

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 208**

51 Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)
C07D 209/42 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/66 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2016 PCT/US2016/039307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16210294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2016 E 16736683 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3313846**

54 Título: **Compuestos de tienopirrol y usos de los mismos como inhibidores de luciferasas procedentes de Oplophorus**

30 Prioridad:

25.06.2015 US 201562184714 P
18.08.2015 US 201562206525 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2021

73 Titular/es:

PROMEGA CORPORATION (100.0%)
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711-5399, US

72 Inventor/es:

DUELLMAN, SARAH;
ROBERS, MATTHEW, B.;
WALKER, JOEL, R.;
ZHOU, WENHUI y
ZIMPRICH, CHAD

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 809 208 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de tienopirrol y usos de los mismos como inhibidores de luciferasas procedentes de *Oplophorus*

5 CAMPO TÉCNICO

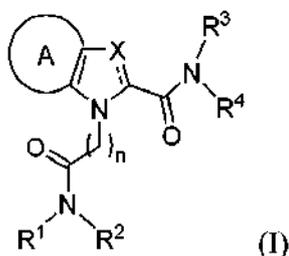
La presente divulgación se refiere a compuestos de tienopirrol que pueden inhibir luciferasas procedentes de *Oplophorus*.

10 ANTECEDENTES

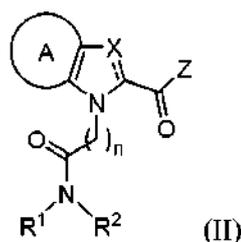
Las moléculas informadoras se usan rutinariamente para monitorizar sucesos moleculares en los campos de la Biología, Bioquímica, Inmunología, Biología celular, y Biología molecular. Las luciferasas basadas en la luciferasa secretada por el camarón de aguas profundas, *Oplophorus gracilirostris*, se pueden usar como moléculas informadoras y se ha mostrado que tienen características ventajosas que incluyen amplia especificidad de sustrato, alta actividad, y alto rendimiento cuántico. Puede ser aún más ventajoso, en ciertas aplicaciones, controlar la señal luminiscente de las luciferasas de *Oplophorus*.

20 SUMARIO

La invención es como se describe en las reivindicaciones. En un aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal del mismo:



- 25 en la que:
- la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
 - n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
 - 30 X es CH, N, O, o S;
 - en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
 - A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;
 - 35 R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxialquilo opcionalmente sustituido y alcoxialcoxialquilo opcionalmente sustituido; y
 - R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido.
 - 45 En un aspecto, la divulgación proporciona un método de inhibición de una luciferasa procedente de *Oplophorus*, comprendiendo el método poner en contacto la luciferasa procedente de *Oplophorus* con un compuesto descrito en el presente documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II).
 - 50 En un aspecto, la divulgación proporciona un método de inhibición de una luciferasa procedente de *Oplophorus*, comprendiendo el método poner en contacto la luciferasa procedente de *Oplophorus* con un compuesto de fórmula (II):



en la que:

- 5 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
 n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
 X es CH, N, O, o S;
 en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea
 discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
 10 A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente
 sustituido;
 R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈
 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo
 opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido;
 15 Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y
 R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈
 opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente
 sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente
 sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo
 20 opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo
 opcionalmente sustituido.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para modular la luminiscencia de una luciferasa procedente de
Oplophorus en una muestra, comprendiendo el método,

- 25 (a) poner en contacto la muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto descrito en el presente
 documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II); y
 (b) detectar luminiscencia en la muestra,

30 en el que el compuesto causa una disminución en la luminiscencia de la luciferasa procedente de *Oplophorus*.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una
 segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

- 35 (a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto descrito en el presente
 documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II), en el que la muestra comprende:
 (i) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de
 fusión comprende un primer fragmento de una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera proteína; y
 40 (ii) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína de
 fusión comprende un segundo fragmento de luciferasa procedente de *Oplophorus* y una segunda proteína; y
 (b) detectar luminiscencia en la muestra,

45 en el que la detección de luminiscencia indica una interacción entre la primera proteína y la segunda proteína.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una
 segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

- 50 (a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto descrito en el presente
 documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II), en el que la muestra comprende:
 (iii) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de
 fusión comprende una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera proteína, en el que la luciferasa
 55 procedente de *Oplophorus* es un donador bioluminiscente; y
 (iv) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína de
 fusión comprende una molécula aceptora fluorescente y una segunda proteína;

(b) detectar transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) en la muestra, que indica una interacción o proximidad del donador bioluminiscente y el aceptor de fluorescencia.

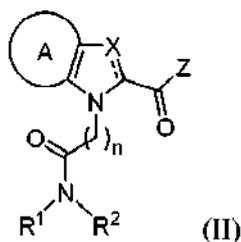
5 En un aspecto, la divulgación proporciona un sistema de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) que comprende: una primera proteína de fusión que incluye una primera proteína diana y una molécula donadora de bioluminiscencia, en el que la molécula donadora de bioluminiscencia es una luciferasa procedente de *Oplophorus*; una segunda proteína de fusión que incluye una segunda proteína diana y una molécula aceptora fluorescente; un sustrato de coelenterazina, y un compuesto descrito en el presente documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II).

En un aspecto, la divulgación proporciona un kit que comprende:

15 (a) un compuesto descrito en el presente documento, tal como un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ib') o (II); y
(b) una luciferasa procedente de *Oplophorus*.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para modular la luminiscencia de una luciferasa procedente de *Oplophorus* en una muestra, comprendiendo el método:

20 (a) poner en contacto la muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

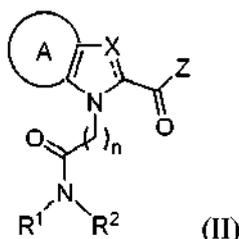
25 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
X es CH, N, O, o S;
en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
30 A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;
R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido;
35 Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y
R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y

45 (b) detectar luminiscencia en la muestra,

en el que el compuesto de fórmula (II) causa una disminución en la luminiscencia de la luciferasa procedente de *Oplophorus*.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):

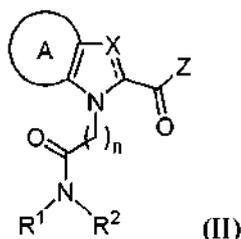


en la que:

- 5 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
X es CH, N, O, o S;
en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea
discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
10 A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente
sustituido;
R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈
opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo
opcionalmente sustituido, alcoxialquilo opcionalmente sustituido y alcoxialcoxialquilo opcionalmente
15 sustituido;
Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y
R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo
C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈
opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo
20 opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y
heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos,
forman juntos un anillo opcionalmente sustituido,
en el que la muestra comprende:
- 25 (v) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de
fusión comprende un primer fragmento de una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera
proteína; y
(vi) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína
de fusión comprende un segundo fragmento de la luciferasa procedente de *Oplophorus* y una segunda
30 proteína; y
- (b) detectar luminiscencia en la muestra,
en el que la detección de luminiscencia indica una interacción entre la primera proteína y la segunda proteína.

35 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una
segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

- 45 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
X es CH, N, O, o S;
en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea
discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilcoxilalquilo opcionalmente sustituido; Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y

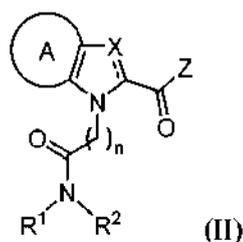
R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido, en el que la muestra comprende:

(vii) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de fusión comprende una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera proteína, en el que la luciferasa procedente de *Oplophorus* es un donador bioluminiscente; y

(viii) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína de fusión comprende una molécula aceptora fluorescente y una segunda proteína;

(b) detectar transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) en la muestra, que indica una interacción o proximidad del donador bioluminiscente y el aceptor de fluorescencia.

En un aspecto, la divulgación proporciona un sistema de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) que comprende: una primera proteína de fusión que incluye una primera proteína diana y una molécula donadora de bioluminiscencia, en el que la molécula donadora de bioluminiscencia es una luciferasa procedente de *Oplophorus*; una segunda proteína de fusión que incluye una segunda proteína diana y una molécula aceptora fluorescente; un sustrato de coelenterazina, y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

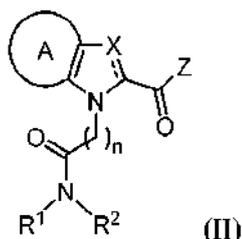
R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilcoxilalquilo opcionalmente sustituido;

Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y

R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido.

En un aspecto, la divulgación proporciona un kit que comprende:

(a) un compuesto de fórmula (II):



en la que:

- 5 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
 n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
 X es CH, N, O, o S;
 en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea
 discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
 10 A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente
 sustituido;
 R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈
 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo
 opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente
 15 sustituido;
 Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y
 R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo
 C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈
 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo
 20 opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y
 heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos,
 forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y (b) una luciferasa procedente de *Oplophorus*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 La Figura 1 muestra la inhibición de la enzima NANOLUC[®] (Nluc) por parte de JRW-0004 en un ensayo múltiple
 que combina RealTime-Glo y el sistema de ensayo CASPASE-GLO[®].
 La Figura 2 muestra la inhibición de Nluc por parte de los compuestos de tienopirrol JRW-0004, JRW-0013, JRW-
 0006, JRW-0042, JRW-0138, y JRW-0147.
 30 La Figura 3 muestra que los compuestos de tienopirrol JRW-0004, JRW-0013, JRW-0006, JRW-0042, JRW-
 0138, y JRW-0147 no inhiben la actividad de luciferasa de luciérnaga.
 Las Figuras 4A-4D muestra que los compuestos de tienopirrol JRW-0004 (Figuras 4A y 4B) y WZ141-88 (Figuras
 4C y 4D) inhiben Nluc de forma dependiente de la dosis y el tiempo.
 Las Figuras 5A-5D muestran que los compuestos de tienopirrol WZ141-86 (Figuras 5A y 5B), WZ141-74 (Figura
 5C), y WZ141-84 (Figura 5D) inhiben Nluc de forma dependiente de la dosis y el tiempo.
 35 Las Figuras 6A-6C muestran que los compuestos de tienopirrol WZ141-89 (Figura 6A), WZ141-90 (Figura 6B), y
 WZ141-91 (Figura 6C) inhiben Nluc de forma dependiente de la dosis y el tiempo.
 Las Figuras 7A-7F muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0138 (Figura 7A), JRW-
 0140 (Figura 7B), JRW-0142 (Figura 7C), JRW-0143 (Figura 7D), JRW-0145 (Figura 7E), y JRW-0147 (Figura
 40 7F) usando células HEK293 o HeLa transfectadas de forma transitoria con una proteína de fusión Receptor Beta-
 2 Adrenérgico-Nluc.
 Las Figuras 8A-8F muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0148 (Figura 8A), JRW-
 0149 (Figura 8B), JRW-0151 (Figura 8C), JRW-0152 (Figura 8D), JRW-0051 (Figura 8E), y JRW-0043 (Figura
 8F) usando células HEK293 o HeLa transfectadas de forma transitoria con una proteína de fusión Receptor Beta-
 45 Adrenérgico-Nluc.
 Las Figuras 9A-9F muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0044 (Figura 9A), JRW-
 0013 (Figura 9B), JRW-0034 (Figura 9C), JRW-0052 (Figura 9D), JRW-0110 (Figura 9E), y JRW-0187 (Figura
 9F) usando células HEK293 o HeLa transfectadas de forma transitoria con una proteína de fusión Receptor Beta-
 2 Adrenérgico-Nluc.
 50 Las Figuras 10A-10F muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0188 (Figura 10A), JRW-
 0190 (Figura 10B), JRW-0191 (Figura 10C), JRW-0192 (Figura 10D), JRW-0195 (Figura 10E), y JRW-0197
 (Figura 10F) usando células HEK293 o HeLa transfectadas de forma transitoria con una proteína de fusión
 Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc.
 Las Figuras 11A-11C muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0198 (Figura 11A), JRW-
 0200 (Figura 11B), y JRW-0208 (Figura 11C) usando células HEK293 o HeLa transfectadas de forma transitoria
 55 con una proteína de fusión Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc.
 Las Figuras 12A-12E muestran la capacidad de los compuestos de tienopirrol para inhibir BRET extracelular. La

Figura 12A muestra un diagrama esquemático del diseño de ensayo de BRET extracelular parásita. Las Figuras 12B-12E muestran las curvas de respuesta a compuesto de los compuestos de tienopirrol, JRW-0013 (Figura 12B), JRW-0051 (Figura 12C), JRW-0147 (Figura 12D), y JRW-0187 (Figura 12E) usando el ensayo de BRET extracelular.

Las Figuras 13A-13E muestran la capacidad de los compuestos de tienopirrol para inhibir la actividad de luciferasa extracelular y mejorar BRET intracelular. La Figura 13A muestra un diagrama esquemático de un diseño de ensayo de Nluc extracelular parásita. Las Figuras 13B-13E muestran las curvas de respuesta a compuesto de los compuestos de tienopirrol, JRW-0013 (Figura 13B), JRW-0051 (Figura 13C), JRW-0147 (Figura 13D), y JRW-0187 (Figura 13E) usando el ensayo de Nluc extracelular.

La Figura 14 muestra la permeabilidad celular de los compuestos de tienopirrol JRW-0147, JRW-0051, y JRW-0138.

Las Figuras 15A-15C muestran la permeabilidad celular del compuesto de tienopirrol JRW-0147 en un modelo de acoplamiento de diana. La Figura 15A muestra un diagrama esquemático de un diseño de ensayo de SRC-Nluc. Las Figuras 15B-15C muestran curvas de respuesta a compuesto para Dasatinib-DY607 (Figura 15B) y JRW-0147 (Figura 15C).

La Figura 16 muestra la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0147 y JRW-0013. Las Figuras 17A-17C muestran la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol JRW-0013 (Figura 17A), JRW-0147 (Figura 17B), y JRW-0344 (Figura 17C) usando células HEK293 transfectadas de forma transitoria con una proteína de fusión Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc.

Las Figuras 18A-18C muestran la viabilidad celular y toxicidad de JRW-0344 (Figura 18A) en comparación con digitonina (Figura 18B) y DMSO (Figura 18C).

La Figura 19 muestra la permeabilidad celular de los compuestos de tienopirrol JRW-0147, JRW-0344, y JRW-0013.

Las Figuras 20A-20C muestran la capacidad del compuesto de tienopirrol JRW-0344 para inhibir la actividad de luciferasa extracelular. La Figura 20A muestra un diagrama esquemático del diseño de ensayo de SRC-Nluc. Las Figuras 20B y 20C muestran las curvas de respuesta a compuesto del compuesto de tienopirrol JRW-0344 usando el ensayo de SRC-Nluc (Figura 20B) o el ensayo de Nluc extracelular (Figura 20C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se desvelan compuestos de tienopirrol que pueden inhibir selectivamente luciferasas procedentes de *Oplophorus*, tales como una luciferasa de SEQ ID NO: 2 (también denominada en el presente documento de forma intercambiable "NanoLuc", "Nluc", "luciferasa Nluc", y "enzima Nluc"). Debido a sus estabildades y su potencial para excretarse de las células, puede ser ventajoso usar inhibidores selectivos para suprimir la luminiscencia de las luciferasas procedentes de *Oplophorus* en ciertas aplicaciones. Por ejemplo, en aplicaciones que implican multiplexación temporal de múltiples sistemas luminiscentes, puede ser beneficioso tener inhibidores selectivos para cada sistema para permitir la medición y/o detección de una única señal luminiscente a la vez. Además, en algunos ensayos basados en placa, las células pueden excretar una cierta cantidad de luciferasa. Un compuesto inhibidor extracelular permitiría suprimir selectivamente la luminiscencia de la luciferasa excretada y, por lo tanto, puede ayudar a mejorar la relación señal/ruido en ciertos ensayos.

Se ha descubierto que los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento son inhibidores selectivos para luciferasas de *Oplophorus*. Los compuestos de tienopirrol pueden competir por la unión a los sustratos de coelenterazina con las luciferasas y se pueden modificar para producir inhibidores tanto permeables a las células como impermeables a las células.

1. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido normalmente por el experto habitual en la materia. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. A continuación se describen métodos y materiales preferentes, aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento al poner en práctica o someter a ensayo la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos desvelados en el presente documento son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los términos "comprende", "incluye", "tener", "tiene", "puede", "contiene", y las variantes de los mismos, como se usa en el presente documento, se pretende que sean expresiones de transición, términos o palabras abiertos que no excluyan la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La presente divulgación también contempla otras realizaciones "que comprenden", "que consisten en", y "que consisten esencialmente en", las realizaciones o elementos presentados en el presente documento, tanto si se exponen explícitamente como en caso contrario.

Como se usa en el presente documento, el término "sustituyente" o "sustituyente adecuado" pretende indicar un grupo funcional químicamente aceptable, por ejemplo, un resto que no anule la actividad de los compuestos de la invención. Algunos ejemplos ilustrativos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos halo,

grupos perfluoroalquilo, grupos perfluoroalcoxi, grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos hidroxilo, grupos halo, grupos oxo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcoxi, grupos nitro, grupos azidoalquilo, grupos ácido sulfónico, grupos arilo o heteroarilo, grupos ariloxi o heteroariloxi, grupos aralquilo o heteroaralquilo, grupos aralcoxi o heteroaralcoxi, grupos HO-(C=O)-, grupos heterocíclicos, grupos cicloalquilo, grupos amino, grupos alquil- y dialquil-amino, grupos carbamoilo, grupos alquilcarbonilo, grupos alquilcarboniloxi, grupos alcoxycarbonilo, grupos alquilaminocarbonilo, grupos dialquilaminocarbonilo, grupos arilcarbonilo, grupos ariloxycarbonilo, grupos alquilsulfonilo, grupos arilsulfonilo y similares. Los sustituyentes pueden estar sustituidos con sustituyentes adicionales. Los sustituyentes también pueden estar en formas de sal (por ejemplo, un grupo ácido sulfónico puede estar en forma de un grupo sulfonato).

Como se usa en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene de 2 a 10 carbonos y contiene al menos un doble enlace carbono-carbono formado por la retirada de dos hidrógenos. Algunos ejemplos representativos de alqueno incluyen, pero no se limitan a, etenilo, 2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 3-butenilo, 4-pentenilo, 5-hexenilo, 2-heptenilo, 2-metil-1-heptenilo, y 3-decenilo. Los grupos alqueno de la presente divulgación pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 3 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un átomo de oxígeno. Algunos ejemplos representativos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi, y hexiloxi.

Como se usa en el presente documento, el término "alcoxialcoxi" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de otro grupo alcoxi, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alcoxialcoxi incluyen, pero no se limitan a, terc-butoximetoxi, 2-etoxietoxi, 2-metoxietoxi, y metoximetoxi.

El término "alcoxialcoxialquilo" como se usa en el presente documento, significa un grupo alcoxialcoxi, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alqueno, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alcoxialcoxialquilo incluyen, pero no se limitan a, terc-butoximetoximetilo, etoximetoximetilo, (2-metoxietoxi)metilo, y 2-(2-metoxietoxi)etilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alcoxialquilo incluyen, pero no se limitan a, terc-butoximetilo, 2-etoxietilo, 2-metoxietilo, y metoximetilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alcoxycarbonilo" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alcoxycarbonilo incluyen, pero no se limitan a, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, y terc-butoxycarbonilo.

El término "alcoxycarbonilalquilo" como se usa en el presente documento, significa un grupo alcoxycarbonilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alqueno, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alcoxycarbonilalquilo incluyen, pero no se limitan a, etoxycarbonilmetilo, 3-metoxycarbonilpropilo, 4-etoxycarbonilbutilo, y 2-terc-butoxycarboniletilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado, que tiene adecuadamente de 1 a 30 átomos de carbono, 1 a 12 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 6 átomos de carbono, o 1 a 4 átomos de carbono. El término "alquilo C₁-C₈" se define para incluir grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, "alquilo C₁-C₈" incluye específicamente metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo (por ejemplo, n-pentilo), hexilo (por ejemplo, n-hexilo), heptilo (por ejemplo, n-heptilo) y octilo (por ejemplo, n-octilo). El término "alquilo C₁-C₆" se define para incluir grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, "alquilo C₁-C₆" incluye específicamente metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo (por ejemplo, n-pentilo), y hexilo (por ejemplo, n-hexilo). El término "alquilo C₁-C₄" se define para incluir grupos alquilo que tienen 1, 2, 3 o 4 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, "alquilo C₁-C₄" incluye específicamente metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo y terc-butilo. Los grupos alquilo de la presente invención pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, tales como 1 a 3 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes halo para formar un grupo haloalquilo, o con uno o más sustituyentes hidroxilo para formar un grupo hidroxialquilo, o con uno o más grupos alcoxi para formar un grupo alcoxialquilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilamino" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo amino, como se define en el presente

documento. Algunos ejemplos representativos de alquilamino incluyen, pero no se limitan a, metilamino, etilamino, iso-propilamino, butil-amino y sec-butilamino.

5 Como se usa en el presente documento, el término "alquilaminoalquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo aminoalquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de grupos alquilaminoalquilo incluyen, pero no se limitan a, metilaminoetilo y metilamino-2-propilo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "alquilcarbonilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alquilcarbonilo incluyen, pero no se limitan a, acetilo, 1-oxopropilo, 2,2-dimetil-1-oxopropilo, 1-oxobutilo, y 1-oxopentilo.

15 Como se usa en el presente documento, el término "alquilcarbonilalquilo" se refiere a un grupo alquilcarbonilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento.

20 Como se usa en el presente documento, el término "alquilcarbonilalquilamido" se refiere a un grupo alquilcarbonilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilamido, como se define en el presente documento.

25 El término "alquileo" significa un grupo divalente procedente de un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado de 1 a 10 átomos de carbono. Algunos ejemplos representativos de alquileo incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, y $-\text{CH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

30 Como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 carbonos, y que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo, y butinilo. Los grupos alquinilo de la presente divulgación pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 3 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente.

35 Como se usa en el presente documento, el término "amido" se refiere a un grupo amino unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento (es decir, $-\text{CONH}_2$). El término "alquilamido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilamino o un grupo dialquilamino unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de alquilamido incluyen, pero no se limitan a, metilaminocarbonilo, dimetilaminocarbonilo, etilmetilaminocarbonilo, y n-hexilaminocarbonilo.

40 Como se usa en el presente documento, el término "amino" se refiere a un grupo $-\text{NH}_2$.

45 Como se usa en el presente documento, el término "aminoalquilo" se refiere a al menos un grupo amino, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de aminoalquilo incluyen, pero no se limitan a, aminometilo, 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, 5-aminopentilo, y 6-aminohexilo.

50 Como se usa en el presente documento, el término "aminoalquilamido" se refiere a al menos un grupo amino, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilamido, como se define en el presente documento.

55 Como se usa en el presente documento, el término "grupo protector de amino", se refiere a un resto que evita que se produzcan reacciones químicas en el átomo de nitrógeno al que está unido el grupo protector. Un grupo protector de amino también debe poderse retirar mediante una reacción química. Tales grupos se conocen bien en la técnica e incluyen los que se describen con detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999. Algunos grupos protectores de amino adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbobenciloxi ($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ o $-\text{NH}-\text{Cbz}$); t-butiloxicarbonilo ($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{NH}-\text{Boc}$); 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ($-\text{NH}-\text{Fmoc}$), 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo ($-\text{NH}-\text{Troc}$), y aliloxicarbonilo ($-\text{NH}-\text{Alloc}$). (En cada uno de los grupos anteriores, $-\text{NH}-$ representa el nitrógeno del grupo amino que se está protegiendo).

60 Como se usa en el presente documento, el término "aminoluciferina" se refiere a ácido (4S)-2-(6-amino-1,3-benzotiazol-2-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico, o un análogo sustituido de esta molécula.

65 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" significa radicales aromáticos monocíclicos, bicíclicos, o tricíclicos. Algunos ejemplos representativos de los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, dihidroindenilo, indenilo, naftilo, dihidronaftalenilo, y tetrahidronaftalenilo. Los grupos arilo de la presente invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 5 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, fenilmetilo (es decir, bencilo) y feniletilo.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "arilcarbonilo" se refiere a un grupo arilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "bioluminiscencia" o "luminiscencia" se puede referir a luz producida como resultado de una reacción entre una enzima y un sustrato que genera luz. Algunos ejemplos de tales enzimas (enzimas bioluminiscentes) incluyen luciferasa de *Oplophorus*, por ejemplo, *Oplophorus gracilirostris*, luciferasa de luciérnaga, por ejemplo *Photinus pyralis* o *Photuris Pennsylvania*, luciferasa de elatéridos, luciferasa de *Renilla*, luciferasa de *Cypridina*, fotoproteína Aequorina, fotoproteína obelina y similares.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "carbonilo" o "(C=O)" (como se usan expresiones tales como alquilcarbonilo, alquil-(C=O)- o alcoxicarbonilo) se refiere a la unión del resto >C=O con un segundo resto tal como un grupo alquilo o amino (es decir un grupo amido). Alcoxicarbonilamino (es decir alcoxi(C=O)-NH-) se refiere a un grupo carbamato de alquilo. El grupo carbonilo también se define de forma equivalente en el presente documento como (C=O). Alquilcarbonilamino se refiere a grupos tales como acetamida.
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "carboxi" se refiere a un grupo -C(O)OH.
- 30 Como se usa en el presente documento, el término "carboxialquilo" se refiere a un grupo carboxi como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo como se define en el presente documento.
- 35 Como se usa en el presente documento, el término "carboxialquilamido" se refiere a un grupo carboxialquilo como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo amido como se define en el presente documento.
- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "sustrato de coelenterazina" se refiere a una clase de moléculas informadoras que emiten luminiscencia cuando actúan sobre una gran diversidad de proteínas bioluminiscentes tales como luciferasas (por ejemplo, luciferasas marinas). Los sustratos de coelenterazina incluyen coelenterazina así como análogos y derivados de la misma.
- 45 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un radical carbocíclico mono, bicíclico o tricíclico (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, biciclo[2.2.1]heptanilo, biciclo[3.2.1]octanilo y biciclo[5.2.0]nonanilo, etc.); que contiene opcionalmente 1 o 2 dobles enlaces. Los grupos cicloalquilo de la presente invención pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 5 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente.
- 50 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de cicloalquilalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclohexilmetilo.
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilamido" se refiere a un grupo cicloalquilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo amido, como se define en el presente documento.
- 60 Como se usa en el presente documento, el término "dialquilamino" se refiere a dos grupos alquilo seleccionados independientemente, como se define en el presente documento, unidos al resto molecular principal a través de un grupo amino, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de dialquilamino incluyen, pero no se limitan a, N,N-dimetilamino, N-etil-N-metilamino, y N-isopropil-N-metilamino.
- 65 Como se usa en el presente documento, el término "dialquilaminoalquilo" se refiere a un grupo dialquilamino, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de dialquilaminoalquilo incluyen, pero no se limitan a, N,N-dimetilaminoetilo y N,N-metil(2-propil)aminoetilo.
- Como se usa en el presente documento, el término "dialquilaminoalquilamido" se refiere a un grupo dialquilamino, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilamido, como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "halógeno" o "halo" se refiere a un radical fluoro, cloro, bromo o yodo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "haloalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, sustituido con uno, dos, tres, o cuatro átomos de halógeno. Algunos ejemplos representativos de haloalcoxi incluyen, pero no se limitan a, clorometoxi, 2-fluoroetoxi, trifluorometoxi, y pentafluoroetoxi.

10 Como se usa en el presente documento, el término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, sustituido con uno, dos, tres, o cuatro átomos de halógeno. Algunos ejemplos representativos de haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, clorometilo, 2-fluoroetilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, 2-cloro-3-fluoropentilo, y 4,4,4,-trifluorobutilo.

15 Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un heteroarilo monocíclico o un heteroarilo bicíclico. El heteroarilo monocíclico es un anillo de cinco o seis miembros. El anillo de cinco miembros contiene dos dobles enlaces. El anillo de cinco miembros puede contener un heteroátomo seleccionado entre O o S; o uno, dos, tres, o cuatro átomos de nitrógeno y opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre. El anillo de seis miembros contiene tres dobles enlaces y uno, dos, tres, o cuatro átomos de nitrógeno. Algunos ejemplos representativos de heteroarilo monocíclico incluyen, pero no se limitan a, furanilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, 1,3-oxazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, pirrolilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, 1,3-tiazolilo, tienilo, triazolilo, y triazinilo. El heteroarilo bicíclico incluye un heteroarilo monocíclico condensado con un fenilo, o un heteroarilo monocíclico condensado con un cicloalquilo monocíclico, o un heteroarilo monocíclico condensado con un cicloalqueno monocíclico, o un heteroarilo monocíclico condensado con un heteroarilo monocíclico, o un heteroarilo monocíclico condensado con un heterociclo monocíclico. Algunos ejemplos representativos de grupos heteroarilo bicíclico incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxazolilo, benzoimidazolilo, benzoxadiazolilo, 6,7-dihidro-1,3-benzotiazolilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, isoquinolinilo, naftiridinilo, piridoimidazolilo, quinazolinilo, quinolinilo, tiazolo[5,4-b]piridin-2-ilo, tiazolo[5,4-d]pirimidin-2-ilo, y 5,6,7,8-tetrahidroquinolin-5-ilo. Los grupos heteroarilo de la presente invención pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 5 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente.

