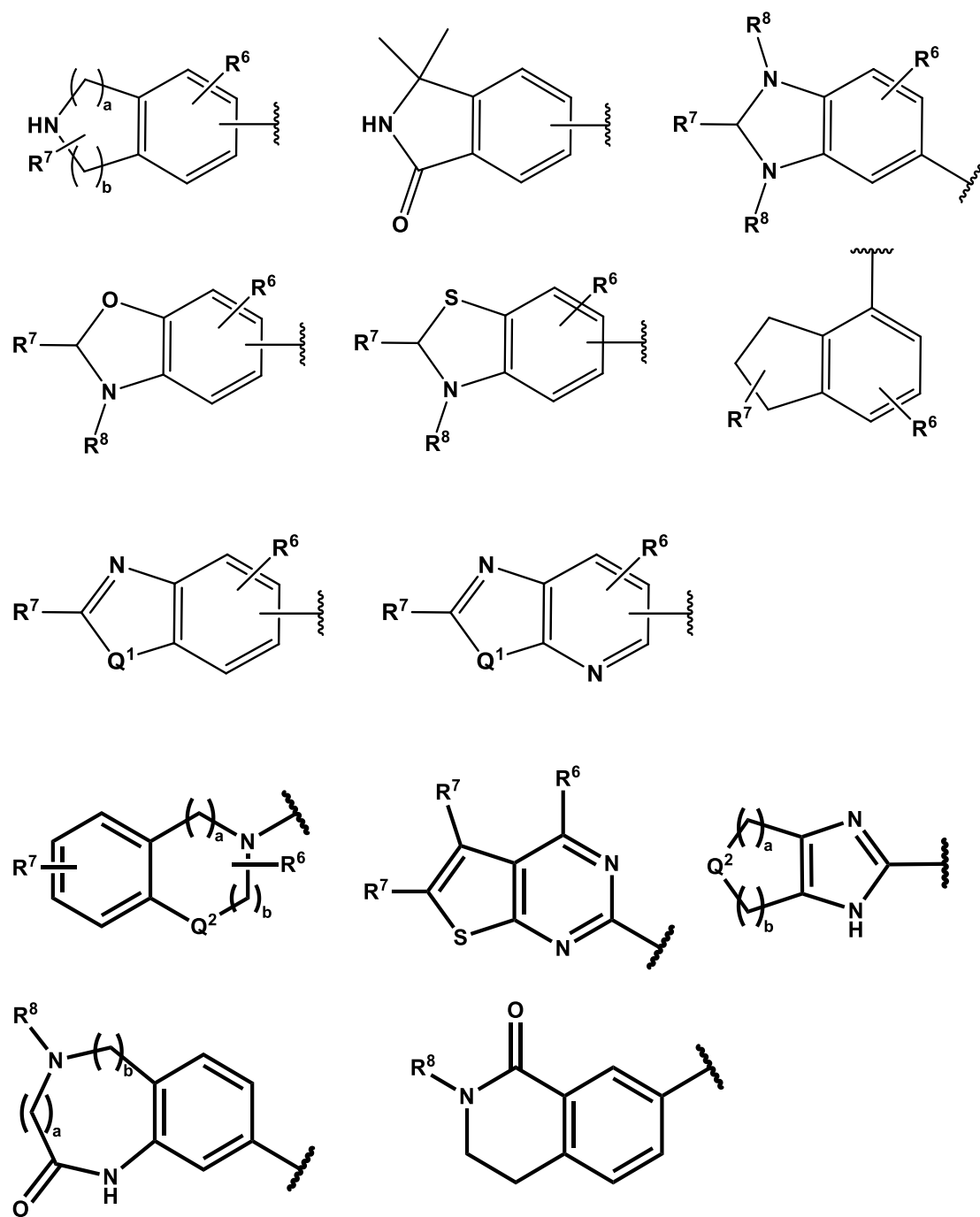


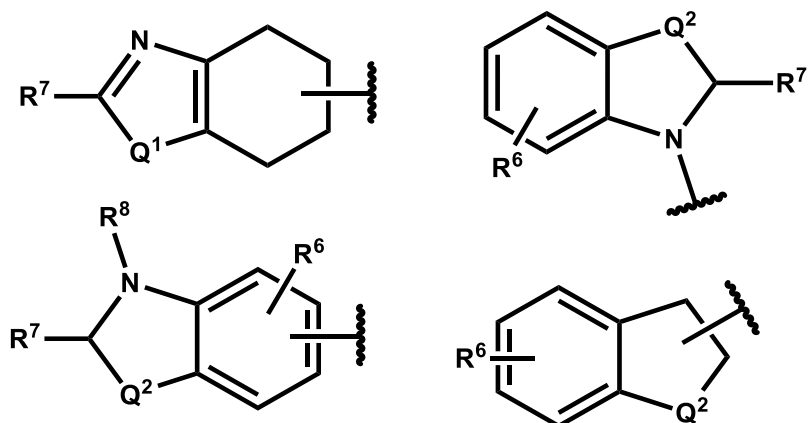
R<sup>4</sup> = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>1</sup> = ausente, -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -LR<sup>2</sup>; cuando R<sup>1</sup>= -LR<sup>2</sup>, la sustitución en M está ausente;

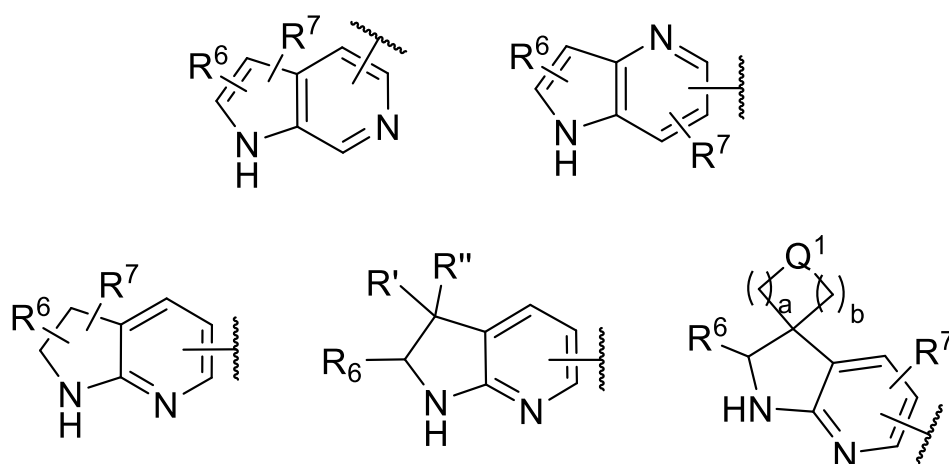
R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en:





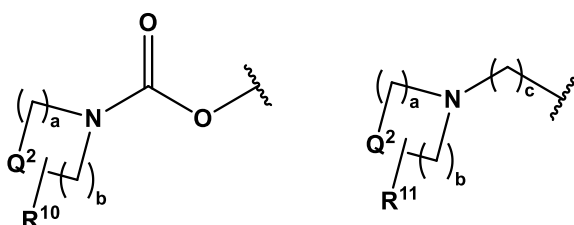


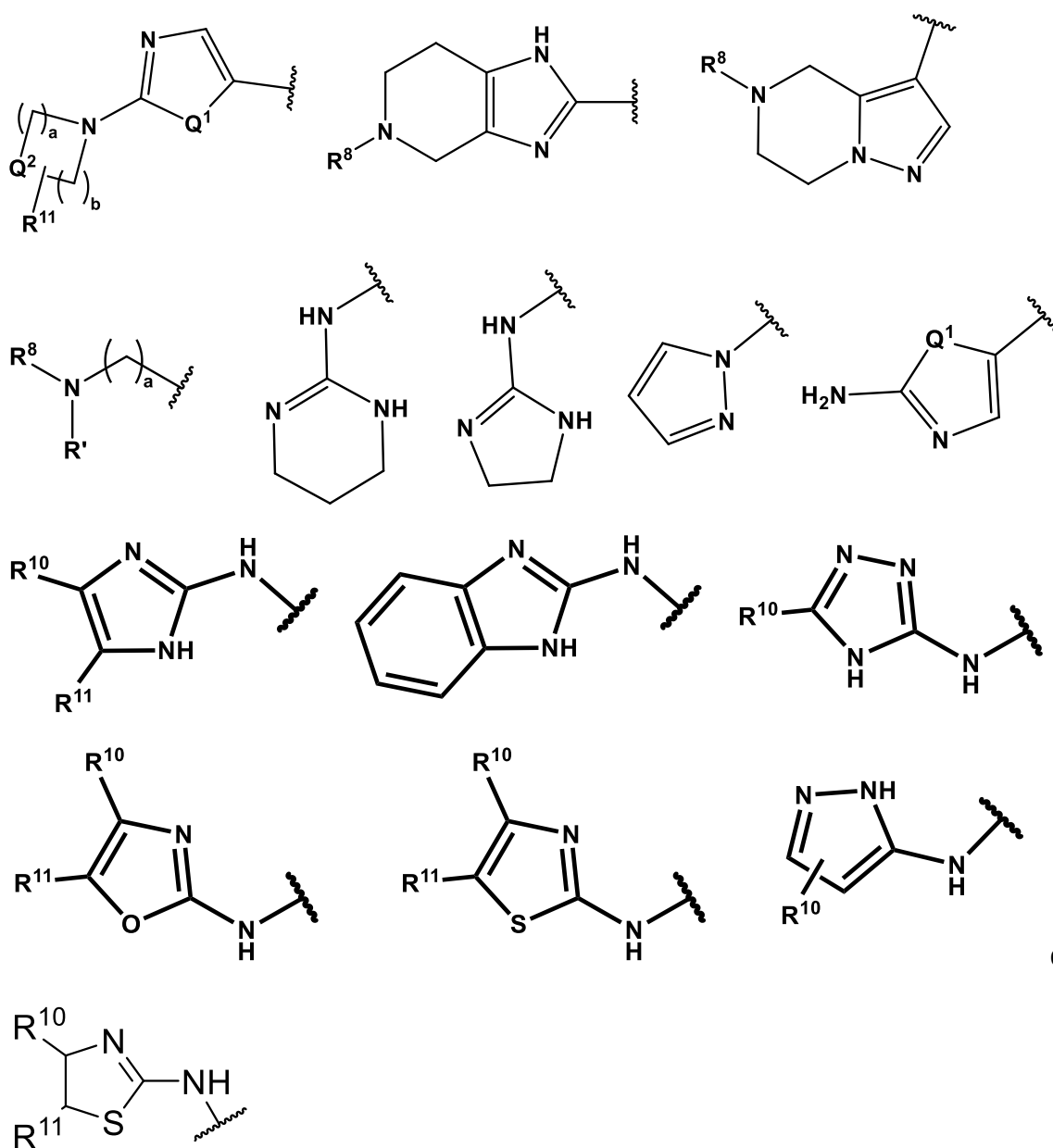
o  $R^2$  se selecciona del grupo que consiste en:



en donde  $R^6$  y  $R^7$  se seleccionan de modo independiente del grupo que comprende: - H, -D, -OH, alquilo  $C_1$ - $C_4$ , alcoxi o tioalcoxi, cicloalquilo  $C_3$ - $C_6$  o sus derivados halogenados, halógeno,  $-(CH_2)_aNR'R''$ ,  $-NHR^8$ ,  $-C(=O)R^9$ ,  $-NO_2$ , -Ph,  $-SO_2-NR'R''$ ,  $=O$ ,  $=NR^8$ ,  $-SO_2$ -alquilo  $C_1$ - $C_4$ , o  $-CH_2OH$ ; o

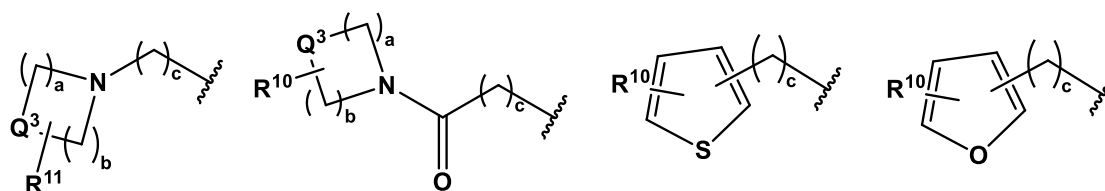
$R^6$  y  $R^7$  se seleccionan de modo independiente entre las siguientes subestructuras:

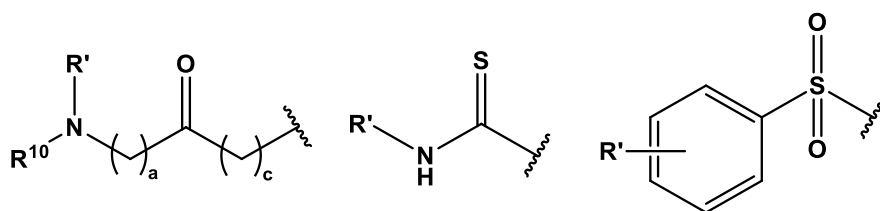




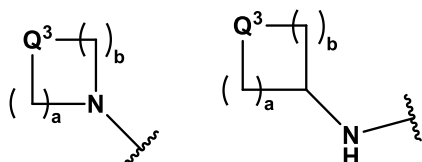
O

$R^8 = -H, -D, -OH$ , alquilo  $C_1-C_6$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$  o sus derivados halogenados, -  
 $(CH_2)_aNR'R''$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R^9$ ,  $-C(=NH)R^9$ ,  $-SO_2$ -alquilo  $C_1-C_4$  o  $R^8$  se selecciona  
entre las siguientes subestructuras:





$R^9 = -NR'R''$ , alquilo  $C_1-C_4$ , o sus derivados halogenados o se selecciona entre las siguientes subestructuras:



$R^{10}$  y  $R^{11}$  se seleccionan de modo independiente de  $-H$ , alquilo  $C_1-C_4$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$  o sus derivados halogenados,  $-OR'$ ,  $-C(=O)OR'$ ,  $-C(=O)R'$ , o halógeno;

$Q^1$  es  $CH_2$ ,  $O$ ,  $S$ ,  $NR^8$ ;

$Q^2$  y  $Q^3$  son de modo independiente  $CR'R''$ ,  $CF_2$ ,  $O$ ,  $S$ ,  $NR^8$ ;

$R'$  y  $R''$  son de modo independiente  $-H$ , alquilo  $C_1-C_4$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$  o sus derivados halogenados;

$a$ ,  $b$ ,  $c$ , y  $R^8$  son como se definieron anteriormente.

Se prefieren los siguientes compuestos de fórmula (I):

- 5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 1
- 2-(difluorometil)-5-[5-[(4-feniltriazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 2
- 4-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]anilina; comp. 3
- 2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 4
- 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 5
- 2-(difluorometil)-5-[5-[(4-feniltriazol-1-il)metil]furano-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 6

- 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]furano-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 7
- 5-[2-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]tetrazol-5-il]piridin-2-amina; comp. 8
- 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]tetrazol-5-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 9
- 6-[2-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]tetrazol-5-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 10
- 5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]furano-2-il]metil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 11
- 2-(difluorometil)-5-[5-[[5-(1-piridin-2-ilciclopropil)tetrazol-2-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 12
- 2-(difluorometil)-5-[4-[(4-feniltriazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 13
- 5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-3-il]metil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 14
- 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-3-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 15
- 2-[5-[[4-(2-clorofenil)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol; comp. 16
- 2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(2-metoxifenil)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 17
- 2-[5-[[4-(4-clorofenil)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol; comp. 18
- 2-[5-[(4-tert-butiltriazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol; comp. 19

- 5-(1-(1-(5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tetrahidrotiofen-2-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridin-2-amina ; comp. 20
- N-[3-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]fenil]morfolin-4-carboxamida; comp. 21
- 6-(1-((5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tiofen-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-amina; comp. 22
- 2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(4-metilfenil)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 23
- 5-(1-(2-(5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tetrahidrotiofen-2-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridin-2-amina; comp. 24
- 6-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 25
- 5-[1-[[5-[5-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 26
- 6-[1-[[5-[5-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 27
- 5-(1-((5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tiofen-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1-isopropil-1H-benzo[d]imidazol-2-amina; comp. 28
- 5-[1-[(1S)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 29
- 5-[1-[(1R)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 30
- 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1H-indazol-3-amina; comp. 31

6-[1-[(1S)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 32

6-[1-[(1R)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 33

N-[4-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]fenil]-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-amina; comp. 34

5-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]butil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 36

5-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]propil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 37

5-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-feniletil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 38

5-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-metilpropil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 39

5-[1-[1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-pirrolidin-1-iletel]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 40

2-(difluorometil)-5-[5-[(4-fenilpirazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 41

5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-

[1,3]tiazolo[5,4-b]piridin-2-amina; comp. 42

2-(difluorometil)-5-[5-[(4-fenilimidazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 43

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(3-metil-1H-pirrol[2,3-b]piridin-5-il)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 44

6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-3-metil-1,3-benzotiazol-2-imine; comp. 45

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(2-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 46

N-[5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-2-hidroksifenil]morfolin-4-carboxamida; comp. 47

6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-5-metoksi-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 48

5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 49

6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]-4-fluorotiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 50

5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,2-benzotiazol-3-amina; comp. 51

5-[1-[(1R)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]propil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 52

5-[1-[(1S)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]propil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 53

5-{1-[(1R)-1-{5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il}-2-(pirrolidin-1-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}piridin-2-amina; comp. 54

5-{1-[(1S)-1-{5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il}-2-(pirrolidin-1-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}piridin-2-amina; comp. 55

5-[1-[2-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]propil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 56

2-[5-[[4-(3-ciclobutil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol; comp. 57

5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-3,3-dimetil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-ona; comp. 58

5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-dihidropirrolo[2,3-b]piridin-2-ona; comp. 59

[5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il]metanol; comp. 60

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 61

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(2,3-dimetil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 62

5-[1-[(1S)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-feniletil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 63

5-[1-[(1R)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-feniletil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 64

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-6-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 65

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(6-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 66

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(6-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 67

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(2-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-6-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 68

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(1H-pirrolo[3,2-b]piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 69

2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(1H-pirrolo[2,3-c]piridin-5-il)triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 70

2-(difluorometil)-5-[5-[(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 71

1-[5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]etanona; comp. 72

2-(difluorometil)-5-[5-[(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 73

2-(difluorometil)-5-[5-[(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 74

2-(difluorometil)-5-[5-[(5-fenil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 75

2-(difluorometil)-5-[5-[(3-fenil-1,2-oxazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 76

2-(difluorometil)-5-[5-[(4-fenil-1,3-tiazol-2-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 77

2-(difluorometil)-5-[5-[(2-fenil-1,3-tiazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 78

N-[4-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]fenil]-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-amina; comp. 79

N-[4-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]fenil]-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-amina; comp. 80

N-[5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]acetamida; comp. 82

6-[1-[[3-bromo-5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina; comp. 83

2-(difluorometil)-5-[5-[(2-fenil-1,3-oxazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp.

84

2-(difluorometil)-5-[5-[(2-fenil-1,3-tiazol-4-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 85

6-(1-((5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-3-fluorotiofen-2-il)metil)-1H-1,2,3-

triazol-4-il)benzo[d]tiazol-2-amina; comp. 87

N-(3-(4-(6-aminopiridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3-(5-(5-(difluorometil)-1,3,4-

oxadiazol-2-il)tiofen-2-il)propil)metansulfonamida; comp. 88

2-(difluorometil)-5-(5-((5-feniloxazol-2-il)tio)tiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol; comp. 91

2-(difluorometil)-5-(5-((3-fenil-1,2,4-tiadiazol-5-il)tio)tiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol; comp.

92

5-(1-((4-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tiofen-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-

il)piridin-2-amina; comp. 93

5-(1-((4-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)furano-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-

il)piridin-2-amina; comp. 94

2-(difluorometil)-5-(5-((4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)tiofen-2-il)-1,3,4-

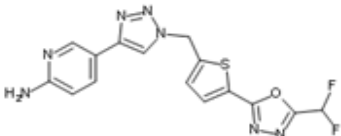
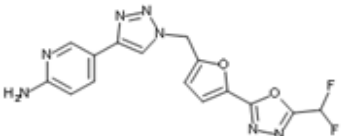
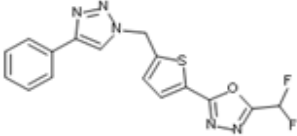
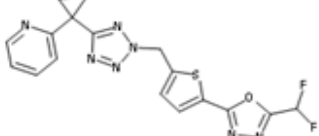
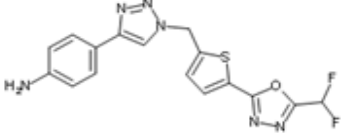
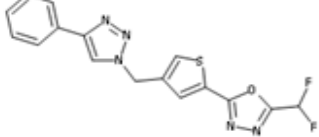
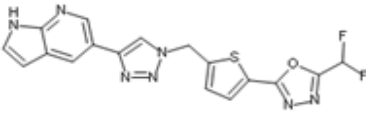
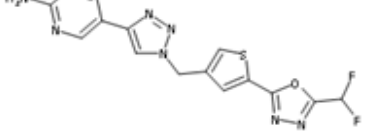
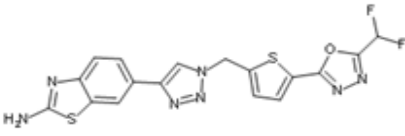
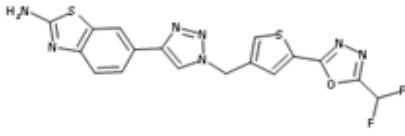
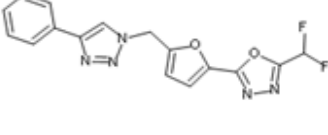
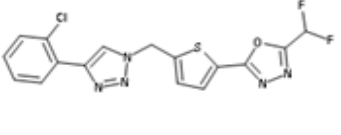
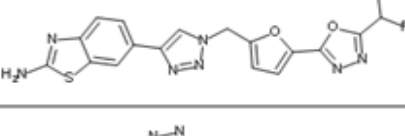
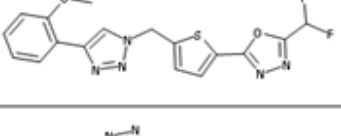
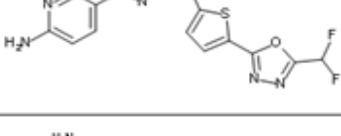
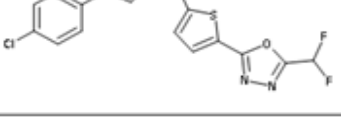
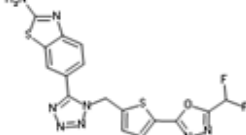
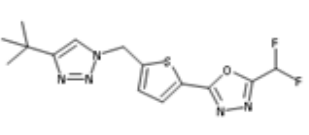
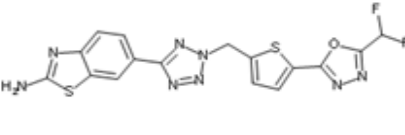
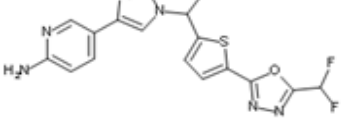
oxadiazol; comp. 98

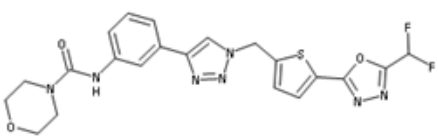
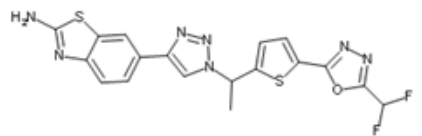
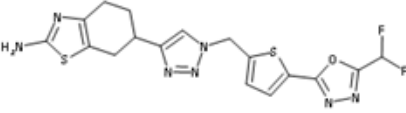
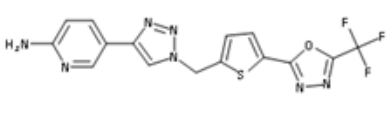
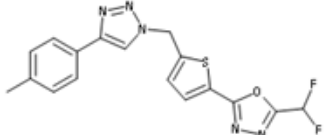
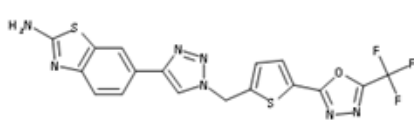
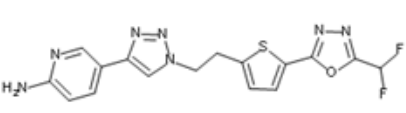
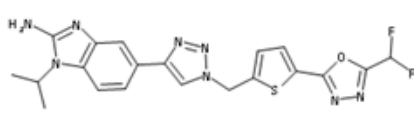
2-(difluorometil)-5-(5-(((5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)oxi)metil)tiofen-2-il)-1,3,4-

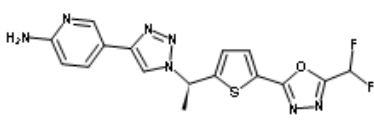
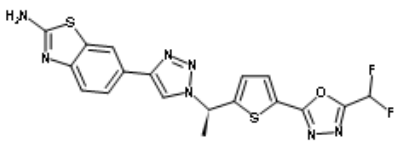
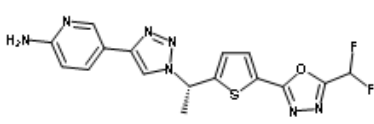
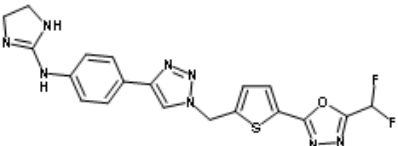
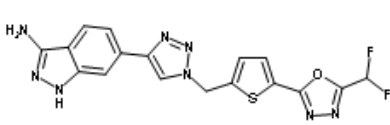
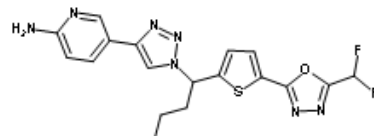
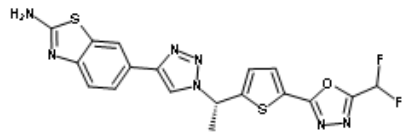
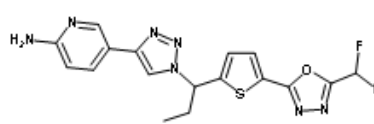
oxadiazol; comp. 101

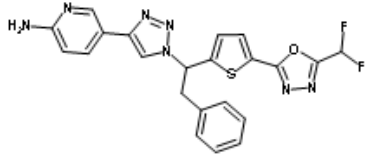
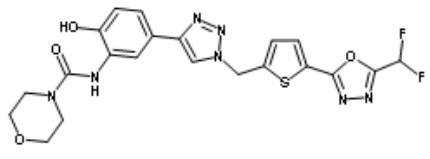
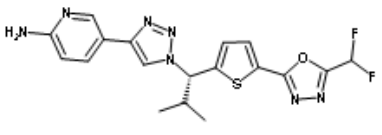
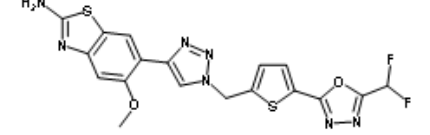
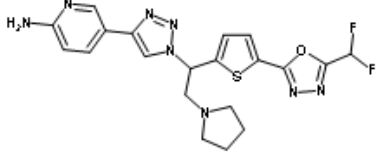
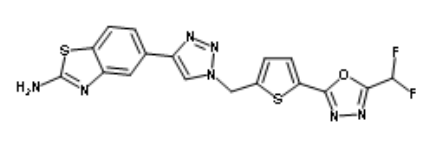
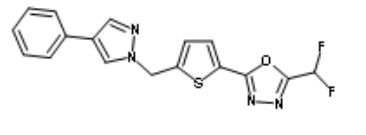
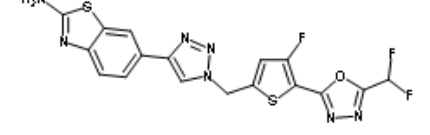
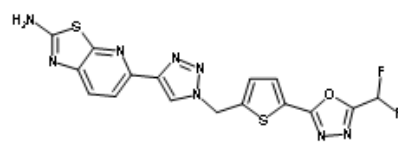
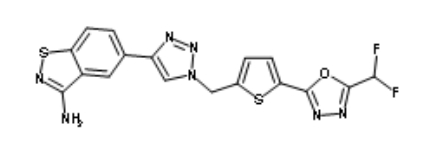
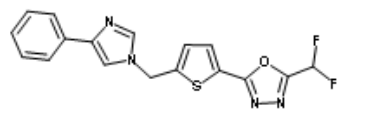
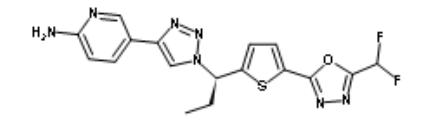
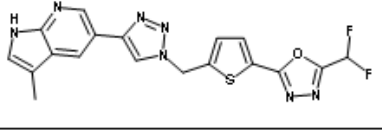
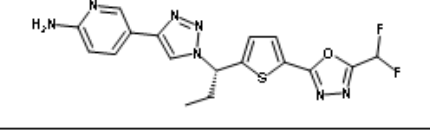
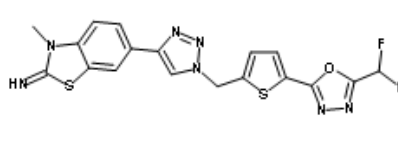
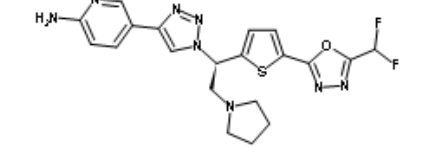
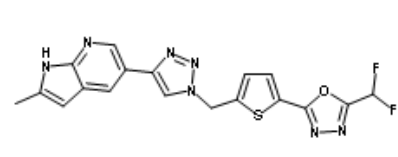
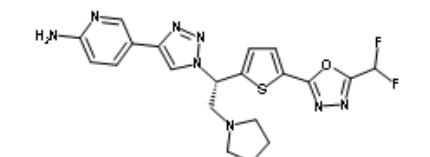
2-(difluorometil)-5-(5-(((4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)metil)tiofen-3-il)-

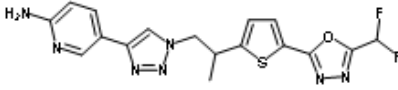
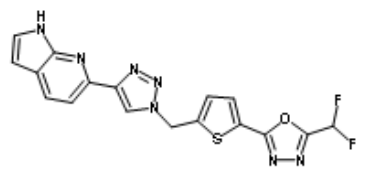
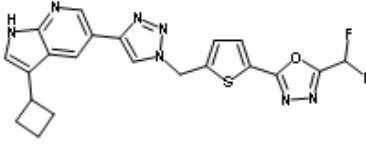
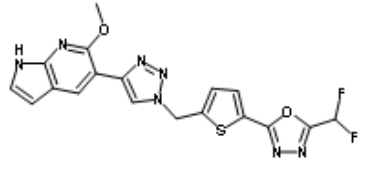
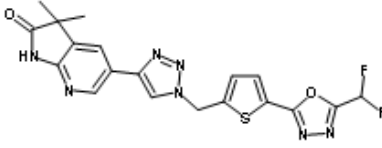
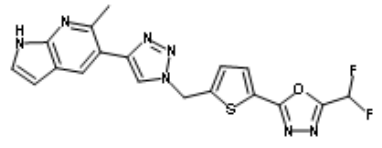
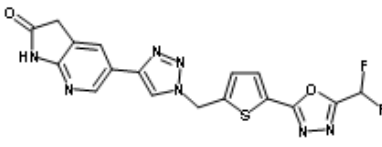
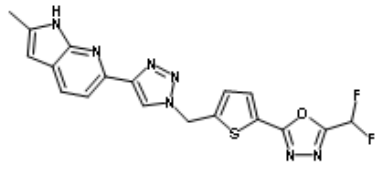
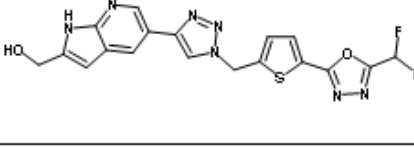
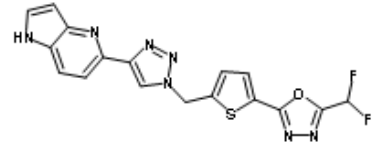
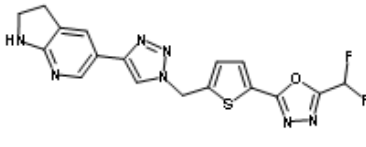
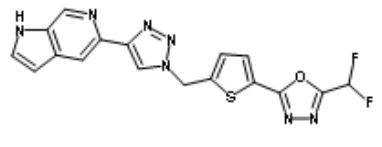
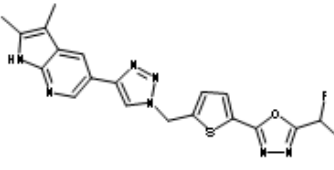
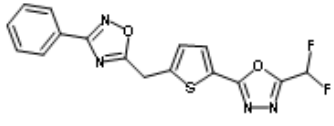
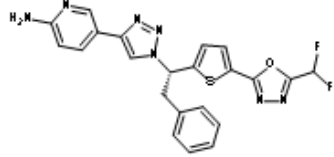
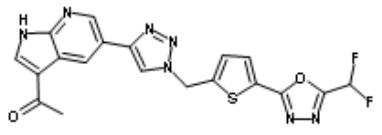
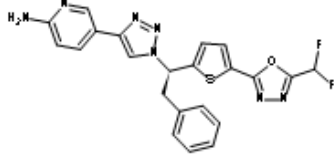
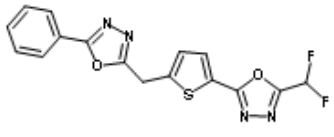
1,3,4-oxadiazol; comp. 104

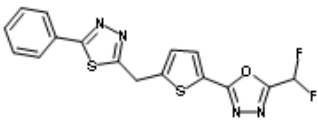
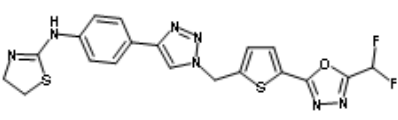
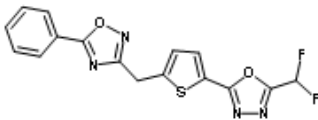
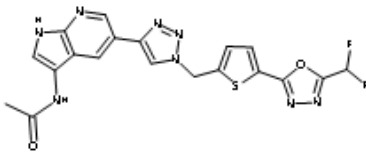
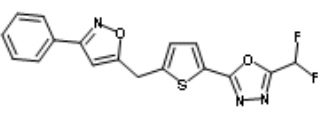
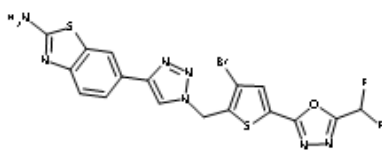
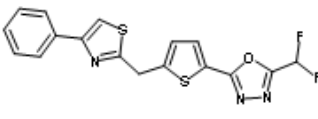
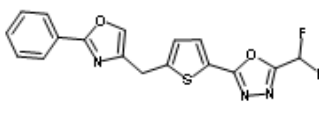
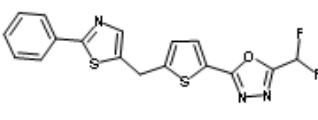
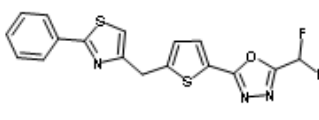
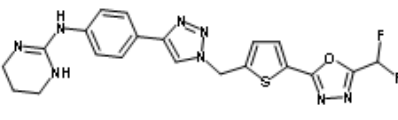
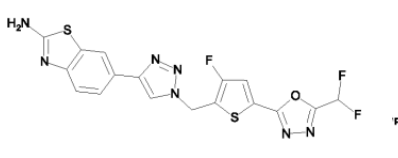
| Comp. | QUÍMICA                                                                             | Comp. | QUÍMICA                                                                               |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     |    | 11    |     |
| 2     |    | 12    |    |
| 3     |    | 13    |    |
| 4     |    | 14    |     |
| 5     |  | 15    |   |
| 6     |  | 16    |  |
| 7     |  | 17    |  |
| 8     |  | 18    |  |
| 9     |  | 19    |  |
| 10    |  | 20    |   |

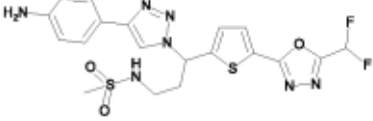
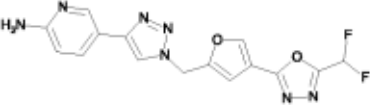
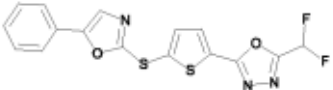
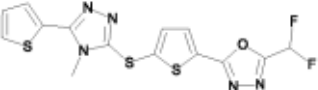
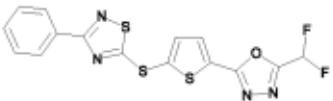
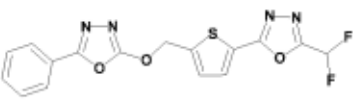
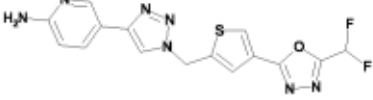
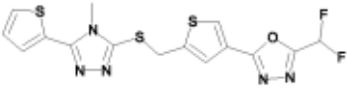
| Comp. | QUIMICA                                                                           | Comp. | QUIMICA                                                                            |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 21    |  | 25    |  |
| 22    |  | 26    |  |
| 23    |  | 27    |  |
| 24    |  | 28    |  |

| Comp. | QUIMICA                                                                             | Comp. | QUIMICA                                                                              |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 29    |  | 33    |  |
| 30    |  | 34    |  |
| 31    |  | 36    |  |
| 32    |  | 37    |  |

| Comp. | QUIMICA                                                                             | Comp. | QUIMICA                                                                              |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 38    |    | 47    |    |
| 39    |    | 48    |    |
| 40    |    | 49    |    |
| 41    |    | 50    |    |
| 42    |  | 51    |  |
| 43    |  | 52    |  |
| 44    |  | 53    |  |
| 45    |  | 54    |  |
| 46    |  | 55    |  |

| Comp. | QUIMICA                                                                             | Comp. | QUIMICA                                                                              |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 56    |    | 65    |    |
| 57    |    | 66    |    |
| 58    |    | 67    |    |
| 59    |    | 68    |    |
| 60    |  | 69    |  |
| 61    |  | 70    |  |
| 62    |  | 71    |  |
| 63    |  | 72    |  |
| 64    |  | 73    |  |

| Comp. | QUIMICA                                                                             | Comp. | QUIMICA                                                                              |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 74    |    | 80    |    |
| 75    |    | 82    |    |
| 76    |    | 83    |    |
| 77    |    | 84    |   |
| 78    |   | 85    |  |
| 79    |  | 87    |  |

| Comp. | QUIMICA                                                                           | Comp. | QUIMICA                                                                            |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 88    |  | 94    |  |
| 91    |  | 98    |  |
| 92    |  | 101   |  |
| 93    |  | 104   |  |

Los siguientes compuestos de fórmula (I) son particularmente preferidos: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 76, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 91, 93, 94, 98 y 104.

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más centros quirales (átomos de carbono asimétricos), por lo que pueden existir en formas enantioméricas y/o diastereoisoméricas.

Todos los isómeros ópticos posibles, solos o mezclados entre sí, se hallan dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar solos o en combinación con otros fármacos tales como inhibidores de proteasoma, inhibidores

inmunoquímicos, esteroides, inhibidores de bromodominio y otros fármacos epigenéticos, agentes quimioterapéuticos tradicionales, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, vincristina, cisplatino, taxol, inhibidores del proteasoma, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, bortezomib, inhibidores de quinasa tal como, por ejemplo, pero sin limitación, inhibidores de los puntos de control de la familia JAK, CTLA4, PD1 o PDL1, tal como nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab o BMS-936559 (anti-PD1), atezolizumab o avelumab (anti-PDL1), ipilimumab o tremelimumab (anti-CTLA4).

Un segundo objeto de la presente invención son los anteriores compuestos de fórmula (I) para su uso como medicamentos.

Un tercer objeto de la presente invención son los compuestos anteriores para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno modulado por HDAC6. Los compuestos de la invención solos o en combinación son con preferencia útiles para el tratamiento de neuropatías periféricas, tanto de origen genético, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, inducidas por medicación (quimioterapia o antibióticos, tal como las clases metronidazol y fluoroquinolona) como debidas a enfermedades sistémicas, tal como diabetes o lepra o, en general, para el tratamiento de neuropatías periféricas correlacionadas con un déficit grave de transporte axonal. Los compuestos de la invención también pueden ser útiles para el tratamiento del deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia (CRCI).

Los compuestos de la invención solos o en combinación son con preferencia útiles para el tratamiento del rechazo de injertos, GVHD, miositis, enfermedades asociadas con funciones linfocitarias anormales, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, neuropatía periférica, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias,

cáncer y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades oculares (por ejemplo, uveítis).

Un cuarto objeto de la presente invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables, isómeros y profármacos farmacológicamente aceptables de los mismos, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dichas composiciones pueden ser líquidas, adecuadas para administración enteral o parenteral, o sólidas, por ejemplo, en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos o gránulos para administración oral, o en formas adecuadas para administración cutánea tales como cremas o ungüentos, o para administración por inhalación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos.

### **Vía de síntesis general**

Los compuestos descritos en la presente invención se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia.

Todos los materiales de partida, reactivos, ácidos, bases, solventes y catalizadores utilizados en la síntesis de los compuestos descritos están disponibles comercialmente.

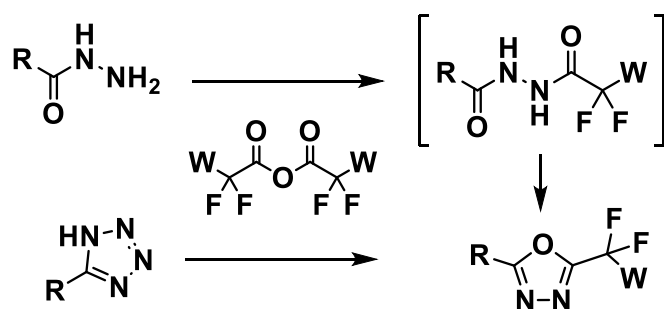
La progresión de la reacción se monitoreó mediante análisis TLC, HPLC, UPLC o HPLC-MS.

Los compuestos finales se analizaron mediante HPLC y LC-MS. El análisis cromatográfico se realizó con un HPLC 1100 Agilent equipado con un detector de matriz de diodos. Se utilizó una columna cromatográfica XTerra RP18 3,5  $\mu\text{m}$  2,1×150

mm (Waters). La fase móvil consistió en: (A) ácido trifluoroacético 0,1% en agua y (B) ácido trifluoroacético 0,1% en acetonitrilo. El programa de gradiente se fijó de 0 a 100% (B) en 39 minutos, y el caudal de flujo fue de 0,2 ml/min. El análisis LCMS se realizó utilizando un HPLC Shimadzu Nexera X2 conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 3200 QTrap (Ab Sciex). El instrumento estaba equipado con una fuente de iones Turbo Spray, que opera en modo positivo. Se estableció un análisis de barrido completo en el rango  $m/z$  50-800 amu. Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna cromatográfica XTerra RP18 3,5  $\mu$ m 2,1×150 mm (Waters). La fase móvil consistió en: (A) ácido fórmico 0,1% en agua y (B) ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo. El programa de gradiente se fijó de 0 a 100% (B) en 39 minutos, y el caudal de flujo fue de 0,3 ml/min.

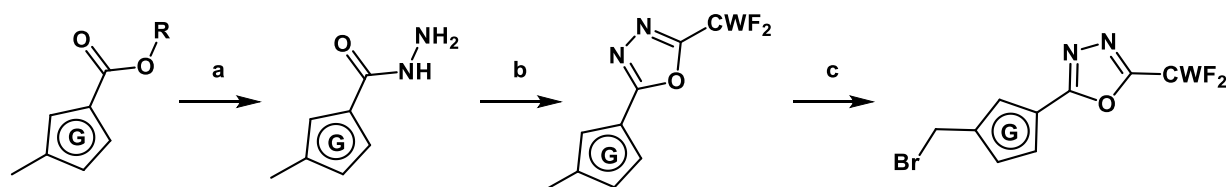
Las moléculas 2-(difluorometil)- y 2-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol se sintetizaron en la mayoría de los casos, se tratan la hidrazida correspondiente con un exceso de anhídrido difluoroacético o trifluoroacético respectivamente (ver esquema 1). El anhídrido tiene una doble función de agente acilante y deshidratante (Lee, Jaekwang; Han, Younghue; Kim, Yuntae; Min, Jaeki; Bae, Miseon; Kim, Dohoon; Jin, Seokmin; Kyung, Jangbeen; 2017; "1,3,4-Oxadiazole sulfonamide derivatives as histone deacetylase 6 inhibitors and their pharmaceutical composition and preparation"; WO2017018805). El reactivo de Burgess puede ayudar a la ciclización de la acilhidrazida intermedia. En algunos casos, el resto de 2-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol se preparó a partir del tetrazol correspondiente, que se convirtió en 2-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol en presencia de anhídrido difluoroacético. (Vereshchagin et al *Rus. J. Org. Chem.* **2007**, 43(11), 1710 – 1714).

Esquema 1 – Síntesis del resto de 2-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol



La síntesis de compuestos basados en 1,2,3-triazoles y tetrazoles se basó en los intermediarios comunes 2-(4-(bromometil)aril)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazoles o 2-(4-(bromometil)aril)-5-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazoles (Esquema 2). Los metil o etil ésteres se trataron con hidrazina para obtener las hidrazidas correspondientes, que se convirtieron en moléculas de difluorometil y trifluorometil-1,3,4-oxadiazol como se describió anteriormente. A continuación, se obtuvieron intermediarios de bromometilo por bromación en posición bencílica con N-bromosuccinimida y azobisisobutironitrilo (AIBN) o peróxido de dibenzoilo (BPO) como catalizador.