25 Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilalquilo" se refiere a un grupo heteroarilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de heteroarilalquilo incluyen, pero no se limitan a, fur-3-ilmético, 1H-imidazol-2-ilmético, 1H-imidazol-4-ilmético, 1-(piridin-4-il)etilo, piridin-3-ilmético, 6-cloropiridin-3-ilmético, piridin-4-ilmético, (6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilo, (6-(ciano)piridin-3-il)metilo, (2-(ciano)piridin-4-il)metilo, (5-(ciano)piridin-2-il)metilo, (2-(cloro)piridin-4-il)metilo, pirimidin-5-ilmético, 2-(pirimidin-2-il)propilo, tien-2-ilmético, y tien-3-ilmético.

40 Como se usa en el presente documento, el término "heterociclo" o "heterociclilo" se refiere a un heterociclo monocíclico, un heterociclo bicíclico, o un heterociclo tricíclico. El heterociclo monocíclico es un anillo de tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho miembros que contiene al menos un heteroátomo seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. El anillo de tres o cuatro miembros contiene cero o un doble enlace, y un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. El anillo de cinco miembros contiene cero o un doble enlace, y uno, dos o tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. El anillo de seis miembros contiene cero, uno o dos dobles enlaces y uno, dos, o tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Los anillos de siete y ocho miembros contienen cero, uno, dos, o tres dobles enlaces y uno, dos, o tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Algunos ejemplos representativos de heterociclos monocíclicos incluyen, pero no se limitan a, azetidínilo, azepánilo, aziridinilo, diazepánilo, 1,3-dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-ditolanilo, 1,3-ditianilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, oxadiazolinilo, oxadiazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, fosfinano, piperazinilo, piperidinilo, piranilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuránilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotienilo, tiadiazolinilo, tiadiazolidinilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, tiomorfolinilo, 1,1-dioxidotiomorfolinilo (tiomorfolina sulfona), tiopiranilo, tritánilo, y 2,5-dioxopirrolidinilo. El heterociclo bicíclico es un heterociclo monocíclico condensado con un grupo fenilo, o un heterociclo monocíclico condensado con un cicloalquilo monocíclico, o un heterociclo monocíclico condensado con un cicloalqueno monocíclico, o un heterociclo monocíclico condensado con un heterociclo monocíclico, o un sistema de anillos heterocíclico monocíclico con puente en el que dos átomos no adyacentes del anillo están unidos mediante un puente de alqueno de 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono, o un puente de alqueno de dos, tres, o cuatro átomos de carbono. Algunos ejemplos representativos de heterociclos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, benzopiranilo, benzotipiranilo, crománilo, 2,3-dihidrobenzofuranilo, 2,3-dihidrobenzotienilo, azabicyclo[2.2.1]heptilo (incluyendo 2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-ilo), 2,3-dihidro-1H-indolilo, isoindolinilo, octahidrocloropenta[c]pirrolilo, octahidropirrolpiridinilo, 9-fosfabciclo[3.3.1]nonano, 8-fosfabciclo[3.2.1]octano, y tetrahidroisoquinolinilo. Los heterociclos tricíclicos se muestran a modo de ejemplo mediante un heterociclo bicíclico condensado con un grupo fenilo, o un heterociclo bicíclico condensado con un cicloalquilo monocíclico, o un

heterociclo bicíclico condensado con un cicloalqueno monocíclico, o un heterociclo bicíclico condensado con un heterociclo monocíclico, o un heterociclo bicíclico en el que dos átomos no adyacentes del anillo bicíclico están unidos mediante un puente de alqueno de 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono, o un puente de alqueno de dos, tres, o cuatro átomos de carbono. Algunos ejemplos de heterociclos tricíclicos incluyen, pero no se limitan a, octahidro-2,5-epoxipentaleno, hexahidro-2H-2,5-metanociclopenta[b]furano, hexahidro-1H-1,4-metanociclopenta[c]furano, azaadamantano (1-azatriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano), oxaadamantano (2-oxatriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano), y 2,4,6-trioxa-8-fosfatriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano. Los grupos heterocíclicos de la presente divulgación pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, preferentemente de 1 a 3 sustituyentes adecuados, como se ha definido anteriormente. Los grupos heterocíclicos de la presente divulgación pueden contener uno o más grupos oxo (=O) o grupos tioxo (=S) unidos al anillo.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo heterociclilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo alquilo, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de heterociclilalquilo incluyen, pero no se limitan a, piperidin-4-ilmetilo, piperazin-1-ilmetilo, 3-metil-1-pirrolidin-1-ilbutilo, (1R)-3-metil-1-pirrolidin-1-ilbutilo, (1S)-3-metil-1-pirrolidin-1-ilbutilo, y 3-morfolinopropilo.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclamido" se refiere a un grupo heterociclilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo amido, como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "hidroxi" se refiere a un grupo -OH.

Como se usa en el presente documento, el término "hidroxialcoxi" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, sustituido con al menos un grupo hidroxilo. Algunos ejemplos representativos de hidroxialcoxi incluyen, pero no se limitan a, hidroxietoxi, y 2-hidroxipropoxi.

Como se usa en el presente documento, el término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, sustituido con al menos un grupo hidroxilo. Algunos ejemplos representativos de hidroxialquilo incluyen, pero no se limitan a, hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2,3-dihidroxipropilo, 2,3-dihidroxipentilo, 4-hidroxibutilo, 2-etil-4-hidroxieptilo, 3,4-dihidroxibutilo, y 5-hidroxipentilo.

El término "hidroxialquilamido" como se usa en el presente documento se refiere a un grupo hidroxialquilo unido a un grupo amido, por ejemplo, -amido-alquil-OH.

Como se usa en el presente documento, el término "hidroxicarbonilo" se refiere a un grupo hidroxilo, como se define en el presente documento, unido al resto molecular principal a través de un grupo carbonilo, como se define en el presente documento.

Las expresiones "enzima luminiscente", "enzima bioluminiscente", o el término "luciferasa", que se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a una clase de enzimas oxidativas usadas en bioluminiscencia en donde la enzima produce y emite luz cuando se le da un sustrato. La luciferasa puede ser una luciferasa mutante, recombinante, o de origen natural que usa un sustrato de luciferasa. El sustrato de luciferasa puede ser luciferina, un derivado o análogo de luciferina, un derivado o análogo de preluciferina, una coelenterazina, o un derivado o análogo de coelenterazina. La enzima luminiscente, si es de origen natural, se puede obtener fácilmente por el experto en la materia a partir de un organismo. Si la enzima luminiscente es de origen natural o es una enzima luminiscente recombinante o mutante, por ejemplo una que retiene la actividad de una enzima luminiscente natural en una reacción luciferasa-coelenterazina o luciferasa-luciferina, se puede obtener fácilmente a partir de un cultivo de bacterias, levaduras, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, o similares, transformadas para expresar un ácido nucleico que codifique la enzima luminiscente. Además, la enzima luminiscente recombinante o mutante puede proceder de un sistema *in vitro* exento de células usando un ácido nucleico que codifique la luciferasa. Algunas enzimas luminiscentes adecuadas incluyen luciferasas procedentes de decápodos bioluminiscentes, tales como *Oplophoroidea* (por ejemplo, luciferasas procedentes de *Oplophorus*), luciferasas de elatéridos (por ejemplo, *Photinus pyralis*, *Photuris pennsylvanica*, etc.), organismos marinos tales como cnidarios (por ejemplo, luciferasa de *Renilla*), las familias de decápodos *Aristeidae*, *Solenoceridae*, *Luciferidae*, *Sergestidae*, *Pasipheidae* y *Thalassocarididae*, luciferasas de copépodo, tales como luciferasa de *Gaussia*, tal como luciferasa de *Gaussia princeps*, luciferasas de *Metridia*, tales como luciferasas de *Metridia longa* y *Metridia pacifica*, luciferasas de *Vargula*, tales como luciferasa de *Vargula hilgendorffii*, luciferasa de *Pleuromamma xiphias*, y fotoproteínas, tales como Aequorina, y variantes, recombinantes y mutantes, de las mismas.

Una "mezcla de reacción luminiscente" contiene materiales que permitirán que la enzima luminiscente genere una señal luminosa, es decir, luminiscencia. La mezcla también puede contener la enzima, por ejemplo, la enzima luciferasa o luciferina. Los materiales, y las concentraciones y/o cantidades particulares, necesarios para generar una señal luminiscente variarán dependiendo de la enzima luminiscente usada así como del tipo de ensayo que se lleve a cabo. A menudo se añadirán otros materiales a la solución, que incluyen: un tampón para mantener la reacción al pH apropiado, un aditivo tal como PRIONEX o albúmina de suero bovino (BSA) para ayudar a mantener

la actividad enzimática, agentes reductores, detergentes, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "metilendioxi" se refiere a un grupo -OCH₂O- en el que los átomos de oxígeno del metilendioxi están unidos al resto molecular principal a través de dos átomos de carbono adyacentes.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "luciferasa de *Oplophorus*" y "luciferasa procedente de *Oplophorus*" se usan de forma intercambiable y se refieren a una luciferasa secretada por el camarón de aguas profundas *Oplophorus gracilirostris* (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), incluyendo el tipo natural, variantes, y mutantes del mismo. Por ejemplo, se describen variantes adecuadas de luciferasa de *Oplophorus* en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 8.557.970 y 8.669.103. Algunas luciferasas procedentes de *Oplophorus* a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, la de SEQ ID NO: 2 (también denominada en el presente documento de forma intercambiable "NanoLuc", "Nluc", "luciferasa Nluc", y "enzima Nluc").

Como se usa en el presente documento, el término "oxo" se refiere a un radical de oxígeno (=O) unido mediante un doble enlace en el que el compañero de enlace es un átomo de carbono. Tal radical también se puede considerar un grupo carbonilo.

El término "péptido" o "polipéptido" se refiere a una secuencia de al menos dos aminoácidos. En algunas realizaciones, un péptido puede contener no más de 80 aminoácidos, o no más de 35 aminoácidos, no más de 10 aminoácidos, o no más de 5 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto informador" se puede referir a un grupo que, en condiciones apropiadas, genera directa o indirectamente una señal detectable. Algunos restos informadores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos, moléculas luminiscentes, colorantes, radiomarcadores y sustratos para enzimas tales como luciferasa. En algunas realizaciones, un resto informador puede generar indirectamente una señal detectable, por ejemplo, cuando el resto informador es un sustrato para una enzima. La reacción de la enzima con el sustrato produce en ese caso una señal detectable tal como fluorescencia o luminiscencia. Como se usa en el presente documento, la expresión "resto informador bioluminiscente" se puede referir a un resto que es un sustrato para una luciferasa. Por ejemplo, el resto informador bioluminiscente puede ser una luciferina, un derivado de luciferina, por ejemplo, preluciferina, aminoluciferina, quionolil-luciferina, naftil luciferina, fluoroluciferina, cloroluciferina, precursores de derivados de luciferina, una coelenterazina o un derivado o análogo de coelenterazina, por ejemplo, furimazina. La señal luminiscente generada se puede detectar usando un luminómetro. Como se usa en el presente documento, la expresión "resto informador fluorescente" se puede referir a un resto que emite fluorescencia. Por ejemplo, el resto informador fluorescente puede ser un fluoróforo, tal como cumarina, R110, fluoresceína, DDAO, resorufina, violeta de cresilo, sili xanteno, o carbopironina. La fluorescencia se puede detectar usando un fluorómetro.

Un sufijo unido a un sustituyente de múltiples componentes solo se aplica al primer componente que lo precede. A modo de ilustración, el término "cicloalquilalquilo" contiene dos componentes: alquilo y cicloalquilo. De ese modo, el sufijo C₁-C₆ en cicloalquilalquilo C₁-C₆ significa que el componente alquilo del cicloalquilalquilo contiene de 1 a 6 átomos de carbono; el sufijo C₁-C₆ no describe el componente cicloalquilo. A modo de ilustración adicional, la expresión "halo-alquilo C₁-C₆" se refiere a halometilo, haloetilo, halopropilo, halobutilo, halopentilo, y halohexilo. A modo de ilustración adicional, el prefijo "halo" en haloalcoxialquilo indica que solo el componente alcoxi del sustituyente alcoxialquilo está sustituido con uno o más radicales halógeno. Si la situación con halógeno solo se produjera en el componente alquilo, el sustituyente se describiría en su lugar como "alcoxihaloalquilo".

Un sustituyente es "sustituible" si comprende al menos un átomo de carbono o nitrógeno que está unido a uno o más átomos de hidrógeno. De ese modo, por ejemplo, hidrógeno, halógeno, y ciano no entran dentro de esta definición. Además, un átomo de azufre en un heterociclilo que contiene tal átomo es sustituible con uno o dos sustituyentes oxo.

Si se describe que un sustituyente está "sustituido", un radical que no es hidrógeno está en el lugar del radical hidrógeno de un carbono o nitrógeno del sustituyente. De ese modo, por ejemplo, un sustituyente alquilo sustituido es un sustituyente alquilo en el que al menos un radical que no es hidrógeno está en el lugar de un radical hidrógeno en el sustituyente alquilo. A modo de ilustración, monofluoroalquilo es alquilo sustituido con un radical fluoro, y difluoroalquilo es alquilo sustituido con dos radicales fluoro. Se ha de entender que si existe más de una sustitución en un sustituyente, cada radical que no es hidrógeno puede ser idéntico o diferente (a menos que se indique de otro modo).

Cuando se hace referencia a un sustituyente como "sin sustituir" o no se hace referencia como "sustituido" u "opcionalmente sustituido", significa que el sustituyente no tiene ningún sustituyente. Si se describe que un sustituyente está "opcionalmente sustituido", el sustituyente puede estar (1) sin sustituir o (2) sustituido. Si se describe que un sustituyente está opcionalmente sustituido con hasta un número particular de radicales que no son hidrógeno, el sustituyente puede estar (1) sin sustituir; o (2) sustituido con hasta ese número particular de radicales que no son hidrógeno o con hasta el número máximo de posiciones sustituibles en el sustituyente, lo que sea menor.

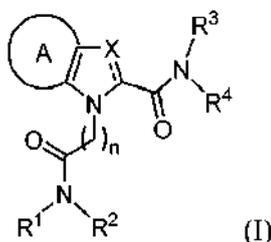
De ese modo, por ejemplo, si un sustituyente se describe como un heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 radicales que no son hidrógeno, entonces cualquier heteroarilo con menos de 3 posiciones sustituibles estaría opcionalmente sustituido solo con hasta tantos radicales que no son hidrógeno como posiciones sustituibles tenga el heteroarilo. A modo de ilustración, tetrazolilo (que solo tiene una posición sustituible) estaría opcionalmente sustituido con hasta un radical que no es hidrógeno. A modo de ilustración adicional, si un nitrógeno de amino se describe que está opcionalmente sustituido con hasta 2 radicales que no son hidrógeno, entonces un nitrógeno de amino primario estará opcionalmente sustituido con hasta 2 radicales que no son hidrógeno, mientras que un nitrógeno de amino secundario estará opcionalmente sustituido solo con hasta 1 radical que no es hidrógeno.

Si se describen sustituyentes como "seleccionados independientemente" entre un grupo, cada sustituyente se selecciona independientemente del otro. Por lo tanto, cada sustituyente puede ser idéntico o diferente de los demás sustituyentes.

Para la enumeración de intervalos numéricos en el presente documento, se contempla explícitamente cada número intermedio entre los mismos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, y 7,0.

2. Compuestos de tienopirrol

En el presente documento se proporcionan compuestos de tienopirrol que pueden inhibir luciferasas procedentes de *Oplophorus* y/o la actividad de luciferasas procedentes de *Oplophorus*. Los compuestos de tienopirrol incluyen compuestos de fórmula (I) y sales de los mismos:



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido; y

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, la línea discontinua representa la presencia de un enlace, y X es CH.

En algunas realizaciones, n es 1.

En algunas realizaciones, A es un anillo de fenilo. En algunas realizaciones, A es un anillo de heteroarilo de 5 miembros. En algunas realizaciones, A es un anillo de tienilo. En algunas realizaciones, A es un anillo de furanilo.

En algunas realizaciones, R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈, halo-alquilo C₁-C₈, alcoxilalcoxilalquilo y arilalquilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, etilo, n-hexilo, 2-(2-metoxietoxi)etilo y bencilo. En algunas realizaciones, R¹ es etilo.

En algunas realizaciones, R² es arilo opcionalmente sustituido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R² es fenilo sustituido. R² es fenilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, ciano, amido, alcoxi C₁-C₄, e hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R² es fenilo sustituido con un grupo metilo (por ejemplo, m-tolilo).

En algunas realizaciones, R¹ es alquilo C₁-C₄ y R² es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R¹ es etilo y R² es m-tolilo.

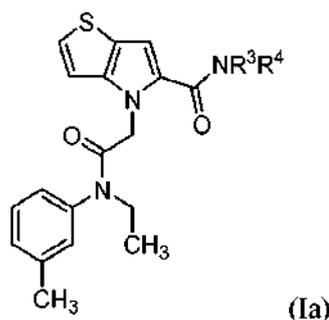
En algunas realizaciones, R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina, piperidina y piperazina opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina sin sustituir, piperidina sin sustituir, piperidina sustituida con un sustituyente (por ejemplo, alcoxicarbonilo tal como etoxicarbonilo), o piperazina sustituida con un sustituyente (por ejemplo, alquilo C₁-C₄ tal como metilo).

En algunas realizaciones, R³ es hidrógeno.

En algunas realizaciones, R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ sin sustituir (por ejemplo, metilo), halo-alquilo C₁-C₈, carboxi-alquilo C₁-C₈ (por ejemplo, -(CH₂)₇-COOH), alcoxicarbonil C₁-C₄-alquilo C₁-C₈ (por ejemplo, -(CH₂)₇-COOCH₃), fenilo opcionalmente sustituido (posterior), cicloalquilo C₅-C₆ opcionalmente sustituido (por ejemplo, ciclopentilo sin sustituir, ciclohexilo sin sustituir, o ciclohexilo sustituido), heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidinilo sin sustituir, piperidinilo sustituido con terc-butoxicarbonilo, alcoxicarbonilalquilcarbonilo tal como -CO-(CH₂)₄-COOCH₃), o carboxialquilcarbonilo tal como -CO-(CH₂)₄-COOH), heteroarilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piridil-alquilo C₁-C₄ tal como -CH₂-piridilo), y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, morfolino-alquilo C₁-C₄ tal como -(CH₂)₃-morfolino). Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁴ es fenilo que está sin sustituir o sustituido con un sustituyente, tal como un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alcoxicarbonilo C₁-C₄ (por ejemplo, -C(O)OCH₃) y alcoxicarbonilo C₁-C₄-alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, -CH₂-C(O)CH₂CH₃).

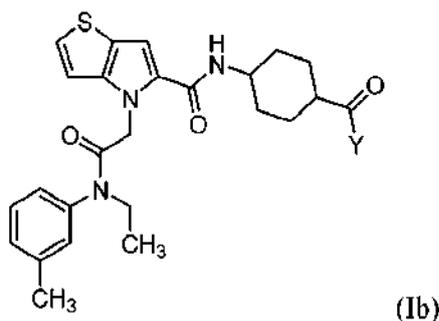
En algunas realizaciones, R⁴ es ciclohexilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en carboxi, alcoxicarbonilo C₁-C₄ (por ejemplo, -C(O)OCH₃), alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃CH₃ o -C(O)NH-(CH₂)₅CH₃), hidroxi-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₂OH o -C(O)NH-(CH₂)₆OH), amido (es decir -CONH₂), amino-alquilamido C₁-C₈ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆NH₂), dialquilamino C₁-C₄-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₂N(CH₃)₂), carboxi-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃COOH, -C(O)NH-(CH₂)₅COOH o -C(O)NH-(CH₂)₇COOH), ácido sulfónico-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆SO₃H), sulfonato-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆SO₃), alquilcarbonil C₁-C₄-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃COOCH₃, -C(O)NH-(CH₂)₅COOCH₃ o -C(O)NH-(CH₂)₇COOCH₃), cicloalquilamido C₃-C₆ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-ciclohexilo, -C(O)NH-ciclohexil-COOH o -C(O)NH-ciclohexil-COOCH₃), y heterociclilamido (por ejemplo, -C(O)NH-piperidinilo, sin sustituir o sustituido con metilo, terc-butoxicarbonilo o acetilo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁴ es amino-alquilamido C₁-C₈ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆NH₂), en el que el grupo amino está protegido con un grupo protector de amino (por ejemplo, terc-butoxicarbonilo), o en el que el grupo amino está protonado para formar una sal (por ejemplo, una sal de clorhidrato), o en el que el grupo amino está funcionalizado adicionalmente con un fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína) o un polipéptido (por ejemplo, un péptido -Asp-Asp-Asp, que puede estar acetilado en los extremos).

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula (Ia):



en la que R³ y R⁴ son como se han definido en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para la fórmula (I).

En algunas realizaciones el compuesto tiene la fórmula (Ib):



5
en la que:

Y se selecciona entre el grupo que consiste en $-NR^aR^b$ y $-OR^c$;

10 R^a y R^b se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_8 opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_8 opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido; o R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y R^c se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido.

15 En algunas realizaciones, Y es $-OR^c$. En algunas realizaciones, R^c se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y metilo.

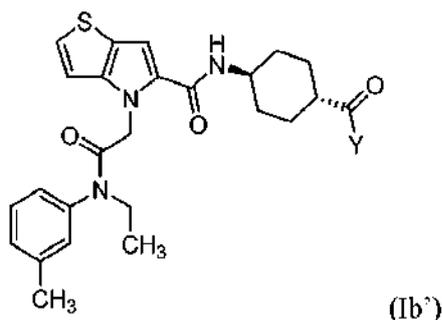
En algunas realizaciones, Y es $-NR^aR^b$.

20 En algunas realizaciones, R^a es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^b se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_8 opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_8 opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^b se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sin sustituir (por ejemplo, n-butilo o n-hexilo), hidroxialquilo (por ejemplo, hidroxi-alquilo C_1-C_6 , tal como $(CH_2)_2OH$ o $-(CH_2)_6OH$), aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, amino-alquilo C_1-C_6 , tal como $-(CH_2)_6NH_2$), dialquilaminoalquilo (por ejemplo, dialquilamino C_1-C_4 -alquilamido C_1-C_8 , tal como $-C(O)NH-(CH_2)_2N(CH_3)_2$), carboxialquilo (por ejemplo, carboxi-alquilo C_1-C_8 , tal como $-(CH_2)_3COOH$, $-(CH_2)_5COOH$ o $-(CH_2)_7COOH$), ácido sulfónico-alquilo C_1-C_8 (por ejemplo, $-(CH_2)_6SO_3H$), sulfonato-alquilo C_1-C_8 (por ejemplo, $-(CH_2)_6SO_3$), alquilcarbonilalquilo (por ejemplo, alquilcarbonil C_1-C_4 -alquilamido C_1-C_8 , tal como $-(CH_2)_3COOCH_3$, $-(CH_2)_5COOCH_3$ o $-(CH_2)_7COOCH_3$), cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido (por ejemplo, -ciclohexilo, -ciclohexil-COOH o -ciclohexil-COOCH₃), y heterociclilo de seis miembros opcionalmente sustituido (por ejemplo, sin sustituir o sustituido con metilo, terc-butoxicarbonilo o acetilo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^b es amino-alquilo C_1-C_8 opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-(CH_2)_6NH_2$), en el que el grupo amino está protegido con un grupo protector de amino (por ejemplo, terc-butoxicarbonilo), o en el que el grupo amino está protonado para formar una sal (por ejemplo, una sal de clorhidrato), o en el que el grupo amino está funcionalizado adicionalmente con un fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína) o un polipéptido (por ejemplo, un péptido $-Asp-Asp-Asp$, que puede estar acetilado en los extremos).

35 En algunas realizaciones R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido es piperidina opcionalmente sustituida. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico se selecciona entre el grupo que consiste en piperidina sin sustituir y piperidina sustituida con un sustituyente (por ejemplo, carboxilo o alcóxicarbonilo tal como $-C(O)OCH_2CH_3$).

40 En algunas realizaciones, el compuesto tiene la siguiente fórmula (Ib')

45



en la que Y es como se ha definido en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para la fórmula (Ib).

5 Los compuestos adecuados incluyen los siguientes:

- N-ciclohexil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-etil-2-(5-(piperidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 N-etil-2-(5-(piperidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 10 1-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-fenil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 2-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)fenil)acetato de etilo;
 3-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)benzoato de metilo;
 15 cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido 8-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)octanoico;
 ácido 6-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)piperidin-1-il)-6-oxohexanoico;
 trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
 20 N-(trans-4-(butilcarbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((2-hidroxi)etil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-(trans-4-((2-dimetilamino)etil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 25 ácido 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)butanoico;
 N-(trans-4-carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(hexilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 30 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo;
 ácido 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico;
 35 ácido 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carbonil)piperidina-4-carboxílico;
 ácido 8-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)octanoico;
 N-(trans-4-(ciclohexilcarbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 40 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((1-metil)piperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(piperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 45 N-(trans-4-((1-acetil)piperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 (6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexil)carbamato de terc-butilo;
 50 N-(trans-4-((6-(3',6'-dihidroxi-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5(6)-carboxamido)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 clorhidrato de N-(trans-4-((6-amino)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-

- carboxamida;
 trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
- 5 ácido (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(carboximetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazanonadecan-19-oico;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-ciclopentil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
- 10 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(piridin-4-ilmetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(3-morfolinopropil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-etil-2-(5-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
- 15 N-ciclohexil-4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-ciclohexil-4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 trans-4-(4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 20 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
 N-ciclohexil-4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 25 4-(2-(bencil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
 ácido 6-(cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo;
- 30 ácido 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de potasio;
- 35 ácido trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
 trans-4-(4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 40 trans-4-(4-(2-((3-carbamoilfenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 45 trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 50 trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 55 trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- 60 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxihexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio;
- 65 trans-4-(4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- trans-4-(4-(2-((3-(bromometil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- trans-4-(4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
- trans-4-(4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;

de metilo;

trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;

1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi-hexil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida;

5 6-(trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio;

trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo; y

trans-4-(6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo.

10 (1) Formas de sal

Un compuesto de tienopirrol descrito en el presente documento puede estar en forma de sal. Se puede regenerar la forma neutra del compuesto poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto precursor de manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente divulgación.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Algunos ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como Na⁺ y K⁺, cationes de metales alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes. Algunos ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R₁⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Ciertos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son los procedentes de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Algunos ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los procedentes de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso.

Algunos ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los procedentes de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, y valérico. Algunos ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los procedentes de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto de tienopirrol particular en el presente documento también incluye las formas de sal del mismo.

45 (2) Isómeros

Ciertos compuestos de tienopirrol pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautómeras, conformacionales, o anoméricas particulares que incluyen, pero no se limitan a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; formas R, S, y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol, y enolato; formas syn y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axial y ecuatorial; formas de bote, silla, bote torcido, sobre, y semisilla; y combinaciones de las mismas, denominadas colectivamente en lo sucesivo en el presente documento "isómeros" (o "formas isoméricas").

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento puede ser un isómero enriquecido enantioméricamente de un estereoisómero descrito en el presente documento. Por ejemplo, el compuesto puede tener un exceso enantiomérico de al menos aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. Enantiómero, cuando se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de una pareja de compuestos químicos cuyas estructuras moleculares tienen una relación de imagen especular entre sí.

En algunas realizaciones, una preparación de un compuesto desvelado en el presente documento está enriquecida con un isómero del compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, correspondiente a un estereocentro seleccionado. Por ejemplo, el compuesto tiene una pureza correspondiente a un compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado de al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %.

En algunas realizaciones, una composición descrita en el presente documento incluye una preparación de un compuesto desvelado en el presente documento que está enriquecida para una estructura o estructuras que tiene una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, en un estereocentro seleccionado. Algunas configuraciones R/S a modo de ejemplo pueden ser las proporcionadas en un ejemplo descrito en el presente documento.

Una "preparación enriquecida", como se usa en el presente documento, está enriquecida para una estereoconfiguración seleccionada de uno, dos, tres o más estereocentros seleccionados en el compuesto objeto. Algunos estereocentros seleccionados a modo de ejemplo y estereoconfiguraciones de los mismos se pueden seleccionar de los proporcionados en el presente documento, por ejemplo, en un ejemplo descrito en el presente documento. Por enriquecido se pretende indicar que al menos un 60 %, por ejemplo, de las moléculas de compuesto en la preparación tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado. En una realización es al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. Enriquecido se refiere al nivel de una molécula o moléculas objeto y no tiene indica ninguna limitación de proceso a menos que se especifique.