Esquema 2 – Síntesis de intermediarios comunes de 2-(4-(bromometil)aril)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol<sup>a</sup>

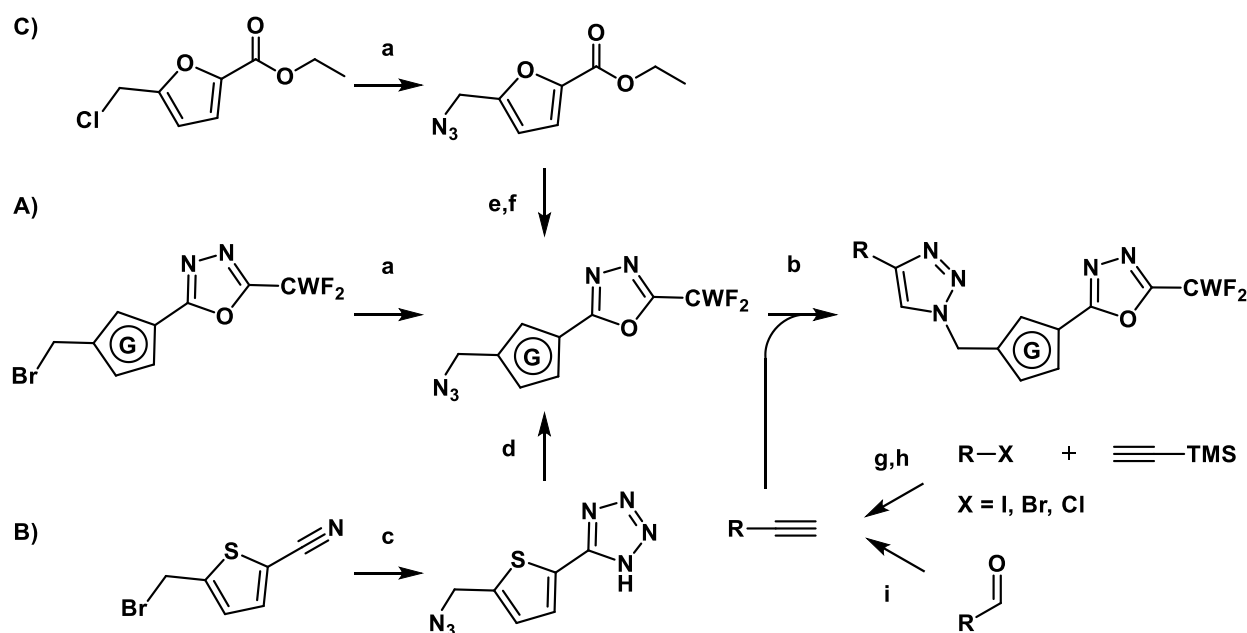


<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MeOH, reflujo; (b) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (c) NBS, AIBN o BPO,  $\text{CCl}_4$ ,  $80^\circ\text{C}$

La conversión de bromuro en azida y la reacción de clic CuAAC de un solo tubo con un alquino apropiado dieron productos que contienen 1,2,3-triazol (Esquema 3A) (en placa: T. Suzuki et al. J. Med. Chem. 2012, 55(22), 9562-9575; en lote: T.U. Connell et al. J. Label Compd. Radiopharm. 2014, 57, 262-269.). En algunos casos se aisló el intermediario 2-(4-(azidometil)aril)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol a partir del correspondiente (halometil)aril nitrilo mediante la introducción concomitante del resto azido y la formación de tetrazol (Esquema 3B). A continuación, el tetrazol se transformó en el resto 5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol como se describió

anteriormente. Cuando el (halometil)aril éster estaba disponible comercialmente, como en el caso del 5-(clorometil)furano-2-carboxilato de etilo (Esquema 3C), la instalación del resto de DFMO o TFMO como se describió anteriormente seguía a la conversión del haluro en azida, en presencia de azida sódica.

### Esquema 3 – Síntesis de compuestos que incorporan 1,2,3-triazol<sup>a</sup>

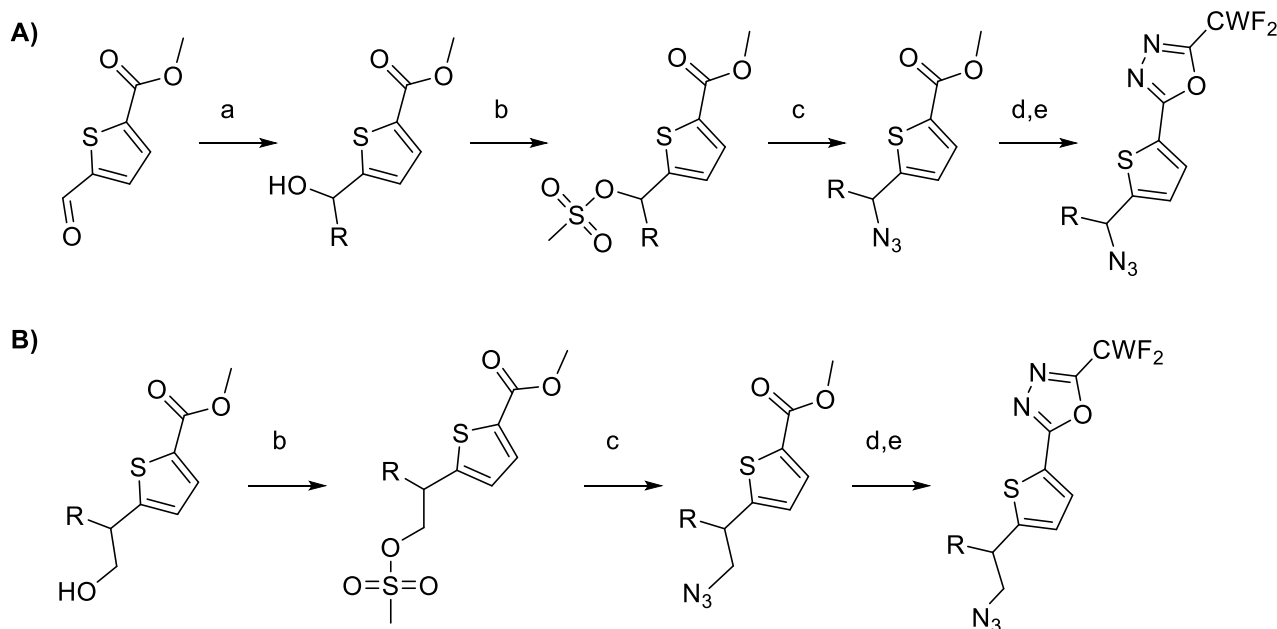


<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 1h, r.t.; (b)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ascorbato de sodio, DMF: $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 16h, 40 °C; (c)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 16h, r.t.  $\rightarrow$  70 °C; (d) DFAA, DCM, r.t.  $\rightarrow$  40 °C; (e)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MeOH, refluxo; (f) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (g)  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ , CuI,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF; (h) TBAF, DMF o  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH; (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, luego reactivo de Ohira-Bestmann.

Los alquinos arílicos no comerciales se prepararon mediante acoplamiento Sonogashira, reacción de un haluro de arilo adecuado con etil(trimetil)silano en presencia de trietilamina, utilizando [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) ( $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ ) y yoduro de cobre(I) como catalizadores (A. G. Sams et al Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011, 21(11), 3407-3410), y posterior escisión de la protección TMS con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) o carbonato de potasio en metanol. La síntesis de alquinos alifáticos se llevó a cabo a partir de los aldehídos correspondientes en condiciones de Ohira-Bestmann, con carbonato de potasio en metanol (Hönig, M., Carreira, E. M. Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59(3), 1192 - 1196).

En algunos casos el resto de 2-(difluorometil)- o 2-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol se sintetizó en la última etapa.

Esquema 4 – Síntesis de intermediarios azida que tienen  $Z \neq \text{CH}_2$ <sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a) RMgX, THF; (b) MsCl, TEA, DCM; (c) NaN<sub>3</sub>, DMF, 1h, r.t.; (d) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, MeOH, reflujo; (e) DFAA o TFAA, DMF, r.t.;

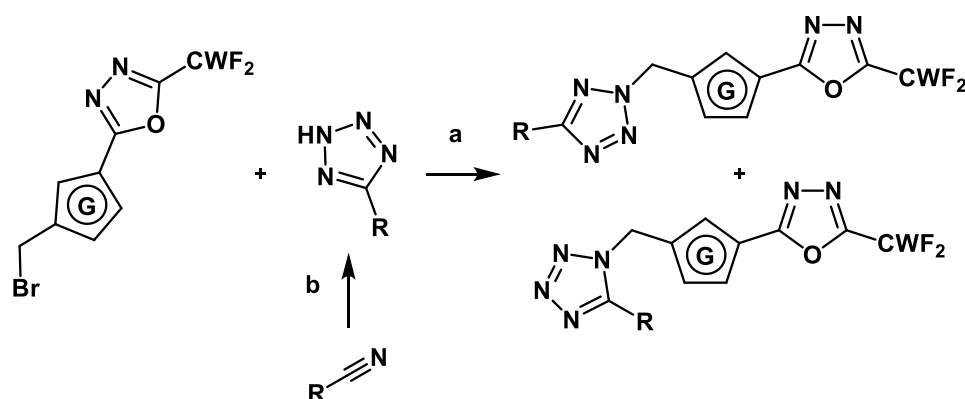
Cuando  $Z \neq \text{CH}_2$ , se siguió la misma vía sintética para formar el andamio central de 1,2,3-triazol. En los ejemplos descriptos, la síntesis de la azida adecuada pasó por la activación de un grupo hidroxilo con cloruro de mesilo y la posterior sustitución nucleofílica en presencia de azida sódica. El precursor del alcohol, cuando no estaba disponible comercialmente, se preparó a partir de un aldehído, que se sometió a la reacción de Grignard. Por último, el metil éster se convirtió en DFMO o TFMO como ya se ha descrito (esquema 4). De acuerdo con la naturaleza del sustituyente R<sub>3</sub>, pueden ser necesarias diversas estrategias (Marchini M. et al WO 2022/029041 A1).

Los compuestos portadores de tetrazol como andamio central se sintetizaron por sustitución nucleofílica, haciendo reaccionar el intermediario común bromometilo con 5-(difluorometil)- o 5-(trifluorometil)-1,3,4-oxadiazol (descrito anteriormente, esquema 2) con tetrazoles sustituidos apropiados en DMF a temperatura ambiente durante la noche, utilizando carbonato de potasio como base (ver el esquema 5). Se obtiene una

mezcla de regioisómeros en proporciones variables, generalmente el regioisómero 2,5-sustituido el más abundante. Los regioisómeros se separaron fácilmente mediante cromatografía flash.

La misma estrategia se siguió en el caso de los imidazoles y pirazoles como andamio central (Esquema 6).

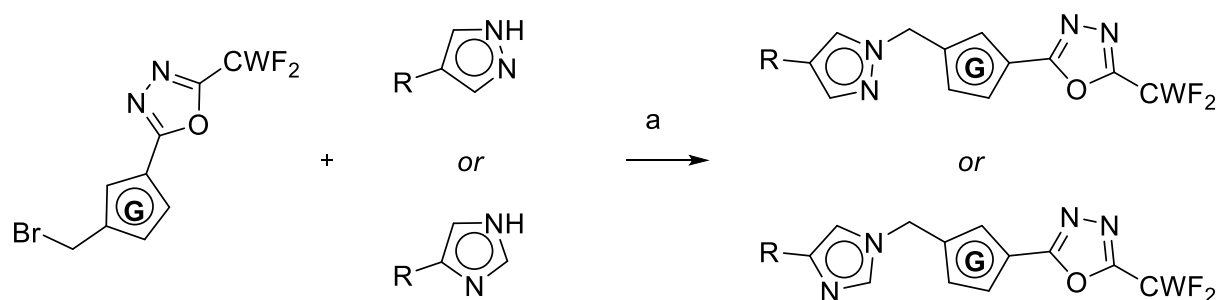
Esquema 5 – Síntesis de compuestos que contienen tetrazol<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $K_2CO_3$ , DMF; (b)  $NaN_3$ ,  $NH_4Cl$ , DMF, 100 °C.

Se dispone comercialmente de varios tetrazoles sustituidos. Los bloques de construcción no comerciales se sintetizaron a partir del carbonitrilo correspondiente por reacción con un exceso de azida sódica en presencia de cloruro de amonio.

Esquema 6 – Síntesis de compuestos que contienen pirazol y imidazol<sup>a</sup>

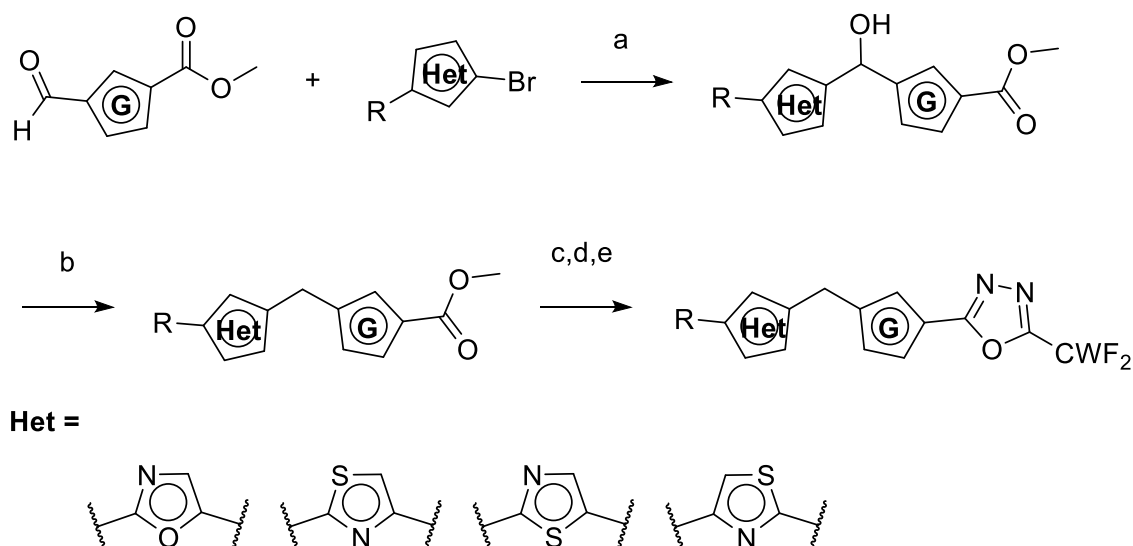


<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $K_2CO_3$ , DMF.

La etapa clave para la síntesis de compuestos que contienen oxazoles y tiazoles como andamio central es la preparación de reactivos de Grignard mediante intercambio metal-halógeno, a partir del correspondiente bromuro de arilo en presencia de  $iPrMgCl$ . Los reactivos de Grignard arílicos así obtenidos se hicieron reaccionar directamente con el formil metiléster correspondiente para proporcionar un alcohol

secundario, que se redujo con TES. El metiléster se convirtió en DFMO o TFMO como ya se ha descrito. Para facilitar la ciclización final, se utilizó el reactivo de Burgess (esquema 7).

#### Esquema 7 – Síntesis de compuestos que contienen oxazol o tiazol<sup>a</sup>

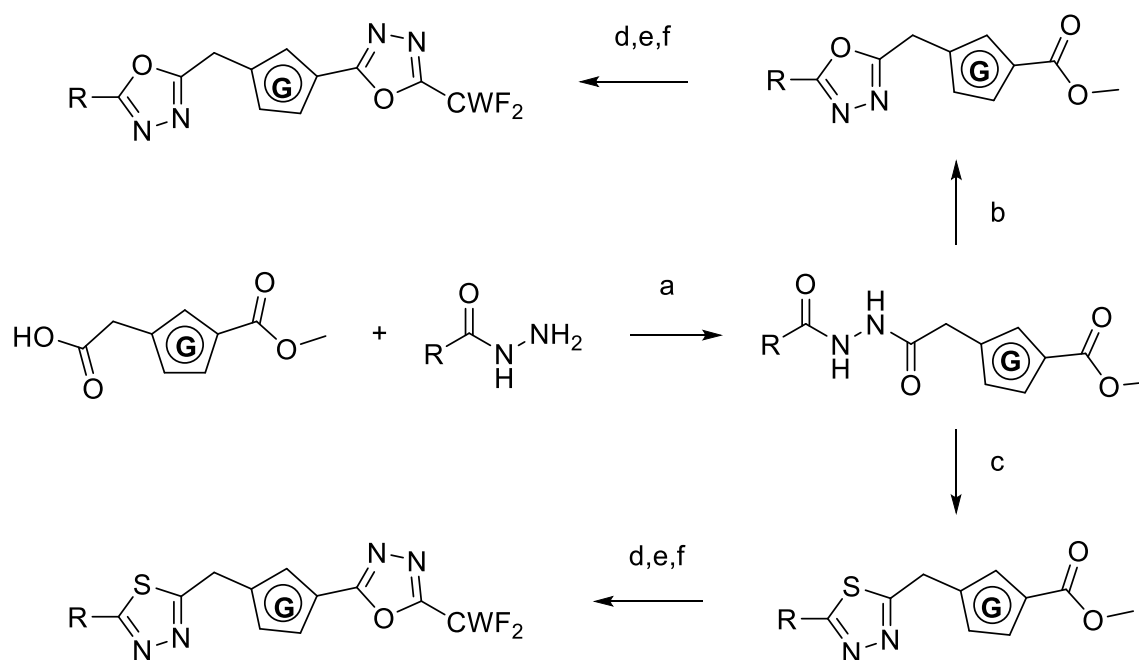


<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $i\text{PrMgCl}$ , THF; (b)  $\text{Et}_3\text{SiH}$ , TFA, DCE; (c)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MeOH, reflujo; (d) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (e) reactivo de Burgess, THF, 65 °C.

Se prepararon compuestos con andamios centrales de 1,3,4-oxadiazol o 1,3,4-tiadiazol mediante la síntesis de un intermediario clave acilhidrazida, utilizando reactivos comunes de acoplamiento amida. Al tratar la acilhidrazida con el reactivo de Burgess, se formó el 1,3,4-oxadiazol, mientras que el 1,3,4-tiadiazol se formó en presencia del reactivo de Lawesson. En ambos casos, se formó DFMO (o TFMO) en la última etapa (Esquema 8).

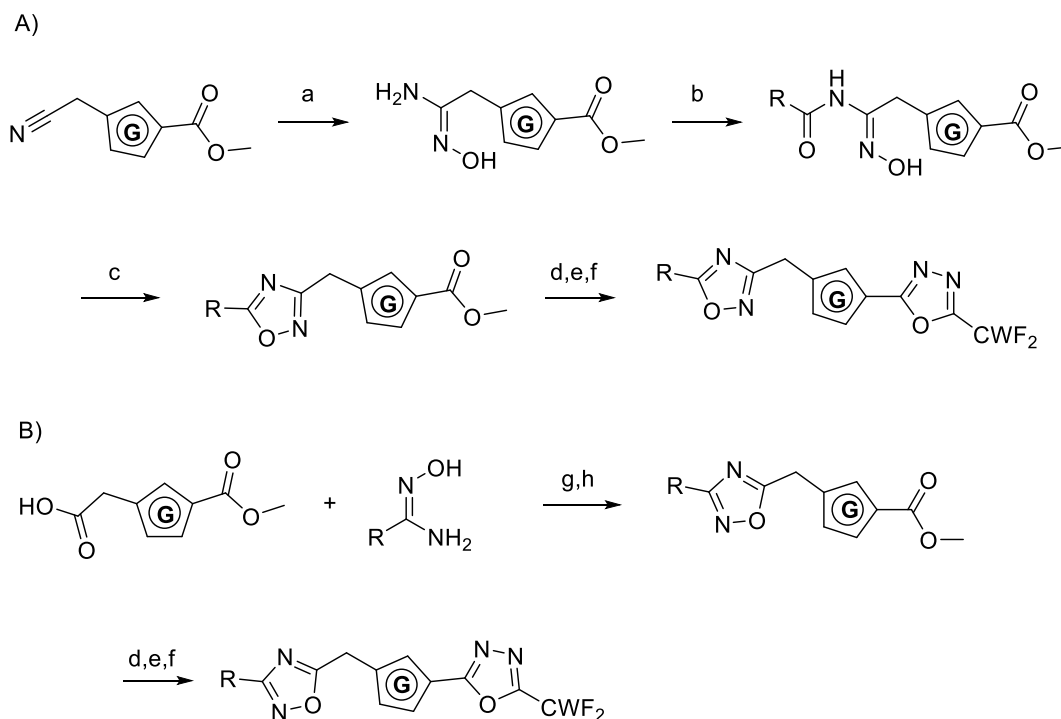
En el caso de la síntesis de compuestos que contienen 1,2,4-oxadiazoles (ambos regioisómeros), se hace reaccionar una amidoxima con un ácido carboxílico activado adecuado para formar un intermediario acilamidoxima, que rápidamente da lugar al producto ciclizado. También en este caso, se formó DFMO (o TFMO) en la última etapa (Esquema 9). Se utilizó el reactivo de Burgess para ciclizar la acilhidrazida intermedia.

#### Esquema 8 – Síntesis de compuestos que contienen 1,3,4-oxadiazol o 1,3,4-tiadiazol<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a) HATU, DIPEA, DMF; (b) reactivo de Burgess, THF, 65 °C; (c) reactivo de Lawesson, THF, 50 °C; (d) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, MeOH, refluxo; (e) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (f) reactivo de Burgess, THF, 65 °C.

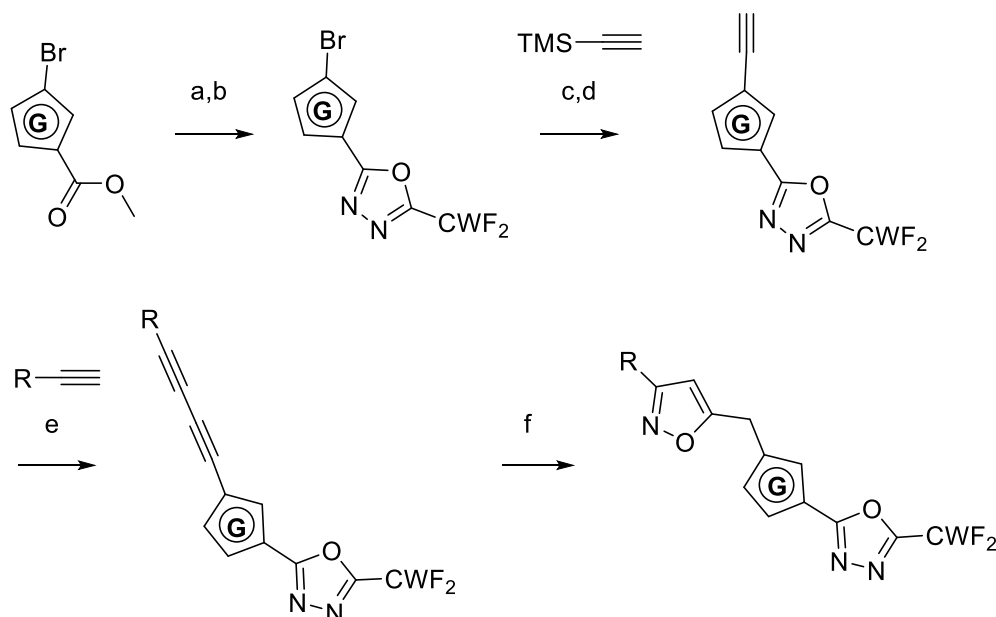
### Esquema 9– Síntesis de compuestos que contienen 1,2,4-oxadiazol<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $\text{NH}_2\text{OH}$ , MeOH, 1h, 50 °C; (b)  $\text{RCO}_2\text{H}$ , HATU, DIPEA, DMF; (c) DMF, MW, 150 °C, 5 min; (d)  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, reflujo; (e) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (f) reactivo de Burgess, THF, 65 °C; (g) HATU, DIPEA, DMF; (h) 80°C, 4 h.

Los compuestos que contienen 1,2-oxazol se obtuvieron mediante la reacción de Sonogashira, mediante la reacción de 2-(difluorometil) o (trifluorometil) -5-(4-bromoaril)-1,3,4-oxadiazol con etil(trimetil)silano y trietilamina, en presencia de CuI y [1,1'-Bis(trifenilfosfino)dicloropaladio(II)] ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ) como catalizadores. La protección con trimetilsililo se eliminó mediante tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio (esquema 10). El intermediario obtenido se sometió a acoplamiento Glazer con un alquino apropiado en presencia de acetato de cobre(II) (B. Nammalwar et al WO2017083434 2017; Ding, Shi et al Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018, 28(2), 94-102), que proporciona un intermediario abierto, que se ciclizó mediante tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina y trietilamina a 100 °C (L. Wang et al Org. Lett. 2012, 14(9), 2418-2421).

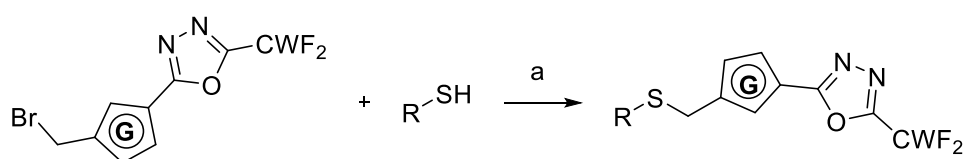
Esquema 10 – Síntesis de compuestos que contienen 1,2-oxazol<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MeOH, reflujo; (b) DFAA o TFAA, DMF, r.t.; (c) CuI,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF; (d) TBAF, THF; (e)  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ , Py, MeOH; (f)  $\text{NH}_2\text{OH}$ , TEA, DMSO, 100 °C, 1 h.