Los compuestos de tienopirrol se pueden preparar en forma racémica o en forma de enantiómeros o diastereómeros individuales mediante síntesis estereoespecífica o mediante resolución. Los compuestos se pueden resolver, por ejemplo, en sus enantiómeros o diastereómeros componentes mediante técnicas convencionales, tales como la formación de pares estereoisoméricos mediante formación de sales con una base ópticamente activa, seguido de cristalización fraccionada y regeneración del ácido libre. Los compuestos también se pueden resolver mediante formación de ésteres o amidas estereoisoméricas, seguido de separación cromatográfica y retirada del auxiliar quiral. Alternativamente, los compuestos se pueden resolver usando una columna de HPLC quiral. Los enantiómeros también se pueden obtener a partir de resolución cinética del racemato de los ésteres correspondientes usando enzimas lipasa.

Excepto como se discute posteriormente para las formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, los isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en lugar de meramente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi no se debe interpretar como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. De forma análoga, una referencia a orto-clorofenilo no se debe interpretar como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isómeras que entren dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C_3 o propilo incluye n-propilo e iso-propilo; alquilo C_4 o butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta-, y para-metoxifenilo).

La exclusión anterior no se refiere a las formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol, y enolato como, por ejemplo, en los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol, imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enotiol, N-nitroso/hidroxiato, y nitro/aci-nitro.

Se ha de observar que en el término "isómero" se incluyen específicamente compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D), y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C , y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similar.

3. Luciferasas de *Oplophorus*

Los compuestos de tienopirrol de la presente invención se pueden usar para inhibir luciferasas procedentes de *Oplophorus*. Los compuestos de tienopirrol pueden inhibir la actividad de luciferasa de las luciferasas procedentes de *Oplophorus*. La luciferasa procedente de *Oplophorus* puede ser una luciferasa de *Oplophorus* de tipo natural o una variante de una luciferasa de *Oplophorus*, tal como una luciferasa de SEQ ID NO: 2. Se describen variantes de luciferasas de *Oplophorus* en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 8.557.970 y 8.669.103.

La secuencia polipeptídica de la subunidad madura de 19 kDa de la forma de origen natural de la luciferasa de *Oplophorus gracilirostris* se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Una secuencia polipeptídica a modo de ejemplo para una luciferasa sintética procedente de *Oplophorus*, que se puede usar en los métodos descritos en el presente documento, se proporciona en la SEQ ID NO: 2 (también denominada de forma intercambiable en el presente documento "NanoLuc", "Nluc", "luciferasa Nluc", y "enzima Nluc").

4. Sustratos de coelenterazina

Los compuestos de tienopirrol de la presente invención se pueden usar para inhibir la actividad de luciferasa por competencia o interferencia con una coelenterazina o un sustrato procedente de coelenterazina de su unión a una luciferasa. Los sustratos de coelenterazina son una clase de moléculas informadoras que emiten luminiscencia cuando actúan sobre luciferasas y otras proteínas bioluminescentes. Algunos ejemplos de sustratos de coelenterazina incluyen pero no se limitan a: coelenterazina; derivados y/o análogos de coelenterazina tales como 2-furanilmetil-desoxi-coelenterazina (furimazina), coelenterazina-n, coelenterazina-f, coelenterazina-h, coelenterazina-

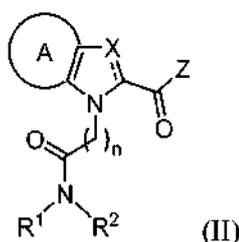
hcp, coelenterazina-cp, coelenterazina-c, coelenterazina-e, coelenterazina-fcp, bis-desoxicoelenterazina ("coelenterazina-hh"), coelenterazina-i, coelenterazina-icp, coelenterazina-v, y 2-metil-coelenterazina, además de los desvelados en el documento de Patente WO 2003/040100, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2008/0248511, y el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos n.º US 2012/0117667; pro-coelenterazinas (es decir, compuestos que no son sustratos para una enzima no luminiscente, que convierte el compuesto en un sustrato para una luciferasa), coelenterazinas enmascaradas con quinona, y similares. Se describen ejemplos adicionales de sustratos de coelenterazina, por ejemplo, en el documento de Publicación de Estados Unidos n.º 2012/0107849, el documento de Publicación de Estados Unidos n.º 2013/0130289, el documento de Publicación de Estados Unidos n.º 14/608.910, y el documento de Publicación de Estados Unidos n.º 14/609.372.

5. Métodos de inhibición de la actividad de luciferasa de *Oplophorus*

Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar en métodos para inhibir la actividad de luciferasa de *Oplophorus*. El método puede incluir poner en contacto el compuesto de tienopirrol desvelado en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib) o (Ib')) con una célula que expresa o contiene una luciferasa procedente de *Oplophorus*, en el que los compuestos desvelados pueden inhibir selectivamente la luciferasa procedente de *Oplophorus*. Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar en ensayos que se usan para detectar la presencia o actividad de enzimas usando luciferasas de *Oplophorus*, para inhibir selectivamente la señal de la luciferasa de *Oplophorus*. Por ejemplo, se pueden usar en un método bioluminógeno que emplea una luciferasa de *Oplophorus* y una coelenterazina o un sustrato procedente de coelenterazina para detectar una o más moléculas en una muestra, por ejemplo, una proteína de interés (por ejemplo, una enzima, un compañero de unión, un ligando, etc.), un cofactor para una reacción enzimática, un sustrato enzimático, un inhibidor enzimático, un activador enzimático, o radicales OH, o una o más condiciones, por ejemplo, condiciones rédox. Aunque el sustrato de coelenterazina sirve como sustrato para la luciferasa de *Oplophorus*, los compuestos de tienopirrol reivindicados pueden servir para inhibir que la luciferasa suprima selectivamente la señal luminiscente en realizaciones en las que se puede desear tal supresión, tales como en aplicaciones que implican multiplexación temporal de sistemas bioluminescentes múltiples, o en algunos ensayos luminiscentes basados en placa. Por ejemplo, los compuestos de tienopirrol se pueden usar para inhibir las actividades de luciferasa de *Oplophorus* intracelular y/o extracelular.

(1) Compuestos de tienopirrol

Como se ha discutido anteriormente, los métodos pueden incluir poner en contacto un compuesto de tienopirrol desvelado en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib) o (Ib')) con una célula que expresa una luciferasa procedente de *Oplophorus*, en los que los compuestos desvelados pueden inhibir selectivamente la luciferasa procedente de *Oplophorus*. Además de los compuestos de fórmulas (I), (Ia), (Ib) y (Ib'), los compuestos que se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento también incluyen los compuestos de fórmula (II), o sales de los mismos:



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilcoxilalquilo opcionalmente sustituido;

Z se selecciona entre el grupo que consiste en -NR³R⁴ y -OR⁵; y

R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente

sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicllalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido.

5 En algunas realizaciones, n es 1.

En algunas realizaciones, la línea discontinua representa la presencia de un enlace, y X es CH.

10 En algunas realizaciones, A es un anillo de fenilo. En algunas realizaciones, A es un anillo de heteroarilo de 5 miembros. En algunas realizaciones, A es un anillo de tienilo. En algunas realizaciones, A es un anillo de furanilo.

15 En algunas realizaciones, R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈, halo-alquilo C₁-C₈, alcoxi-alcoxi-alquilo y arilalquilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, etilo, n-hexilo, 2-(2-metoxietoxi)etilo y bencilo. En algunas realizaciones, R¹ es etilo.

20 En algunas realizaciones, R² es arilo opcionalmente sustituido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R² es fenilo sustituido. R² es fenilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, ciano, amido, alcoxi C₁-C₄, e hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R² es fenilo sustituido con un grupo metilo (por ejemplo, m-tolilo).

25 En algunas realizaciones, R¹ es alquilo C₁-C₄ y R² es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R¹ es etilo y R² es m-tolilo.

En algunas realizaciones, Z es -NR³R⁴.

30 En algunas realizaciones, R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina, piperidina y piperazina opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones, el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina sin sustituir, piperidina sin sustituir, piperidina sustituida con un sustituyente (por ejemplo, alcoxicarbonilo tal como etoxicarbonilo), o piperazina sustituida con un sustituyente (por ejemplo, alquilo C₁-C₄ tal como metilo).

35 En algunas realizaciones, R³ es hidrógeno.

40 En algunas realizaciones, R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ sin sustituir (por ejemplo, metilo), carboxi-alquilo C₁-C₈ (por ejemplo, -(CH₂)₇-COOH), alcoxicarbonil C₁-C₄-alquilo C₁-C₈ (por ejemplo, -(CH₂)₇-COOCH₃), fenilo opcionalmente sustituido (posterior), cicloalquilo C₅-C₆ opcionalmente sustituido (por ejemplo, ciclopentilo sin sustituir, ciclohexilo sin sustituir, o ciclohexilo sustituido), heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidinilo sin sustituir, piperidinilo sustituido con terc-butoxicarbonilo, alcoxicarbonilalquilcarbonilo tal como -CO-(CH₂)₄-COOCH₃), o carboxialquilcarbonilo tal como -CO-(CH₂)₄-COOH), heteroarilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piridil-alquilo C₁-C₄ tal como -CH₂-piridilo), y heterocicllalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, morfolino-alquilo C₁-C₄ tal como -(CH₂)₃-morfolino). Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁴ es fenilo que está sin sustituir o sustituido con un sustituyente, tal como un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alcoxicarbonilo C₁-C₄ (por ejemplo, -C(O)OCH₃) y alcoxicarbonil C₁-C₄-alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, -CH₂-C(O)CH₂CH₃).

50 En algunas realizaciones, R⁴ es ciclohexilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en carboxi, alcoxicarbonilo C₁-C₄ (por ejemplo, -C(O)OCH₃), alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃CH₃ o -C(O)NH-(CH₂)₅CH₃), hidroxi-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₂OH o -C(O)NH-(CH₂)₆OH), amido (es decir -CONH₂), amino-alquilamido C₁-C₈ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆NH₂), dialquilamino C₁-C₄-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₂N(CH₃)₂), carboxi-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃COOH, -C(O)NH-(CH₂)₅COOH o -C(O)NH-(CH₂)₇COOH), ácido sulfónico-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆SO₃H), sulfonato-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆SO₃), alquilcarbonil C₁-C₄-alquilamido C₁-C₈ (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₃COOCH₃, -C(O)NH-(CH₂)₅COOCH₃ o -C(O)NH-(CH₂)₇COOCH₃), cicloalquilamido C₃-C₆ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-ciclohexilo, -C(O)NH-ciclohexil-COOH o -C(O)NH-ciclohexil-COOCH₃), y heterocicllamido (por ejemplo, -C(O)NH-piperidinilo, sin sustituir o sustituido con metilo, terc-butoxicarbonilo o acetilo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁴ es amino-alquilamido C₁-C₈ opcionalmente sustituido (por ejemplo, -C(O)NH-(CH₂)₆NH₂), en el que el grupo amino está protegido con un grupo protector de amino (por ejemplo, terc-butoxicarbonilo), o en el que el grupo amino está protonado para formar una sal (por ejemplo, una sal de clorhidrato), o en el que el grupo amino está además funcionalizado con un fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína) o un polipéptido (por ejemplo, un péptido -Asp-Asp-Asp, que puede estar acetilado en el extremo).

65 En algunas realizaciones, Z es -OR⁵. En algunas realizaciones, R⁵ es H. En algunas realizaciones, R⁵ es alquilo C₁-

C4 opcionalmente sustituido (por ejemplo, metilo).

(2) Uso de compuestos de tienopirrol con impermeabilidad celular

5 En ciertas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento incluyen poner en contacto una muestra (por ejemplo, una célula) con una mezcla de un sustrato de coelenterazina con permeabilidad celular y un compuesto descrito en el presente documento que está modificado de un modo tal que posee impermeabilidad celular. En tales realizaciones, los compuestos de tienopirrol y los métodos desvelados se pueden usar para
10 acumular el brillo inicial de un formato de ensayo de operación de análisis sistemático de alto rendimiento, y a continuación inhibir selectivamente cualquier luciferasa que se pueda excretar de la célula, para inhibir selectivamente la luminiscencia que se pueda producir en el exterior de las células. Tales métodos pueden proporcionar una señal más selectiva dentro de las células. Algunos ejemplos de compuestos de tienopirrol con impermeabilidad celular incluyen JRW-0051, JRW-0147, y JRW-0187.

15 (3) Uso de compuestos de tienopirrol con permeabilidad celular

En ciertas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento incluyen poner en contacto una muestra (por ejemplo, una célula) con una mezcla de un sustrato de coelenterazina con permeabilidad celular y un compuesto descrito en el presente documento que posee permeabilidad celular. En tales realizaciones, los
20 compuestos de tienopirrol desvelados pueden entrar en las células e inhibir selectivamente una luciferasa de *Oplophorus* en la misma. Tales métodos pueden ser ventajosos en ensayos de multiplexación que implican el uso de dos o más luciferasas, y pueden permitir la inhibición de la luminiscencia de una luciferasa de *Oplophorus* de un modo tal que se vea selectivamente la luminiscencia de otra luciferasa del interior de la célula. Algunos ejemplos de compuestos de tienopirrol con permeabilidad celular incluyen JRW-0013 y JRW-0138.

25 (4) Uso con informadores transcripcionales

Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar con sistemas informadores transcripcionales genéticos. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para medir la actividad de un promotor en una muestra, en el
30 que el promotor está unido operativamente a un gen que codifica una luciferasa procedente de *Oplophorus* o una variante de la misma. El método incluye (a) poner en contacto la muestra con un sustrato de coelenterazina; (b) determinar la actividad del promotor midiendo la luminiscencia de la muestra, en el que la muestra comprende el promotor. El método puede incluir además una etapa de poner en contacto la muestra con un compuesto de tienopirrol descrito en el presente documento, para inhibir selectivamente la luminiscencia. El promotor puede estar
35 unido operativamente al gen mediante una fusión traduccional o transcripcional. Se puede examinar una ruta biológica de interés, por ejemplo, por tratamiento de una célula que comprende el promotor, que está unido operativamente a un gen que codifica la luciferasa, con un agente inductor de la ruta. A continuación se puede medir y monitorizar la actividad del promotor para estudiar cualquier correlación entre la actividad del promotor y la ruta de interés, así como obtener mediciones cinéticas relativas a la expresión génica (por ejemplo, inducibilidad, represión y
40 activación). El compuesto de tienopirrol descrito en el presente documento se puede usar para inhibir selectivamente la luminiscencia.

(5) Multiplexación

45 Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar para inhibir luciferasas de *Oplophorus* que se aplican a multiplexación temporal con otras luciferasas y ensayos. En algunas realizaciones, la luciferasa procedente de *Oplophorus* o la variante de la misma se puede multiplexar con otra enzima (por ejemplo, una luciferasa) que emite luz a una longitud de onda diferente, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga verde, por ejemplo, *Photinus pyralis* (por ejemplo, Luc2; Promega Corp) o luciferasa de elatérico roja (luciferasa CHROMA-LUC™; Promega Corp.). Por
50 ejemplo, si se usa una luciferasa de *Oplophorus* como informador funcional, entonces se podría usar luciferasa de luciérnaga verde o luciferasa roja CHROMA-LUC™ para controlar los efectos no específicos en la regulación genética o para normalizar la eficacia de transfección. En algunas realizaciones, la luminiscencia generada a partir de la luciferasa de *Oplophorus* (aproximadamente 460 nm) y CHROMA-LUC roja (aproximadamente 610 nm) se puede resolver fácilmente usando un luminómetro con filtros de discriminación de longitud de onda, permitiendo la
55 medición de ambas señales a partir de la misma muestra. En tales realizaciones, se puede usar un compuesto de tienopirrol descrito en el presente documento para inhibir selectivamente la luciferasa de *Oplophorus*, de un modo tal que se pueda ver selectivamente la señal de la otra luciferasa.

En otro ejemplo, se podría usar una luciferasa de *Oplophorus* como informador transcripcional y emparejar con una
60 luciferasa que emite luz a una longitud de onda diferente contenida en un reactivo de ensayo. En otro ejemplo, se puede usar una luciferasa de *Oplophorus* con una o más luciferasas adicionales, donde se puede medir la luminiscencia de cada luciferasa por separado mediante el uso de inhibidores enzimáticos selectivos. Por ejemplo, se puede medir la luminiscencia de la luciferasa de *Oplophorus* tras la adición de sustratos y tampones apropiados, seguido de la medición de una segunda luciferasa tras una adición posterior de sustratos y tampones apropiados y
65 uno o más compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento, que son selectivos para una luciferasa de *Oplophorus*. En otro ejemplo, se puede usar la luciferasa de *Oplophorus* contenida en un reactivo de ensayo para

medir un aspecto específico de la fisiología celular, por ejemplo, ATP para estimar viabilidad celular o actividad de caspasa para estimar apoptosis celular.

5 (6) Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET)

5 Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar en cualquier método en el que se use una luciferasa de *Oplophorus* para detectar interacciones ligando-proteína y/o proteína-proteína. En diversas realizaciones, la luciferasa de *Oplophorus* se puede usar para transferir energía a un aceptor de energía. Uno de tales métodos es
 10 Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Con respecto al BRET, la transferencia de energía desde un donador bioluminescente a un aceptor fluorescente da como resultado un desplazamiento en la distribución espectral de la emisión de luz. Esta transferencia de energía puede permitir la monitorización en tiempo real de la interacción proteína-proteína o ligando-proteína *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, el método BRET puede ser un Ensayo de Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia mediada por Nluc (tal como NanoBRET) para interacciones ligando-proteína y proteína-proteína. NANO BRET comprende dos métodos
 15 diferentes: 1) usando HALOTAG y tecnologías basadas en Nluc, se puede conseguir Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) para detectar interacciones proteína-proteína y/o ligando-proteína con aumento de señal y disminución de superposición espectral; y 2) usando luciferasa de Nluc fusionada a una proteína de interés y un trazador fluorescente para detectar interacción ligando-receptor en células vivas.

20 En algunas realizaciones, las enzimas luminiscentes (es decir, luciferasas de *Oplophorus*) usadas en el análisis BRET se pueden usar para determinar si dos moléculas son capaces de unirse entre sí o localizarse conjuntamente en una célula. Por ejemplo, se puede usar una enzima luminiscente como molécula donadora de bioluminiscencia, que se combina con una molécula o proteína de interés para crear una primera proteína de fusión. En diversas realizaciones, la primera proteína de fusión contiene una enzima luminiscente y una proteína de interés. En diversas
 25 realizaciones, las primeras proteínas de fusión que contienen la enzima luminiscente se pueden usar en análisis BRET para detectar interacción proteína/proteína en sistemas que incluyen, pero no se limitan a, lisados celulares, células intactas, y animales vivos. En diversas realizaciones, se puede usar HALOTAG como molécula aceptora fluorescente. En algunas realizaciones, se puede fusionar HALOTAG a una segunda proteína de interés o a una enzima luminiscente. Por ejemplo, se puede fusionar una enzima luminiscente a HALOTAG, expresar en células o
 30 animales, y marcar con un ligando de HALOTAG fluorescente tal como ligando TMR de HALOTAG. La fusión se puede excitar posteriormente para que emita fluorescencia en presencia de un sustrato enzimático luminiscente con permeabilidad celular. En algunas realizaciones, BRET se puede llevar a cabo usando enzimas luminiscentes en combinación con proteínas fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, Proteína fluorescente verde (GFP) o Proteína fluorescente roja (RFP) o etiquetas fluorescentes que incluyen fluoresceína, verde de rodamina, verde de Oregón, o Alexa 488, por nombrar algunos ejemplos no limitantes.

35 En algunas realizaciones, la inactivación de la señal de la Nluc excretada puede mejorar la relación señal/ruido cuando se usa el ensayo de placa NanoBRET.

40 En ciertas realizaciones, se puede usar un compuesto de tienopirrol con permeabilidad celular para inhibir BRET intracelular. En ciertas realizaciones, se puede usar un compuesto de tienopirrol con impermeabilidad celular para inhibir BRET extracelular. En ciertas realizaciones, se puede usar un compuesto de tienopirrol con impermeabilidad celular en un modelo de acoplamiento de diana.

45 (7) Ensayos de proximidad de proteínas para células vivas o formatos líticos

En algunas realizaciones, se pueden usar luciferasas de *Oplophorus* en proteínas de fusión de enzimas luminiscentes permutadas circularmente (CP) o de división lineal (SS) para medir la proximidad de proteínas. La luciferasa de *Oplophorus* se permuta o se divide mediante inserción de una secuencia de aminoácidos de sustrato
 50 de proteasa (por ejemplo, TEV) para generar baja bioluminiscencia. La luciferasa inactiva se une (por ejemplo, por fusión genética) a una proteína de seguimiento. Una proteína de interacción potencial se une (por ejemplo, mediante fusión genética) a una proteasa (por ejemplo, TEV). Cuando las dos proteínas de seguimiento interactúan o están en suficiente proximidad (por ejemplo, mediante una interacción constitutiva, un estímulo farmacológico o una respuesta de la ruta), la enzima luminiscente se escinde para generar un aumento de la actividad de bioluminiscencia. El
 55 ejemplo se puede aplicar a mediciones de proximidad de proteínas en células o en ensayos bioquímicos.

(8) Ensayos de complementación de proteínas

60 En algunas realizaciones, los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar para inhibir una luciferasa de *Oplophorus* cuando tal luciferasa se usa en otros métodos para detectar interacciones o proximidad ligando-proteína y proteína-proteína, tal como el ensayo de complementación de proteínas (PCA) o ensayo de fragmentación enzimática. Los ensayos de complementación de proteínas (PCA) proporcionan un medio para detectar la interacción de dos biomoléculas, por ejemplo, polipéptidos. PCA utiliza dos fragmentos de la misma proteína, por ejemplo, enzima, que cuando están muy próximos entre sí se pueden reconstituir en una proteína activa funcional.
 65 En algunas realizaciones, se puede usar la tecnología NANOBIT® (Promega Corporation) para detectar proximidad molecular en virtud de la reconstitución de una enzima luminiscente mediante la interacción de unión de

subunidades o componentes enzimáticos. NANOBIT utiliza un péptido no luminiscente (NLPep) y un polipéptido no luminiscente (NLPoly) procedentes de la variante de luciferasa de *Oplophorus*, luciferasa Nluc. NLPep y NLPoly se fusionan a proteínas de interés. Si las proteínas de interés interactúan, NLPep y NLPoly interactúan para reconstituir una enzima luciferasa de *Oplophorus* de longitud completa.

Por ejemplo, una enzima luminiscente se puede separar en dos fragmentos en un sitio o sitios tolerantes a la separación y cada fragmento de la enzima luminiscente separada se puede fusionar a uno de una pareja de polipéptidos de interés que se cree que interactúan, por ejemplo, FKBP y FRB. Si los dos polipéptidos de interés de hecho interactúan, los fragmentos de la enzima luminiscente, por ejemplo, se encuentran entonces muy próximos entre sí para reconstituir la enzima luminiscente activa funcional. En algunas realizaciones, a continuación se puede detectar y medir la actividad de la enzima luminiscente reconstituida. En algunas realizaciones, la enzima luminiscente dividida se puede usar en un sistema de complementación más general similar a lac-Z (Langley *et al.*, PNAS 72:1254-1257 (1975)) o ribonucleasa S (Levit y Berger, J. Biol. Chem. 251:1333 -1339 (1976)). En algunas realizaciones, un fragmento de enzima luminiscente (denominado "A") que se sabe que complementa a otro fragmento de enzima luminiscente ("B") se puede fusionar a una proteína diana, y la fusión resultante se puede monitorizar mediante luminiscencia en una célula o lisado celular que contiene el fragmento B. En algunas realizaciones, la fuente del fragmento B podría ser la misma célula (por ejemplo, si el gen para el fragmento B está integrado en el genoma de la célula o está contenido en otro plásmido dentro de la célula) o podría ser un lisado o proteína purificada procedente de otra célula. En algunas realizaciones, esta misma proteína de fusión (fragmento A) se podría capturar o inmovilizar usando una fusión entre el fragmento B y un polipéptido tal como HALOTAG capaz de unirse a un soporte sólido. En algunas realizaciones, se puede usar luminiscencia para demostrar captura con éxito o para cuantificar la cantidad de material capturado.

(9) Ensayo de dimerización

En algunas realizaciones, los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar con enzimas luminiscentes permutadas circularmente de longitud completa fusionadas a los respectivos compañeros de unión, por ejemplo, FRB y FKBP, y usarse en un ensayo de tipo complementación de proteínas. La diferencia principal entre el método desvelado en el presente documento y la complementación de proteínas tradicional es que no hubo ninguna complementación, sino que en su lugar hubo dimerización de dos enzimas de longitud completa, por ejemplo, enzimas luminiscentes permutadas circularmente.

En resumen, las proteínas indicadoras permutadas circularmente configuradas de forma similar para baja actividad se fusionan a ambos compañeros de proteína de fusión. Por ejemplo, cada compañero de fusión puede estar unido a informadores permutados estructurados de forma idéntica. La interacción de los compañeros de fusión acercó mucho los informadores permutados, permitiendo de ese modo la reconstitución de un informador híbrido que tenía mayor actividad.

6. Muestra

Los compuestos de tienopirrol desvelados se pueden usar con muestras que contienen componentes biológicos. La muestra puede comprender células. La muestra puede comprender mezclas heterogéneas de componentes (incluyendo células intactas, extractos celulares, lisados celulares, bacterias, virus, orgánulos, exosomas, y mezclas de los mismos) o un componente individual o grupo homogéneo de componentes (por ejemplo, aminoácido, ácido nucleico o polímeros de carbohidrato naturales o sintéticos, o complejos de membrana lipídica). Los compuestos de tienopirrol, en general, pueden ser no tóxicos para las células vivas y otros componentes biológicos en las concentraciones de uso.

La muestra puede incluir un animal (por ejemplo, un vertebrado), una planta, un hongo, fluido fisiológico (por ejemplo, sangre, plasma, orina, secreciones mucosas y similares), una célula, un lisado celular, un sobrenadante celular, o una fracción purificada de una célula (por ejemplo, una fracción subcelular). En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una célula. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una célula viva. La célula puede ser una célula eucariota, por ejemplo, células de levadura, ave, planta, insecto o mamífero, que incluye, pero no se limita a, células humanas, de simio, murinas, caninas, bovinas, equinas, felinas, ovinas, caprinas o porcinas, o células procariontas, o células de dos o más organismos diferentes, o lisados celulares o sobrenadantes de los mismos. Las células pueden no haber sido modificadas genéticamente mediante técnicas recombinantes (células no recombinantes), o pueden ser células recombinantes que están transfectadas de forma transitoria con ADN recombinante y/o cuyo genoma está aumentado de forma estable con un ADN recombinante, o cuyo genoma se ha modificado para alterar un gen, por ejemplo, alterar un promotor, intrón o marco de lectura abierto, o reemplazar un fragmento de ADN por otro. El ADN recombinante o fragmento de ADN de reemplazo puede codificar una molécula que se detecta mediante los métodos de la invención, un resto que altera el nivel o la actividad de la molécula que se detecta, y/o un producto génico no relacionado con la molécula o resto que altera el nivel o la actividad de la molécula. La célula puede expresar o no expresar una luciferasa. Las células pueden haber sido modificadas genéticamente mediante técnicas recombinantes.

7. Kits

Se desvelan kits para determinar la presencia o actividad de una o más enzimas (por ejemplo, una luciferasa de *Oplophorus* o variante de *Oplophorus*). El kit puede incluir uno o más de los siguientes: un compuesto o composición desvelado en el presente documento que puede inhibir la luciferasa de *Oplophorus* o variante de *Oplophorus*, una coelenterazina o sustrato procedente de coelenterazina, una luciferasa de *Oplophorus* o variante de *Oplophorus*, instrucciones para llevar a cabo un ensayo de luminiscencia, y un tampón o tampones de reacción. Los tampones de reacción pueden estar presentes en formulaciones individuales para las reacciones de enzimas que no son luciferasas y las reacciones de enzimas luminiscentes o en una formulación individual para un ensayo de etapa individual. Los kits también pueden contener otros inhibidores, activadores y/o potenciadores para la enzima o enzimas que no son luciferasa. Los kits también pueden contener un control positivo y/o negativo para el ensayo.

8. Ejemplos

Procedimiento de síntesis general A: A una solución de éster intermedio (1 eq) en dioxano/agua (4:1), se añadió hidróxido de litio (5 eq). La suspensión se calentó a 60 °C hasta que se consumió el material de partida (monitoreado mediante análisis por LCMS o TLC). La mezcla de reacción se enfrió y se acidificó con HCl (2 M) hasta pH 3. La suspensión se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado.

Procedimiento de síntesis general B: A una solución de carboxilato intermedio (1 eq) en dimetilformamida, se añadieron la amina necesaria (o clorhidrato de amina), hidroxibenzotriazol (2 eq), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (2 eq) y diisopropiletilamina (3 eq). La mezcla se calentó a 60 °C hasta que se consumieron los materiales de partida (monitoreado mediante análisis por LCMS o TLC). La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol o heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado.

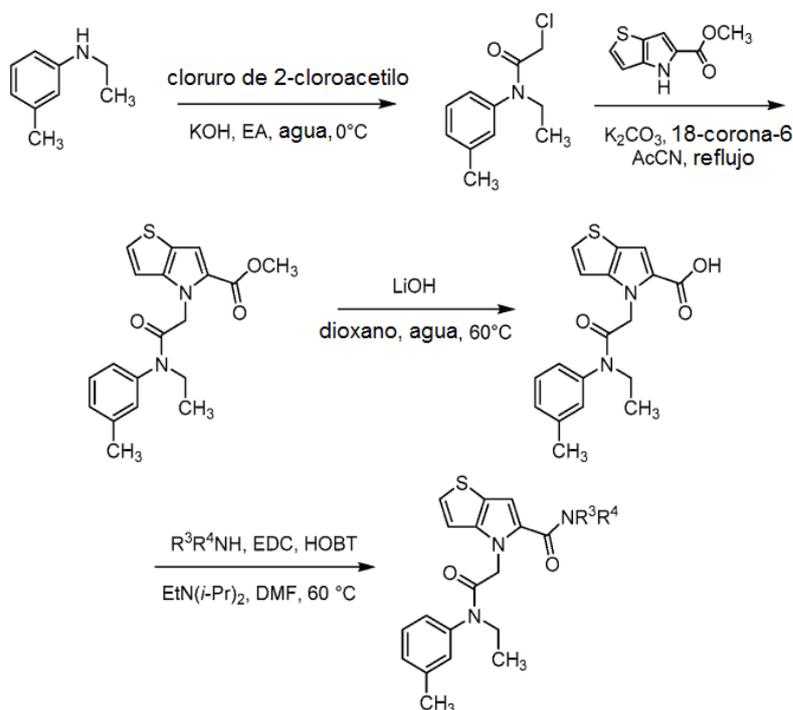
La presente invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos, que se presentan únicamente a modo de ejemplo y en la medida en que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones anexas no se pretende que formen parte de la presente invención.

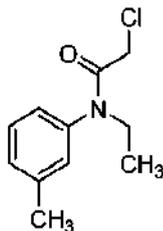
Ejemplo 1

Síntesis general de compuestos de Fórmula (Ia)

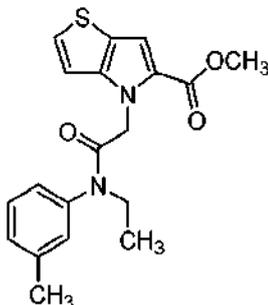
Los compuestos de fórmula (Ia) se pueden sintetizar, en general, de acuerdo con el Esquema 1.

Esquema 1.



2-Cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (JRW-0003)

5 A una solución de *N*-etil-3-metilanilina (2,0 g, 14,8 mmol) en acetato de etilo (25 ml), se añadió agua (12 ml). La solución bifásica se enfrió a 0 °C, y se añadió hidróxido de potasio (2,49 g, 44,4 mmol) en un movimiento. Se añadió cloruro de 2-cloroacetilo (2,5 g, 1,8 ml, 22,2 mmol) gota a gota durante 10 min. La mezcla se agitó durante 1 h, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró.
10 ESI MS *m/z* 212 [M + H]⁺.

4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0004)

15 A una solución de 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (14,8 mmol) en acetonitrilo (100 ml), se añadieron 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (2,28 g, 12,6 mmol), carbonato de potasio (2,09 g, 15,1 mmol) y 18-corona-6 (166 mg, 0,63 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 h, y la reacción se concentró al vacío hasta un volumen de ~20 ml. La suspensión se diluyó con agua, se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó al vacío para proporcionar el producto en bruto (4,6 g) en forma de un sólido de color pardo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,53 (d, *J* = 5,4, 1H), 7,46 - 7,36 (m, 1H), 7,35 - 7,11 (m, 5H), 4,92 (s, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,67 - 3,53 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,00 (t, *J* = 6,6, 3H); ESI MS *m/z* 357 [M + H]⁺.
20

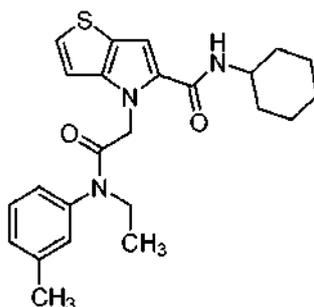
Ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (WZ-141-74)

25

30 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (2,0 g, 5,6 mmol) con hidróxido de litio (671 mg 28,0 mmol) para proporcionar el producto deseado (1,8 g, 93 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,45 (s, 1H), 7,49 (d, *J* = 5,4, 1H), 7,44 - 7,37 (m, 1H), 7,33 - 7,12 (m, 4H), 7,09 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 3,71 - 3,54 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,08 - 0,94 (s, 3H); ESI MS *m/z* 343 [M + H]⁺.

Ejemplo 2

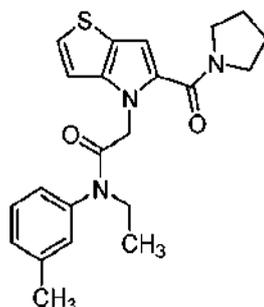
35 **N-ciclohexil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0006)**



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)-amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (75 mg, 0,22 mmol) con ciclohexilamina (43 mg, 0,44 mmol) para proporcionar el producto deseado (50 mg, 54 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,83 (d, J = 8,1, 1H), 7,44 - 7,16 (m, 5H), 7,13 - 7,06 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,75 - 3,52 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,84 - 1,51 (m, 5H), 1,37 - 1,17 (m, 6H), 1,05 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 424 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,02 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 25.200.

10 Ejemplo 3

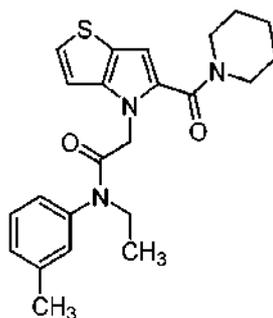
N-etil-2-(5-(pirrolidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida (JRW-0008)



15 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (75 mg, 0,22 mmol) con pirrolidina (43 mg, 0,44 mmol) para proporcionar el producto deseado (70 mg, 81 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,45 - 7,16 (m, 5H), 7,06 (d, J = 5,2, 1H), 6,83 (s, 1H), 4,83 (s, 2H), 3,77 - 3,32 (m, 6H), 2,36 (s, 3H), 1,91 - 1,75 (m, 4H), 1,06 - 0,92 (m, 3H); ESI MS m/z 396 [M + H]⁺; HPLC 97,3 % (AUC), T_R 6,24 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 21.773.

20 Ejemplo 4

25 N-etil-2-(5-(piperidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida (JRW-0009)

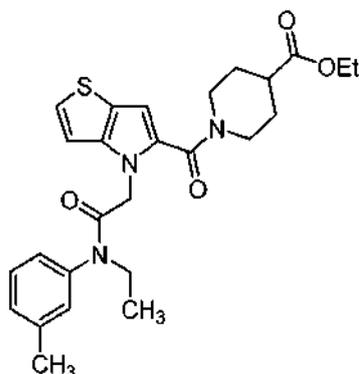


30 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (80 mg, 0,23 mmol) con piperidina (40 mg, 0,47 mmol) para proporcionar el producto deseado (90 mg, 94 %) en forma de una goma de color naranja. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,52 - 7,13 (m, 5H), 7,05 (d, J = 5,2, 1H), 6,58 (s, 1H), 4,75 (s, 2H), 3,68 - 3,45 (m, 6H), 2,37 (s, 3H), 1,69 - 1,42 (m, 6H), 1,00 (t, J = 6,9, 3H); ESI

MS m/z 410 [M + H]⁺; HPLC 98,8 % (AUC), T_R 5,91 min; UV (MeOH) λ_{máx} 284 nm, ε 24.598.

Ejemplo 5

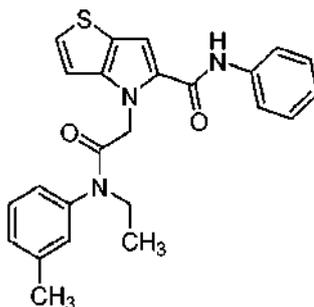
- 5 **1-(4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo (JRW-0012)**



- 10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (120 mg, 0,35 mmol) con piperidina-4-carboxilato de etilo (110 mg, 0,70 mmol) para proporcionar el producto deseado (160 mg, 94 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,47 - 7,36 (m, 1H), 7,32 (d, J = 5,3, 1H), 7,29 - 7,14 (m, 3H), 7,07 (d, J = 5,3, 1H), 6,61 (s, 1H), 4,75 (s, 2H), 4,22 (d, J = 13,2, 2H), 4,06 (c, J = 7,1, 2H), 3,68 - 3,52 (m, 2H), 3,18 - 2,94 (m, 2H), 2,70 - 2,55 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 1,90 - 1,78 (m, 2H), 1,62 - 1,48 (m, 2H), 1,17 (t, J = 7,1, 3H), 0,98 (t, J = 6,8, 3H); ESI MS m/z 482 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,25 min; UV (MeOH) λ_{máx} 286 nm, ε 20.009.

Ejemplo 6

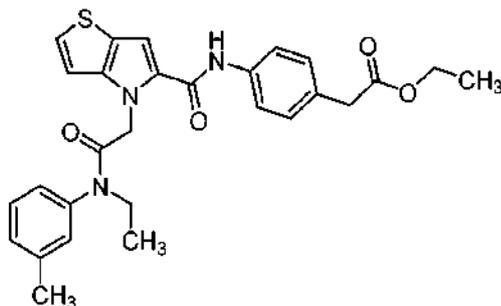
- 20 **4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-fenil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0143)**



- 25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,15 mmol) con anilina (16 mg, 0,18 mmol) para proporcionar el producto deseado (30 mg, 49 %) en forma de una espuma. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,93 (s, 1H), 7,74 - 7,68 (m, 2H), 7,49 - 7,19 (m, 9H), 7,16 (d, J = 5,3, 1H), 7,05 (t, J = 7,4, 1H), 4,99 (s, 2H), 3,67 - 3,52 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,06 - 0,92 (m, 3H); ESI MS m/z 418 [M + H]⁺; HPLC 85,4 % (AUC), T_R 6,04 min; UV (EtOH) λ_{máx} 306 nm, ε 27.330.

- 30 **Ejemplo 7**

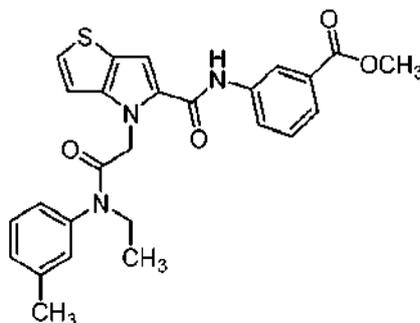
2-(4-(4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)fenil)acetato de etilo (JRW-0152)



5 A una solución de ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,15 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron 2-(4-aminofenil)acetato de etilo (31 mg, 0,18 mmol), HATU (111 mg, 0,29 mmol) y diisopropiletilamina (56 mg, 0,44 mmol). La reacción se calentó a 60 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (28 mg, 38 %) en forma de un sólido de color naranja. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,93 (s, 1H), 7,64 (d, J = 7,6, 2H), 7,50 - 7,11 (m, 9H), 4,99 (s, 2H), 4,06 (c, J = 6,4 Hz, 2H), 3,60 (s, 4H), 2,37 (s, 3H), 1,17 (t, J = 7,2, 3H), 0,98 (t, J = 6,4, 3H); ESI MS m/z 476 [M + H]⁺; HPLC 97,2 % (AUC), T_R 7,61 min; UV (EtOH) λ_{máx} 308 nm, ε 34.350.

Ejemplo 8

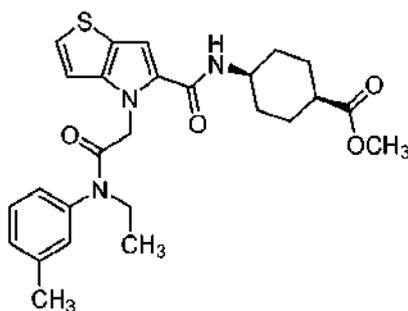
15 **3-(4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)benzoato de metilo (JRW-0151)**



20 A una solución de ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,15 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron 3-aminobenzoato de metilo (33 mg, 0,22 mmol), HATU (111 mg, 0,29 mmol) y diisopropiletilamina (56 mg, 0,44 mmol). La reacción se calentó a 60 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (30 mg, 43 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,15 (s, 1H), 8,42 - 8,38 (m, 1H), 8,00 (d, J = 8,2, 1H), 7,67 - 7,63 (m, 1H), 7,56 - 7,10 (m, 8H), 5,00 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,67 - 3,55 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 0,99 (t, J = 6,7, 3H); ESI MS m/z 476 [M + H]⁺; HPLC 98,3 % (AUC), T_R 7,52 min; UV (EtOH) λ_{máx} 309 nm, ε 37.302.

Ejemplo 9

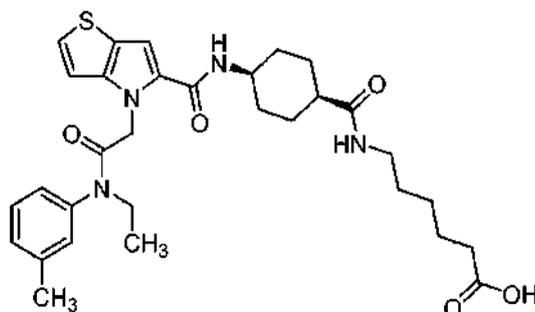
30 **Cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0041)**



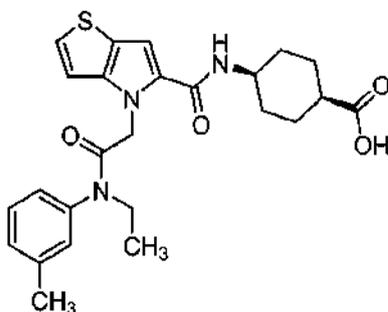
5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (150 mg, 0,44 mmol) con clorhidrato de cis-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (127 mg, 0,66 mmol) para proporcionar el producto deseado (186 mg, 88 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,82 (d, J = 7,8, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,16 (m, 3H), 7,12 (s, 1H), 7,08 (d, J = 5,3, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,85 - 3,70 (m, 1H), 3,68 - 3,53 (m, 5H), 2,63 - 2,56 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,08 - 1,92 (m, 2H), 1,69 - 1,43 (m, 6H), 1,08 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 482 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,16 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.998.

10 Ejemplo 10

15 **Ácido 6-(cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico (JRW-0264)**

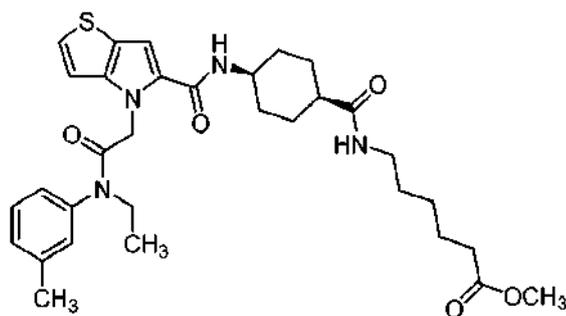


20 **Etapa 1. Ácido cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0261)**



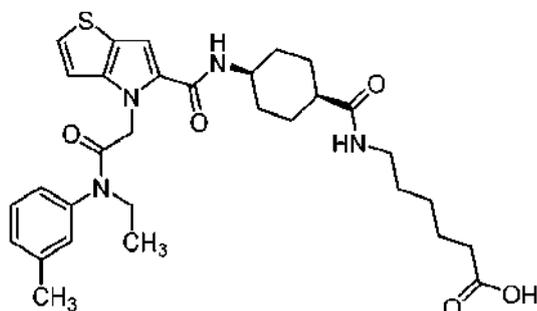
25 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (160 mg, 0,33 mmol) con hidróxido de litio (40 mg, 1,66 mmol) para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color pardo claro. ESI MS m/z 468 [M + H]⁺.

30 **Etapa 2. 6-(Cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (JRW-0262)**



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (68 mg, 0,15 mmol) con clorhidrato de 6-aminohexanoato de metilo (40 mg, 0,22 mmol) para proporcionar el producto deseado (63 mg, 72 %) en forma de una espuma de color rojo claro. ESI MS m/z 595 [M + H]⁺.

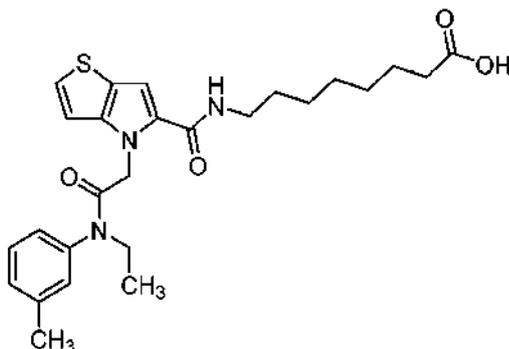
10 **Etapa 3.** Ácido 6-(cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico (JRW-0264)



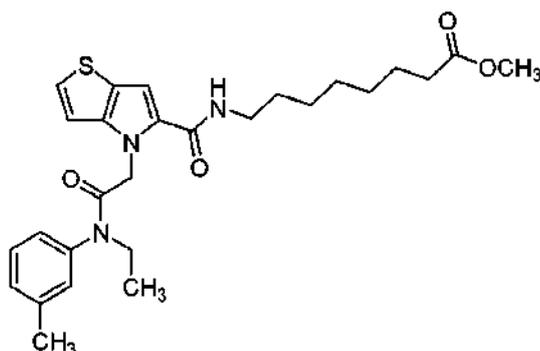
15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 6-(cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (60 mg, 0,10 mmol) con hidróxido de litio (12 mg, 0,50 mmol) para proporcionar el producto deseado (56 mg, 95 %) en forma de una espuma de color rojo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,96 (s, 1H), 7,77 (d, J = 7,2, 1H), 7,61 (t, J = 5,5, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H), 7,33 - 7,14 (m, 4H), 7,08 (d, J = 5,5, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,92 - 3,74 (m, 1H), 3,67 - 3,56 (m, 2H), 3,01 (dd, J = 6,8, 12,6, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,27 - 2,10 (m, 3H), 1,94 - 1,79 (m, 2H), 1,78 - 1,64 (m, 2H), 1,60 - 1,31 (m, 8H), 1,30 - 1,18 (m, 2H), 1,06 - 0,94 (m, 3H).; ESI MS m/z 581 [M + H]⁺; HPLC 97,8 % (AUC), T_R 5,50 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 18.873.

Ejemplo 11

25 **Ácido 8-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno [3,2-b] pirrol-5-carboxamido)octanoico (JRW-0198)**

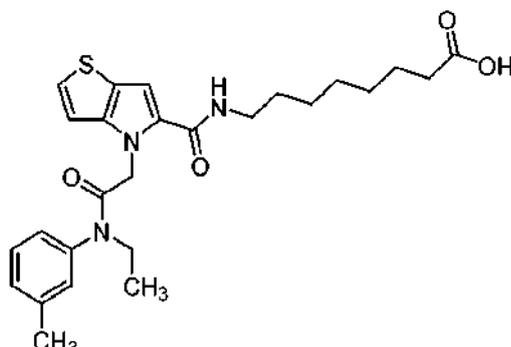


Etapa 1. 8-(4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)octanoato de metilo (JRW-0196)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,15 mmol) con clorhidrato de 8-aminooctanoato de metilo (46 mg, 0,22 mmol) para proporcionar el producto deseado (72 mg, 99 %) en forma de un aceite. ESI MS m/z 498 [M + H]⁺.

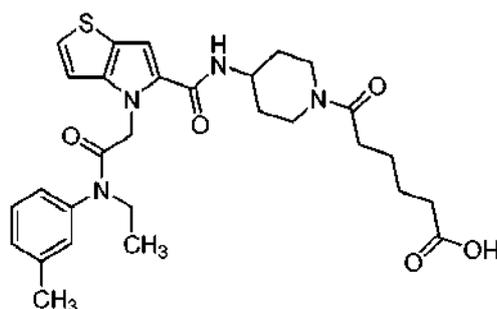
Etapa 2. Ácido 8-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)octanoico (JRW-0198)



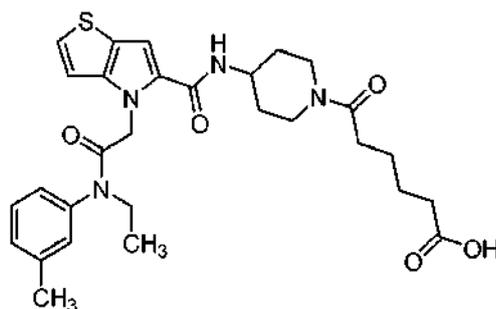
10 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 8-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)octanoato de metilo (72 mg, 0,14 mmol) con hidróxido de litio (17 mg, 0,72 mmol) para proporcionar el producto deseado (47 mg, 67 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,91 (s, 1H), 8,09 (t, J = 5,3, 1H), 7,47 - 7,16 (m, 5H), 7,09 (d, J = 5,3, 1H), 7,03 (s, 1H), 4,96 (s, 2H), 3,72 - 3,52 (m, 2H), 3,16 (dd, J = 6,4, 12,8, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,17 (t, J = 7,3, 2H), 1,60 - 1,40 (m, 4H), 1,36 - 1,18 (m, 6H), 1,08 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 484 [M + H]⁺; HPLC 99,4 % (AUC), T_R 5,43 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.627.

Ejemplo 12

20 **Ácido 6-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)piperidin-1-il)-6-oxohexanoico (JRW-0208)**



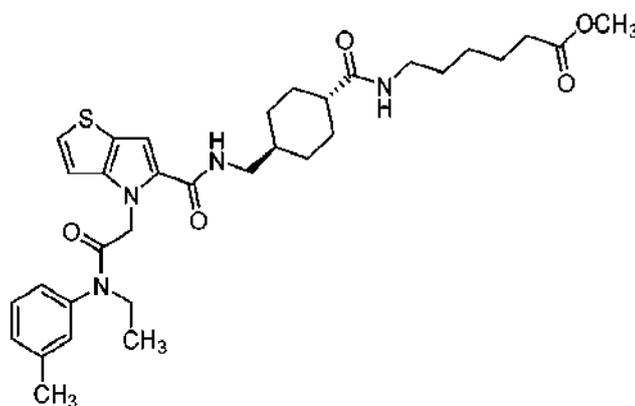
25 **Etapa 1.** 4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (JRW-0203)



5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 6-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)piperidin-1-yl)-6-oxohexanoato de metilo (100 mg, 0,18 mmol) con hidróxido de litio (21 mg, 0,88 mmol) para proporcionar el producto deseado (98 mg, cuant.) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,96 (s, 1H), 7,93 (d, *J* = 7,9, 1H), 7,46 - 7,34 (m, 2H), 7,33 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,06 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,39 - 4,26 (m, 1H), 4,05 - 3,75 (m, 2H), 3,68 - 3,54 (m, 2H), 3,17 - 3,00 (m, 1H), 2,73 - 2,57 (m, 1H), 2,42 - 2,25 (m, 5H), 2,24 - 2,12 (m, 2H), 1,86 - 1,67 (m, 2H), 1,55 - 1,11 (m, 6H), 1,07 - 0,93 (m, 3H); ESI MS *m/z* 553 [M + H]⁺; HPLC 98,8 % (AUC), *T_R* 5,30 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 23.015.

10 Ejemplo 13

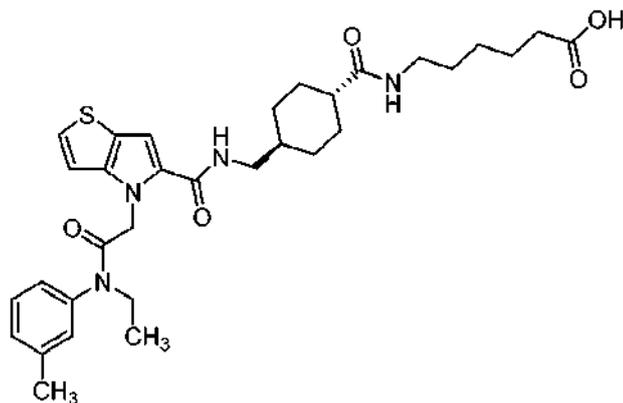
15 **6-(Trans-4-((4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (JRW-0267)**



20 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (133 mg, 0,39 mmol) con 6-(trans-4-(aminometil)ciclohexano-1-carboxamido) hexanoato de metilo (111 mg, 0,39 mmol) para proporcionar el producto deseado (180 mg, 76 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,09 (t, *J* = 5,6, 1H), 7,61 (t, *J* = 5,5, 1H), 7,66 - 7,56 (m, 2H), 7,32 - 7,16 (m, 3H), 7,14 - 6,99 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,67 - 3,46 (m, 5H), 3,07 - 2,92 (m, 4H), 2,37 (s, 3H), 2,25 (t, *J* = 7,4, 2H), 2,08 - 1,93 (m, 1H), 1,83 - 1,60 (m, 4H), 1,56 - 1,12 (m, 10H), 1,08 - 0,80 (m, 5H); ESI MS *m/z* 609 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), *T_R* 5,95 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 20.078.

25 Ejemplo 14

30 **Ácido 6-(trans-4-((4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico (JRW-0268)**

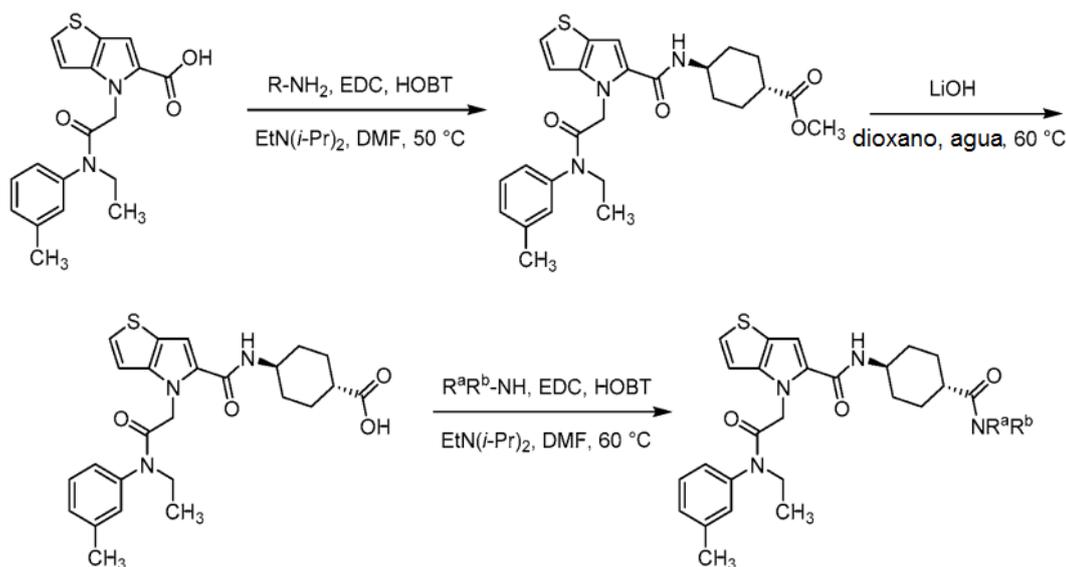


5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 6-(trans-4-((4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (165 mg, 0,27 mmol) con hidróxido de litio (32 mg 3,4 mmol) para proporcionar el producto deseado (115 mg, 71 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,93 (s, 1H), 8,14 - 8,04 (m, 1H), 7,61 (t, J = 5,3, 1H), 7,46 - 7,16 (m, 5H), 7,13 - 6,98 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,68 - 3,53 (m, 2H), 3,08 - 2,92 (m, 4H), 2,36 (s, 3H), 2,15 (t, J = 7,2, 2H), 2,07 - 1,92 (m, 1H), 1,80 - 1,63 (m, 4H), 1,54 - 1,14 (m, 10H), 1,08 - 0,79 (m, 5H); ESI MS m/z 595 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,44 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 25.604.

10 Ejemplo 15

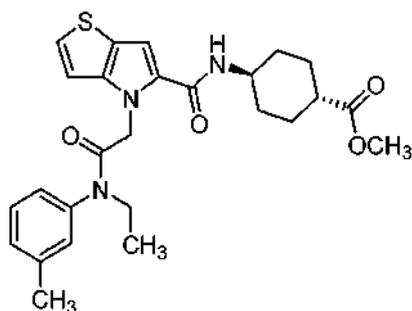
Síntesis general de compuestos de Fórmula (Ib)

15 Los compuestos de fórmula (Ib) se pueden sintetizar, en general, de acuerdo con el Esquema 2. **Esquema 2.**



20 Ejemplo 16

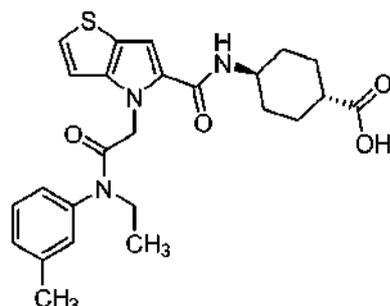
Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0013)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (100 mg, 0,29 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (84 mg 0,44 mmol) para proporcionar el producto deseado (103 mg, 73 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,89 (d, *J* = 7,9, 1H), 7,46 - 7,36 (m, 2H), 7,34 - 7,15 (m, 3H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,72 - 3,46 (s, 6H), 2,36 (s, 3H), 2,32 - 2,18 (m, 1H), 2,03 - 1,77 (m, 4H), 1,52 - 1,20 (m, 4H), 1,06 - 0,95 (m, 3H); ESI MS *m/z* 482 [M + H]⁺; HPLC 99,0 % (AUC), *T_R* 7,75 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 26.100.