Los intermediarios DFMO (o TFMO) bromometil comunes podrían utilizarse en la síntesis de compuestos que tengan Z = tioalcoxi, mediante reacción de sustitución nucleofílica con un heteroarilo mercapto convenientemente sustituido en presencia de carbonato de potasio como base (Esquema 11).

#### Esquema 11 – Síntesis de compuestos que tienen Z = tioalcoxi<sup>a</sup>

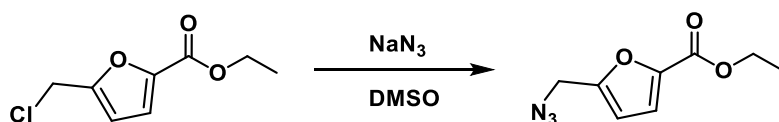


<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar mejor la invención pero no son limitantes.

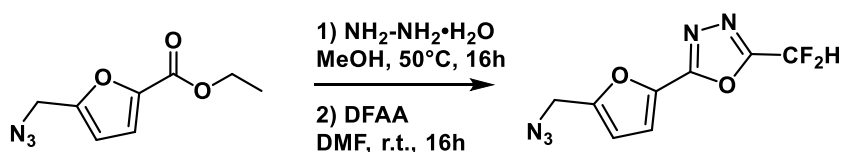
#### **Ejemplo 1. Síntesis de 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]furano-2-il]metil]triazol-4-il]-1,3-benzotiazol-2-amina (Comp. 7)**

Etapas A



5-(clorometil)furano-2-carboxilato de etilo (1 g, 5,3 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 10 ml de DMSO y se añadió azida sódica (1,1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con Et<sub>2</sub>O y se lavó con salmuera (x3). La capa orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró. El producto bruto se empleó en la siguiente etapa sin purificación.

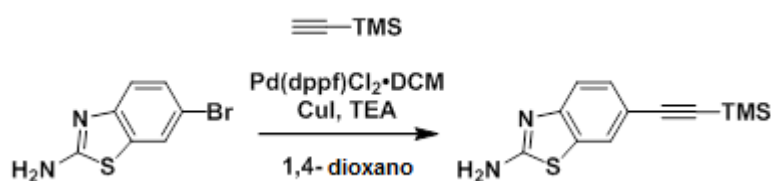
#### Etapa B



A una solución de 5-(azidometil)furano-2-carboxilato de etilo (840 mg, 4,3 mmol) en metanol (14 ml, 0,3 M) se añadieron monohidrato de hidrazina (0,84 ml, 17,2 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante la noche. Se observó la conversión completa por UPLC. La mezcla de reacción luego se concentró y secó.

El producto bruto se disolvió en DMF y se añadió DFAA (3 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. 90% de conversión se detectó por UPLC. La mezcla se diluyó con Et<sub>2</sub>O y se añadió gota a gota una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> para inactivar el exceso de DFAA. La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O fresco (3x), y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x), agua y salmuera. Luego se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró, lo que produce 600 mg del producto deseado como un aceite anaranjado (2,49 mmol, 58% de rendimiento). El producto fue suficientemente puro para ser utilizado en la posterior etapa sin purificación adicional.

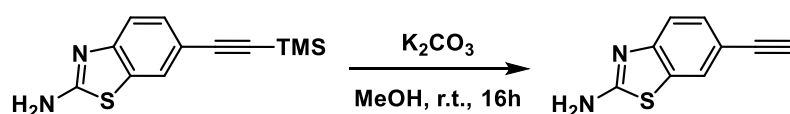
#### Etapa C



6-bromo-1,3-benzotiazol-2-amina (8g, 34,9 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 75 ml de dioxano. Se añadió trietilamina (2 equiv.) y la mezcla se degasificó con Ar. Se

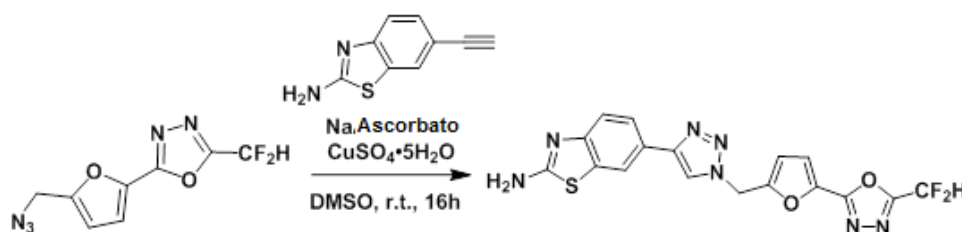
añadieron yoduro de cobre (0,1 equiv.) y complejo DCM [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio (II) (0,1 equiv.) y la mezcla se desgasificó nuevamente. Se añadió Etinil(trimetil)silano (3 equiv.) y la mezcla se agitó a 95 °C durante la noche. La mezcla de reacción se dejó alcanzar r.t., luego se diluyó con EtOAc, y se filtró en celite. La solución se filtrado se lavó con solución acuosa de NH<sub>3</sub> 5%, luego con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. La fase orgánica luego se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró a sequedad. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, Hex/EtOAc 20-50%), para obtener 7,38 g del intermediario deseado (29,9 mmol, 86% de rendimiento).

#### Etapas D



6-((trimetilsilil)etnil)benzo[d]tiazol-2-amina (7,38 g, 29,9 mmol, 1 equiv.) se suspendió en 75 ml de MeOH y se añadió carbonato de potasio (1,5 equiv.). La mezcla resultante se agitó a r.t. durante la noche para obtener la conversión completa. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, carga seca, 0-4 % MeOH/DCM) para obtener 4,2 g del intermediario deseado (24,1 mmol, 80% de rendimiento).

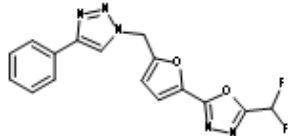
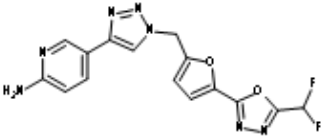
#### Etapas E



6-etnil-1,3-benzotiazol-2-amina (29 mg, 0,166 mmol, 1 equiv.) y 2-[5-(azidometil)furano-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (40 mg, 0,166 mmol, 1 equiv.) se disolvieron en 1 ml de DMSO. L-ascorbato de sodio (1 M, 0,4 equiv.) y sulfato de cobre pentahidrato (0,5 M, 0,3 equiv.) se añadieron a r.t. como soluciones acuosas. RM se agitó a r.t. durante la noche. La conversión completa se detectó por UPLC. La mezcla de reacción se dejó caer en solución acuosa de amoníaco diluida (2 ml, solución acuosa 5%) en agua (4 ml). El precipitado que se formó se recolectó por filtración, se lavó con agua, y se secó. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (agua/ACN + 0,1% FA). 22,9 mg del compuesto del título, base libre, se aislaron como un sólido blanco (0,055 mmol, 99,7% de pureza, 33% de rendimiento).

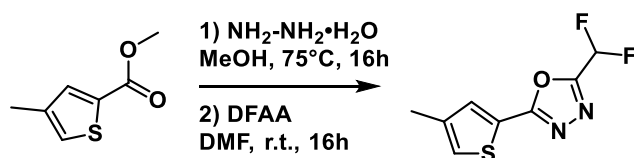
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,56 (s, 1H), 8,15 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 7,71 (dd,  $J$  = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 7,57 (br s, 2H), 7,54 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H), 7,53 (t,  $J$  = 51,3 Hz, 1H), 7,37 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H), 6,95 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H), 5,89 (s, 2H); LRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  416,38 experimental 416,13.

Los siguientes compuestos se sintetizaron de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura                                                                        | $[\text{M}+\text{H}]^+$ Experimental | $^1\text{H}$ NMR                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6    |  | 344,18                               | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 8.68 (s, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 2H), 7.54 (d, $J$ = 3.6 Hz, 1H), 7.53 (t, $J$ = 51.3 Hz, 1H), 7.45 (dd, $J$ = 8.4, 6.9 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 1H), 6.96 (d, $J$ = 3.6 Hz, 1H), 5.90 (s, 2H).                           |
| 11   |  | 360,19                               | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 8.46 (s, 1H), 8.39 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 7.81 (dd, $J$ = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.68 – 7.38 (m, 1H), 7.53 (d, $J$ = 1.4 Hz, 1H), 6.94 (d, $J$ = 3.6 Hz, 1H), 6.50 (dd, $J$ = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.86 (s, 2H). |

## Ejemplo 2. Síntesis de 5-[1-[[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tíofen-3-il]metil]triazol-4-il]piridin-2-amina (Comp. 14)

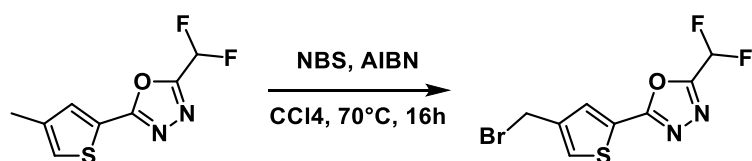
### Etapas A



4-metiltiofeno-2-carboxilato de metilo (1 g, 6,4 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 15 ml de metanol y se añadió hidrato de hidrazina (4 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 75 °C durante la noche. El material de partida se convirtió completamente en el intermediario hidrazida. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y sólido blanco residual se secó durante la noche.

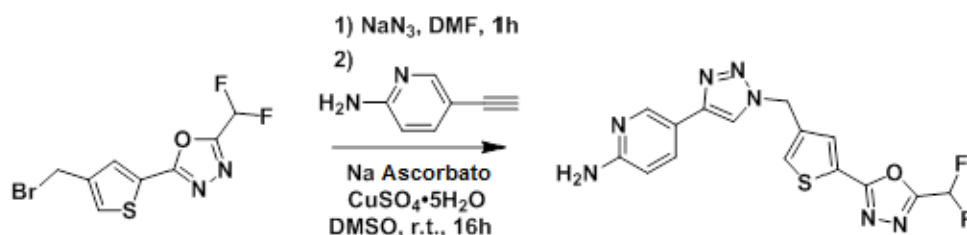
La hidrazida bruta se disolvió en DMF bajo argón, y la solución resultante se enfrió a 0 °C. Anhídrido difluoroacético se añadió gota a gota; luego, la mezcla se dejó alcanzar r.t. y se agitó a r.t. durante la noche. Se añadió agua a la mezcla de reacción, que se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se lavó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash (hexano/EtOAc, 95:5 a 7:3) que suministra el producto como aceite/sólido incoloro (727 mg, 3,36 mmol, 52% de rendimiento).

## Etapa B



Una mezcla de 2-(difluorometil)-5-(4-metiltiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol (581 mg, 2,69 mmol, 1 equiv.) y *N*-bromosuccinimida (1,05 equiv.) en 10 ml de tetracloruro de carbono se agitó bajo argón hasta la disolución completa. Luego se añadió AIBN (0,03 equiv.) a la mezcla de reacción, que se agitó a 70 °C durante la noche. La mezcla luego se dejó alcanzar r.t., se diluyó con DCM y se lavó sucesivamente con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, agua y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, hexano/EtOAc, 9:1 a 8:2) que suministra el producto como sólido blanco (405 mg, 1,37 mmol, 51% de rendimiento).

## Etapa C

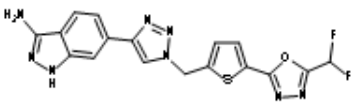
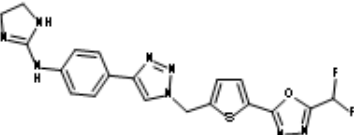
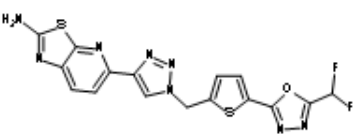
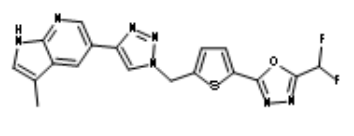
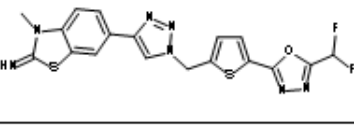
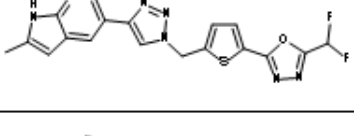
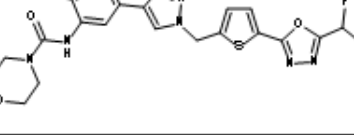
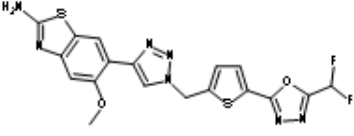


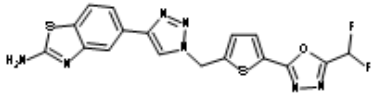
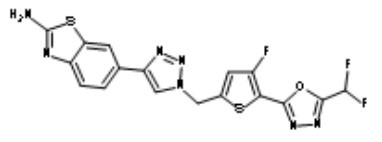
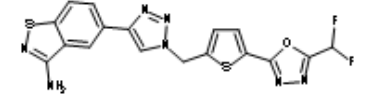
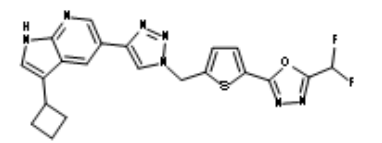
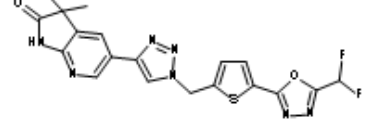
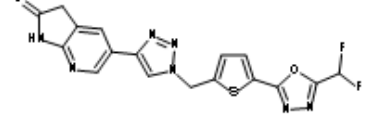
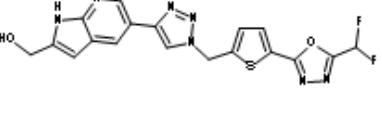
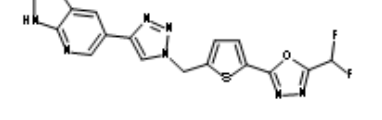
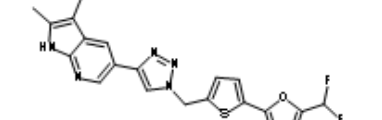
2-(4-(bromometil)tiofen-2-il)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (130 mg, 0,44 mmol, 1 equiv.) y azida sódica (1 equiv.) se disolvieron en DMSO y la mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 1 hora. Luego se añadió 5-etinilpiridin-2-amina (1 equiv.), seguido por la adición de soluciones acuosas de L-ascorbato de sodio (1 M, 0,4 equiv.) y sulfato de cobre pentahidrato (0,5 M, 0,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. Se añadió agua a la mezcla y se produjo la precipitación del producto. El precipitado se recolectó por filtración y se lavó con agua. El producto bruto así obtenido se purificó por HPLC preparativa (agua/ACN + 0,1% FA) que suministra el producto como un sólido blanco, como una sal de formiato (41,3 mg, 0,11 mmol, 98,56% de pureza, 25% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,49 (s, 1H), 8,38 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,01 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,94 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,80 (dd, J = 8,5, 2,4 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 6,50 (d, J = 8,6 Hz,

1H), 6,10 (s, 2H), 5,69 (s, 2H); LRMS (ESI+) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 376,36 experimental 376,13.

Los siguientes compuestos se sintetizaron de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H NMR                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------|------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13   |            | 360.13                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.71 (s, 1H), 8.03 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.74 (s, 2H).                                              |
| 15   |            | 432.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.60 (s, 1H), 8.14 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.52 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H).                                |
| 16   |            | 394.09                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.87 (s, 1H), 8.09 (dd, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.48 (m, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 6.06 (s, 2H).                                        |
| 17   |            | 390.12                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.58 (s, 1H), 8.16 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.58 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 3.93 (s, 3H).                                |
| 18   |            | 394.09                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.76 (s, 1H), 7.92 – 7.85 (m, 3H), 7.55 – 7.51 (m, 2H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H).                                                                                                                  |
| 19   |            | 340.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.00 (s, 1H), 7.84 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 1.27 (s, 9H).                                                                                                                    |
| 21   |            | 488.14                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.67 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.03 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 1H), 7.42 – 7.39 (m, 2H), 7.31 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 3.64 – 3.59 (m, 4H), 3.45 (t, J = 4.8 Hz, 4H). |
| 23   |            | 374.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.65 (s, 1H), 7.86 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.78 – 7.72 (m, 2H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.00 (s, 2H), 2.33 (s, 3H).                                                                     |
| 28   |            | 457.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.59 (s, 1H), 7.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 6.39 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.60 (m, J = 6.8 Hz, 1H), 1.49 (d, J = 6.8 Hz, 6H).                        |

| Comp | Estructura                                                                          | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31   |    | 415.12                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 11.47 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 6.01 (s, 2H), 5.36 (s, 2H).                                                                                        |
| 34   |    | 443.22                          | <sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.68 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.52 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.01 (s, 2H), 3.58 (s, 4H).                                                          |
| 42   |    | 433.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.69 (s, 1H), 7.94 – 7.83 (m, 4H), 7.70 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.58 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H).                                                                                                                                     |
| 44   |    | 414.14                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 11.39 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 2.4, 1.3 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 2.30 (d, J = 1.1 Hz, 3H). |
| 45   |   | 446.09                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.60 (s, 1H), 8.15 (brs, 1H), 7.92 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 3.35 (s, 3H).                        |
| 46   |  | 414.11                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 11.56 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.60 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.20 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 2.43 – 2.39 (m, 3H).                        |
| 47   |  | 504.13                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.94 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.98 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 3.63 (dd, J = 5.7, 4.0 Hz, 4H), 3.49 – 3.42 (m, 4H).                          |
| 48   |  | 462.04                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.48 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.51 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.01 (s, 2H), 3.93 (s, 3H).                                                                                  |

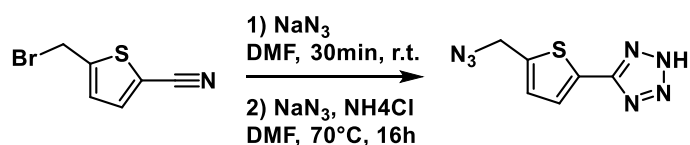
| Comp | Estructura                                                                          | $[M+H]^+$ Experimental | $^1\text{H-NMR}$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 49   |    | 432.08                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 8.72 (s, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.57 (brs, 2H), 7.55 – 7.52 (m, 1H), 7.52 (t, J = 51.8 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H).                                                                                                           |
| 50   |    | 450,1                  | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 8.62 (s, 1H), 8.16 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.58 (s, 2H), 7.54 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H).                                                                                                                                        |
| 51   |    | 432.06                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta$ 8.66 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 8.03 – 7.93 (m, 2H), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.07 (s, 2H).                                                                                                                                                        |
| 57   |    | 454.08                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 11.45 (brs, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.70 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 3.78 – 3.66 (m, 1H), 2.44 – 2.32 (m, 2H), 2.26 – 2.14 (m, 2H), 2.11 – 1.99 (m, 1H), 1.98 – 1.85 (m, 1H). |
| 58   |   | 444.10                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 11.10 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 1.33 (s, 6H).                                                                                                                   |
| 59   |  | 416.25                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 11.11 (brs, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 3.62 (s, 2H).                                                                                                                 |
| 60   |  | 430.08                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 11.64 (brs, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.65 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.39 – 6.34 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 5.30 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 5.6 Hz, 2H).                                                      |
| 61   |  | 402.09                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ 8.49 (s, 1H), 7.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.69 (brd, J = 1.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.57 (brs, 1H), 5.97 (s, 2H), 3.51 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 3.02 (t, J = 8.5 Hz, 2H).                                                                                                    |
| 62   |  | 428.13                 | 1H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta$ 11.29 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.58 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.19 (s, 3H).                                                                                                        |

| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 65   |            | 400.09                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.67 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 3.5, 2.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.48 (dd, J = 3.5, 1.6 Hz, 1H), 6.05 (s, 2H). |
| 66   |            | 430.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.55 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 3.4, 2.4 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 3.5, 1.9 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.04 (s, 3H).                         |
| 67   |            | 414.13                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.55 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.87 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.42 (dt, J = 3.5, 1.0 Hz, 2H), 6.44 (dd, J = 3.4, 1.9 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 2.65 (s, 3H).                                                   |
| 68   |            | 414.10                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.50 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 2H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.1 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 2.41 (d, J = 1.0 Hz, 3H).                                                        |
| 69   |            | 400.11                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.40 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.91 – 7.81 (m, 3H), 7.67 (t, J = 3.0 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.56 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H).                                                                      |
| 70   |            | 399.83                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.66 (s, 1H), 8.76 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.65 – 7.37 (m, 1H), 7.42 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.02 (s, 2H).                                           |
| 72   |            | 442.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.57 (s, 1H), 8.91 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.83 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H).                                    |
| 79   |            | 457.21                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.72 (s, 1H), 7.92 – 7.85 (m, 3H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.02 (s, 2H), 3.29 (t, J = 5.8 Hz, 4H), 1.92 – 1.83 (m, 2H).                                                             |
| 80   |            | 460.06                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.73 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 3.98 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.53 (t, J = 7.5 Hz, 2H).                         |

|    |  |        |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|--|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 82 |  | 457.09 | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.42 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.67 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 2.10 (s, 3H). |
| 83 |  | 509.95 | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.60 (s, 1H), 8.16 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.54 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H).                                                               |
| 87 |  | 450.01 | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.59 (s, 1H), 8.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.71 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.53 (t, J = 51.2 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H).                                                               |

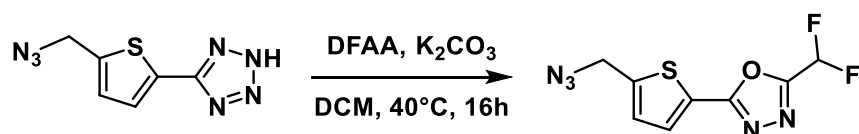
### Ejemplo 3. Síntesis de 2-(difluorometil)-5-[5-[[4-(1H-pirrol-2-yl)piridin-5-il]triazol-1-il]metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol (Comp. 4)

#### Etapas A



5-(bromometil)tiofeno-2-carbonitrilo (500 mg, 2,47 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 3 ml de DMF. Se añadió azida sódica (1 equiv.), y la mezcla se agitó a r.t.. Después de 30 min, el bromuro se convirtió completamente en azida. Se añadieron una alícuota adicional de azida sódica (1,1 equiv.) y cloruro de amonio (1,1 equiv.). La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante la noche. La conversión completa al producto deseado se observó mediante LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10x), y se acidificó con HCl 1 M hasta pH ~ 5. El sólido blanco que precipitó se filtró, se lavó con agua, y se secó. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (411 mg, 1,98 mmol, 80% de rendimiento).

#### Etapas B

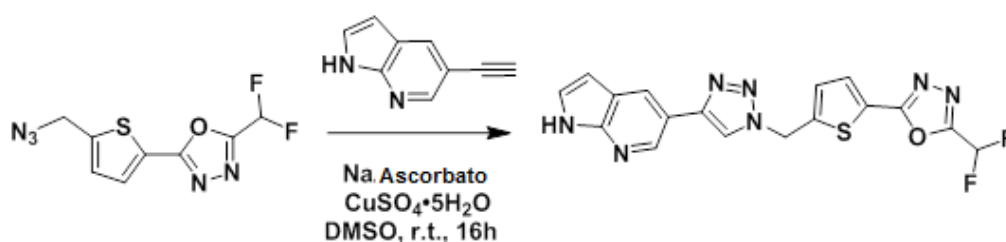


5-[5-(azidometil)tiofen-2-il]-2H-tetrazol (411 mg, 1,98 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 4 ml de DCM. Se añadieron anhídrido difluoroacético (2 equiv.) y carbonato de potasio

(1 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C. Después de 1 h, se añadieron 2 equiv. Extra de DFAA. Después de 16 h se detectó la conversión completa. La mezcla luego se concentró a presión reducida; el producto bruto así obtenido se suspendió en agua y se extrajo con EtOAc (3x). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, se secaron en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y concentraron.