10 Ejemplo 17

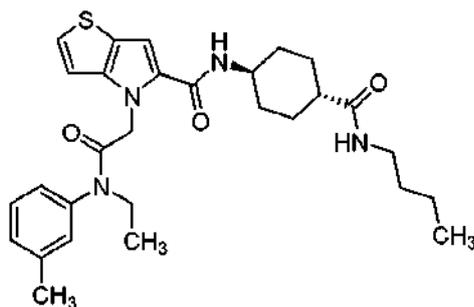
Ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0034)



15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (55 mg, 0,11 mmol) con hidróxido de litio (14 mg, 0,57 mmol) para proporcionar el producto deseado (50 mg, 93 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,99 (s, 1H), 7,92 - 7,84 (m, 1H), 7,44 - 7,19 (m, 5H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,73 - 3,52 (m, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,22 - 2,06 (m, 1H), 1,98 - 1,76 (m, 4H), 1,47 - 1,21 (m, 4H), 1,08 - 0,93 (m, 3H); ESI MS *m/z* 468 [M + H]⁺; HPLC 99,4 % (AUC), *T_R* 5,81 min; UV (MeOH) λ_{máx} 290 nm, ε 26.502.

25 Ejemplo 18

N-(trans-4-(butilcarbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0042)



30 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con butilamina (9 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (50 mg, 89 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz,

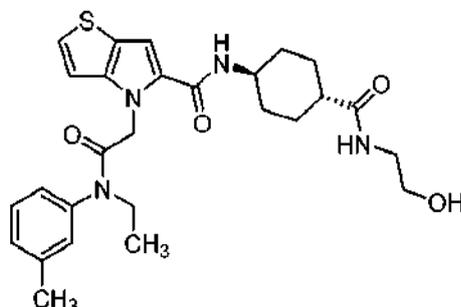
DMSO- d_6) δ 7,82 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,65 - 7,57 (m, 1H), 7,46 - 7,11 (m, 5H), 7,06 - 6,98 (m, 2H), 4,91 (s, 2H), 3,66 - 3,45 (m, 3H), 2,96 (c, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,05 - 1,92 (m, 1H), 1,85 - 1,60 (m, 4H), 1,50 - 1,10 (m, 9H), 1,02 - 0,90 (m, 3H), 0,80 (t, $J = 7,2$, 3H); ESI MS m/z 523 $[M + H]^+$; HPLC 99,6 % (AUC), T_R 6,52 min; UV (MeOH) λ_{max} 288 nm, ϵ 28.364.

5

Ejemplo 19

4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((2-hidroxi)etil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0043)

10



Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con etanolamina (7 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (48 mg, 88 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,86 (d, $J = 7,8$, 1H), 7,69 (t, $J = 5,4$, 1H), 7,45 - 7,18 (m, 5H), 7,13 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,60 (t, $J = 5,5$, 1H), 3,75 - 3,54 (m, 3H), 3,36 (c, $J = 5,9$, 2H), 3,08 (c, $J = 5,9$, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,14 - 2,00 (m, 1H), 1,90 - 1,69 (m, 4H), 1,52 - 1,10 (m, 4H), 1,08 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 511 $[M + H]^+$; HPLC 99,7 % (AUC), T_R 6,52 min; UV (MeOH) λ_{max} 289 nm, ϵ 24.966.

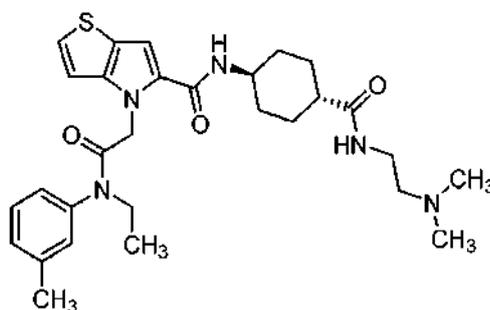
15

20

Ejemplo 20

N-(trans-4-((2-(dimetilamino)etil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0044)

25



Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con etanolamina (18 mg, 0,21 mmol) para proporcionar el producto deseado (45 mg, 78 %) en forma de un sólido de color rojo claro. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,87 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,62 (t, $J = 5,5$, 1H), 7,45 - 7,35 (m, 2H), 7,33 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,05 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,73 - 3,54 (m, 3H), 3,10 (c, $J = 6,4$, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,24 (t, $J = 6,4$, 2H), 2,15 - 2,00 (m, 7H), 1,88 - 1,69, 1,78 (m, 4H), 1,53 - 1,19 (m, 4H), 1,08 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 538 $[M + H]^+$; HPLC 99,4 % (AUC), T_R 4,31 min; UV (MeOH) λ_{max} 289 nm, ϵ 29.980.

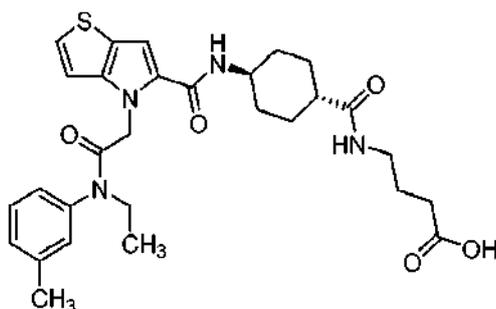
30

35

Ejemplo 21

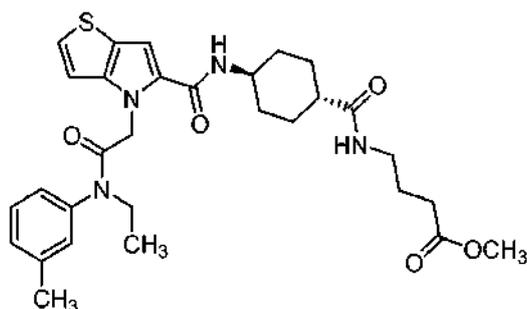
Ácido 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)butanoico (JRW-0051)

40



Etapa 1. 4-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)butanoato de metilo (JRW-0050)

5

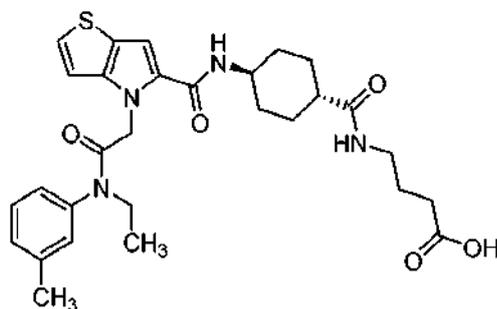


Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con 4-aminobutanoato de metilo (15 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto en bruto (80 mg) en forma de un vidrio de color blanco. ESI MS m/z 567 [M + H]⁺.

10

Etapa 2. Ácido 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)butanoico (JRW-0051)

15



Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)butanoato de metilo (60 mg, 0,10 mmol) con hidróxido de litio (13 mg, 0,53 mmol) para proporcionar el producto deseado (55 mg, 93 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,97 (s, 1H), 7,82 (d, J = 7,7, 1H), 7,66 (t, J = 5,4, 1H), 7,40 - 7,29 (m, 2H), 7,27 - 7,13 (m, 3H), 7,07 - 7,00 (m, 2H), 4,92 (s, 2H), 3,68 - 3,48 (m, 3H), 3,03 - 2,92 (m, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,14 (t, J = 7,3, 2H), 2,06 - 1,93 (m, 1H), 1,85 - 1,64 (m, 4H), 1,62 - 1,47 (m, 2H), 1,47 - 1,15 (m, 4H), 1,05 - 0,88 (m, 3H); ESI MS m/z 553 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,17 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 24.710.

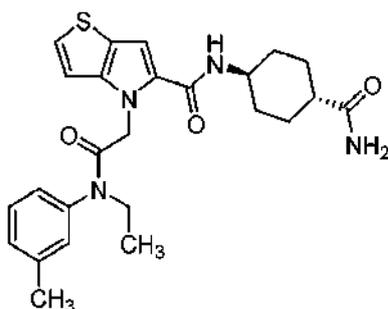
20

25

Ejemplo 22

N-(trans-4-carbamoilciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0052)

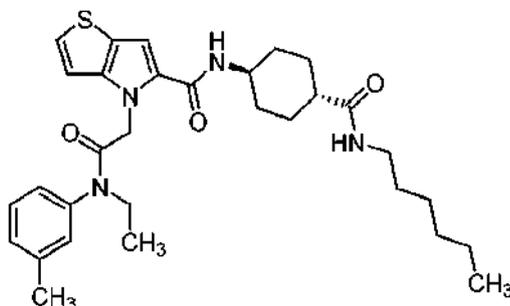
30



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con amoniaco (1,1 ml, 0,5 M, 0,21 mmol) para proporcionar el producto deseado (45 mg, 90 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,82 (d, J = 8,2, 1H), 7,40 - 7,29 (m, 2H), 7,28 - 7,08 (m, 4H), 7,06 - 6,98 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 3,67 - 3,49 (m, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,03 - 1,91 (m, 1H), 1,82 - 1,68 (m, 4H), 1,47 - 1,14 (m, 4H), 1,03 - 0,88 (s, 3H); ESI MS m/z 467 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,11 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 25.213.

10 Ejemplo 23

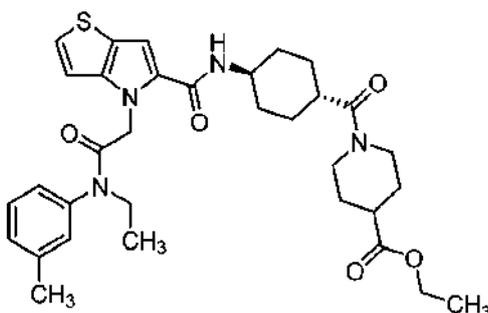
4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(hexilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0138)



15 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con hexilamina (13 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (50 mg, 85 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,88 (d, J = 8,1, 1H), 7,67 (t, J = 5,6, 1H), 7,45 - 7,34 (m, 2H), 7,33 - 7,18 (m, 3H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,72 - 3,52 (m, 3H), 2,99 (dd, J = 6,5, 12,6, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,10 - 1,96 (m, 1H), 1,88 - 1,68 (m, 4H), 1,52 - 1,16 (m, 12H), 1,08 - 0,92 (m, 3H), 0,88 - 0,78 (m, 3H); ESI MS m/z 551 [M + H]⁺; HPLC 99,4 % (AUC), T_R 6,54 min; UV (EtOH) λ_{máx} 292 nm, ε 29.535.

25 Ejemplo 24

1-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo (JRW-0140)

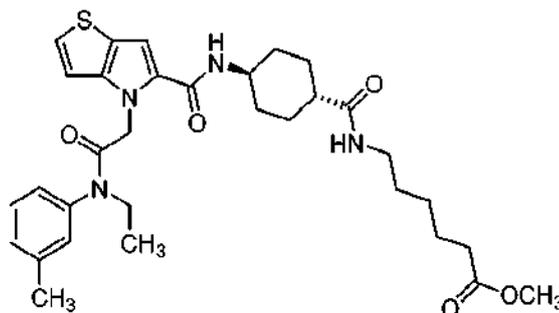


30 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-

tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con piperidina-4-carboxilato de etilo (20 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (60 mg, 92 %) en forma de un semisólido transparente. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,92 (d, *J* = 7,8, 1H), 7,45 - 7,34 (m, 2H), 7,32 - 7,18 (m, 3H), 7,12 - 7,05 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,23 (d, *J* = 12,7, 1H), 4,05 (c, *J* = 7,1, 2H), 3,87 (d, *J* = 12,7, 1H), 3,72 - 3,52 (m, 3H), 3,18 - 3,02 (m, 1H), 2,76 - 2,51 (m, 3H), 2,36 (s, 3H), 1,93 - 1,63 (m, 6H), 1,56 - 1,26 (m, 6H), 1,16 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H), 1,07 - 0,93 (m, 3H); ESI MS *m/z* 607 [M + H]⁺; HPLC 99,5 % (AUC), T_R 6,01 min; UV (EtOH) λ_{máx} 290 nm, ε 29.325.

Ejemplo 25

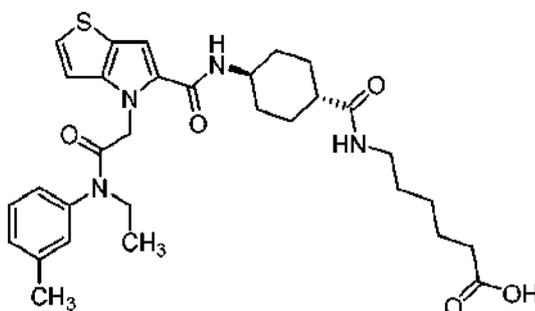
10 **6-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (JRW-0145)**



15 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con 6-aminohexanoato de metilo (23 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (60 mg, 94 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,88 (d, *J* = 8,1, 1H), 7,68 (t, *J* = 5,6, 1H), 7,44 - 7,34 (m, 2H), 7,32 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,03 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,73 - 3,50 (m, 6H), 2,98 (dd, *J* = 6,6, 12,5, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,26 (t, *J* = 7,4, 2H), 2,08 - 1,95 (m, 1H), 1,87 - 1,67 (m, 4H), 1,57 - 1,15 (m, 10H), 1,05 - 0,93 (m, 3H); ESI MS *m/z* 595 [M + H]⁺; HPLC 99,4 % (AUC), T_R 6,24 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 26.555.

Ejemplo 26

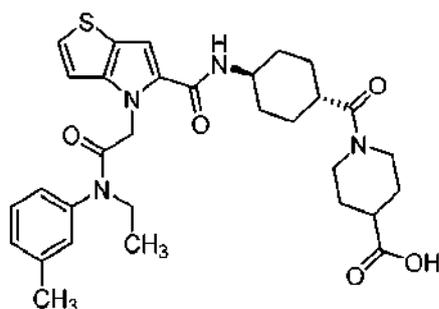
25 **Ácido 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico (JRW-0147)**



30 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo (53 mg, 0,089 mmol) con hidróxido de litio (10 mg, 0,44 mmol) para proporcionar el producto deseado (50 mg, 96 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,98 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,6, 1H), 7,72 - 7,63 (m, 1H), 7,44 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,18 (m, 3H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,72 - 3,52 (m, 3H), 3,04 - 2,93 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,16 (t, *J* = 7,1, 2H), 2,10 - 1,93 (m, 1H), 1,88 - 1,67 (m, 4H), 1,55 - 1,10 (m, 10H), 1,08 - 0,92 (m, 3H); ESI MS *m/z* 581 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,49 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 23.738.

Ejemplo 27

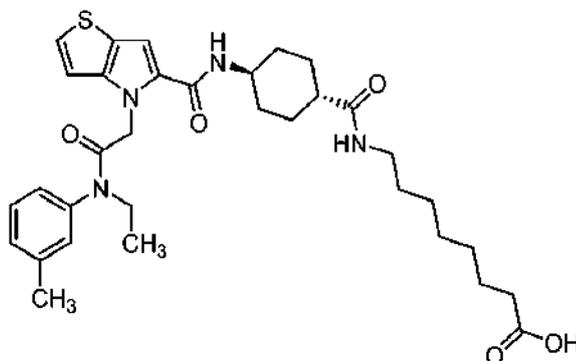
40 **Ácido 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carbonil)piperidina-4-carboxílico (JRW-0187)**



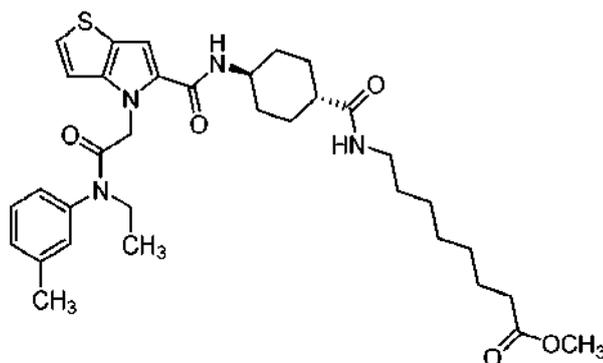
5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo (60 mg, 0,099 mmol) con hidróxido de litio (12 mg, 0,49 mmol) para proporcionar el producto deseado (45 mg, 78 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,20 (s, 1H), 7,90 (d, J = 7,5, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,18 (m, 3H), 7,08 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,28 - 4,15 (m, 1H), 3,92 - 3,79 (m, 1H), 3,70 - 3,52 (m, 3H), 3,15 - 3,00 (m, 1H), 2,75 - 2,60 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 1,92 - 1,63 (m, 7H), 1,56 - 1,25 (m, 7H), 1,08 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 579 [M + H]⁺; HPLC 99,5 % (AUC), T_R 4,45 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 23.470.

10 Ejemplo 28

15 **Ácido 8-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)octanoico (JRW-0188)**

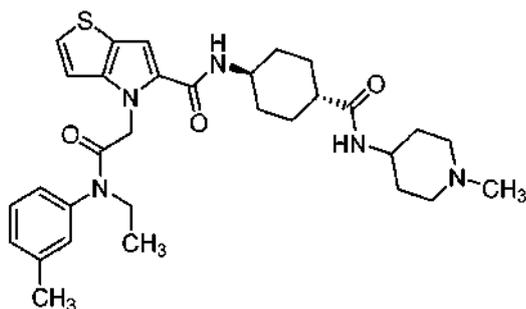


20 **Etapa 1.** 8-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)octanoato de metilo (JRW-0186)



25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con 8-aminooctanoato de metilo (27 mg, 0,13 mmol) para proporcionar el producto deseado (55 mg, 82 %) en forma de un aceite. ESI MS m/z 623 [M + H]⁺.

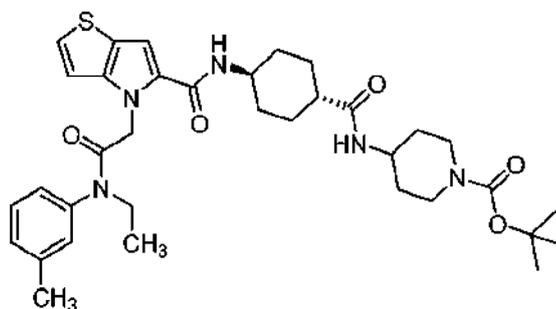
Etapa 2. Ácido 8-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)octanoico (JRW-0188)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (50 mg, 0,11 mmol) con 1-metilpiperidin-4-amina (18 mg, 0,16 mmol) para proporcionar el producto deseado (47 mg, 78 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,87 (d, J = 8,1, 1H), 7,58 (d, J = 7,6, 1H), 7,50 - 7,16 (m, 5H), 7,13 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,75 - 3,38 (m, 4H), 2,73 - 2,61 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,22 - 1,96 (m, 5H), 1,96 - 1,58 (m, 8H), 1,53 - 1,19 (m, 6H), 1,08 - 0,97 (s, 3H); ESI MS m/z 564 [M + H]⁺; HPLC 98,8 % (AUC), T_R 3,35 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 30.051.

10 Ejemplo 31

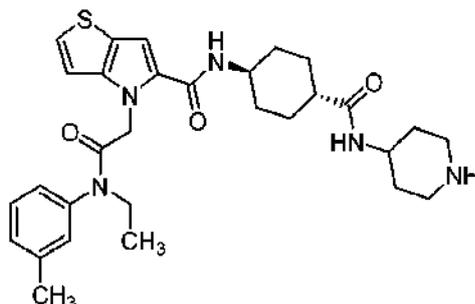
15 **4-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (JRW-0192)**



20 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (84 mg, 0,18 mmol) con 4-aminopiperidina-1-carboxilato de terc-butilo (54 mg, 0,27 mmol) para proporcionar el producto deseado (115 mg, 99 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,93 - 7,83 (m, 1H), 7,68 - 7,58 (m, 1H), 7,45 - 7,16 (m, 5H), 7,13 - 7,03 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,96 - 3,46 (m, 6H), 2,93 - 2,70 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,09 - 1,95 (m, 1H), 1,88 - 1,60 (m, 6H), 1,55 - 1,08 (m, 15H), 1,06 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 650 [M + H]⁺; HPLC 99,6 % (AUC), T_R 5,87 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 31.128.

25 Ejemplo 32

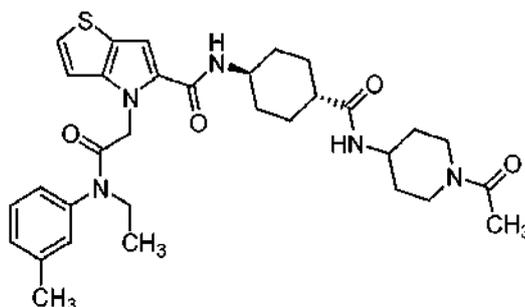
30 **4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(piperidin-4-ilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0194)**



A una solución de 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (105 mg, 0,16 mmol) en diclorometano (5 ml), se añadió ácido trifluoroacético (1 ml). La reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla se diluyó con tolueno y se concentró al vacío (3 x) para proporcionar el producto en bruto (150 mg) en forma de una espuma de color blanco. ESI MS m/z 550 [M + H]⁺.

Ejemplo 33

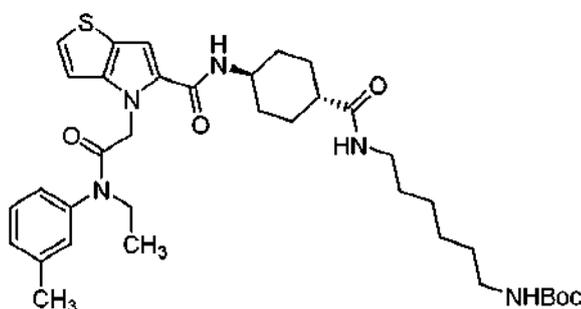
N-(trans-4-((1-acetilpiperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0195)



A una solución de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(piperidin-4-ilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (0,16 mmol) en diclorometano (5 ml) enfriada a 0 °C, se añadieron cloruro de acetilo (25 mg, 0,32 mmol) y diisopropiletilamina (104 mg, 0,81 mmol). La reacción se agitó, y se calentó a TA durante una noche. La mezcla se diluyó con diclorometano y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (84 mg, 88 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,87 (d, J = 7,6, 1H), 7,67 (d, J = 7,6, 1H), 7,46 - 7,32 (m, 2H), 7,33 - 7,17 (m, 3H), 7,13 - 7,03 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,22 - 4,08 (m, 1H), 3,81 - 3,52 (m, 5H), 3,15 - 3,00 (m, 1H), 2,70 (t, J = 11,9, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,11 - 1,94 (m, 4H), 1,91 - 1,59 (m, 6H), 1,52 - 1,09 (m, 6H), 1,06 - 0,91 (m, 3H); ESI MS m/z 592 [M + H]⁺; HPLC 99,8 % (AUC), T_R 4,09 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 26.034.

Ejemplo 34

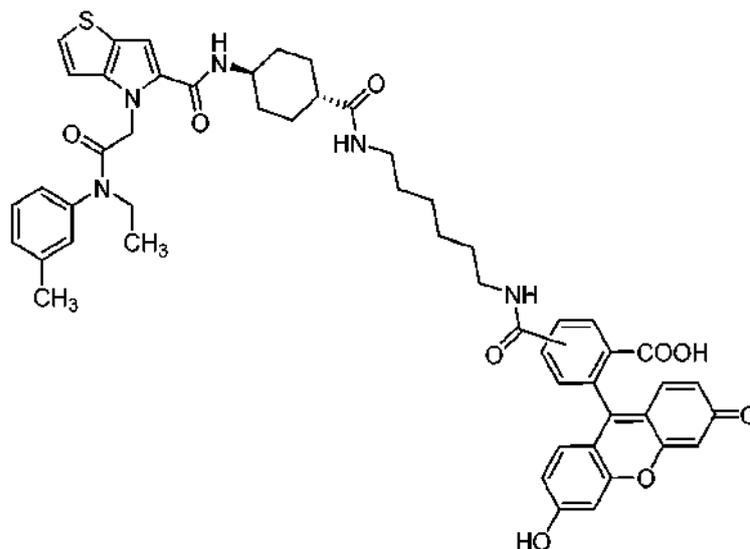
(6-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexil)carbamato de terc-butilo (JRW-0197)



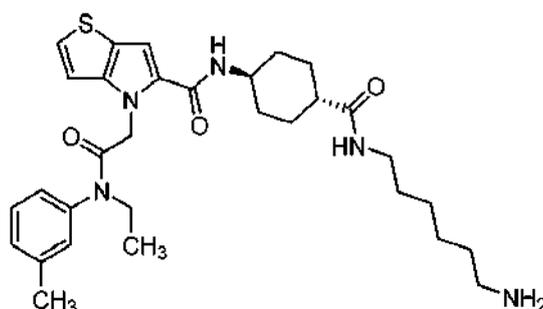
Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (115 mg, 0,25 mmol) con (6-aminohekil)carbamato de terc-butilo (80 mg, 0,37 mmol) para proporcionar el producto deseado (150 mg, 91 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,87 (d, J = 8,0, 1H), 7,65 (t, J = 5,1, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,06 (m, 2H), 6,77 - 6,68 (m, 1H), 4,96 (s, 2H), 3,72 - 3,53 (m, 3H), 3,03 - 2,93 (m, 2H), 2,87 (dd, J = 6,0, 12,6, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,12 - 1,96 (m, 1H), 1,88 - 1,68 (m, 4H), 1,51 - 1,16 (m, 21H), 1,06 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 666 [M + H]⁺; HPLC 99,7 % (AUC), T_R 4,11 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 21.608.

Ejemplo 35

N-(trans-4-((6-(3',6'-dihidroxi-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5(6)-carboxamido)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0200)

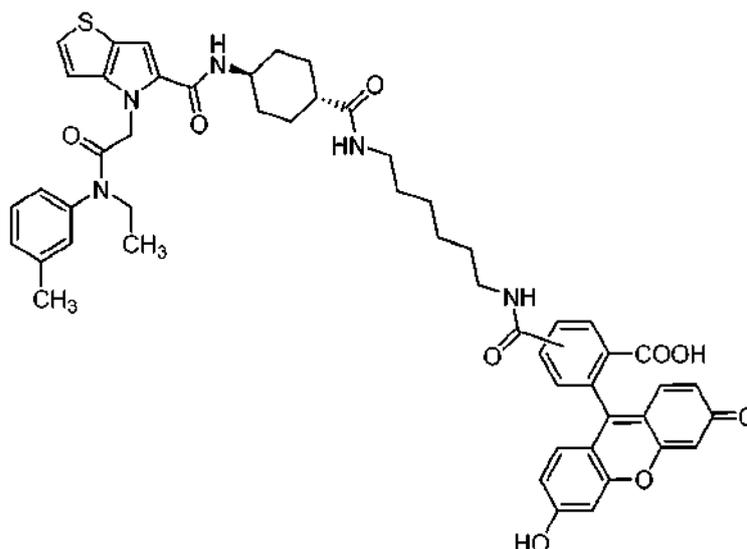


5 **Etapa 1.** N-(trans-4-((6-aminohexil)carbamoyl)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0199)



10 A una solución de (6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexil)carbamato de terc-butilo (150 mg, 0,22 mmol) en diclorometano (5 ml), se añadió ácido trifluoroacético (1 ml). La reacción se agitó a TA durante 5 h. La mezcla se diluyó con tolueno y se concentró al vacío (3 x) para proporcionar el producto en bruto (150 mg) en forma de un aceite transparente. ESI MS m/z 566 [M + H]⁺.

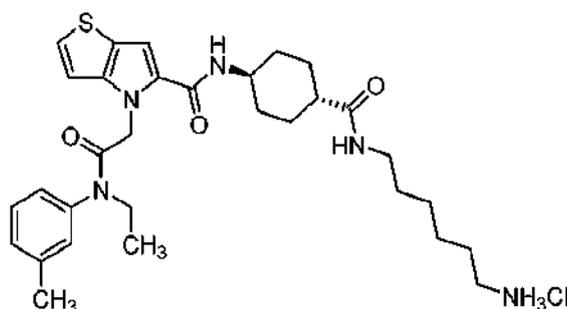
15 **Etapa 2.** N-(trans-4-((6-(3',6'-dihidroxi-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5(6)-carboxamido)hexil)carbamoyl)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0200)



5 A una solución de N-(trans-4-((6-aminohexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-
 b]pirrol-5-carboxamida (0,22 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron 3',6'-dihidroxi-3-oxo-3H- espiro[isobenzofuran-1,9'-
 xanteno]-5(6)-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo [5(6)-FAM-SE] (106 mg, 0,22 mmol) y diisopropiletamina
 (145 mg, 1,1 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se acidificó (HCl 0,1 M), se diluyó
 con agua, y se extrajo con CHCl₃/isopropanol 3:1. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró.
 El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice,
 10 diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (145 mg, 69 %) en forma de un sólido de color
 naranja. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,12 (s, 2H), 8,78 (t, J = 5,5, 1H, isómero A), 8,64 (t, J = 5,7, 1H, isómero
 B), 8,44 (s, 1H, isómero A), 8,23 (dd, J = 1,5, 8,1, 1H, isómero A), 8,15 (dd, J = 1,3, 8,1, 1H, isómero B), 8,05 (d, J =
 8,1, 1H, isómero B), 7,87 (d, J = 8,0, 1H), 7,72 - 7,60 (m, 1H), 7,44 - 7,32 (m, 3H), 7,32 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,04 (m,
 15 2H), 6,70 - 6,65 (m, 2H), 6,61 - 6,49 (m, 4H), 4,96 (s, 2H), 3,70 - 3,52 (m, 3H), 3,32 - 3,23 (m, 2H), 3,22 - 3,12 (m,
 1H), 3,08 - 2,91 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,11 - 1,95 (m, 1H), 1,89 - 1,65 (m, 4H), 1,61 - 1,16 (m, 11H), 1,06 - 0,92 (m,
 3H); ESI MS m/z 925 [M + H]⁺; HPLC 97,1 % (AUC), T_R 6,16, 6,26 min; UV (MeOH) λ_{máx} 284 nm, ε 31.419.

Ejemplo 36

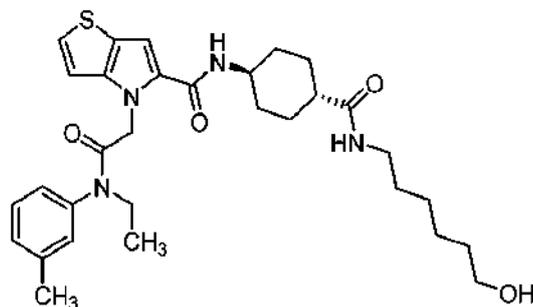
20 **Clorhidrato de N-(trans-4-((6-aminohexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-
 b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0241)**



25 A una solución de (6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carboxamido)hexil)carbamato de terc-butilo (100 mg, 0,15 mmol) en diclorometano (5 ml), se añadió ácido
 trifluoroacético (1 ml). La reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se diluyó con tolueno y se concentró al vacío
 (3 x). El residuo se disolvió en metanol y se añadió HCl (2 ml, 1 M en éter). La solución se evaporó para
 proporcionar el producto deseado (95 mg, cuant.) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-
 30 d₆) δ 8,02 - 7,68 (m, 5H), 7,45 - 7,34 (m, 2H), 7,33 - 7,15 (m, 3H), 7,12 - 7,05 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,74 - 3,51 (m,
 3H), 3,01 (dd, J = 6,5, 12,5, 2H), 2,79 - 2,66 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,11 - 1,97 (m, 1H), 1,88 - 1,68 (m, 4H), 1,59 - 1,17
 (m, 12H), 1,02 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 566 [M + H]⁺; HPLC 99,0 % (AUC), T_R 4,47 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm,
 ε 23.213.

Ejemplo 37

4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0242)



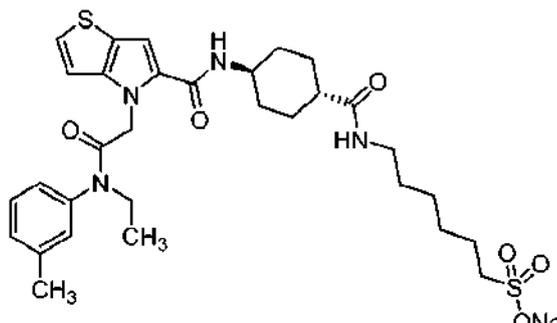
5

Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (150 mg, 0,32 mmol) con 6-aminohexan-1-ol (56 mg, 0,48 mmol) para proporcionar el producto deseado (160 mg, 88 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,87 (d, J = 7,4, 1H), 7,73 - 7,59 (s, 1H), 7,48 - 7,15 (m, 5H), 7,13 - 7,02 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,35 - 4,23 (m, 1H), 3,73 - 3,50 (m, 3H), 3,43 - 3,30 (m, 2H), 3,05 - 2,94 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,10 - 1,95 (m, 1H), 1,90 - 1,65 (m, 4H), 1,55 - 1,13 (m, 12H), 1,09 - 0,90 (s, 3H); ESI MS m/z 567 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,48 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 26.356.

10

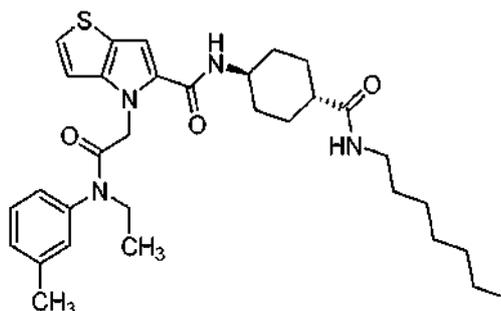
Ejemplo 38

6-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0344)



20

Etapa 1. 4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodo)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0342)



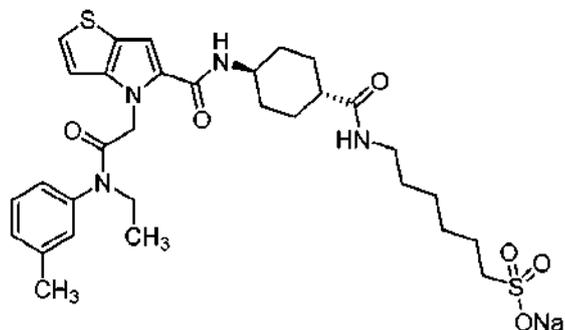
25

A una solución de imidazol (36 mg, 0,53 mmol), trifetilfosfina (138 mg, 0,53 mmol), y yodo (134 mg, 0,53 mmol), se añadió 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (100 mg, 0,18 mmol) disuelta en THF (5 ml). La solución se agitó durante 1 h a TA. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se interrumpió con una solución al 10 % de Na₂S₂O₃. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con una solución al 10 % de Na₂S₂O₃ y solución salina saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo

30

se purificó parcialmente por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 677 [M + H]⁺.

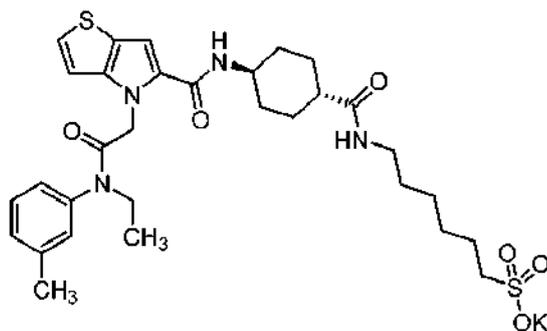
5 **Etapa 2.** 6-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0344)



10 A una solución de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodoetil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (0,18 mmol) en etanol (5 ml), se añadieron sulfito de sodio (66 mg, 0,53 mmol) y agua (3 ml). La mezcla se calentó a 75 °C durante 2 h. La reacción se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (100 mg, 90 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,87 (d, J = 8,0, 1H), 7,67 (t, J = 5,5, 1H), 7,49 - 7,17 (m, 5H), 7,13 - 7,05 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,72 - 3,54 (m, 3H), 3,05 - 2,93 (m, 2H), 2,40 - 2,28 (m, 5H), 2,12 - 1,96 (m, 15
1H), 1,88 - 1,68 (m, 4H), 1,62 - 1,14 (m, 12H), 1,05 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 631 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 4,56 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 21.072.

Ejemplo 39

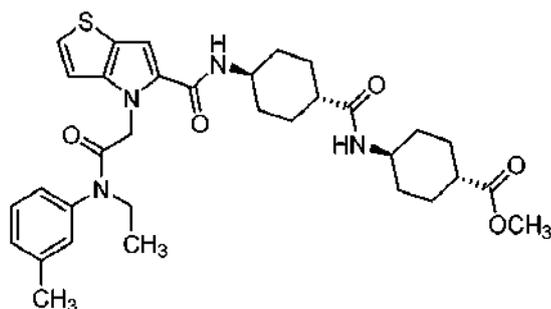
20 **6-(Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de potasio (JRW-0348)**



25 A una solución de ácido 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfónico (50 mg, 0,08 mmol) en agua (25 ml), se añadió DowEx 50WX4 (con carga de potasio). La suspensión se agitó a TA durante 10 min. La mezcla se filtró, y el filtrado se concentró por liofilización para proporcionar el producto deseado (48 mg, 90 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,83 (d, J = 8,1, 1H), 7,62 (t, J = 5,5, 1H), 7,47 - 7,15 (m, 5H), 7,10 - 7,04 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,71 - 3,54 (m, 3H), 3,05 - 2,94 (m, 2H), 2,41 - 2,31 (m, 5H), 2,15 - 1,96 (m, 1H), 1,90 - 1,70 (m, 4H), 1,61 - 1,16 (m, 12H), 1,06 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 631 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 4,55 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 19.812.

Ejemplo 40

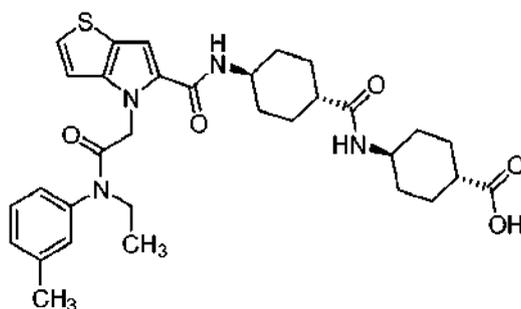
35 **Trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0243)**



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (75 mg, 0,16 mmol) con clorhidrato de trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (46 mg, 0,24 mmol) para proporcionar el producto deseado (89 mg, 91 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,86 (d, J = 8,5, 1H), 7,58 (d, J = 7,8, 1H), 7,47 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,18 (m, 3H), 7,11 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,72 - 3,53 (m, 6H), 3,52 - 3,35 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,29 - 2,16 (m, 1H), 2,08 - 1,95 (m, 1H), 1,95 - 1,65 (m, 8H), 1,53 - 1,06 (m, 8H), 1,05 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 607 [M + H]⁺; HPLC 99,7 % (AUC), T_R 6,27 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.192.

10 Ejemplo 41

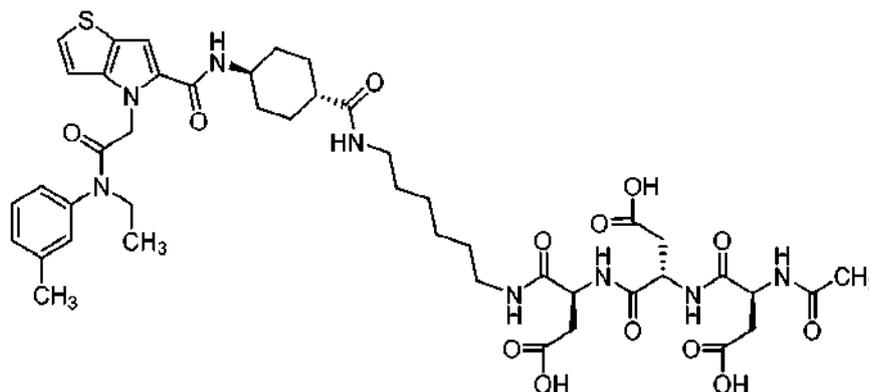
15 **Ácido trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0245)**



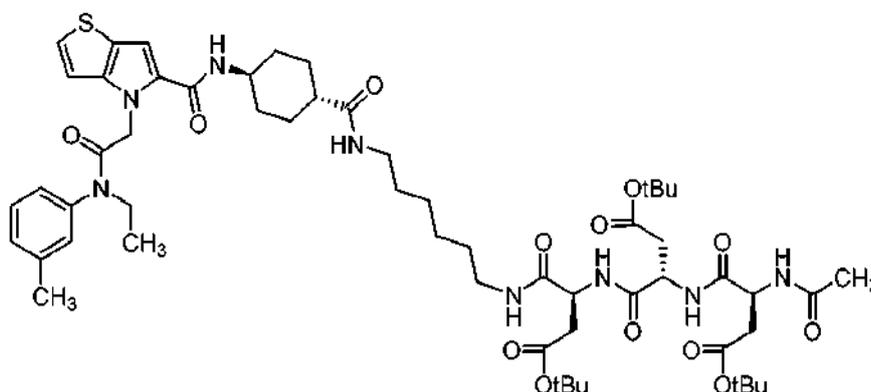
20 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (80 mg, 0,13 mmol) con hidróxido de litio (16 mg, 0,66 mmol) para proporcionar el producto deseado (66 mg, 84 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,00 (s, 1H), 7,86 (d, J = 8,1, 1H), 7,57 (d, J = 7,6, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H), 7,32 - 7,15 (m, 3H), 7,12 - 7,03 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,73 - 3,52 (m, 3H), 3,52 - 3,35 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,19 - 1,95 (m, 2H), 1,94 - 1,65 (m, 8H), 1,51 - 1,05 (m, 8H), 1,05 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 593 [M + H]⁺; HPLC 98,4 % (AUC), T_R 5,51 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.976.

25 Ejemplo 42

30 **Ácido (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(carboximetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazonadecan-19-oico (JRW-0251)**

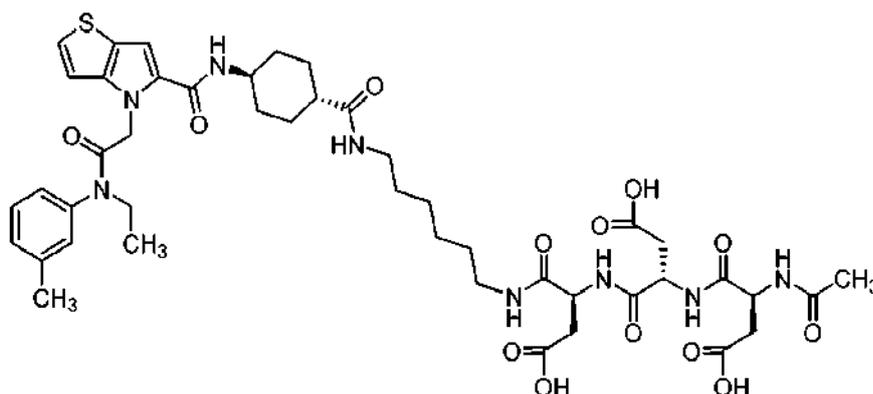


5 **Etapa 1.** (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazanonadecan-19-oato de terc-butilo (JRW-0249)



10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido (S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-4-(terc-butoxi)-4-oxobutanamido)-4-(terc-butoxi)-4-oxobutanamido)-4-(terc-butoxi)-4-oxobutanoico (81 mg, 0,14 mmol) con clorhidrato de N-(trans-4-((6-amino-hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (85 mg, 0,14 mmol) para proporcionar el producto deseado (125 mg, 78 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 1122 [M + H]⁺.

15 **Etapa 2.** Ácido (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(carboximetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazanonadecan-19-oico (JRW-0251)



20 A una solución de (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazanonadecan-19-oato de terc-butilo (120 mg, 0,11 mmol) en diclorometano (10 ml), se añadió ácido

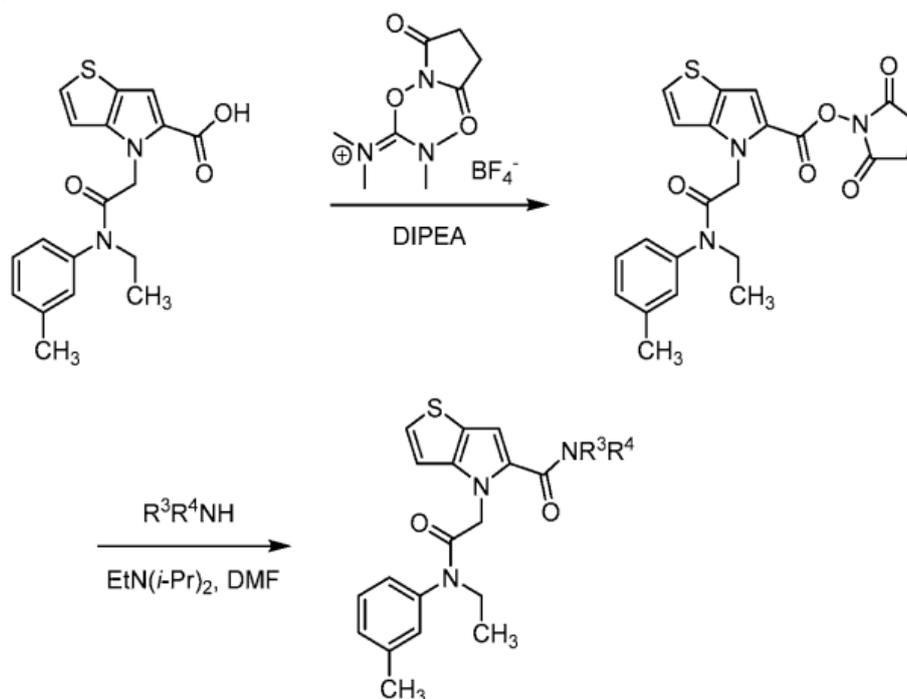
trifluoroacético (1 ml). La reacción se agitó a TA durante 18 h. La mezcla se diluyó con tolueno y se concentró al vacío (3 x). El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (68 mg, 66 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,31 (s, 3H), 8,45 - 8,18 (m, 2H), 7,95 - 7,83 (m, 2H), 7,66 (t, J = 5,5, 1H), 7,52 - 7,17 (m, 6H), 7,11 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,55 - 4,35 (m, 3H), 3,71 - 3,52 (m, 2H), 3,06 - 2,90 (m, 4H), 2,75 - 2,60 (m, 3H), 2,60 - 2,42 (m, 4H), 2,36 (s, 3H), 2,09 - 1,96 (m, 1H), 1,89 - 1,66 (m, 7H), 1,53 - 1,13 (m, 12H), 1,06 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 953 [M + H]⁺; HPLC 93,8 % (AUC), T_R 4,74 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 24.417.

Ejemplo 43

Síntesis alternativa de compuestos de Fórmula (Ia)

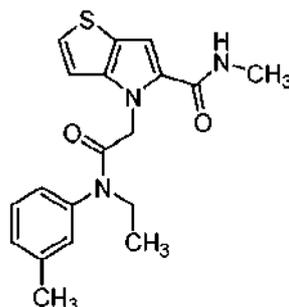
Los compuestos de fórmula (Ia) también se pueden sintetizar, en general, de acuerdo con el Esquema 3.

Esquema 3.

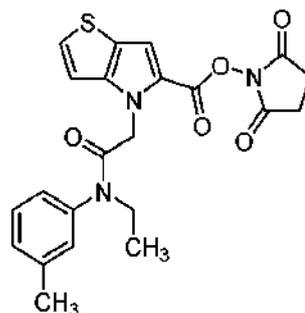


Ejemplo 44

20 4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ-141-84)

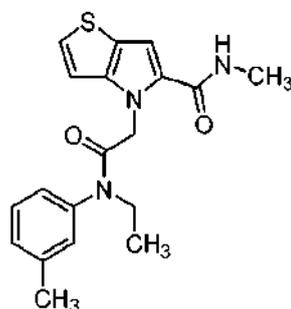


25 Etapa 1. 4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (WZ-141-82)



Se disolvió ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (0,44 g, 1,28 mmol) y TSTU (1,16 g, 3,85 mol) en 15 ml de cloruro de metileno y 15 ml de acetonitrilo. Se añadió DIPEA (0,996 g, 7,71 mmol) lentamente a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de cloruro de metileno, se lavó dos veces con ácido cítrico al 30 % y dos veces con agua, y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente orgánico se concentró hasta una solución de 30 ml. Sin purificación adicional, una parte de la solución se usó directamente en la siguiente etapa.

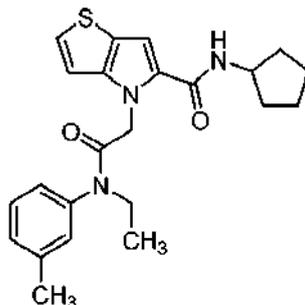
Etapa 2. 4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ-141-84)



A los 10 ml anteriores de solución en bruto de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (WZ141-82) (150 mg, 0,34 mmol), se añadió metilamina (40 %) (0,53 g, 6,83 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de retirar el disolvente, el compuesto se purificó por columna ultrarrápida usando heptano/acetato de etilo como eluyente para dar el producto deseado con rendimiento cuantitativo. RMN ¹H (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7,5 - 6,8 (m, 7H), 4,95 (s, 2H), 3,76 (m, 2H), 2,91 (d, 3H), 2,43 (s, 3H), 1,10 (t, 3H); ESI MS m/z 356 [M + H]⁺; HPLC 99,6 % a 254 nm.

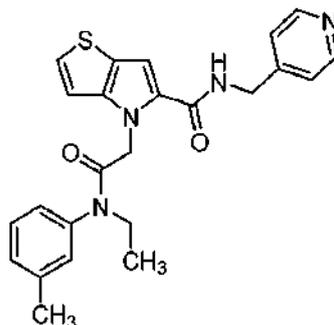
Ejemplo 45

N-ciclopentil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ-141-88)

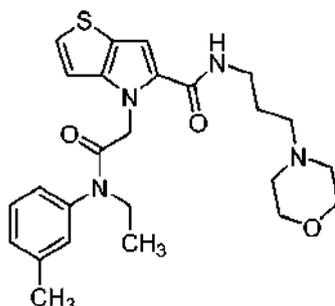


El compuesto WZ141-88 se sintetizó empleando un método similar al de la preparación de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ141-84). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,96 (d, 1H), 7,5 - 7,1 (m, 6H), 6,8 (d, 1H), 4,90 (s, 2H), 4,61 (m, 1H), 3,63 (m, 2H), 2,38 (s, a, 3H), 1,9 - 1,4 (m, 8H), 1,00 (t, 3H); ESI MS m/z 410 [M + H]⁺; Pureza por HPLC 99,1 % a 254 nm.

Ejemplo 46

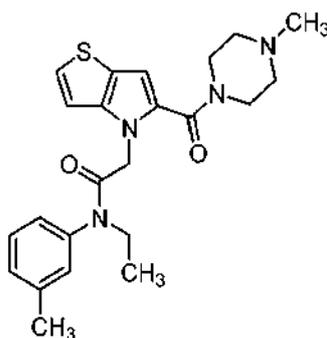
4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(piridin-4-ilmetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ-141-89)

5 El compuesto WZ141-89 se sintetizó empleando un método similar al anterior para la preparación de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ141-84). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,79 (t, 1H), 8,46 (d, 2H), 7,45 - 7,05 (m, 8H), 4,92 (s, 2H), 4,41 (d, 2H), 3,58 (m, 2H), 2,32 (s, 3H), 1,10 (t, 3H); ESI MS m/z 433 [M + H] $^+$; Pureza por HPLC 94,2 % a 254 nm.

Ejemplo 47**4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(3-morfolinopropil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ-141-90)**

15 El compuesto WZ141-90 se sintetizó empleando un método similar al de la preparación de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ141-84). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,12 (d, 2H), 7,4 - 7,0 (m, 6H), 4,93 (s, 2H), 3,7 - 3,4 (m, 6H), 3,4 - 3,2 (m, 2H), 2,4 - 2,2 (s, 9H), 1,7 - 1,5 (m, 2H), 1,10 (t, 3H); ESI MS m/z 469 [M + H] $^+$; Pureza por HPLC 98,0 % a 254 nm.

20

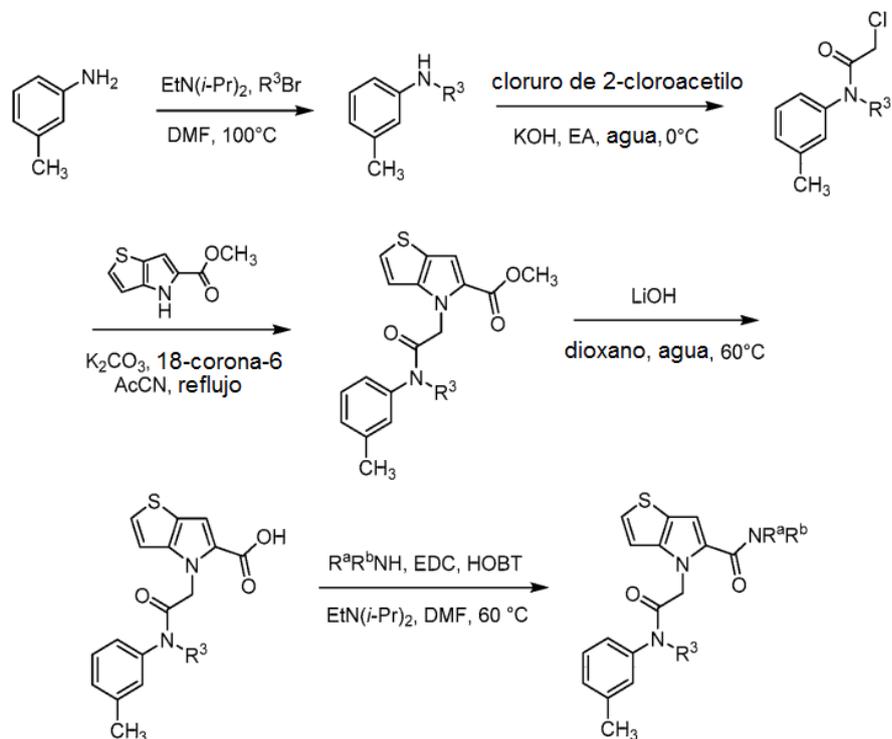
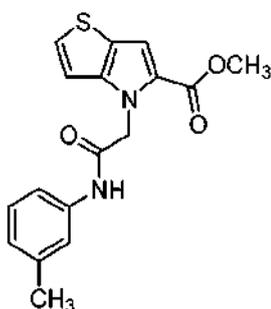
Ejemplo 48**N-etil-2-(5-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida (WZ-141-91)**

25

30 El compuesto WZ141-91 se sintetizó empleando un método similar al de la preparación de 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (WZ141-84). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,44 (d, 1H), 7,3 - 7,1 (m, 3H), 7,03 (d, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,68 (s, 2H), 3,7 - 3,5 (m, 6H), 2,35 (s, 3H), 2,32 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 1,10 (t, 3H); ESI MS m/z 425 [M + H] $^+$; Pureza por HPLC 96,0 % a 254 nm.

Ejemplo 49**Síntesis de compuestos de Fórmula (Ic)**

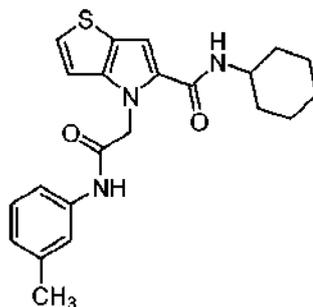
5 Los compuestos de fórmula (Ic) se pueden sintetizar, en general, de acuerdo con el Esquema 4.

Esquema 4.**Ejemplo 50****4-(2-Oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0077)**

15 A una solución de 2-cloro-N-(m-tolil)acetamida (500 mg, 2,7 mmol) en acetonitrilo (20 ml), se añadieron 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (411 mg, 2,3 mmol), carbonato de potasio (376 mg, 2,7 mmol) y 18-corona-6 (30 mg, 0,11 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 1,5 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (530 mg, 71 %) en forma de un sólido de color pardo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,21 (s, 1H), 7,57 (d, J = 5,4, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,37 - 7,30 (m, 1H), 7,27 (d, J = 5,4, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,16 (t, J = 7,8, 1H), 6,85 (d, J = 7,8, 1H), 5,31 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,24 (s, 3H); ESI MS m/z 329 [M + H]⁺; HPLC 99,6 % (AUC), T_R 6,32 min; UV(MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 29.177.

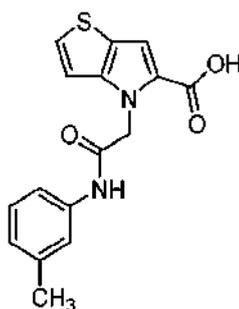
25

Ejemplo 51**N-ciclohexil-4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0081)**



Etapa 1. Ácido 4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0080)

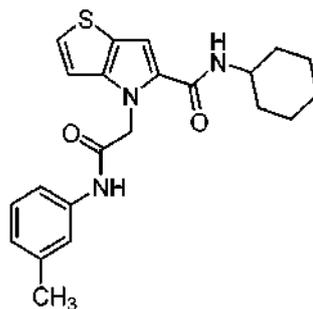
5



Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (130 mg, 0,39 mmol) con hidróxido de litio (47 mg 2,0 mmol) para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color pardo claro.

10

Etapa 2. N-ciclohexil-4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0081)



15

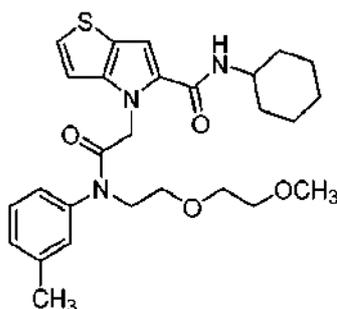
Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (120 mg, 0,38 mmol) con ciclohexilamina (56 mg, 0,57 mmol) para proporcionar el producto deseado (47 mg, 31 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,13 (s, 1H), 7,95 (d, J = 8,1, 1H), 7,43 - 7,38 (m, 2H), 7,33 (d, J = 8,1, 1H), 7,23 - 7,10 (m, 3H), 6,84 (d, J = 7,5, 1H), 5,30 (s, 2H), 3,75 - 3,58 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 1,85 - 1,53 (m, 5H), 1,35 - 1,00 (m, 5H); ESI MS m/z 396 [M + H]⁺; HPLC 94,7 % (AUC), T_R 7,34 min; UV (MeOH) λ_{máx} 285 nm, ε 28.066.