El producto se usó en la posterior etapa sin purificación adicional (426 mg, 1,65 mmol, 83% de rendimiento).

### Etapa C



El recipiente de reacción se cargó con 5-etinil-1H-pirrólo[2,3-b]piridina (21 mg, 0,15 mmol, 1 equiv.). Luego se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de 2-(5-(azidometil)tiofen-2-il)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (solución 0,33 M en DMF, 1,1 equiv.), seguido por 250  $\mu\text{L}$  de L-ascorbato de sodio (solución acuosa 0,3 M, 0,5 equiv.) y 250  $\mu\text{L}$  sulfato de cobre pentahidrato (solución acuosa 0,12 M, 0,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante la noche.

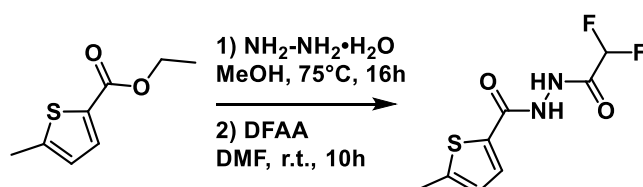
La conversión completa al producto deseado se observó mediante HPLC y LC-MS. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, carga seca, DCM/MeOH 1-5%). Las fracciones que contienen producto se recolectaron juntas y evaporaron a sequedad, para dar el compuesto del título en 60% de rendimiento (36 mg, 0,09 mmol). LRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_7\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  400,39 experimental 400,30.

Los siguientes compuestos se sintetizaron de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H NMR                                                                                                                                                                                                                     |
|------|------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    |            | 376.3                           | -                                                                                                                                                                                                                                      |
| 2    |            | 360.4                           | -                                                                                                                                                                                                                                      |
| 3    |            | 375.4                           | -                                                                                                                                                                                                                                      |
| 5    |            | 432.1                           | -                                                                                                                                                                                                                                      |
| 26   |            | 394.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.51 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 5.99 (s, 2H). |
| 27   |            | 450.05                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.61 (s, 1H), 8.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.44 – 7.34 (m, 2H), 6.02 (s, 2H).                                |

**Ejemplo 4. Síntesis de 6-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]tetrazol-5-il]-1,3-benzotiazol-2-amina (Comp. 9) y 6-[2-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]tetrazol-5-il]-1,3-benzotiazol-2-amina (Comp. 10)**

EtapA A



Monohidrato de hidrazina (2,5 equiv.) se añadió a una solución de 5-metiltiofeno-2-carboxilato de etilo (10 g, 58,7 mmol, 1 equiv.) en metanol (75 ml, 0,78 M). La mezcla resultante se calentó a 50 °C y se agitó durante la noche. La conversión completa al intermediario hidrazida se observó mediante UPLC, y la mezcla se concentró y se secó.

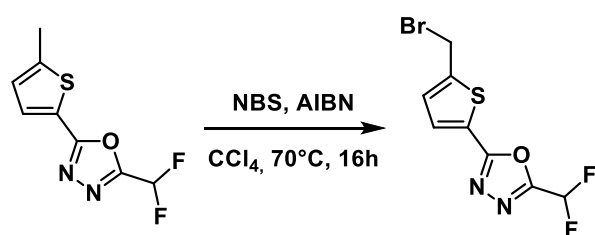
La hidrazida bruta se disolvió en DMF (50 ml) y se añadió anhídrido difluoroacético (2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 10 h. La conversión a acilhidrazida se observó mediante UPLC. La reacción se inactivó mediante la adición de una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se separaron las capas, y la fase acuosa también se extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Etapa B



A una solución de N'-(2,2-difluoroacetil)-5-metiltiofeno-2-carbohidrazida (12,4 g, 52,9 mmol) en DMF (30 ml, 1,77 M) se añadió anhídrido difluoroacético (3 equiv.) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 36 horas a r.t.. Después de esto, la reacción se vertió gota a gota en solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . El producto bruto que precipitó se recolectó por filtración y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (4,46 g, 20,63 mmol, 39% de rendimiento).

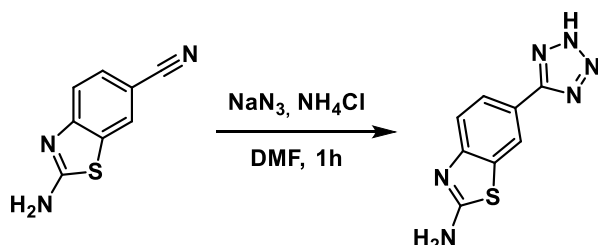
#### Etapa C



A una solución de 2-(difluorometil)-5-(5-metiltiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol (4,46 g, 20,63 mmol) en tetracloruro de carbono (80 ml, 0,26 M) se añadieron N-bromosuccinimida (1,05 equiv.) y AIBN (0,03 equiv.). La mezcla resultante se desgasificó con Ar y se calentó a 70 °C durante 8 horas. La mezcla de reacción luego se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con DCM (150 ml) y se lavó sucesivamente con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3x), y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por

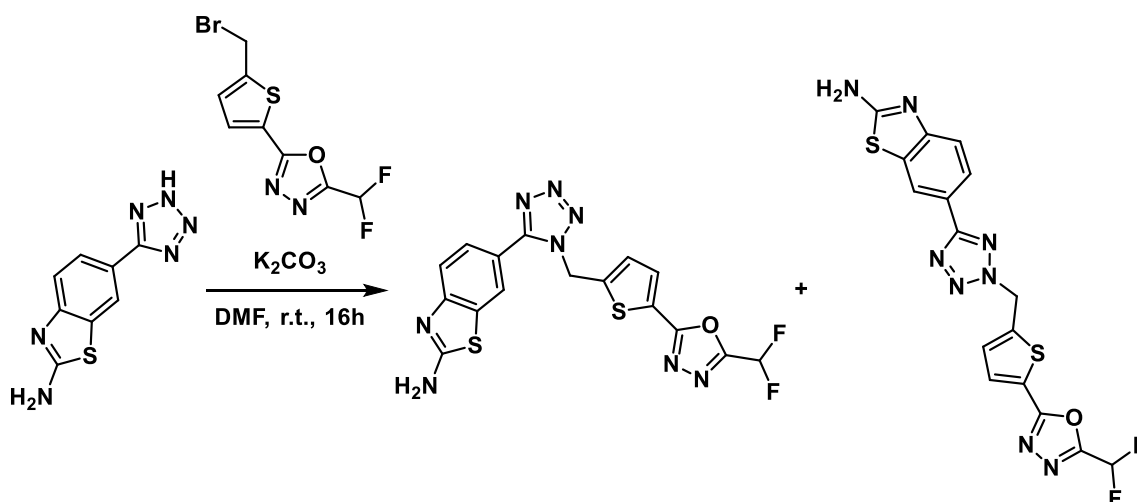
cromatografía flash (gel de sílice, hexano/EtOAc 0-20%) que suministra el producto como un sólido color canela en 51% de rendimiento (3,1 g, 10,5 mmol).

#### Etapa D



2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo (400 mg, 2,28 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 7 ml de DMF, y se añadieron azida sódica (2,2 equiv.) y cloruro de amonio (2,2 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 95 °C durante la noche, luego se dejó alcanzar a r.t. y se diluyó con agua. Se añadió HCl 1 M hasta que se alcanzó un pH~4. El sólido precipitó después de 30 min de enfriamiento en refrigerador. El producto se recolectó por filtración y se secó en un evaporador rotatorio (262 mg, 1,20 mmol, 53% de rendimiento).

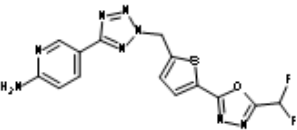
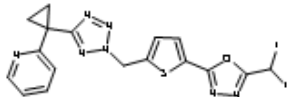
#### Etapa E



68 mg de 6-(2H-tetrazol-5-il)-1,3-benzotiazol-2-amina (0,31 mmol, 1 equiv.) y carbonato de potasio (1,2 equiv.) se suspendieron en 1,5 ml de DMF. Después de 15 min 2-[5-(bromometil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (92 mg, 0,31 mmol, 1 equiv.) se añadió a la suspensión y la mezcla se agitó a r.t. durante la noche. Se observó la conversión completa por LCMS. Se añadió agua a la mezcla de reacción y se produjo la precipitación. Los productos se extrajeron en EtOAc. Las capas

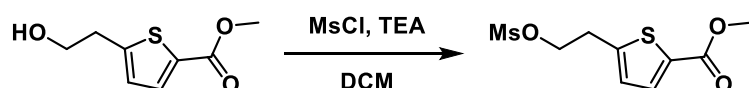
orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, se secaron en  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (neutral) que suministra el comp. 9 (regioisómero menor) como un sólido amarillo (5 mg, 0,012 mmol, 3% de rendimiento) y comp. 10 (regioisómero mayor) como un sólido blanco (40 mg, 0,09 mmol, 30% de rendimiento). Los productos se aislaron como bases libres. Comp. 9: LRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_8\text{OS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  433,44 experimental 433,02;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,19 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,88 (s, 2H), 7,79 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 7,66 (dd,  $J = 8,4, 1,9$  Hz, 1H), 7,50 (t,  $J = 51,2$  Hz, 1H), 7,50 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,23 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 6,18 (s, 2H). Comp. 10: LRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_8\text{OS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  433,44 experimental 433,06;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,38 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 7,92 (dd,  $J = 8,4, 1,8$  Hz, 1H), 7,88 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 7,76 (s, 2H), 7,53 (t,  $J = 51,2$  Hz, 1H), 7,50 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 7,46 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 6,38 (s, 2H).

Los siguientes compuestos se sintetizaron de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura                                                                          | Experimental | $^1\text{H}$ NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8    |  | 377.15       | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ 8.60 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 51.3$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.53 (s, 2H), 6.34 (s, 2H).                         |
| 12   |  | 402.15       | $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ 8.53 – 8.46 (m, 1H), 7.86 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.70 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 51.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.32 – 7.20 (m, 2H), 6.32 (s, 2H), 1.70 (q, $J = 4.0, 3.6$ Hz, 2H), 1.53 (q, $J = 4.4, 4.0$ Hz, 2H). |

### Ejemplo 5. Síntesis de 5-(1-(2-(5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tetrahidrotiofen-2-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridin-2-amina (Comp. 24)

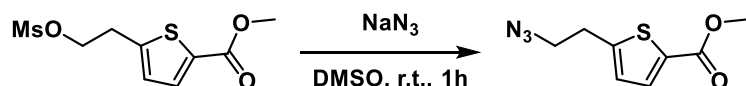
#### Etapas A



5-(2-hidroxietil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (250 mg, 1,34 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 5 ml de DCM. Se añadieron Trietilamina (2 equiv.) y cloruro de metansulfonilo (1,2 equiv.), y la mezcla se agitó a r.t. durante la noche. Se observó conversión completa. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró. El producto bruto así obtenido se

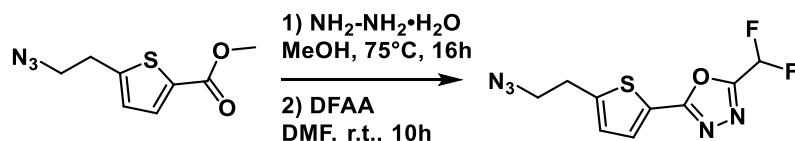
usó en las siguientes etapas sin purificación adicional (320 mg, 1,09 mmol, 81% de rendimiento).

#### Etapas B



5-(2-metilsulfoniloetil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (320 mg, 1,09 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 3,5 ml DMSO y se añadió azida sódica (1 equiv.). Después de 1 h se observó la conversión completa a azida. La mezcla de reacción se diluyó con MTBE, se lavó con salmuera, se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró. El producto bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (125 mg, 0,59 mmol, 54% de rendimiento).

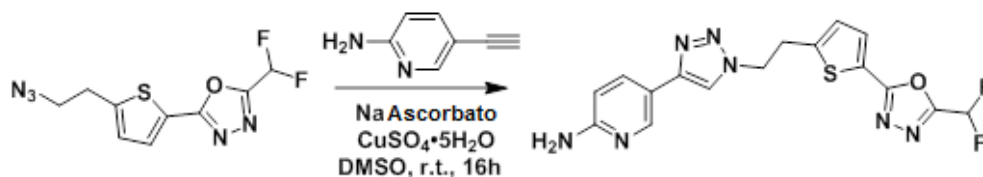
#### Etapas C



Una solución de 5-(2-azidoetil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (125 mg, 0,59 mmol, 1 equiv.) y monohidrato de hidrazina (2,5 equiv.) en 1 ml de metanol se sometió a reflujo durante la noche. La conversión al intermediario hidrazida se observó mediante TLC y el solvente se evaporó a sequedad.

El residuo se disolvió en 1,5 ml de DMF, y la mezcla se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  con un baño de hielo. DFAA (2,2 equiv.) se añadió gota a gota; la mezcla de reacción se dejó alcanzar r.t., luego se agitó durante la noche. Se añadieron 1,5 equiv. de DFAA adicionales, y la mezcla se agitó durante 4 h adicionales. Se observó la conversión completa al producto deseado. La mezcla de reacción se inactivó al verterla en 400 ml de solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  con hielo. El sólido blanco que precipitó se recolectó por filtración y se secó. El producto bruto así obtenido se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, DCM/MeOH 0-5%), para obtener el producto deseado (160 mg, 0,59 mmol, 100% de rendimiento).

#### Etapas D



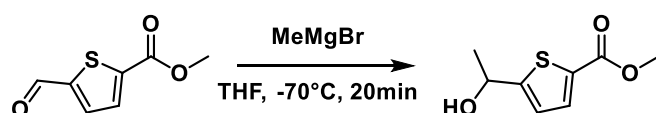
L-ascorbato de sodio (solución acuosa 0,3 M, 0,5 equiv.) y sulfato de cobre pentahidrato (solución acuosa 0,12 M, 0,3 equiv.) se añadieron a una suspensión de 2-[5-(2-azidoetil)tiopen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (23 mg, 0,08 mmol, 1 equiv.) y 5-etinilpiridin-2-amina (10 mg, 0,08 mmol, 1 equiv.) en 1 ml de DMSO. La mezcla resultante se agitó a r.t. durante la noche. Se observó la conversión completa por LCMS. La mezcla se filtró y el producto bruto se purificó por HPLC preparativa. El producto se aisló como una base libre (6,7 mg, 0,017 mmol, 20% de rendimiento). LRMS (ESI+) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 390,39 experimental 390,11; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,40 (s, 1H), 8,35 (dd, J = 2,4, 0,8 Hz, 1H), 7,79 – 7,74 (m, 2H), 7,50 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 7,08 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,11 (s, 2H), 4,72 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,58 (t, J = 6,7 Hz, 2H).

El siguiente compuesto se sintetizó de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura | [M+H] Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------|------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 56   |            | 404.21             | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.33 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.78 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.09 (s, 2H), 4.65 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 3.86 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 1.38 (d, J = 6.9 Hz, 3H). |

## Ejemplo 6. Síntesis de 5-(1-(1-(5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tetrahidrotiopen-2-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridin-2-amina (Comp. 20)

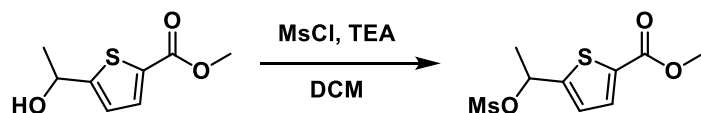
### Etapas A



5-formiltiopeno-2-carboxilato de metilo (1 g, 5,87 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 25 ml THF. La mezcla se enfrió a -70 °C, y se añadió gota a gota bromuro de metilmagnesio (1 equiv., solución 3 M en Et<sub>2</sub>O). La mezcla se agitó a -70 °C durante 20 min, luego se inactivó con solución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl, y se extrajo con MTBE. Las capas orgánicas

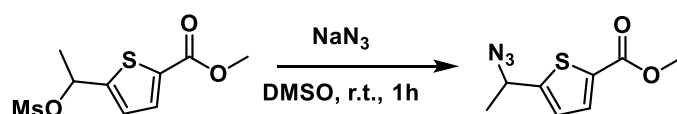
combinadas se secaron en  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, hexano/ $\text{EtOAc}$  0-20%) para suministrar el alcohol deseado (628 mg, 3,37 mmol, 57% de rendimiento).

#### Etapa B



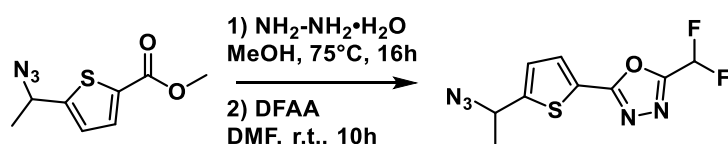
5-(1-hidroxietil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (628 mg, 3,37 mmol, 1 equiv.) se suspendió en  $\text{DCM}$  (15 ml). Trietilamina (2 equiv.) y cloruro de metansulfonilo se añadieron sucesivamente (1,2 equiv.), y la mezcla resultante se agitó a r.t. durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con salmuera y se extrajo con  $\text{DCM}$ . Las capas orgánicas se recolectaron juntas, se secaron en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y concentraron. El producto bruto así obtenido se usó en las siguientes etapas sin purificación adicional (700 mg, 2,65 mmol, 79% de rendimiento).

#### Etapa C



5-(1-metilsulfoniloxietil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (700 mg, 2,65 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 7 ml  $\text{DMSO}$ , y se añadió azida sódica (1 equiv.). La mezcla se agitó a r.t. durante la noche. La mezcla de reacción luego se diluyó con  $\text{Et}_2\text{O}$ , y se lavó con agua y salmuera. La fracción orgánica se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró. La purificación por cromatografía flash (gel de sílice, hexano/ $\text{EtOAc}$  0-20%) proporcionó el producto deseado (490 mg, 2,32 mmol, 87% de rendimiento).

#### Etapa D

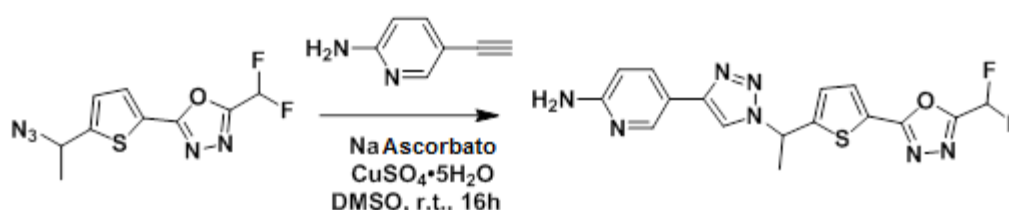


5-(1-azidoetil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (490 mg, 2,32 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 10 ml de metanol. Se añadió monohidrato de hidrazina (4 equiv.), y la mezcla

resultante se sometió a reflujo durante 3 h. La conversión al intermediario hidrazida se observó mediante TLC y el solvente se evaporó a sequedad.

El residuo se suspendió en 6 ml de DMF. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota DFAA (3 equiv.); la mezcla de reacción se dejó alcanzar r.t., luego se agitó durante 3 h. Se observó la conversión completa al producto deseado. La mezcla de reacción se diluyó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con Et<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró. La purificación por cromatografía flash (gel de sílice, hexano/EtOAc 0-30%) proporcionó el producto deseado (242 mg, 0,89 mmol, 38% de rendimiento).

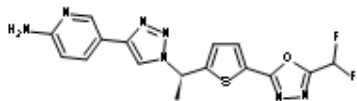
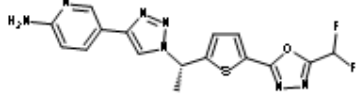
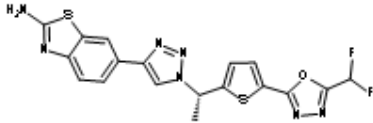
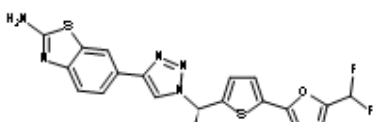
#### Etapa E



2-[5-(1-azidoetil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (100 mg, 0,37 mmol, 1 equiv.) y 5-etinilpiridin-2-amina (44 mg, 0,37 mmol, 1 equiv.) se disolvieron en 1,5 ml de DMSO. Se añadieron sulfato de cobre pentahidrato (0,3 equiv.) y L-ascorbato de sodio (0,5 equiv.) como una solución en 1,5 ml de agua. La mezcla resultante se agitó a r.t. durante 2 h. La conversión completa se confirmó por LCMS. La muestra se filtró y se envió para HPLC preparativa. El producto se aisló como base libre (63 mg, 0,16 mmol, 43% de rendimiento). LRMS (ESI+) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 390,39 experimental 390,37; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,63 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,85 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 7,82 (dt, J = 8,6, 2,5 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 7,35 (dd, J = 3,9, 0,9 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,40 (q, J = 6,9 Hz, 1H), 6,12 (s, 2H), 2,04 (dd, J = 7,2, 2,5 Hz, 3H).

El siguiente compuesto se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura | Experimental | <sup>1</sup> H NMR                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25   |            | 446.09       | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.74 (s, 1H), 8.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.58 (s, 2H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 6.43 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 2.05 (d, J = 7.1 Hz, 3H). |

| Comp | Estructura                                                                         | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 29   |   | 390.14                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.62 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 3.9, 0.8 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 8.6, 0.8 Hz, 1H), 6.39 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H), 2.03 (d, J = 7.0 Hz, 3H). |
| 30   |   | 390.14                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.62 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 3.9, 0.8 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 8.6, 0.8 Hz, 1H), 6.39 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H), 2.03 (d, J = 7.0 Hz, 3H). |
| 32   |   | 446.07                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 6.42 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 2.05 (d, J = 7.0 Hz, 3H).                                                          |
| 33   |  | 446.07                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.73 (s, 1H), 8.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 6.42 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 2.05 (d, J = 7.0 Hz, 3H).                                            |

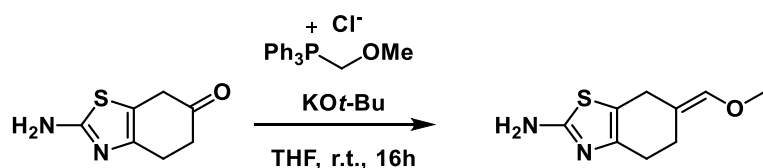
| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 36   |            | 99.91                           | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.65 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.25 (dd, J = 9.3, 6.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 2.43 (td, J = 9.1, 5.1 Hz, 1H), 2.38 – 2.25 (m, 1H), 1.26 (ddt, J = 35.1, 16.4, 7.0 Hz, 2H), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H). |
| 37   |            | 404.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.64 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.16 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 6.12 (s, 2H), 2.46 – 2.35 (m, 2H), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, 3H).                                                                         |
| 38   |            | 466.08                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.72 (s, 1H), 8.35 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.22 (m, 4H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.76 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 9.3, 6.7 Hz, 1H), 3.89 – 3.67 (m, 2H).                                                               |
| 52   |            | 404.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.64 (s, 1H), 8.41 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.38 (m, 1H), 6.51 (dd, J = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 6.16 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 2.49 – 2.35 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H).                                                                        |
| 53   |            | 404.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.64 (s, 1H), 8.41 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.38 (m, 1H), 6.51 (dd, J = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 6.16 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 2.49 – 2.35 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H).                                                                        |
| 63   |            | 466.11                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.63 (s, 1H), 8.42 – 8.31 (m, 1H), 7.84 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.32 – 7.22 (m, 4H), 7.21 – 7.14 (m, 1H), 6.59 (dd, J = 9.4, 6.5 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1H), 6.12 (s, 2H), 3.93 – 3.64 (m, 2H).                                                        |
| 64   |            | 466.11                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.72 (s, 1H), 8.35 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.22 (m, 4H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.76 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 9.3, 6.7 Hz, 1H), 3.89 – 3.67 (m, 2H).                                                               |

Los compuestos 29, 30, 32, 33, 52 y 53 se obtuvieron como enantiómeros únicos después de la separación por SFC quiral.

Para la síntesis de los compuestos 63 y 64, el intermediario de azida racémica se separó en dos enantiómeros por SFC quiral.

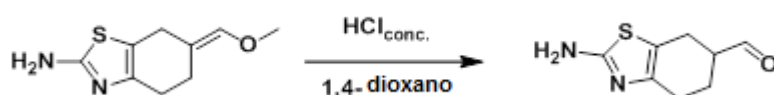
### Ejemplo 7. Síntesis de 6-(1-((5-(5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)tiofen-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-2-amina (Comp. 22)

#### Etapa A



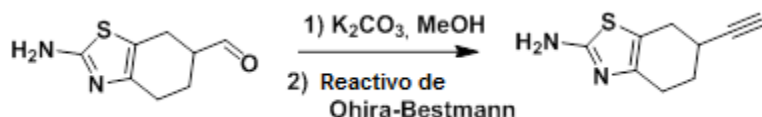
2-amino-5,7-dihidro-4H-1,3-benzotiazol-6-ona (5,86 g, 34,83 mmol, 1 equiv.) y cloruro de (Metoximetil)trifenilfosfonio (1,25 equiv.) se disolvieron en 80 ml de THF. Se añadió *ter*-butóxido de potasio (1,25 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo en EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y concentraron a presión reducida. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, DCM/MeOH 98:2) que suministra el producto como un sólido rojo (2,87 g, 14,6 mmol, 42% de rendimiento).

#### Etapa B



(6E)-6-(metoximetiliden)-5,7-dihidro-4H-1,3-benzotiazol-2-amina (2,87 g, 14,6 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 70 ml de 1,4-dioxano y se añadió lentamente HCl conc. (12 M, 8 equiv.). La mezcla resultante se agitó a r.t. durante la noche; luego se diluyó con EtOAc. Se añadió solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (>100 ml) para inactivar el exceso de HCl. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y concentró a presión reducida, lo que proporciona un sólido amarillo, que se usó directamente en la siguiente etapa (2,1 g, 11,5 mmol, 79% de rendimiento).

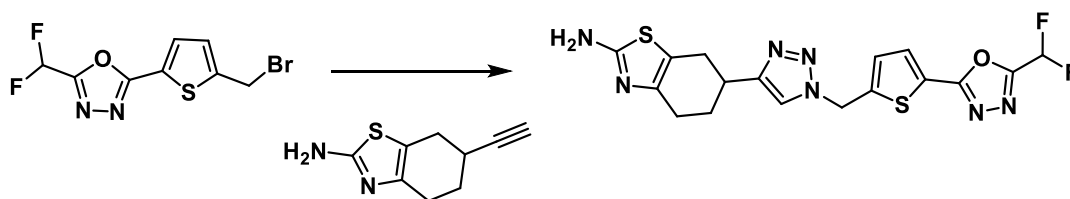
#### Etapa C



1-diazo-1-dimetoxifosforilpropan-2-ona (1,2 equiv.) se añadió a una solución de 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzotiazol-6-carbaldehído (2,1 g, 11,5 mmol, 1 equiv.) y carbonato de potasio (2 equiv.) en 70 ml de metanol. La mezcla resultante se agitó a r.t. durante la noche, y la conversión se examinó mediante LCMS.

La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera. La capa orgánica se secó en  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, EtOAc/MeOH 0-2%) que suministra el producto como un sólido amarillo (806 mg, 4,52, 39% de rendimiento).

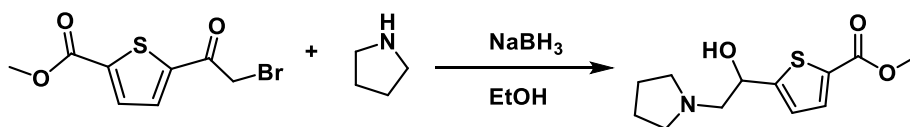
#### Etapa D



2-[5-(bromometil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (50 mg, 0,17 mmol, 1 equiv., etapa C, ejemplo 4), 6-etinil-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzotiazol-2-amina (30 mg, 0,17 mmol, 1 equiv.), sulfato de cobre pentahidrato (0,3 equiv.) y L-ascorbato de sodio (0,5 equiv.) se suspendieron en 1 ml de DMSO. Luego se añadió azida sódica (1,2 equiv.) y la mezcla se agitó a r.t.. Después de 2 h, LCMS reveló la conversión completa en el compuesto del título. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se purificó por HPLC preparativa. El producto se aisló como una base libre (13 mg, 0,028, 17% de rendimiento). LRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_7\text{OS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  436,48 experimental 436,12;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,24 (br s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,84 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 7,52 (t,  $J = 51,3$  Hz, 1H), 7,34 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 6,65 (s, 2H), 5,92 (s, 2H), 3,20 – 3,12 (m, 2H), 2,89 (dd,  $J = 15,7, 5,4$  Hz, 1H), 2,72 – 2,63 (m, 1H), 2,45 (d,  $J = 20,9$  Hz, 1H), 2,12 (d,  $J = 13,3$  Hz, 1H), 1,92 – 1,78 (m, 1H).

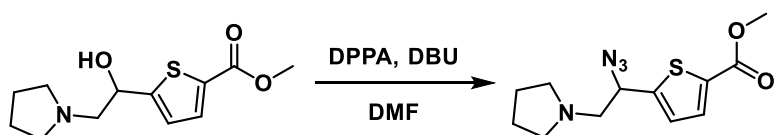
#### **Ejemplo 8. 5-{1-[(1R)-1-{5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il}-2-(pirrolidin-1-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}piridin-2-amina (comp. 54).**

##### Etapa A



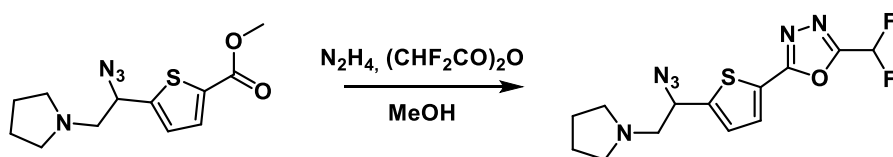
5-(2-bromoacetyl)tiofeno-2-carboxilato de metilo (500 mg, 1,0 mmol, 1 eq.) se disolvió en etanol (11 ml) y se añadió pirrolidina (202,73 mg, 2,85 mmol, 1,5 eq.). La RM se agitó a 50 °C durante 1 h. Luego se añadió borohidruro de sodio (75,5 mg, 2 mmol, 1,05 eq.) y la RM se agitó a rt durante la noche. Se añadió agua al RM y la extracción se realizó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FCC, lo que suministra el producto deseado como sólido marrón claro (250 mg, 51,5% de rendimiento).

#### Etapa B



A una solución del alcohol (75 mg, 0,294 mmol, 1 eq.) en DMF (2 ml) a 0 °C se añadieron difenil fosforil azida (97 mg, 0,35 mmol, 1,2 eq.) y DBU (62,6 mg, 0,411 mmol, 1,4 eq.). La RM se agitó a 0 °C durante 3 h y a rt durante la noche. Se añadió la misma cantidad de DPPA y DBU y la RM se agitó a rt durante la noche. La reacción se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FCC, que suministra el producto deseado como un aceite amarillo (43 mg, 52,2% de rendimiento).

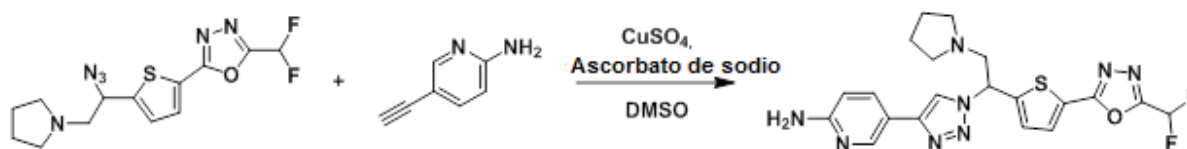
#### Etapa C



Metiléster (41 mg, 0,146 mmol, 1 eq.) se disolvió en metanol (1,5 ml) y se añadió hidrato de hidrazina (58,57 mg, 1,17 mmol, 8 eq.). La RM se agitó a 75 °C durante la noche, luego se concentró a presión reducida y el sólido blanco residual se secó durante la noche. La hidrazida obtenida se disolvió en DMF bajo argón y se añadió gota a gota DFAA (0,055 ml, 0,44 mmol, 3 eq.). La RM se agitó a rt durante la noche. Se añadió agua a la RM y la extracción se realizó con acetato de etilo. La capa acuosa se alcalinizó mediante la adición de bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con

acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$ , salmuera, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por FCC.

#### Etapa D



El derivado de azida (62 mg, 0,182 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMSO (1,5 ml). Se añadió 5-etinilpiridin-2-amina (21,5 mg, 0,182 mmol, 1 eq.) seguido por las soluciones de  $\text{CuSO}_4$  (0,073 ml, 0,036 mmol, 0,2 eq.) y ascorbato de sodio (0,073 ml, 0,073 mmol, 0,4 eq.). La RM se agitó a rt durante la noche. Se añadió agua y la precipitación se produjo. El sólido amarillo se filtró y se lavó con agua. El filtrado se alcalinizó mediante la adición de bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$ , salmuera, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y concentraron a presión reducida.

El residuo se purificó por FCC y mediante HPLC preparativa que suministra el producto como un sólido incoloro. El producto se aisló como una sal de formiato (33,5 mg, 83,5% de rendimiento).

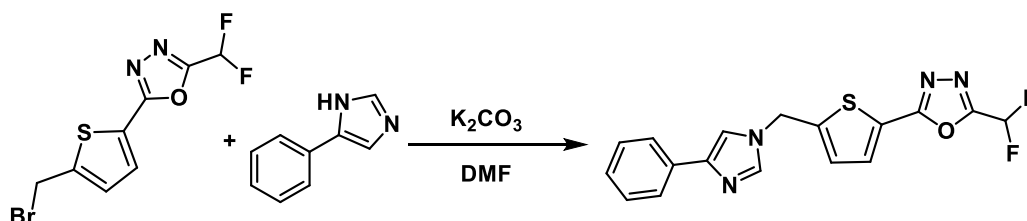
La mezcla racémica se separó mediante SFC quiral, que suministra 3,5 mg de compuesto puro (y 3,4 mg del enantiómero opuesto, comp. 55).  $[\text{M}+\text{H}]^+$  experimental 459,20;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,62 (s, 1H), 8,40 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 7,84 – 7,78 (m, 2H), 7,52 (t,  $J = 51,4$  Hz, 1H), 7,17 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 6,52 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 6,38 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 6,13 (s, 2H), 3,44 – 3,35 (m, 2H), 2,65 – 2,56 (m, 4H), 1,69 (t,  $J = 3,9$  Hz, 4H).

El siguiente compuesto se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------|------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 39   |            | 418.15                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.65 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.89 – 7.81 (m, 2H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.22 (br s, 2H), 5.93 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 2.80 – 2.68 (m, 1H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.5 Hz, 3H).               |
| 40   |            | 459.33                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.62 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.84 – 7.79 (m, 2H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 3.38 (qd, J = 12.5, 7.5 Hz, 2H), 2.60 (s, 4H), 1.69 (s, 4H). |
| 55   |            | 459.09                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.62 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.52 (t, J = 51.4 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 3.44 – 3.35 (m, 2H), 2.65 – 2.56 (m, 4H), 1.69 (t, J = 3.9 Hz, 4H).        |

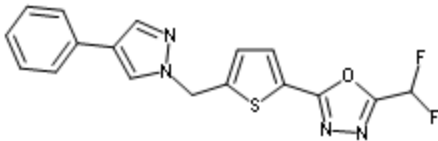
**Ejemplo 9. 5,2-(difluorometil)-5-[5-[(4-fenilimidazol-1-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol (comp. 43).**

**EtapA**



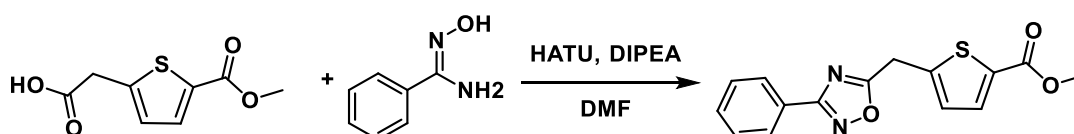
5-fenil-1H-imidazol (60 mg, 0,416 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMF (2 ml) y se añadió  $K_2CO_3$  (69 mg, 0,499 mmol, 1,2 eq.). Después de 30 min, se añadió 2-[5-(bromometil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (ejemplo 4, etapa C, 122,8 mg, 0,416 mmol, 1 eq.) a la mezcla de reacción. Después de 1 h, se añadió agua y el producto se extrajo con AcOEt, se secó en  $Na_2SO_4$  y se concentró a presión reducida. El producto puro se obtuvo después de la purificación por HPLC preparativa (62,7 mg, 41,8% de rendimiento). [M+H]<sup>+</sup> experimental 359,12; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,89 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,77 (dd, J = 3,6, 1,4 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 7,38 – 7,30 (m, 3H), 7,24 – 7,15 (m, 1H), 5,58 (s, 2H).

El siguiente compuesto se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento:

| Comp | Estructura                                                                        | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                                            |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 41   |  | 359.16                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.35 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.57 (m, 2H), 7.51 (t, 52Hz, 1H), 7.40 – 7.33 (m, 2H), 7.30 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 5.69 (s, 2H). |

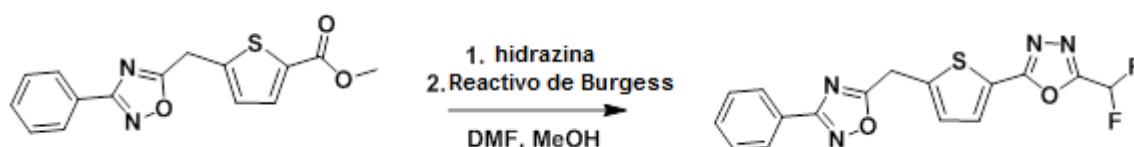
### Ejemplo 10. 2-(difluorometil)-5-[5-[(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol (comp. 71).

#### Etapas A



Ácido 2-(5-metoxycarboniltiofen-2-il)acético (200 mg, 1 mmol, 1 eq.), benzamidoxy (136 mg, 1 mmol, 1 eq.) y DIPEA (193,66 mg, 1,5 mmol, 1,5 eq.) se mezclaron en DMF (8 ml) y se añadió HATU (493,8 mg, 1,3 mmol, 1,3 eq.). La mezcla se agitó a r.t. durante 2 h. LCMS mostró la conversión completa en amida. La mezcla de reacción luego se calentó a 80 °C durante 4 h para obtener el producto de ciclización. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, luego se lavó con agua y se extrajo con EtOAc. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (80 mg, 26,7% de rendimiento).

#### ETAPA B

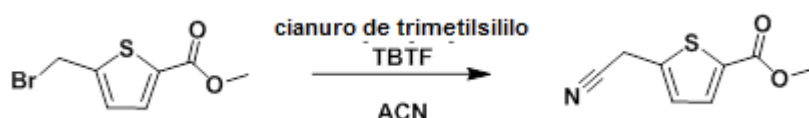


5-[(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (80 mg, 0,266 mmol, 1 eq.) se disolvió en MeOH (2 ml) y se añadió monohidrato de hidrazina (0,039 ml, 0,799 mmol, 3 eq.). La mezcla se calentó a 65 °C o/n. LCMS mostró la conversión completa. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad. El producto bruto material se disolvió en DMF (3 ml) y se añadió DFAA (0,093 ml, 0,799 mmol, 3 eq.). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. LCMS mostró la formación del intermediario abierto. La mezcla se lavó con agua y se extrajo con EtOAc. El residuo se disolvió en THF y se agitó con el reactivo de Burgess a r.t. durante la noche. LCMS mostró la conversión completa. La mezcla se lavó con NaHCO<sub>3</sub>, luego se extrajo con EtOAc y se lavó con agua. La fase orgánica se secó en

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por pTLC. (13,5 mg, 13% de rendimiento). [M-1] experimental 358,85; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,05 – 7,98 (m, 2H), 7,87 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,66 – 7,54 (m, 3H), 7,53 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,90 (s, 2H).

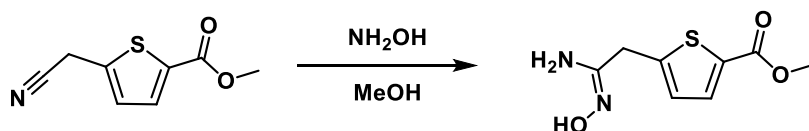
**Ejemplo 11. 2-(difluorometil)-5-[5-[(5-fenil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; (comp. 75)**

Etapa A



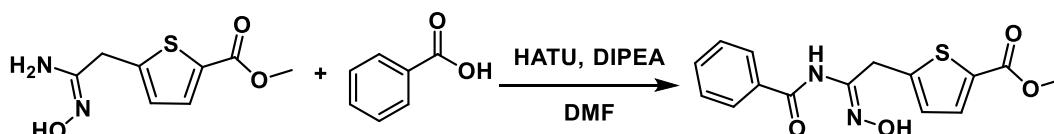
Una solución de 5-(bromometil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (3 g, 12,8 mmol, 1 eq.) y TMS-CN (1266 mg, 12,8 mmol, 1 eq.) en ACN (15 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se enfrió a 0 °C y se trató con TBAF (12,8 ml, 12,8 mmol, 1 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h, luego se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía flash. (550 mg, 23,8% de rendimiento).

Etapa B



Se añadió hidroxilamina (1 g, 15,18 mmol, 5 eq.) a una solución de 5-(cianometil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (550 mg, 3,03 mmol, 1 eq.) en metanol (3,5 ml). La RM se agitó durante 1 h a 50 °C. LCMS mostró la conversión completa. La RM se concentró a sequedad y el producto bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

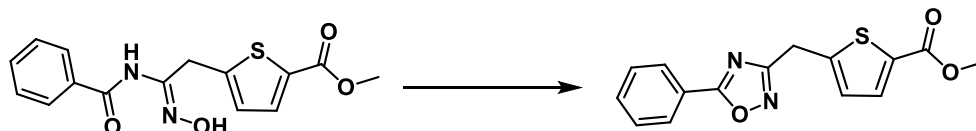
Etapa C



5-[(2E)-2-amino-2-hidroxiiminoetil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (615 mg, 2,87 mmol, 1 eq.) y ácido benzoico (385,62 mg, 3,16 mmol, 1,1 eq.) se mezclaron con DIPEA (1,5 ml, 8,61 mmol, 3 eq.) en DMF (15 ml) y se añadió HATU (1419 mg, 3,78 mmol, 1,3 eq.). La mezcla se agitó a r.t. durante 2 h. LCMS mostró la conversión completa. La

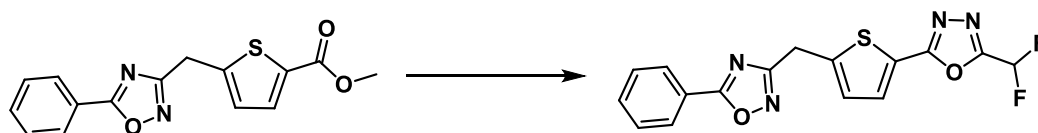
mezcla de reacción se lavó con agua y se extrajo con EtOAc, luego se lavó con agua 3 veces. La fase orgánica se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por FCC (965 mg, 100% de rendimiento).

#### Etapa D



5-[(2E)-2-benzamido-2-hidroxiiminoetil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (500 mg, 1,49 mmol) se disolvió en DMF (5 ml) y la mezcla se calentó a 150 °C en microondas durante 5 min. LCMS mostró la conversión completa. El producto bruto se purificó por cromatografía flash.

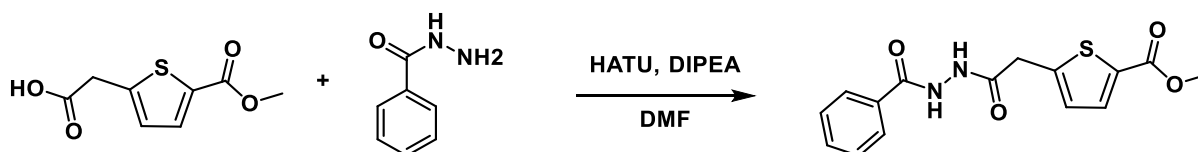
#### Etapa E



5-[(5-fenil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (60 mg, 0,2 mmol, 1 eq.) se disolvió en MeOH (0,3 ml) y se añadió monohidrato de hidrazina (0,194 ml, 4 mmol, 20 eq.) (10 eq.). La hidrazida bruta se purificó por cromatografía flash. La hidrazida obtenida se disolvió en DMF y se añadió DFAA (10 eq.). Después de la agitación durante la noche a r.t. se observó la conversión completa. La mezcla de reacción luego se lavó con  $\text{NaHCO}_3$ , se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  y se lavó con agua. El producto bruto se purificó por pTLC. (3,2 mg, 3,2% de rendimiento).  $[\text{M}-\text{H}]^+$  experimental 361,04;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,16 – 8,09 (m, 2H), 7,84 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 7,77 – 7,69 (m, 1H), 7,65 (m,  $J = 8,3, 6,5, 1,4$  Hz, 2H), 7,46 (t,  $J = 51,3$  Hz, 1H), 7,33 – 7,28 (m, 1H), 4,61 (s, 2H).

### Ejemplo 12. 5-[1-[(1S)-1-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]-2-feniletil]triazol-4-il]piridin-2-amina; comp. 63

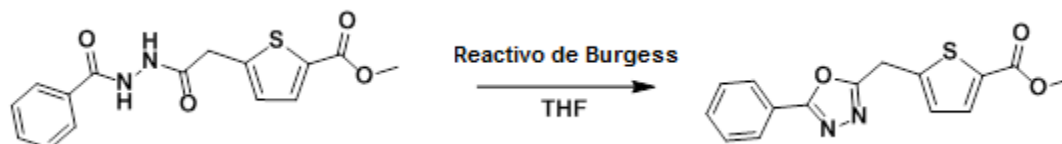
#### Etapa A



Una mezcla de ácido 2-(5-metoxycarboniltiofen-2-il)acético (500 mg, 2,5 mmol, 1 eq.), benzohidrazida (340 mg, 2,5 mmol, 1 eq.), HATU (1234 mg, 3,25 mmol, 1,3 eq.) y

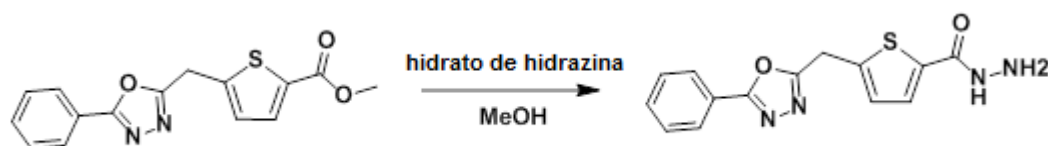
DIPEA (0,652 ml, 3,75 mmol, 1,5 eq.) en DMF (10 ml) se agitó a rt durante 2 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción y la precipitación se produjo. El sólido amarillo se filtró y se secó. (690 mg, 87% de rendimiento).