20

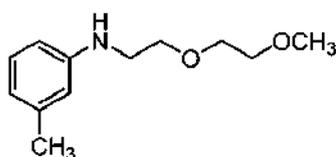
Ejemplo 52

N-ciclohexil-4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0109)

25



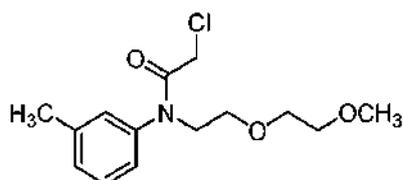
Etapa 1. N-(2-(2-metoxietoxi)etil)-3-metilanolina (JRW-0101)



5

A una solución de m-toluidina (1,0 g, 9,3 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron 1-bromo-2-(2-metoxietoxi)etano (0,85 g, 4,6 mmol) y diisopropilamina (1,2 g, 0,93 mmol). La mezcla se calentó a 100 °C durante 4 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (650 mg, 66 %) en forma de un aceite. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,07 (t, J = 7,5, 1H), 6,56 (d, J = 7,5, 1H), 6,52 - 6,45 (m, 2H), 3,71 (t, J = 5,3, 2H), 3,67 - 3,62 (m, 2H), 3,60 - 3,52 (m, 2H), 3,31 (t, J = 5,3, 2H), 2,28 (s, 3H); ESI MS m/z 210 [M + H]⁺.

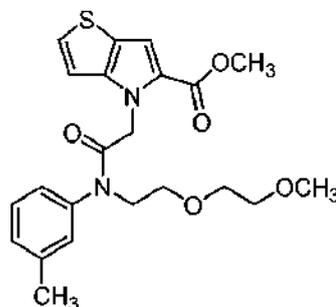
Etapa 2. 2-Cloro-N-(2-(2-metoxietoxi)etil)-N-(m-tolil)acetamida (JRW-0104)



A una solución de N-(2-(2-metoxietoxi)etil)-3-metilanolina (650 mg, 3,1 mmol) en acetato de etilo (15 ml), se añadió agua (5 ml). La solución bifásica se enfrió a 0 °C y se añadió hidróxido de potasio (522 mg, 9,3 mmol) en un movimiento. Se añadió cloruro de 2-cloroacetilo (526 mg, 4,7 mmol) gota a gota durante 10 min. La mezcla se agitó durante 2,5 h, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. A continuación, el filtrado se concentró para proporcionar el producto en bruto (830 mg) en forma de un aceite de color rojo claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,34 - 7,25 (m, 1H), 7,18 (d, J = 7,7, 1H), 7,15 - 7,03 (m, 2H), 3,89 (t, J = 5,8, 2H), 3,83 (s, 2H), 3,65 (t, J = 5,8, 2H), 3,62 - 3,55 (m, 2H), 3,54 - 3,46 (m, 2H), 2,37 (s, 3H); ESI MS m/z 286 [M + H]⁺.

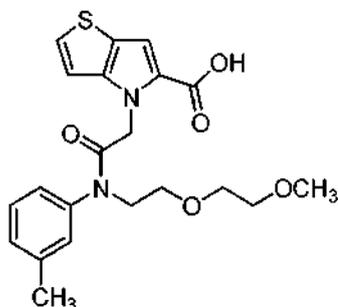
Etapa 3. 4-(2-((2-(2-Metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0105)

30



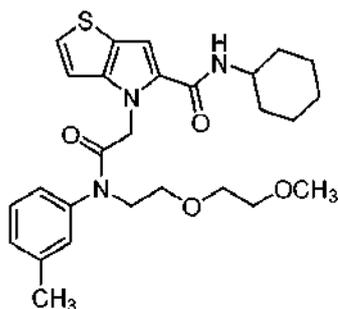
A una solución de 2-cloro-N-(2-(2-metoxietoxi)etil)-N-(m-tolil)acetamida (830 mg, 2,9 mmol) en acetonitrilo (20 ml), se añadieron 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (438 mg, 2,4 mmol), carbonato de potasio (400 mg, 2,9 mmol) y 18-corona-6 (32 mg, 0,12 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto en bruto (1,3 g) en forma de un aceite espeso. ESI MS m/z 430 [M + H]⁺.

Etapa 4. Ácido 4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0107)



Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (2,4 mmol) con hidróxido de litio (287 mg, 12,0 mmol) para proporcionar el producto en bruto (1,0 g, cuant.) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 417 [M + H]⁺.

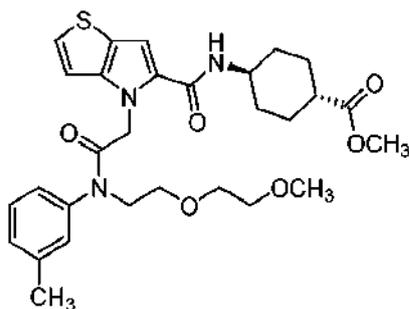
Etapa 5. N-ciclohexil-4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0109)



Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (120 mg, 0,28 mmol) con ciclohexilamina (42 mg, 0,43 mmol) para proporcionar el producto deseado (120 mg, 83 %) en forma de una goma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,96 - 7,85 (m, 1H), 7,48 - 7,30 (m, 4H), 7,30 - 7,20 (m, 1H), 7,17 - 7,07 (m, 2H), 5,01 (s, 2H), 3,82 - 3,62 (m, 3H), 3,56 - 3,35 (m, 6H), 3,25 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,90 - 1,54 (m, 5H), 1,41 - 1,04 (m, 5H); ESI MS m/z 498 [M + H]⁺; HPLC 96,0 % (AUC), T_R 7,38 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 25.434.

Ejemplo 53

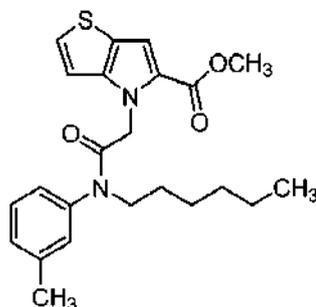
Trans-4-(4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0110)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (120 mg, 0,28 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (68 mg, 0,43 mmol) para proporcionar el producto deseado (140 mg, 87 %) en forma de una goma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,94 (d, J = 7,8, 1H), 7,46 - 7,20 (m, 5H), 7,15 - 7,04 (m, 2H), 5,00 (s, 2H), 3,78 - 3,65 (m, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,52 - 3,35 (m, 6H), 3,23 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,34 - 2,20 (m, 1H), 2,02 - 1,81 (m, 4H), 1,53 - 1,22 (m, 4H); ESI MS m/z 556 [M + H]⁺; HPLC 98,7 % (AUC), T_R 6,60 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 23.567.

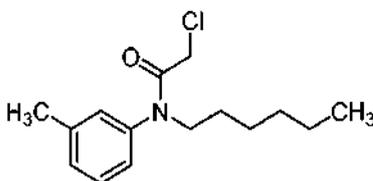
10 Ejemplo 54

4-(2-(Hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0142)



15

Etapa 1. 2-Cloro-N-hexil-N-(m-tolil)acetamida (JRW-0141)

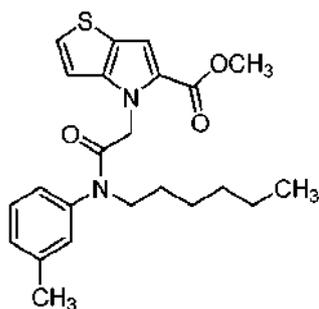


20 A una solución de N-hexil-3-metilanilina (500 mg, 2,6 mmol) en acetato de etilo (15 ml), se añadió agua (5 ml). La solución bifásica se enfrió a 0 °C, y se añadió hidróxido de potasio (440 mg, 7,8 mmol) en un movimiento. Se añadió cloruro de 2-cloroacetilo (442 mg, 3,9 mmol) gota a gota durante 10 min. La mezcla se agitó durante 1 h, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. A continuación, el filtrado se concentró para proporcionar el producto en bruto (730 mg) en forma de un aceite de color rojo claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,32 (t, J = 8,0, 1H), 7,24 - 7,17 (m, 1H), 7,04 - 6,97 (m, 2H), 3,80 (s, 2H), 3,74 - 3,61 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 1,59 - 1,41 (m, 2H), 1,37 - 1,16 (m, 6H), 0,92 - 0,80 (m, 3H); ESI MS m/z 268 [M + H]⁺.

25

30 Etapa 2. 4-(2-(Hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0142)

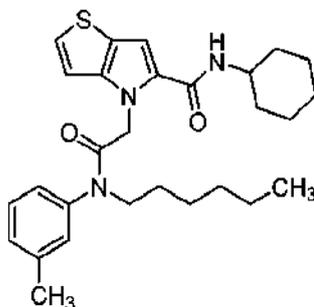
30



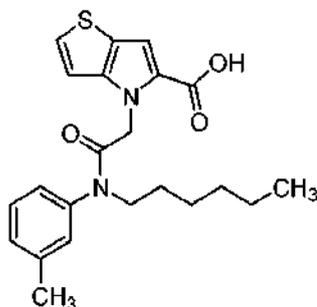
5 A una solución de 2-cloro-N-hexil-N-(m-tolil)acetamida (700 mg, 2,6 mmol) en acetonitrilo (20 ml), se añadieron 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (394 mg, 2,2 mmol), carbonato de potasio (361 mg, 2,6 mmol) y 18-corona-6 (29 mg, 0,11 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (780 mg, 86 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,53 (d, J = 5,4, 1H), 7,41 (t, J = 7,7, 1H), 7,33 - 7,11 (m, 5H), 4,93 (s, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,58 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,48 - 1,30 (m, 2H), 1,28 - 1,15 (m, 6H), 0,81 (t, J = 6,7, 3H); ESI MS m/z 413 [M + H]⁺; HPLC 97,1 % (AUC), T_R 7,18 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 26.840.

Ejemplo 55

15 **N-ciclohexil-4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0148)**

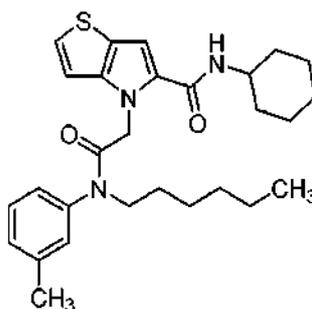


20 **Etap 1. Ácido 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0149)**



25 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (300 mg, 0,73 mmol) con hidróxido de litio (87 mg, 3,6 mmol) para proporcionar el producto en bruto (300 mg) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 399 [M + H]⁺.

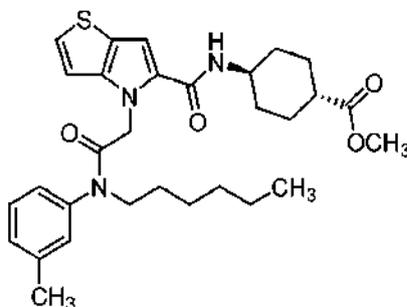
Etap 2. N-ciclohexil-4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0148)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,12 mmol) con ciclohexilamina (15 mg, 0,15 mmol) para proporcionar el producto deseado (60 mg, 99 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,85 (d, J = 8,2, 1H), 7,46 - 7,16 (m, 5H), 7,12 - 7,06 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,75 - 3,60 (m, 1H), 3,56 (t, J = 6,7, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,84 - 1,52 (m, 5H), 1,43 - 1,04 (m, 13H), 0,81 (t, J = 6,9, 3H); ESI MS m/z 480 [M + H]⁺; HPLC 98,1 % (AUC), T_R 8,62 min; UV (EtOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.544.

10 Ejemplo 56

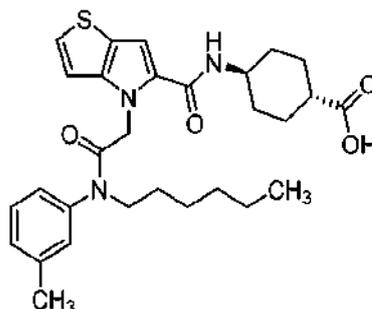
Trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0149)



15 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (50 mg, 0,12 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (24 mg, 0,15 mmol) para proporcionar el producto deseado (65 mg, 96 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (d, J = 8,0, 1H), 7,44 - 7,33 (m, 2H), 7,33 - 7,17 (m, 3H), 7,12 - 7,06 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 3,75 - 3,47 (m, 6H), 2,36 (s, 3H), 2,31 - 2,20 (m, 1H), 1,99 - 1,78 (m, 4H), 1,51 - 1,10 (m, 12H), 0,81 (t, J = 6,9, 3H); ESI MS m/z 538 [M + H]⁺; HPLC 99,8 % (AUC), T_R 8,17 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 26.509.

25 Ejemplo 57

Ácido trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0260)

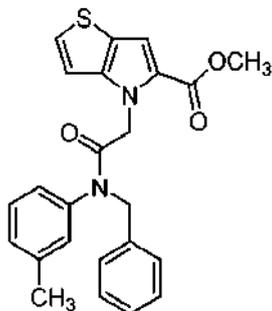


30 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (58 mg, 0,11 mmol) con hidróxido de litio (13 mg, 0,54 mmol) para proporcionar el producto deseado (55 mg, 97 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H

(300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,03 (s, 1H), 7,88 (d, $J = 7,8$, 1H), 7,46 - 7,17 (m, 5H), 7,12 - 7,06 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 3,74 - 3,48 (m, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,19 - 2,05 (m, 1H), 2,00 - 1,77 (m, 4H), 1,48 - 1,09 (m, 12H), 0,88 - 0,77 (m, 3H); ESI MS m/z 524 $[M + H]^+$; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,42 min; UV (EtOH) λ_{max} 288 nm, ϵ 24.240.

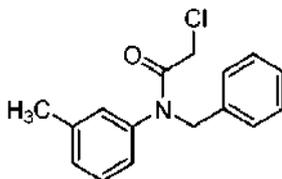
5 Ejemplo 58

4-(2-(Bencil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (WZ-141-86)



10

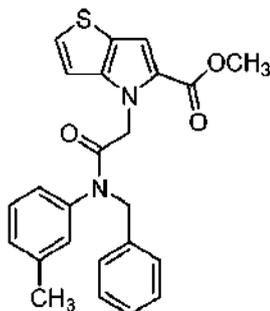
Etapa 1. N-Bencil-2-cloro-N-(m-tolil)acetamida (WZ-141-85)



15 A la solución de N-bencil-3-metilanilina (1,35 g, 6,84 mmol) y TEA (0,761 g, 7,53 mmol) en 50 ml de cloruro de metileno, se añadió lentamente cloruro de 2-cloroacetilo (0,772 g, 0,772 mmol) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos y a continuación durante una noche a TA. La mezcla se diluyó hasta 100 ml de cloruro de metileno y se lavó con agua tres veces, y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de retirar el disolvente, el compuesto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando heptano y acetato de etilo como disolvente para dar el producto de color amarillento con un rendimiento de un 74 %. RMN 1H (300 MHz, CD_2Cl_2) δ 7,6 - 6,7 (m, 9H), 4,89 (s, 2H), 3,71 (s, 2H), 2,31 (s, 3H); ESI MS m/z 274 $[M + H]^+$.

20

Etapa 2. 4-(2-(Bencil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (WZ-141-86)

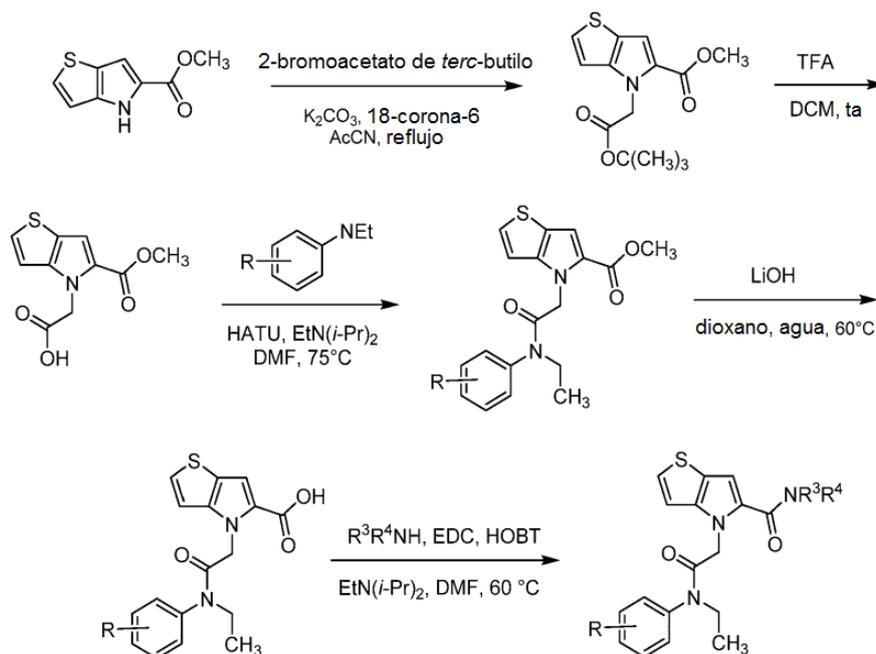


25

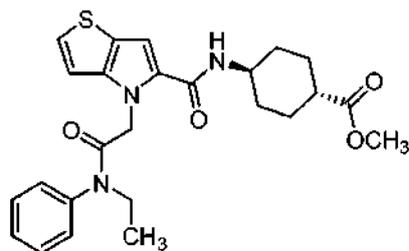
La mezcla de N-bencil-2-cloro-N-(m-tolil)acetamida (1,36 g, 4,97 mmol), 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (0,6 g, 3,31 mmol), éter 18-corona-6 (0,262 g, 0,993 mmol) y K_2CO_3 (0,915 g, 6,62 mmol) en 50 ml de acetonitrilo se calentó a reflujo durante una noche. Después de enfriar, la mayoría del disolvente se retiró al vacío, y el residuo se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de retirar el disolvente, el compuesto se purificó por columna ultrarrápida usando heptano y acetato de etilo como disolvente para dar el producto de color blanco pálido con un rendimiento de un 95 %. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,57 (s, 1H), 7,4 - 7,1 (m, 11H), 5,06 (s, 2H), 4,83 (s, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,31 (s, 3H); ESI MS m/z 419 $[M + H]^+$; Pureza por HPLC 94,3 % a 254 nm.

35

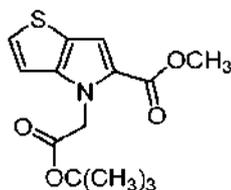
Esquema 5.

**Ejemplo 59**

- 5 **Trans-4-(4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0318)** de

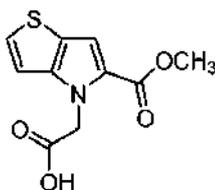


- 10 **Etapas 1.** 4-(2-(terc-Butoxi)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0277)



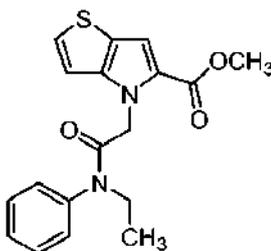
- 15 A una solución de 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (1,4 g, 7,73 mmol) en acetonitrilo (30 ml), se añadieron carbonato de potasio (1,28 g, 9,28 mmol), 18-corona-6 éter (102 mg, 0,38 mmol) y 2-bromoacetato de terc-butilo (1,81 g, 9,28 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (2,1 g, 91 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,34 (d, J = 5,4, 1H), 7,22 (d, J = 0,7, 1H), 6,87 (dd, J = 0,7, 5,4, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 1,46 (s, 9H); ESI MS m/z 296 [M + H]⁺.
- 20

Etapas 2. Ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (JRW-0288)



5 A una solución de 4-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (1,92 g, 6,50 mmol) en DCM (20 ml), se añadió ácido trifluoroacético (2 ml). La solución se agitó a TA durante 4 h, y a continuación la mezcla se concentró. Se añadió tolueno al residuo y se concentró para obtener el producto en bruto en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (d, *J* = 5,4, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,89 (d, *J* = 5,4, 1H), 5,24 (s, 2H), 3,86 (s, 3H); ESI MS *m/z* 240 [M + H]⁺.

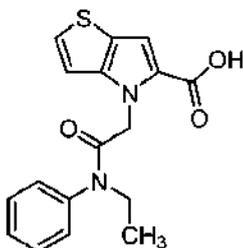
10 Etapa 3. 4-(2-(Etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0294)



15 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N-etilanilina (101 mg, 0,84 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (108 mg, 0,84 mmol). La reacción se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (86 mg, 60 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,57 - 7,21 (m, 6H), 7,16 (s, 1H), 6,80 (d, *J* = 5,5, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,87 - 3,68 (m, 5H), 1,13 (t, *J* = 7,2, 3H); ESI MS *m/z* 343 [M + H]⁺.

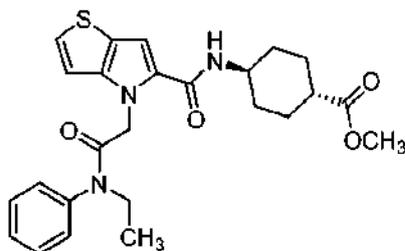
20

Etapa 4. Ácido 4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-309)



25 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (86 mg, 0,25 mmol) con hidróxido de litio (30 mg, 1,3 mmol) para proporcionar el producto en bruto (82 mg) en forma de un sólido de color pardo claro. ESI MS *m/z* 329 [M + H]⁺.

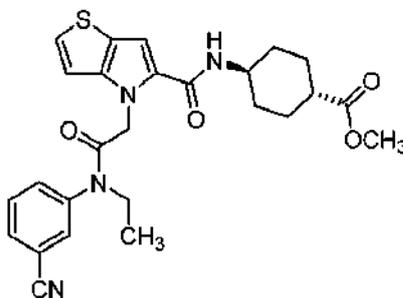
30 **Etapa 5.** Trans-4-(4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0318)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (80 mg, 0,24 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (56 mg, 0,29 mmol) para proporcionar el producto deseado (81 mg, 71 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,89 (d, J = 7,9, 1H), 7,60 - 7,28 (m, 6H), 7,04 - 7,13 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,73 - 3,52 (m, 5H), 2,31 - 2,18 (m, 1H), 2,03 - 1,78 (m, 4H), 1,50 - 1,20 (m, 4H), 1,07 - 0,93 (s, 3H); ESI MS m/z 468 [M + H]⁺; HPLC 97,7 % (AUC), Tr 6,51 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 28.274.

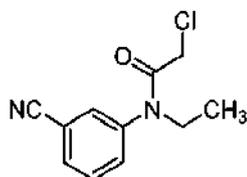
10 Ejemplo 60

Trans-4-(4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0321)



15

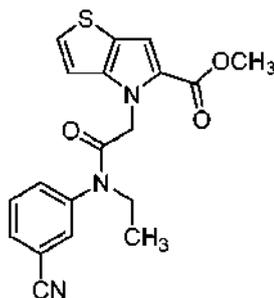
Etapa 1. 2-Cloro-N-(3-cianofenil)-N-etilacetamida (JRW-0313)



20

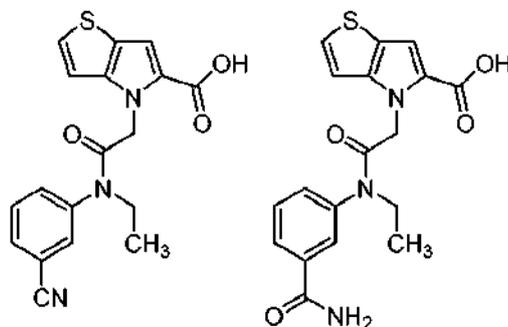
A una solución de 3-(etilamino)benzonitrilo (60 mg, 0,41 mmol) en acetato de etilo (7 ml), se añadió agua (3 ml). La solución bifásica se enfrió a 0 °C, y se añadió hidróxido de potasio (69 mg, 1,2 mmol) en un movimiento. Se añadió cloruro de 2-cloroacetilo (69 mg, 0,62 mmol) gota a gota durante 10 min. La mezcla se agitó durante 2 h, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. A 25 continuación, el filtrado se concentró para proporcionar el producto en bruto (98 mg) en forma de un aceite. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,81 - 7,42 (m, 4H), 3,84 - 3,70 (m, 4H), 1,15 (t, J = 7,2, 3H); ESI MS m/z 223 [M + H]⁺.

Etapa 2. 4-(2-((3-Cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0316)



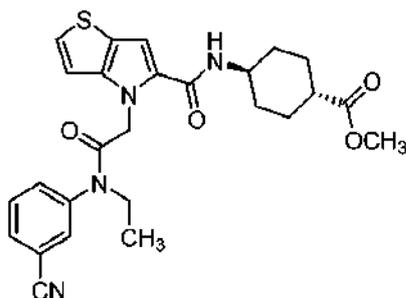
5 A una solución de 4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (68 mg, 0,37 mmol) en acetonitrilo (5 ml), se añadieron carbonato de potasio (62 mg, 0,45 mmol), éter 18-corona-6 (5 mg, 0,019 mmol) y 2-cloro-N-(3-cianofenil)-N-etilacetamida (98 mg, 0,45 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (94 mg, 68 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,71 - 7,62 (m, 1H), 7,61 - 7,49 (m, 3H), 7,33 (d, J = 5,4, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,82 (d, J = 5,4, 1H), 4,98 (s, 2H), 3,87 - 3,70 (m, 5H), 1,14 (t, J = 7,1, 3H); ESI MS m/z 368 [M + H]⁺.

10 **Etapa 3.** Ácido 4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0319-1) y ácido 4-(2-((3-carbamoilfenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0319-2)



15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (90 mg, 0,24 mmol) con hidróxido de litio (12 mg, 0,49 mmol). Los dos productos se separaron por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el nitrilo (61 mg) y la amida (31 mg) en forma de sólidos de color blanco. ESI MS m/z 354 [M + H]⁺ y m/z 372 [M + H]⁺.

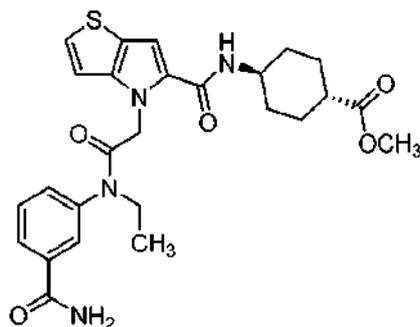
20 **Etapa 4.** Trans-4-(4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0321)



25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (60 mg, 0,17 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (56 mg, 0,29 mmol) para proporcionar el producto deseado (68 mg, 81 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,02 - 7,59 (m, 5H), 7,38 (d, J = 5,3, 1H), 7,17 - 7,03 (m, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,77 - 3,55 (m, 6H), 2,32 - 2,18 (m, 1H), 1,99 - 1,79 (m, 4H), 1,54 - 1,20 (m, 4H), 1,10 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 493 [M + H]⁺; HPLC 98,3 % (AUC), T_R 6,12 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 26.802.

Ejemplo 61

5 **Trans-4-(4-(2-((3-carbamoilfenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0322)**



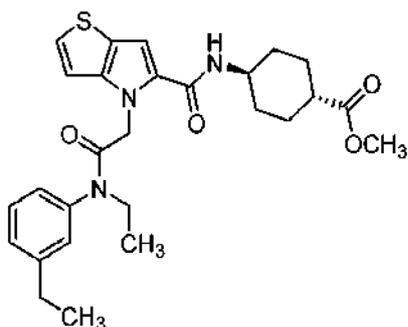
10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-((3-carbamoilfenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (30 mg, 0,08 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (19 mg, 0,10 mmol) para proporcionar el producto deseado (33 mg, 80 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,05 (s, 1H), 7,97 - 7,83 (m, 3H), 7,72 - 7,43 (m, 3H), 7,37 (d, J = 5,4, 1H), 7,12 - 7,05 (m, 2H), 4,98 (s, 2H), 3,75 - 3,54 (m, 6H), 2,32 - 2,18 (m, 1H), 1,99 - 1,79 (m, 4H), 1,53 - 1,22 (m, 4H), 1,10 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 511 [M + H]⁺; HPLC 98,2 % (AUC), T_R 4,81 min; UV (EtOH) λ_{máx} 289 nm, ε 28.223.

15

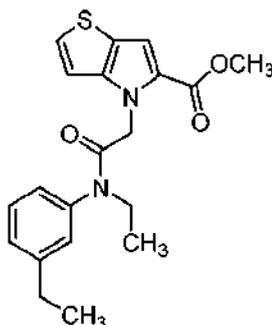
Ejemplo 62

20 **Trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0326)**

20



Etapla 1. 4-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0298)



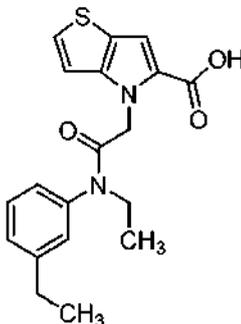
25

30 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N,3-dietilanilina (94 mg, 0,63 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a

continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (107 mg, 69 %) en forma de una espuma de color naranja. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (t, *J* = 7,9, 1H), 7,31 - 7,20 (m, 2H), 7,17 - 7,10 (m, 3H), 6,81 (d, *J* = 5,4, 1H), 4,98 (s, 2H), 3,84 - 3,67 (m, 5H), 2,71 (c, *J* = 7,6, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,6, 3H), 1,13 (t, *J* = 7,2, 3H); ESI MS *m/z* 371 [M + H]⁺.