#### Etapa B



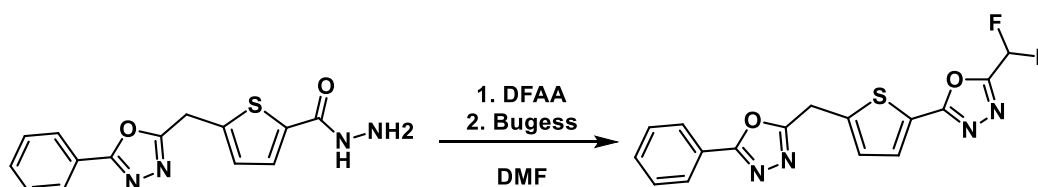
5-[2-(2-benzoylhidrazinil)-2-oxoetil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (200 mg, 0,628 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF (5 ml) y se añadió reactivo de Burgess (179,6 mg, 0,754 mmol, 1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante la noche. Se añadió agua y el sólido ligeramente beige formado se filtró y se lavó con agua. El filtro se lavó con DCM/metanol para recuperar el producto deseado (130 mg, 69% de rendimiento).

#### Etapa C



5-[(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)metil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (100 mg, 0,333 mmol, 1 eq.) se disolvió en metanol (4 ml) y se añadió hidrazina (0,162 ml, 3,33 mmol, 10 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante la noche y se concentró a presión reducida; luego se añadió acetonitrilo y se concentró de nuevo. El residuo sólido marrón se secó durante la noche a presión reducida.

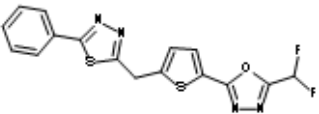
#### Etapa D



5-[(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)metil]tiofeno-2-carbohidrazida (100 mg, 0,333 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMF (3 ml) bajo argón y se añadió gota a gota DFAA (0,041 ml, 0,333 mmol, 1 eq.). La mezcla de reacción se agitó a rt durante 1 hora. Se añadió

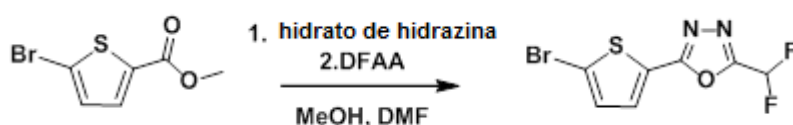
agua y se produjo la precipitación. El sólido blanco se filtró y se lavó con agua. La N'-(2,2-difluoroacetil)-5-[(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)metil]tiofeno-2-carbohidrazida obtenida se disolvió en THF (2 ml) y se añadió el reactivo de Burgess (114,63 mg, 0,48 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. La capa orgánica combinada se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa que suministra el producto como un sólido blanco (15,6 mg, 17% de rendimiento). [M-H]<sup>+</sup> experimental 361,08; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,02 – 7,97 (m, 2H), 7,86 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 7,68 – 7,58 (m, 3H), 7,53 (t, J = 51,4 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,81 (s, 2H).

El siguiente compuesto se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento, usando reactivo de Lwesson en lugar de Burgess':

| Comp | Estructura                                                                          | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                          |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 74   |  | 377.05                          | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 8.00 – 7.94 (m, 2H), 7.85 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 3H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H). |

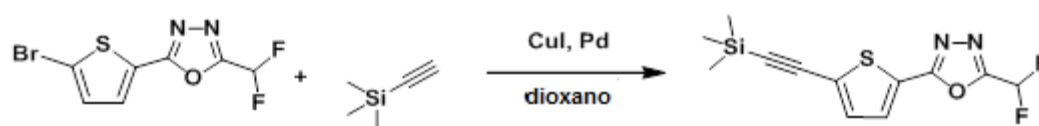
### Ejemplo 13. 2-(difluorometil)-5-[5-[(3-fenil-1,2-oxazol-5-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 76

Etapas A



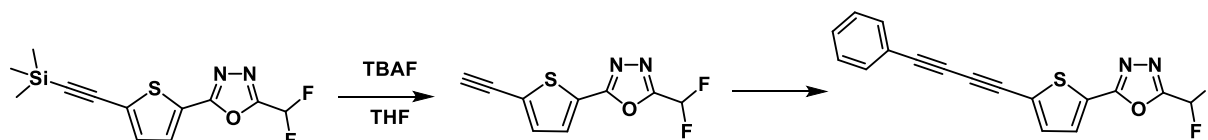
5-bromotiofeno-2-carboxilato de metilo (2 g, 9 mmol, 1 eq.) se disolvió en metanol (25 ml) y se añadió hidracina (1,1 ml, 22,6 mmol, 2,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante la noche, luego se concentró a presión reducida y se coevaporó con tolueno. El residuo se disolvió en DMF (25 ml) y se añadió anhídrido difluoroacético (3,36 ml, 27 mmol, 3 eq.) a 0 °C. la mezcla de reacción se agitó durante la noche a rt. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> y la mezcla de reacción se extrajo con MTBE y se concentró a presión reducida. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación.

## Etapa B



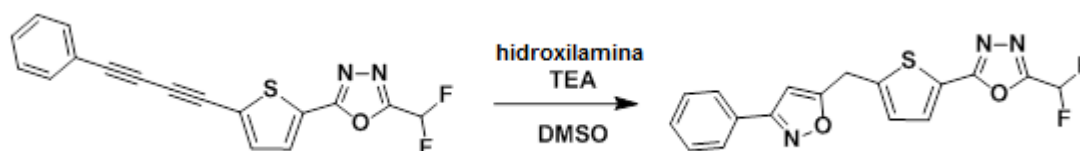
2-(5-bromotiofen-2-il)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (1 g, 3,2 mmol, 1 eq.) se disolvió en dioxano (10 ml), se añadieron catalizador de Pd (264,7 mg, 0,32 mmol, 0,1 eq.) y CuI (60,98 mg, 0,320 mmo, 0,1 eq.) y la mezcla de reacción se desgasificó con N<sub>2</sub>. Luego se añadieron Et<sub>3</sub>N (0,89 ml, 6,4 mmol, 2 eq.) y etnil(trimetil)silano (0,912 ml, 6,4 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a 80 °C. RM se filtró a través de la torta de celite. Se añadió agua al filtrado y se extrajo con AcOEt, se lavó con salmuera, se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. Se purificó por cromatografía flash (603 mg, 63% de rendimiento).

## Etapa C



2-[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]etnil-trimetilsilano (603 mg, 2 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF (4 ml) y se añadió TBAF (581 mg, 2,2 mmol, 1,1 eq.). Después de 30 min, se añadió agua y la mezcla se extrajo con AcOEt. El residuo se purificó por cromatografía flash, luego (240 mg, 1,06 mmol) se disolvió en metanol (1 ml). Se añadió piridina (1 ml) y etnilbenceno (1,1 g, 10,6 mmol) seguido por acetato de cobre (578 mg, 3,18 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche, luego se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía flash (140 mg).

## Etapa D

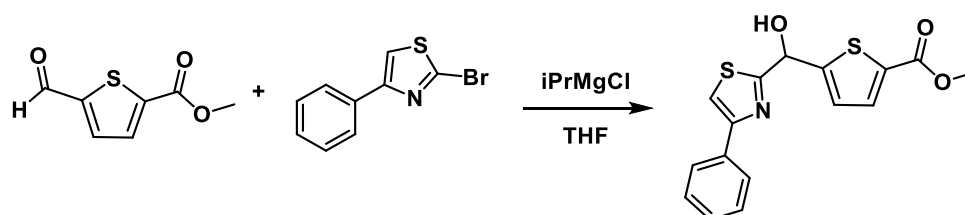


2-(difluorometil)-5-[5-(4-fenilbuta-1,3-diynil)tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol (160 mg, 0,49 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMSO (5 ml) y se añadieron Et<sub>3</sub>N (0,274 ml, 1,96 mmol, 4 eq.) y clorhidrato de hidroxilamina (85 mg, 1,23 mmol, 2,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 100 °C. Se añadió agua y la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt, se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto se purificó

por HPLC preparativa (14 mg, 7% de rendimiento).  $[M-H]^+$  experimental 359,97;  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7,90 – 7,83 (m, 3H), 7,53 (t,  $J$  = 51,2 Hz, 1H), 7,52 – 7,49 (m, 3H), 7,27 (dd,  $J$  = 3,8, 0,9 Hz, 1H), 6,95 (s, 1H), 4,63 (s, 2H).  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7,90 – 7,83 (m, 3H), 7,53 (t,  $J$  = 51,2 Hz, 1H), 7,52 – 7,49 (m, 3H), 7,27 (dd,  $J$  = 3,8, 0,9 Hz, 1H), 6,95 (s, 1H), 4,63 (s, 2H).

**Ejemplo 14. 2-(difluorometil)-5-[5-[(4-fenil-1,3-tiazol-2-il)metil]tiofen-2-il]-1,3,4-oxadiazol; comp. 77**

**Etapas A**



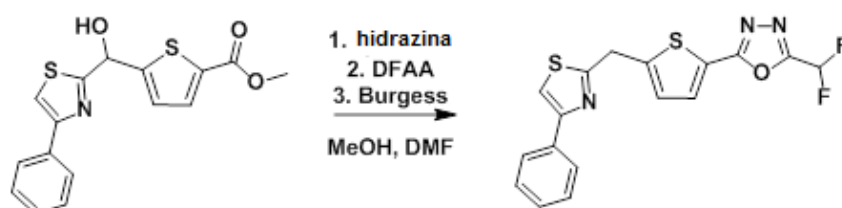
2-bromo-4-fenil-1,3-tiazol (56,436 mg, 0,235 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF seco (1 ml) bajo atmósfera de  $N_2$  y se añadió lentamente  $iPrMgCl$  1 M en THF (0,235 mmol, 1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se añadió aldehído (50 mg, 0,294 mmol, 1,25 eq.) en THF. La agitación continuó durante 2 h adicionales. La mezcla de reacción se lavó con agua y se extrajo con EtOAc. El producto bruto se purificó por pTLC (13 mg, 17% de rendimiento).

**Etapas B**



5-[hidroxi-(4-fenil-1,3-tiazol-2-il)metil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (240 mg, 0,724 mmol, 1 eq.) se disolvió en DCE y se trató con trietilsilano (1,16 ml, 7,24 mmol, 10 eq.) y TFA (1,11 ml, 14,48 mmol, 20 eq.). La mezcla se calentó a 80 °C durante 1 h, luego se concentró a sequedad y el producto bruto se purificó por FCC (150 mg, 66% de rendimiento).

**Etapas C**



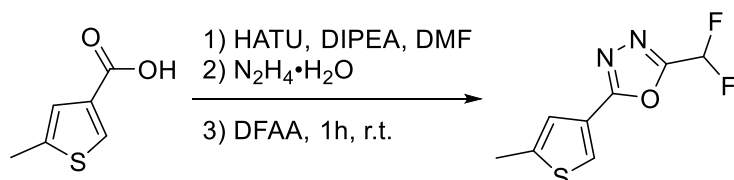
5-[(4-fenil-1,3-tiazol-2-il)metil]tiofeno-2-carboxilato de metilo (150 mg, 0,476 mmol, 1 eq.) se disolvió en MeOH (3 ml) y se añadió monohidrato de hidrazina (3 eq). La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante la noche. Se añadieron otros 3 eq de hidracina y el calentamiento continuó durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, luego el residuo se disolvió en DMF (2 ml) y se trató con DFAA (0,177 ml, 1,4 mmol, 3 eq.). La mezcla se agitó a r.t. durante la noche, luego se lavó con agua, se extrajo con EtOAc, y se concentró a sequedad. El intermediario se disolvió en THF (3 ml) y se añadió reactivo de Burgess (226,7 mg, 0,951 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante la noche. La RM se enfrió a temperatura ambiente, luego se lavó con NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con EtOAc. El producto bruto se purificó por prep. HPLC (17,5 mg, 9,5% de rendimiento). [M-H]<sup>+</sup> experimental 376,10; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,06 (s, 1H), 8,01 – 7,93 (m, 2H), 7,84 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 51,3 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,40 – 7,31 (m, 1H), 7,31 (dt, J = 3,8, 0,9 Hz, 1H), 4,81 (s, 2H).

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el mismo procedimiento, a partir del correspondiente bromuro de arilo:

| Comp | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> Experimental | <sup>1</sup> H-NMR                                                                                                                                                                                                              |
|------|------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 78   |            | 376.35                          | <sup>1</sup> HNMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 7.91 (dd, J = 7.3, 2.4 Hz, 2H), 7.86 – 7.80 (m, 2H), 7.51 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.49 (dt, J = 4.8, 2.7 Hz, 3H), 7.23 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H).                     |
| 84   |            | 360.10                          | <sup>1</sup> HNMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 7.99 – 7.91 (m, 2H), 7.84 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 5.2, 2.0 Hz, 3H), 7.52 (t, J = 51.3 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 4.54 (s, 2H). |
| 85   |            | 376.07                          | <sup>1</sup> HNMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 7.98 – 7.92 (m, 2H), 7.81 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.57 – 7.46 (m, 3H), 7.51 (d, J = 51.3 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.48 (s, 2H).                        |

**Ejemplo 15. 2-(difluorometil)-5-(5-(((4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)metil)tiofen-3-il)-1,3,4-oxadiazol; comp. 104**

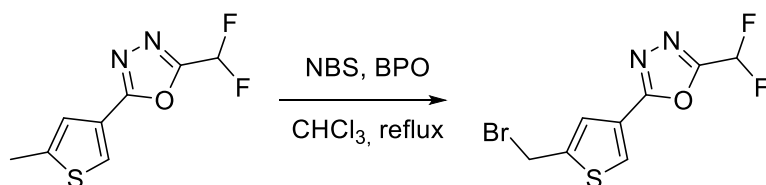
**Etapas A**



Ácido 5-metiltiofeno-3-carboxílico (400 mg, 2,8 mmol, 1 equiv.) se disolvió en DMF y se trató con HATU (1,2 equiv.) en la presencia de DIPEA (3 equiv.) bajo agitación. Tras la activación del ácido carboxílico durante 15 min a r.t., se añadió hidrato de hidrazina (3 equiv.). La formación cuantitativa de hidrazida se observó dentro de 30 min. Se añadió anhídrido difluoroacético (7 equiv.) a la mezcla de reacción. Se formó inmediatamente el intermediario abierto acilhidrazida. Después de agitar la mezcla a r.t. durante 1 h, el intermediario acilhidrazida se cicló completamente al producto de DFMO deseado. La mezcla se diluyó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó de nuevo con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó, se filtró y concentró.

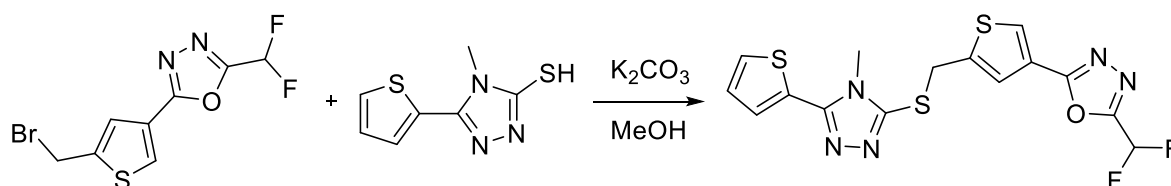
El producto bruto así obtenido se purificó por cromatografía flash (100% DCM) (300 mg, 1,4 mmol, 49% de rendimiento).

**Etapas B**



2-(difluorometil)-5-(5-metiltiofen-3-il)-1,3,4-oxadiazol (300 mg, 1,38 mmol, 1 equiv.) se disolvió en cloroformo. Se añadieron *N*-bromosuccinimida (1,4 equiv., en porciones) y peróxido de dibenzoílo (0,2 equiv.), y la mezcla se agitó bajo reflujo durante 3 h. La mezcla luego se concentró y el residuo se purificó por cromatografía flash (Hex:AcOEt=95:5→70:30). Se obtuvieron 320 mg del producto deseado (1,08 mmol, 78% de rendimiento).

## Etapa C

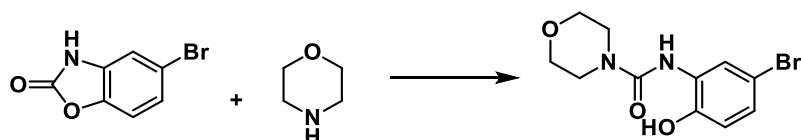


4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (1 equiv.) y carbonato de potasio (2 equiv.) se añadieron a una solución de 2-(5-(bromometil)tiofen-3-il)-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (50 mg, 0,17 mmol, 1 equiv.) en metanol. La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. Se observó conversión completa.

La mezcla de reacción se concentró por evaporación rotatoria, el residuo se suspendió en EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó en  $Na_2SO_4$ , se filtró, se concentró a sequedad. El producto bruto así obtenido se purificó por cromatografía flash (Hex:EA = 7:3  $\rightarrow$  0:10). Se obtuvieron 7 mg del producto puro deseado (10% de rendimiento).  $[M-H]^+$  experimental 412,4 Da.

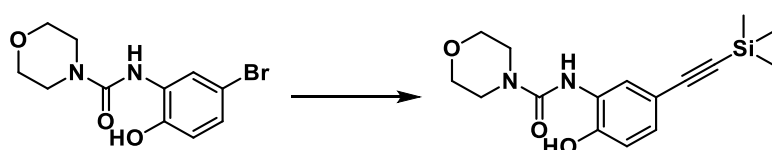
**Ejemplo 16. N-[5-[1-[[5-[5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]tiofen-2-il]metil]triazol-4-il]-2-hidroxifenil]morfolin-4-carboxamida; comp. 47**

## Etapa A



5-bromo-3H-1,3-benzoxazol-2-ona (500 mg, 2,33 mmol, 1 eq.) se disolvió en dioxano (8 ml), y se añadió morfolina (0,370 ml, 4,67 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h a 70 °C, luego se concentró a presión reducida. El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación (640 mg, 61% de pureza por UPLC).

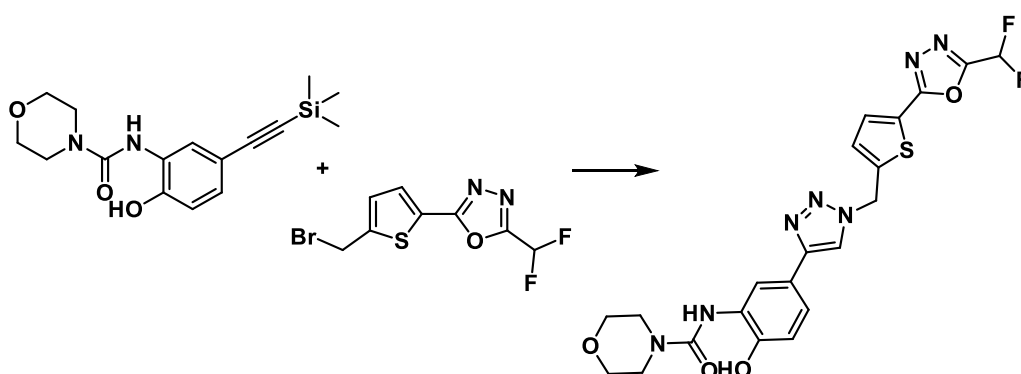
## Etapa B



Una solución de N-(5-bromo-2-hidroxifenil)morfolin-4-carboxamida (640 mg, 2,12 mmol, 1 eq.) en dioxano (8 ml) se purgó con Argón. Luego se añadieron los catalizadores, [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio II) diclorometano (175

mg 0,21 mmol, 0,1 eq.) y yoduro de cobre(I) (20 mg, 0,11 mmol, 0,05 eq.) seguido por TMS-acetileno (0,9 ml, 6,37 mmol, 3 eq.) y TEA (0,593 ml, 4,25 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante la noche, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó varias veces con agua, NaHCO<sub>3</sub>, y salmuera, se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró a través de Celite, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FCC (115 mg, 17% de rendimiento).

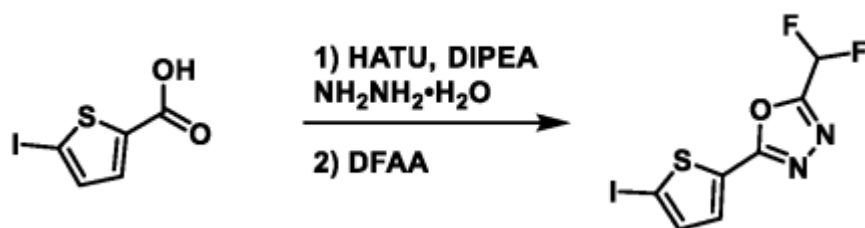
#### Etapa C



Se añadió una solución de TBAF 1 M en THF (0,264 ml, 0,264 mmol, 1,05 eq.) a N-[2-hidroxi-5-(2-trimetilsililetinil)fenil]morfolin-4-carboxamida (80 mg, 0,251 mmol, 1 eq.) En un matraz separado, 2-[5-(bromometil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (74,14 mg, 0,251 mmol, 1 eq.) se mezcló con NaN<sub>3</sub> (17,15 mg, 0,264 mmol, 1,05 eq.) en DMSO. Después de 1 hora las mezclas se combinaron y se añadieron ascorbato de sodio (20 mg, 0,1 mmol, 0,4 eq.) y CuSO<sub>4</sub> (6,3 mg, 0,025 mmol, 0,1 eq.). Después del consumo de los materiales de partida, la mezcla de reacción se filtró y el producto se purificó por HPLC preparativa. El producto se aisló como base libre (34,88 mg, 27% de rendimiento). [M-H]<sup>+</sup> experimental 504,13; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO) δ 9,94 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,98 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 51,4 Hz, 1H), 7,44 – 7,37 (m, 2H), 6,90 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,98 (s, 2H), 3,63 (dd, J = 5,7, 4,0 Hz, 4H), 3,49 – 3,42 (m, 4H).

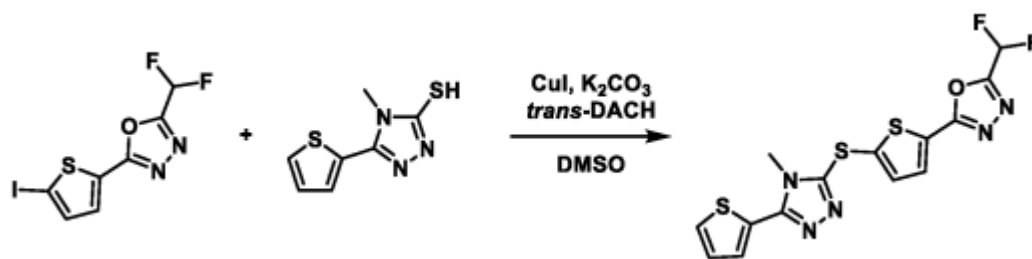
#### **Ejemplo 17. 2-(difluorometil)-5-(5-((4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)tiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazole; compd. 98**

#### Etapa A



HATU (1.2 equiv.) y DIPEA (3 equiv.) son añadidos a una solución de ácido 5-yodotiofeno-2-carboxílico (200 mg, 0,78 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 mL) bajo agitación. Después de 15 min, hidrato de hidrazina (3 equiv.) fue añadido. Se observó una conversión total a la hidrazida dentro de 15 minutos. Anhídrido difluoroacético (12 equiv.) fue luego añadido. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente por 30 min, el intermedio estuvo completamente convertido al producto ciclado. La mezcla de reacción fue neutralizada mediante la adición de  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado. El precipitado que se formó fue recolectado por filtración y úrficado por cromatografía flash (Hex:EtOAc = 95:5  $\rightarrow$  7:3) para obtener el producto puro (180 mg, 0,55 mmol, 70% rendimiento).

#### Etapa B



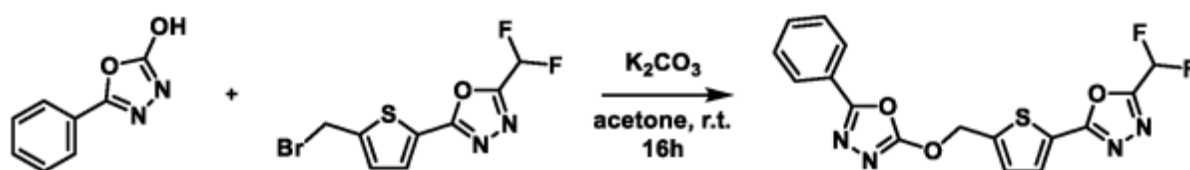
El tanque de reacción fue cargado con 2-(difluorometil)-5-(5-yodotiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol (50 mg, 0,15 mmol, 1 equiv.) del paso previo, 4-metil-5-(tiofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (1 equiv.), carbonato de potasio (3 equiv.) yoduro de cobre (0.2 equiv) y *trans*-(1R,2R)-ciclohexano-1,2-diamina (0.3 equiv.). Los reactivos fueron disueltos en DMSO (4 mL), y la mezcla resultante fue agitada a 110°C durante 1h 30 min. La mezcla de reacción fue diluida con agua. El precipitado que se formó fue recolectado por filtración y purificado por cromatografía flash (Hex:EtOAc = 7:3) para obtener el compuesto del título (35 mg, 0,09 mmol, 60% rendimiento).  $[\text{M}-\text{H}]^+$  experimental 397.9 Da.

Los siguientes compuestos fueron preparados de acuerdo al mismo procedimiento, empezando por el mercaptoaril sustituido correspondiente:

| Compd | Estructura | [M+H] <sup>+</sup> experimental | <sup>1</sup> H-RMN                                                                                                                                                                                 |
|-------|------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 91    |            | 378.11                          | <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 7.98(D, J=4.0 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.74 (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.71-7.64 (m, 2H), 7.61 (t, J=52.6 Hz, 1H), 7.53-7.44 (m, 2H), 7.44-7.35 (m, 1H) |
| 92    |            | 394.7                           |                                                                                                                                                                                                    |

**Ejemplo 18. 2-(difluorometil)-5-(5-(((5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)oxi)metil)tiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol; compd. 101**

**Etapas A**



5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-ol (1 equiv.), 2-[5-(bromoetil)tiofen-2-il]-5-(difluorometil)-1,3,4-oxadiazol (50 mg, 0,17 mmol, 1 equiv.) y carbonato de potasio (4 equiv.) fueron suspendidos en acetona (3mL), y la mezcla de reacción fue agitada durante la noche. Una conversión casi total a producto fue observada. La mezcla fue diluida con agua y extraída en EtOAc. El solvente fue evaporado y el residuo crudo fue purificado por cromatografía flash (hexano:DCM = 3:7 -> 0:10) para obtener el compuesto del título (11,7 mg, 0,03 mmol, 18% rendimiento). [M-H]<sup>+</sup> experimental 377,17 Da.

### Ejemplo 19. Pruebas enzimáticas

Para cada compuesto de prueba, se prepararon soluciones 100X concentradas de DMSO a 8 dosis y luego se diluyeron en buffer de ensayo (Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 130 mM, Tween-20 0,05%, Glicerol 10%) para obtener soluciones 5X concentradas en relación con las concentraciones finales (rango típico de concentración final - 6,4-200000 nM o 0,18-50000 nM, contenido final de DMSO - 1%). A continuación, se colocaron 10 µL de solución de cada concentración de compuesto de prueba en una placa de 96 pocillos por triplicado y se añadieron a cada pocillo 15 µL de solución enzimática concentrada 3,33X en el buffer de ensayo que contenía BSA concentrada 3,33X (concentración final de BSA 1 mg/ml) y, en el caso de HDAC6, TCEP concentrada 3,33X (concentración final de TCEP - 200 µM). Después de un periodo de preincubación a 25 °C (30 minutos para HDAC6 y 120 minutos para HDAC1), se añadieron 25 µL de solución que contiene el sustrato. Como sustrato se utilizaron sustrato de desacetilasa FLUOR DE LYS® (Enzo Life Sciences, cat: BML-KI104, FdL), FLUOR DE LYS®-sustrato verde (Enzo Life Sciences, cat: BML-KI572, FdL\_G) o Boc-Lys(Tfa)-AMC (Bachem, cat: 4060676,005, Tfal) - solución concentrada 2X en buffer de ensayo. Después de un periodo de reacción (30 minutos a 25 °C), se añadieron 50 µL de la solución de revelado consistente en el revelador concentrado FLUOR DE LYS® I (Enzo Life Sciences, ca: BML-KI105), diluido 200 veces en buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) más 2 µM TSA y después de 25 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, utilizando el instrumento Victor 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer Wallac, se realizó la lectura de fluorescencia (excitación/emisión: 485/535 nM - Fluor de Lys Verde, 355/460 nM - Tfal, Fluor de Lys).

Se evaluó la actividad enzimática sobre HDAC6 y HDAC1 humanas recombinantes (Tabla 1) para cada compuesto sintetizado.

Tabla 1 - Ensayo de actividad enzimática inhibitoria sobre HDAC6 y sobre HDAC1 (IC<sub>50</sub> en unidad nM).

| Ejemplo | HDAC6<br>IC <sub>50</sub> , nM | HDAC1 IC <sub>50</sub> ,<br>nM |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
|---------|--------------------------------|--------------------------------|

|    |     |          |
|----|-----|----------|
| 1  | 9,1 | 17115    |
| 2  | 38  | > 100000 |
| 3  | 16  | > 100000 |
| 4  | 7,4 | > 100000 |
| 5  | 6,5 | > 100000 |
| 6  | 490 | > 100000 |
| 7  | 32  | > 100000 |
| 8  | 13  | > 50000  |
| 9  | 135 | > 50000  |
| 10 | 12  | > 100000 |
| 11 | 141 | > 100000 |
| 12 | 130 | >200000  |
| 13 | 850 | >50000   |
| 14 | 310 | > 50000  |
| 15 | 79  | > 50000  |
| 16 | 71  | > 50000  |
| 17 | 84  | > 50000  |
| 18 | 160 | > 50000  |
| 19 | 290 | > 50000  |
| 20 | 17  | 13575    |

|    |     |         |
|----|-----|---------|
| 21 | 19  | >50000  |
| 22 | 19  | 61600   |
| 23 | 89  | >50000  |
| 24 | 433 | >50000  |
| 25 | 9   | >50000  |
| 26 | 32  | 11887   |
| 27 | 85  | >200000 |
| 28 | 12  | >50000  |
| 29 | 8   | 5761    |
| 30 | 9   | >100000 |
| 31 | 17  | 37180   |
| 32 | 11  | >100000 |
| 33 | 14  | >100000 |
| 34 | 2   | 4199    |
| 36 | 17  | >100000 |
| 37 | 20  | 53300   |
| 38 | 65  | >100000 |
| 39 | 181 | >100000 |
| 40 | 10  | 39000   |
| 41 | 56  | >100000 |

|    |      |         |
|----|------|---------|
| 42 | 6    | >100000 |
| 43 | 21   | 80000   |
| 44 | 10   | >100000 |
| 45 | 4    | 5573    |
| 46 | 15   | >100000 |
| 47 | 3    | >100000 |
| 48 | 13   | >100000 |
| 49 | 11   | 16210   |
| 50 | 35   | >100000 |
| 51 | 14   | >100000 |
| 52 | 12   | 21630   |
| 53 | 20   | 36860   |
| 54 | 16   | 25850   |
| 55 | 16   | 17080   |
| 56 | 1264 | >100000 |
| 57 | 52   | >100000 |
| 58 | 9    | 34150   |
| 59 | 16   | >100000 |
| 60 | 3    | 3496    |
| 61 | 8    | >100000 |

|    |     |         |
|----|-----|---------|
| 62 | 30  | >100000 |
| 63 | 41  | 102600  |
| 64 | 53  | 144600  |
| 65 | 16  | >100000 |
| 66 | 18  | >100000 |
| 67 | 12  | >100000 |
| 68 | 29  | >100000 |
| 69 | 4   | >100000 |
| 70 | 4   | 37030   |
| 71 | 410 | >100000 |
| 72 | 2   | >100000 |
| 73 | 45  | >100000 |
| 74 | 43  | >100000 |
| 75 | 276 | 61220   |
| 76 | 105 | >100000 |
| 77 | 367 | 171700  |
| 78 | 98  | >100000 |
| 79 | 2   | 2917    |
| 80 | 10  | >100000 |
| 82 | 6   | >100000 |

|     |      |         |
|-----|------|---------|
| 83  | 172  | 3698    |
| 84  | 263  | >100000 |
| 85  | 776  | >100000 |
| 87  | 17   | 6767    |
| 88  | 6    | 8022    |
| 91  | 333  | >100000 |
| 93  | 70   | >50000  |
| 94  | 91   | >100000 |
| 98  | 17   | >100000 |
| 104 | 7584 | >100000 |

Todos los compuestos analizados resultaron prácticamente inactivos ( $IC_{50} > 15 \mu M$ ) frente a HDAC1.

Todos los compuestos analizados presentan una actividad inhibidora elevada y selectiva frente a la enzima HDAC6.

#### **Ejemplo 20. Acetilación de $\alpha$ -tubulina in vitro en 697 líneas celulares**

La acetilación in vitro de la  $\alpha$ -tubulina se evaluó en células B precursoras 697 de leucemia humana.

Las células 697 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco, cat: 21875-034) suplementado con HEPES 10 mM (Gibco, cat: 15630-080), Pen-Strep (Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100  $\mu g/ml$ , Gibco, cat: 15140-122) y suero bovino fetal 10% (Gibco, cat: 10270-106).

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (Costar, cat: 3512) a una densidad de  $5,5 \times 10^5$  células/ml.

Se prepararon diluciones seriadas de los compuestos de prueba en DMSO utilizando soluciones patrón 20 mM para obtener 8 dosis 200x concentradas con respecto a las dosis finales (2,7-100000 nM). A continuación, las soluciones de DMSO se diluyeron 10x en medio de cultivo para obtener soluciones 20 veces concentradas que se utilizaron para el tratamiento de las células (se añadieron 125 µl de soluciones de medio a 2,375 ml de suspensión celular). El contenido final de DMSO se fijó en el 0,5%. Las placas se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% durante 16 horas.

Al final del periodo de incubación, se recolectaron las células, se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x g y se lavaron con NaCl 0,9% a 4 °C. El pellet resultante se trató durante 30 minutos a 4 °C con 100 µl de buffer completo Lysis-M que contiene inhibidores de proteasas (Lysis completo-M Roche + Comprimidos completos, Mini Easypack, cat: 4719956001) y cócteles de inhibidores de fosfatasa (PhosStop Easypack, Roche, cat: 4906837001) y luego se centrifugó 10 minutos a 18213 x g. La concentración de proteínas en cada sobrenadante se determinó utilizando un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, cat: 23227). Las muestras se diluyeron en PBS 1x para obtener una concentración de 2 µg/ml y se recubrieron en placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, cat: 442404). Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron dos veces con buffer de lavado (PBS 1x + tween 20 0,005%) y se saturaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 300 µL de 1x PBS que contiene FBS 10%. Después de lavar dos veces con buffer de lavado, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de 100 µl/pocillo de anticuerpo anti-α-tubulina acetilada (anticuerpo monoclonal anti-Tubulina, acetilado producido en ratón, Sigma-Aldrich, cat: T6793) o anticuerpo anti-α-tubulina total (Monoclonal anti-α-Tubulina producido en ratón, Sigma-Aldrich, cat: T6074) diluido 1:1000 en 1x PBS que contiene FBS 10%. Después de 5 ciclos de lavado con buffer de lavado se añadió el anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (IgG, IgM, IgA (H+L) anti-ratón de cabra, concentración patrón 0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, cat: A10668), diluido 1:1000 en 1x PBS + FBS 10% se añadió a un volumen de 100 µl/pocillo. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con buffer de lavado y, a continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato TMB (kit de sustrato TMB, Thermo Fisher Scientific, cat: 34021) durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo

mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Las placas se leyeron en el lector multimodo de microplacas BioTek Synergy H1 a una longitud de onda de 450 nm.

La absorbancia medida se corrigió mediante la sustracción de la media de los valores del blanco (muestras sin el anticuerpo primario). Se calcularon las relaciones de absorbancia de los ensayos de acetil tubulina a total y se normalizaron con respecto a la curva logística de 4 parámetros del compuesto de referencia (control positivo), donde 0% es la parte inferior ajustada y 100% es la parte superior ajustada de la curva. Los resultados se expresan como EC<sub>50</sub> relativa.

Tabla 2 – Acetilación de tubulina en la línea celular 697 (EC<sub>50</sub> en unidades nM).

| <b>Ejemplo</b> | <b>Células TubAc<br/>697 EC<sub>50</sub>, nM</b> |  | <b>Ejemplo</b> | <b>Células TubAc<br/>697 EC<sub>50</sub>, nM</b> |
|----------------|--------------------------------------------------|--|----------------|--------------------------------------------------|
| 1              | 30                                               |  | 41             | 210                                              |
| 2              | 168                                              |  | 42             | 8                                                |
| 3              | 50                                               |  | 43             | 159                                              |
| 4              | 11                                               |  | 44             | 2                                                |
| 5              | 6                                                |  | 45             | 9                                                |
| 7              | 72                                               |  | 46             | 18                                               |
| 8              | 17                                               |  | 47             | 4                                                |
| 10             | 25                                               |  | 48             | 8                                                |
| 12             | 278                                              |  | 49             | 16                                               |
| 15             | 83                                               |  | 50             | 20                                               |
| 16             | 326                                              |  | 51             | 9                                                |
| 17             | 149                                              |  | 52             | 37                                               |

|    |    |     |      |  |    |    |    |      |  |
|----|----|-----|------|--|----|----|----|------|--|
| 18 |    | 602 |      |  | 53 |    | 21 |      |  |
| 19 |    | 681 |      |  | 54 |    | 28 |      |  |
| 20 |    | 26  |      |  | 55 |    | 35 |      |  |
| 21 |    | 40  |      |  | 57 |    | 6  |      |  |
|    | 22 |     | 47   |  |    | 58 |    | 24   |  |
|    | 23 |     | 382  |  |    | 59 |    | 46   |  |
|    | 24 |     | 9737 |  |    | 60 |    | 13   |  |
|    | 25 |     | 10   |  |    | 61 |    | 14   |  |
|    | 26 |     | 1105 |  |    | 62 |    | 26   |  |
|    | 27 |     | 498  |  |    | 63 |    | 158  |  |
|    | 28 |     | 10   |  |    | 64 |    | 66   |  |
|    | 29 |     | 39   |  |    | 70 |    | 4    |  |
|    | 30 |     | 29   |  |    | 73 |    | 505  |  |
|    | 31 |     | 61   |  |    | 78 |    | 1137 |  |
|    | 32 |     | 20   |  |    | 79 |    | 108  |  |
|    | 33 |     | 14   |  |    | 80 |    | 47   |  |
|    | 34 |     | 34   |  |    |    |    |      |  |
|    | 36 |     | 43   |  |    |    |    |      |  |
|    | 37 |     | 55   |  |    |    |    |      |  |
| 38 |    | 65  |      |  |    |    |    |      |  |

|    |      |  |  |  |
|----|------|--|--|--|
| 39 | 1340 |  |  |  |
| 40 | 25   |  |  |  |

La mayor parte de los compuestos analizados muestran actividad muy alta en la inducción de la acetilación de tubulina en la línea celular 697.

### **Ejemplo 21. Acetilación de $\alpha$ -tubulina in vitro en las líneas celulares N2a**

La acetilación in vitro de la  $\alpha$ -tubulina se evaluó en líneas celulares de neuroblastoma murino N2a.

Las células se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle (ATCC, cat: 30-2003) suplementado con un 10% de suero bovino fetal - FBS (Gibco, cat: 10270-106).

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (Costar, cat: 3512) a una densidad de  $6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Los compuestos de prueba se prepararon como soluciones concentradas 20X del medio respecto a las concentraciones finales. Las células se trataron al día siguiente. Los compuestos se analizaron a 3 dosis: 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M. El contenido final de DMSO se fijó en el 0,5%. Las células se incubaron con los compuestos a 37 °C durante 16 horas.

Al final del periodo de incubación, se recogieron las células, se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x g y se lavaron con NaCl 0,9% a 4 °C. El pellet resultante se trató durante 30 minutos a 4 °C con 100  $\mu$ l de buffer de lisis M completo que contiene inhibidores de proteasas (Lisis completo-M Roche + Comprimidados completos, Mini Easypack, cat: 4719956001) y cócteles de inhibidores de fosfatasa (PhosStop Easypack, Roche, cat: 4906837001) y luego se centrifugó 10 minutos a 18213 x g. La concentración de proteínas en cada sobrenadante se determinó utilizando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, cat: 23227). Las muestras se diluyeron en PBS 1x para obtener una concentración de 2  $\mu$ g/ml y se recubrieron en placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, cat: 442404). Las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente, después se lavaron dos veces con buffer de lavado (PBS 1x + tween 20 0,005%) y se saturaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 300  $\mu$ L de PBS 1x que contiene FBS 10%. Después de lavar dos veces con buffer de lavado, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (Anticuerpo monoclonal anti-

Tubulina, acetilada, producida en ratón, Sigma-Aldrich, cat: T6793) o anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina total (Monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulina producido en ratón, Sigma-Aldrich, cat: T6074) diluido 1:1000 en 1x PBS que contiene FBS 10%. Después de 5 ciclos de lavado con buffer de lavado, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (IgG, IgM, IgA (H+L) anti-ratón de cabra, concentración patrón 0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, cat: A10668), diluido 1:1000 en 1x PBS + FBS 10% se añadió a un volumen de 100  $\mu$ l/pocillo. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con buffer de lavado y, a continuación, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de sustrato TMB (kit de sustrato TMB, Thermo Fisher Scientific, cat: 34021) durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. Las placas se leyeron en el lector de microplacas multimodo BioTek Synergy H1 a una longitud de onda de 450 nm.

La absorbancia medida se corrigió mediante la sustracción de la media de los valores del blanco (muestras sin el anticuerpo primario). Se calcularon las relaciones de absorbancia de los ensayos de acetil tubulina a total. Los resultados se expresan como nivel de aumento de la relación  $\alpha$ -tubulina acetilada/ $\alpha$ -tubulina total de cada muestra a 1  $\mu$ M en relación con la muestra de control (no tratada) y se resumen en las Tablas 3.

Tabla 3 - Acetilación de tubulina en la línea celular N2a (nivel de aumento de la relación de tubulina acetilada y tubulina total con respecto al control, a una concentración de muestra de 1  $\mu$ M)

| <b>Ejemplo</b> | <b>Células TubAc<br/>N2a FI, @1uM</b> |
|----------------|---------------------------------------|
| 1              | 17                                    |
| 2              | 4                                     |
| 3              | 15                                    |
| 4              | 36                                    |

|    |    |
|----|----|
| 5  | 42 |
| 7  | 5  |
| 8  | 14 |
| 9  | 2  |
| 10 | 19 |
| 11 | 2  |
| 12 | 3  |
| 13 | 2  |
| 14 | 2  |
| 15 | 8  |
| 16 | 3  |
| 17 | 3  |
| 18 | 2  |
| 19 | 2  |

La mayor parte de los compuestos analizados muestran actividad alta en la inducción de la acetilación de tubulina en la línea celular N2a.

**Ejemplo 22. Acetilación in vitro de  $\alpha$ -tubulina en líneas celulares SH-SY5Y indiferenciadas**

Las células SH-SY5Y (ATCC, cod. CRL-2266) se siembran en placas negras de 96 pocillos ópticamente optimizadas (Perkin Elmer, cod. 6055302) a 5000 células/pocillo en 100  $\mu$ l/pocillo de medio de crecimiento (DMEM/F12 (1:1) + 10 mM de hepes + 100 unidades/ml de penicilina + 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina + 10% de suero de ternera fetal inactivado (FCS, Hyclone)).

Después de 24 h de siembra, las células se incuban durante la noche con las moléculas seleccionadas a 0,1 - 1 - 10  $\mu$ M. ACY1083 y Tubastatina A, a las mismas dosis, se analizan como controles positivos de la acetilación de  $\alpha$ -Tubulina, mientras que las células no tratadas se incuban con DMSO 0,01% y se indican como CTRL DMSO.

Al final de la incubación, las células se fijan añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de formaldehído 8% en PBS (concentración final de formaldehído 4% en 200  $\mu$ l/pocillo) directamente en los 100  $\mu$ l/pocillo de medio, durante 30 min a RT. La solución fijadora se retira cuidadosamente, y los pocillos se lavan dos veces con PBS durante 10 min cada uno. Las células fijadas se mantienen en PBS a 4 °C hasta la tinción.

El día del experimento de tinción, las células fijadas se incuban 60 min con el buffer de bloqueo (PBS con FCS 5% + Triton™ X-100 0,3%). Mientras se bloquea, se preparan los anticuerpos primarios diluyendo 1:200 el conjugado anticuerpo  $\alpha$ -Tubulina Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, cod. 5063) y 1:50 de conjugado de anticuerpo Acetil- $\alpha$ -Tubulina Alexa Fluor 647 (Cell Signaling, cod. 81502) en el buffer de dilución de anticuerpo (PBS con BSA 1% + Triton™ X-100 0,3%). Una vez aspirada la solución de bloqueo, se aplican los anticuerpos primarios diluidos y se incuban durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se enjuagan dos veces con PBS (10 min cada una), se incuban 5 min con DAPI 300 nM en PBS y se enjuagan dos veces con PBS (10 min cada una). Para cada tratamiento se tiñen 3 pocillos.

Las imágenes de las células teñidas se adquieren mediante el instrumento IN Analizador celular 2500 HS, utilizando: el canal rojo lejano para la tinción de Acetil- $\alpha$ -Tubulina (exposición 0,02 seg), el canal verde para la tinción de  $\alpha$ -Tubulina (exposición 0,02 seg), y el canal azul para la tinción de DAPI (núcleos). Para cada pocillo se adquieren 10 imágenes.

Las imágenes de las células teñidas se analizan con el software InCarta (Molecular Devices) para obtener la intensidad de fluorescencia considerando células enteras. Para cada tratamiento, los valores medios de intensidad celular - Bckg (Cell), para ambas tinciones, se obtienen utilizando los datos sin procesar InCarta por FOV (Field of View). Los resultados se expresan como nivel de aumento de la relación de tubulina acetilada y tubulina total respecto al control.

Tabla 4 – Acetilación de la tubulina en la línea celular SH-SY5Y indiferenciada (nivel de aumento de la relación de tubulina acetilada y tubulina total respecto al control a 1  $\mu$ M).

| <b>Ejemplo</b> | <b>Células TubAc SH-SY5Y FI,<br/>@1<math>\mu</math>M</b> |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| 1              | 14                                                       |
| 2              | 11                                                       |
| 3              | 15                                                       |
| 4              | 17                                                       |
| 5              | 17                                                       |
| 6              | 1                                                        |
| 7              | 13                                                       |
| 8              | 15                                                       |
| 9              | 4                                                        |
| 10             | 15                                                       |
| 11             | 3                                                        |
| 12             | 5                                                        |
| 15             | 11                                                       |
| 20             | 14                                                       |
| 21             | 11                                                       |
| 22             | 13                                                       |
| 25             | 17                                                       |
| 28             | 15                                                       |
| 29             | 14                                                       |

|    |    |
|----|----|
| 30 | 15 |
| 31 | 14 |
| 32 | 15 |
| 33 | 16 |
| 34 | 9  |
| 36 | 14 |
| 42 | 14 |
| 44 | 16 |
| 45 | 15 |
| 46 | 9  |
| 47 | 16 |
| 48 | 14 |
| 49 | 13 |
| 51 | 15 |
| 57 | 15 |
| 58 | 14 |
| 59 | 10 |
| 60 | 13 |