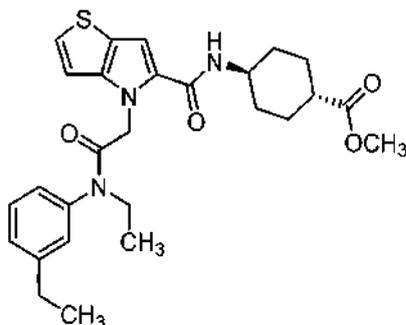
5

Etapa 2. Ácido 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0323)



10 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (100 mg, 0,27 mmol) con hidróxido de litio (19 mg, 0,81 mmol) para proporcionar el producto en bruto (100 mg) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS *m/z* 357 [M + H]⁺.

15 **Etapa 3.** Trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0326)



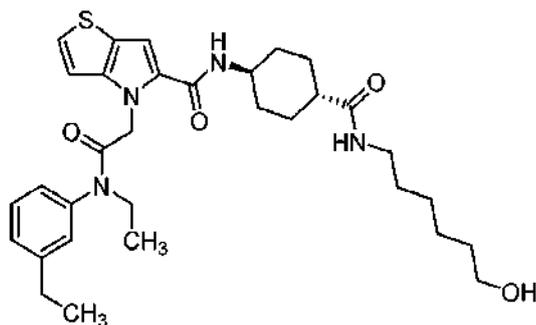
20 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (100 mg, 0,28 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (65 mg, 0,34 mmol) para proporcionar el producto deseado (105 mg, 75 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,90 (d, *J* = 7,9, 1H), 7,51 - 7,19 (m, 5H), 7,13 - 7,04 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,74 - 3,54 (m, 5H), 2,73 - 2,61 (m, 2H), 2,32 - 2,18 (m, 1H), 2,01 - 1,78 (m, 4H), 1,51 - 1,14 (m, 7H), 1,08 - 0,95 (s, 3H); ESI MS *m/z* 496 [M + H]⁺; HPLC 97,6 % (AUC), T_R 7,37 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 27.343.

25

Ejemplo 63

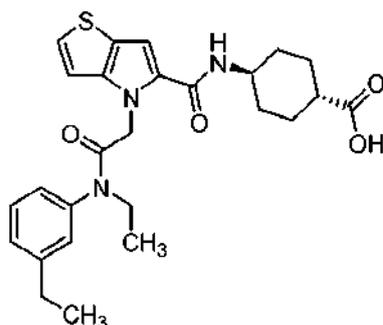
4-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxihexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0429)

30



Etapa 1. Ácido trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0427)

5

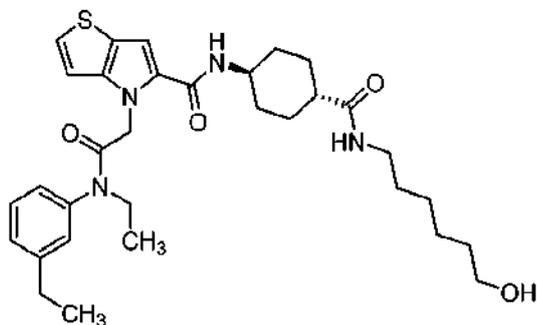


Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (980 mg, 1,98 mmol) con hidróxido de litio (142 mg, 5,93 mmol) para proporcionar el producto en bruto (1,0 g) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 482 [M + H]⁺.

10

Etapa 2. 4-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0429)

15



Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (200 mg, 0,42 mmol) con 6-aminohexan-1-ol (73 mg, 0,62 mmol) para proporcionar el producto deseado (200 mg, 83 %) en forma de una espuma de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,85 (d, J = 8,0, 1H), 7,63 (t, J = 5,6, 1H), 7,46 - 7,18 (m, 5H), 7,11 - 7,04 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,27 (t, J = 5,2, 1H), 3,72 - 3,55 (m, 3H), 3,40 - 3,32 (m, 2H), 3,05 - 2,95 (m, 2H), 2,72 - 2,62 (m, 2H), 2,10 - 1,97 (m, 1H), 1,89 - 1,68 (m, 4H), 1,53 - 1,14 (m, 15H), 1,01 (t, J = 6,9, 3H); ESI MS m/z 581 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,85 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 25.165.

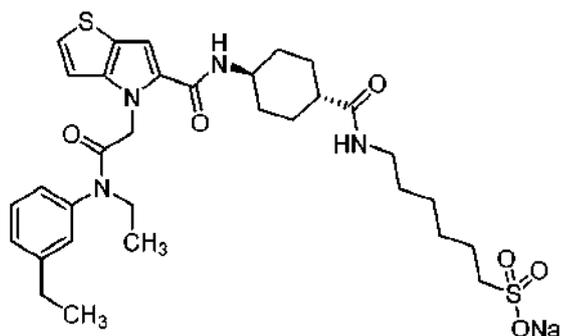
20

25

Ejemplo 64

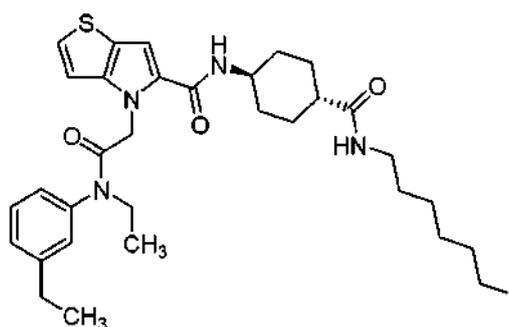
6-(Trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0432)

30



Etapa 1. 4-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodohexil)carbamoyl)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (JRW-0431)

5



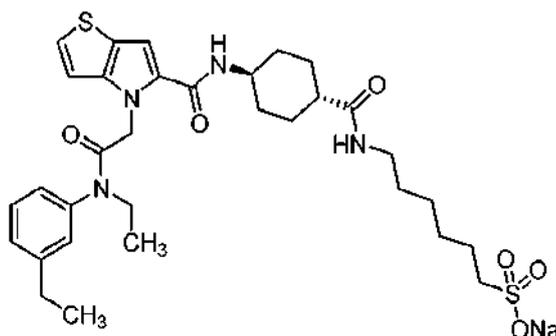
Una solución de imidazol (60 mg, 0,88 mmol), trifetilfosfina (230 mg, 0,88 mmol), y yodo (223 mg, 0,88 mmol) en THF (10 ml) se agitó a TA durante 10 min. Se añadió 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxihexil)carbamoyl)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (170 mg, 0,29 mmol) disuelta en THF (5 ml). La solución se agitó durante 1 h a TA. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se inactivó con una solución al 10 % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con una solución al 10 % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y solución salina saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 691 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

10

15

Etapa 2. 6-(Trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0432)

20



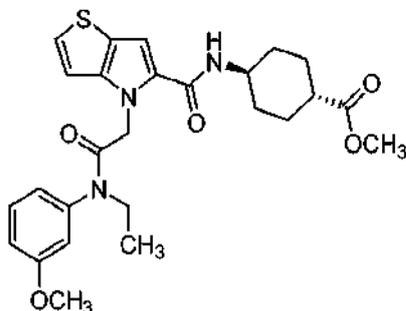
A una solución de 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodohexil)carbamoyl)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida (0,29 mmol) en etanol (10 ml), se añadieron sulfito de sodio (184 mg, 1,46 mmol) y agua (10 ml). La mezcla se calentó a 75 °C durante 3,5 h. La reacción se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (205 mg, cuant.) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,88 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,68 (t, $J = 5,4$, 1H), 7,48 - 7,19 (m, 5H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,71 - 3,55 (m, 3H), 3,04 - 2,94 (m, 2H), 2,74 - 2,61 (m, 2H), 2,40 - 2,32 (m, 2H), 2,11 - 1,97 (m, 1H), 1,88 - 1,68 (m, 4H), 1,62 - 1,14 (m, 15H), 1,00 (t, $J = 6,7$, 3H); ESI MS m/z 645

25

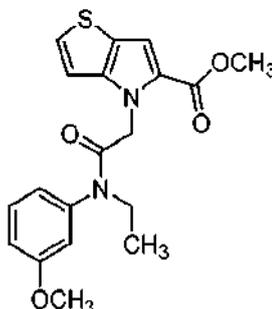
[M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,07 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 18.276.

Ejemplo 65

- 5 **Trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0327)**

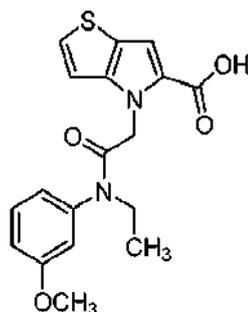


- 10 **Etapa 1. 4-(2-(Etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0299)**



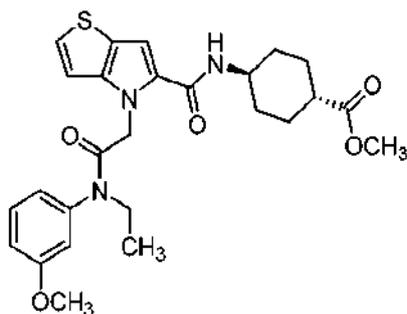
- 15 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N-etil-3-metoxianilina (94 mg, 0,63 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (97 mg, 62 %) en forma de una espuma de color naranja. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,37 (t, J = 8,0, 1H), 7,29 (d, J = 5,4, 1H), 7,15 (s, 1H), 6,99 - 6,84 (m, 3H), 6,81 (d, J = 5,4, 1H), 5,02 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,83 - 3,69 (m, 5H), 1,14 (t, J = 7,2, 3H); ESI MS m/z 373 [M + H]⁺.
- 20

Etapa 2. Ácido 4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0324)



- 25 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (95 mg, 0,26 mmol) con hidróxido de litio (18 mg, 0,77 mmol) para proporcionar el producto en bruto (88 mg) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 359 [M + H]⁺.
- 30

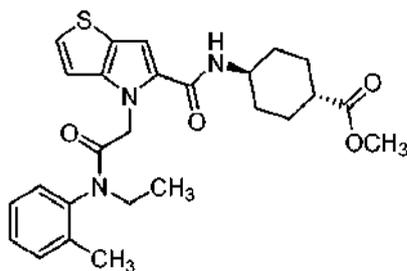
Etapa 3. Trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0327)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (88 mg, 0,25 mmol) con *trans*-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (48 mg, 0,34 mmol) para proporcionar el producto deseado (78 mg, 63 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,90 (d, *J* = 8,3, 1H), 7,50 - 7,31 (m, 2H), 7,16 - 6,91 (m, 5H), 5,00 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,75 - 3,53 (m, 6H), 2,33 - 2,18 (m, 1H), 2,01 - 1,77 (m, 4H), 1,50 - 1,22 (m, 4H), 1,08 - 0,95 (m, 3H); ESI MS *m/z* 498 [M + H]⁺; HPLC 96,4 % (AUC), T_R 6,69 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 28.671.

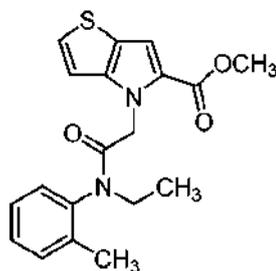
10 Ejemplo 66

Trans-4-(4-(2-(etil(*o*-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0330)



15

Etapla 1. 4-(2-(etil(*o*-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0300)

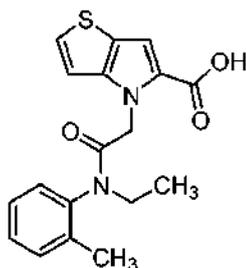


20

A una solución de ácido 2-(5-(metoxycarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron *N*-etil-2-metilnilina (84 mg, 0,63 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (72 mg, 48 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,43 - 7,21 (m, 5H), 7,16 (s, 1H), 6,78 (d, *J* = 5,4, 1H), 5,02 (d, *J* = 16,9, 1H), 4,74 (d, *J* = 16,9, 1H), 4,15 (dc, *J* = 7,1, 14,2, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,24 (dc, *J* = 7,1, 14,2, 1H), 1,14 (t, *J* = 7,1, 4H); ESI MS *m/z* 357 [M + H]⁺.

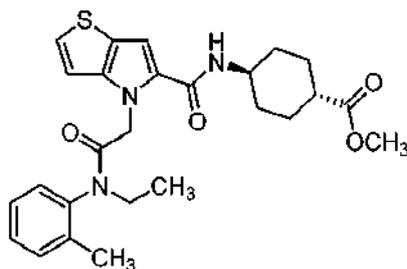
25

30 **Etapla 2.** Ácido 4-(2-(etil(*o*-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0328)



5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(o-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (70 mg, 0,20 mmol) con hidróxido de litio (23 mg, 0,98 mmol) para proporcionar el producto en bruto (69 mg) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 343 [M + H]⁺.

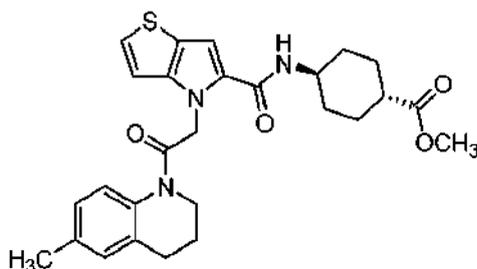
Etapa 3. Trans-4-(4-(2-(etil(o-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0330)



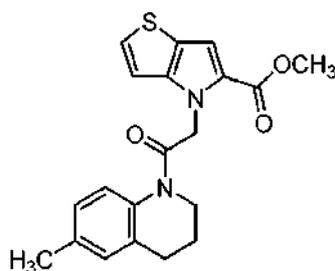
10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(o-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (69 mg, 0,25 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (46 mg, 0,24 mmol) para proporcionar el producto deseado (77 mg, 79 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (d, J = 7,9, 1H), 7,49 - 7,29 (m, 5H), 7,11 - 6,98 (m, 2H), 4,91 (d, J = 16,7, 1H), 4,79 (d, J = 16,7, 1H), 4,06 - 3,90 (m, 1H), 3,72 - 3,53 (m, 4H), 3,14 - 2,99 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,31 - 2,18 (m, 1H), 2,00 - 1,78 (m, 4H), 1,51 - 1,14 (m, 4H), 0,99 (t, J = 7,1, 3H); ESI MS m/z 482 [M + H]⁺; HPLC 92,3 % (AUC), T_R 6,97 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 29.468.

20 Ejemplo 67

Trans-4-(4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0331)

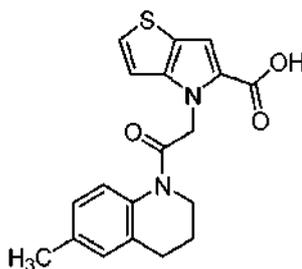


25 **Etapa 1.** 4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0301)



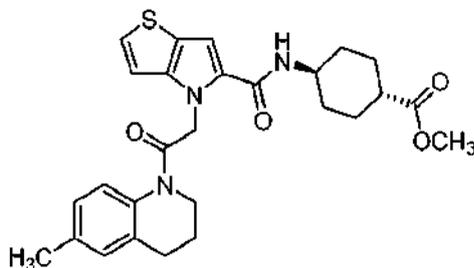
5 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron 6-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (92 mg, 0,63 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (140 mg, 90 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (d, J = 5,4, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,08 - 6,96 (m, 3H), 6,82 (d, J = 5,4, 1H), 5,39 (s, 2H), 3,86 - 3,74 (m, 5H), 2,82 - 2,66 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,05 - 1,89 (m, 2H); ESI MS m/z 367 [M + H]⁺.

10 **Etapa 2.** Ácido 4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0329)



15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (130 mg, 0,35 mmol) con hidróxido de litio (42 mg, 1,76 mmol) para proporcionar el producto en bruto (120 mg) en forma de un sólido de color naranja. ESI MS m/z 355 [M + H]⁺.

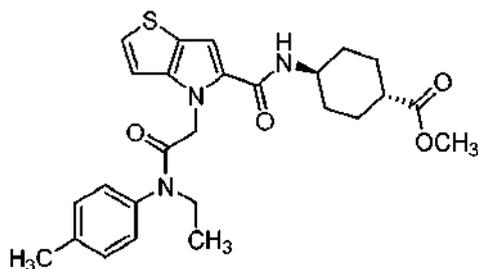
20 **Etapa 3.** Trans-4-(4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0331)



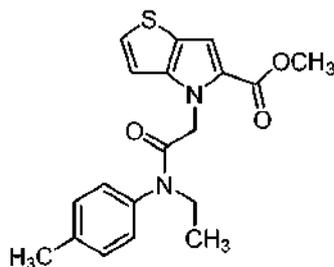
25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (140 mg, 0,40 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (92 mg, 0,47 mmol) para proporcionar el producto deseado (130 mg, 67 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,89 (d, J = 7,7, 1H), 7,47 (d, J = 7,7, 1H), 7,39 (d, J = 5,3, 1H), 7,19 (d, J = 5,3, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,08 - 6,88 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 3,73 - 3,53 (m, 6H), 2,72 (t, J = 6,6, 2H), 2,33 - 2,16 (m, 4H), 2,00 - 1,74 (m, 6H), 1,50 - 1,20 (m, 4H); ESI MS m/z 494 [M + H]⁺; HPLC 98,9 % (AUC), T_R 7,16 min; UV (MeOH) λ_{máx} 287 nm, ε 26.027.

Ejemplo 68

35 **Trans-4-(4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0334)**



Etapa 1. 4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0314)

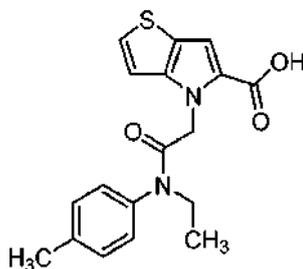


5

A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N-etil-4-metilanilina (68 mg, 0,50 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (120 mg, 80 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,33 - 7,18 (m, 5H), 7,16 (s, 1H), 6,80 (d, J = 5,4, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,74 (c, J = 7,2, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,12 (t, J = 7,2, 3H); ESI MS m/z 357 [M + H]⁺.

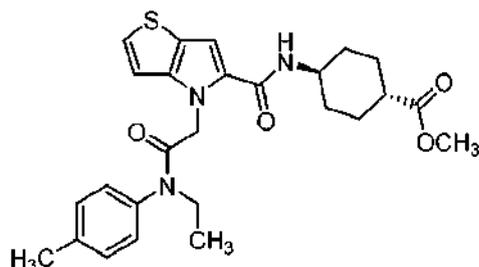
15

Etapa 2. Ácido 4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0332)



20 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (120 mg, 0,34 mmol) con hidróxido de litio (40 mg, 1,68 mmol) para proporcionar el producto en bruto (109 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 343 [M + H]⁺.

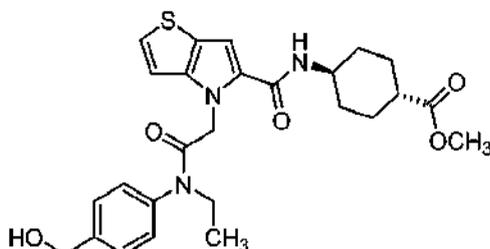
25 **Etapa 3.** Trans-4-(4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0334)



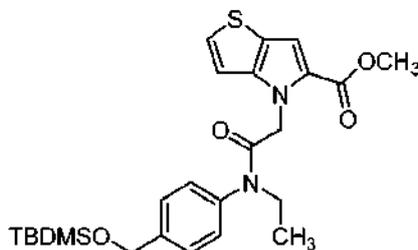
5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (109 mg, 0,32 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (74 mg, 0,38 mmol) para proporcionar el producto deseado (131 mg, 85 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,88 (d, J = 7,9, 1H), 7,41 - 7,25 (m, 5H), 7,12 - 7,03 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,72 - 3,48 (s, 6H), 2,35 (s, 3H), 2,31 - 2,19 (s, 1H), 2,01 - 1,77 (m, 4H), 1,52 - 1,19 (m, 4H), 1,05 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 482 [M + H]⁺; HPLC 98,0 % (AUC), T_R 7,04 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 27.490.

10 Ejemplo 69

Trans-4-(4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0335)

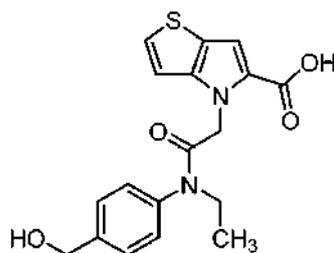


15 **Etapla 1.** 4-(2-(((4-(((terc-Butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0320)



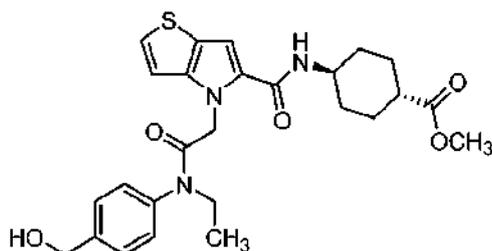
20 A una solución de ácido 2-(5-(metoxycarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (150 mg, 0,63 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-etilanilina (166 mg, 0,63 mmol), HATU (477 mg, 1,25 mmol), y diisopropiletilamina (243 mg, 1,88 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (165 mg, 54 %) en forma de una espuma de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (d, J = 8,1, 2H), 7,23 - 7,11 (m, 3H), 7,03 (s, 1H), 6,66 (d, J = 5,3, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,66 (s, 2H), 3,73 - 3,55 (m, 5H), 0,99 (t, J = 7,2, 3H), 0,83 (s, 9H), 0,00 (s, 6H); ESI MS m/z 487 [M + H]⁺.

Etapla 2. Ácido 4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0333)



5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-((4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (165 mg, 0,34 mmol) con hidróxido de litio (40 mg, 1,68 mmol) para proporcionar el producto en bruto (110 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 359 [M + H]⁺.

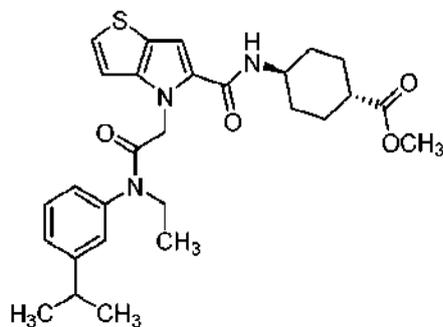
Etapa 3. Trans-4-(4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0335)



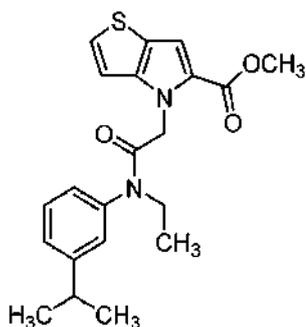
10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (110 mg, 0,31 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (71 mg, 0,37 mmol) para proporcionar el producto deseado (169 mg, 91 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,89 (d, J = 7,8, 1H), 7,52 - 7,31 (m, 5H), 7,12 - 7,05 (m, 2H), 5,30 - 5,21 (m, 1H), 4,95 (s, 2H), 4,54 (d, J = 5,6, 2H), 3,74 - 3,51 (m, 6H), 2,32 - 2,18 (m, 1H), 2,00 - 1,78 (m, 4H), 1,52 - 1,21 (m, 4H), 1,05 - 0,94 (m, 3H); ESI MS m/z 498 [M + H]⁺; HPLC 98,7 % (AUC), T_R 5,13 min; UV (MeOH) λ_{máx} 288 nm, ε 24.103.

Ejemplo 70

20 **Trans-4-(4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0460)**

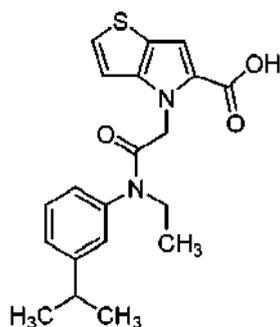


25 **Etapa 1.** 4-(2-(Etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0454)



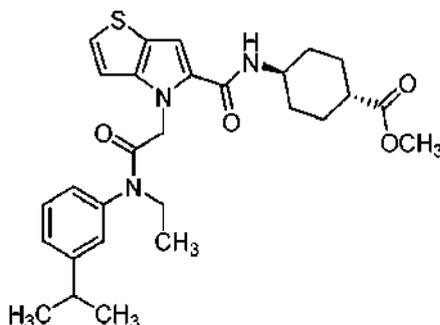
5 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (110 mg, 0,46 mmol) en DMF (5 ml), se añadieron N-etil-3-isopropilfenilina (112 mg, 0,69 mmol), HATU (350 mg, 0,92 mmol), y diisopropiletilamina (178 mg, 1,38 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (147 mg, 83 %) en forma de un aceite de color naranja claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,45 - 7,34 (m, 1H), 7,31 - 7,23 (m, 2H), 7,20 - 7,11 (m, 3H), 6,80 (d, J = 5,4, 1H), 4,96 (s, 2H), 3,83 - 3,71 (m, 5H), 3,05 - 2,87 (m, 1H), 1,35 - 1,25 (m, 6H), 1,18 - 1,09 (m, 3H); ESI MS m/z 385 [M + H]⁺.

Etapla 2. Ácido 4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0457)



15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (145 mg, 0,38 mmol) con hidróxido de litio (45 mg, 1,89 mmol) para proporcionar el producto en bruto (134 mg) en forma de un sólido de color pardo claro. ESI MS m/z 371 [M + H]⁺.

20 **Etapla 3.** Trans-4-(4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0460)



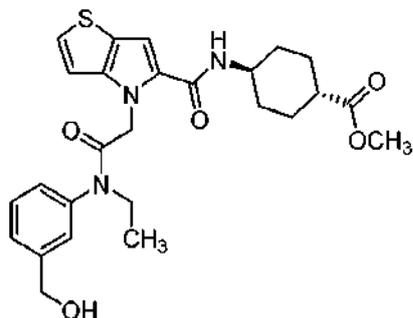
25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (130 mg, 0,35 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (102 mg, 0,53 mmol) para proporcionar el producto deseado (135 mg, 75 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (d, J = 7,9, 1H), 7,48 - 7,33 (m, 3H), 7,32 - 7,19 (m, 2H), 7,12 - 7,03 (m, 2H), 4,93 (s, 2H), 3,73 - 3,52 (m, 6H), 3,04 - 2,87 (m, 1H), 2,33 - 2,18 (m, 1H), 2,00 - 1,78 (m, 4H), 1,51 - 1,18 (m, 10H), 1,08 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 510 [M + H]⁺; HPLC 98,8 % (AUC), T_R 7,61 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 23.933.

30

Ejemplo 71

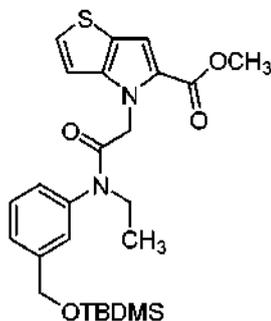
Trans-4-(4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0461)

5



Etap 1. 4-(2-(((3-(((terc-Butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0455)

10

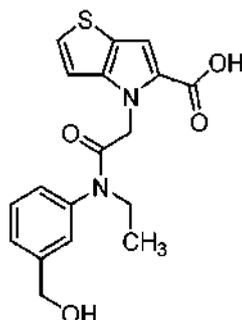


A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (120 mg, 0,50 mmol) en DMF (5 ml), se añadieron 3-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-etilanilina (200 mg, 0,75 mmol), HATU (381 mg, 1,0 mmol), y diisopropiletilamina (194 mg, 1,50 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (156 mg, 63 %) en forma de un aceite incoloro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (t, J = 7,8, 1H), 7,24 - 7,17 (m, 1H), 7,18 - 7,06 (m, 3H), 7,02 (s, 1H), 6,66 (d, J = 5,2, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,66 (s, 2H), 3,71 - 3,54 (m, 5H), 0,99 (t, J = 6,9, 3H), 0,83 (s, 9H), 0,00 (s, 6H); ESI MS m/z 487 [M + H]⁺.

15

20

Etap 2. Ácido 4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0458)

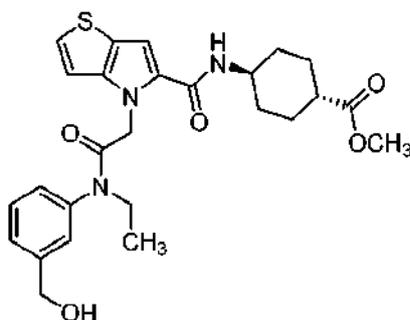


25

Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(((3-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (156 mg, 0,32 mmol) con hidróxido de litio (38 mg, 1,60 mmol) para proporcionar el producto en bruto (150 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 359 [M + H]⁺.

30

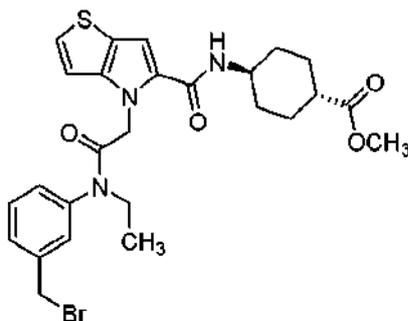
Etapa 3. Trans-4-(4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0461)



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (150 mg, 0,42 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (121 mg, 0,63 mmol) para proporcionar el producto deseado (126 mg, 60 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,90 (d, *J* = 8,0, 1H), 7,54 - 7,27 (m, 5H), 7,13 - 7,03 (m, 2H), 5,33 - 5,24 (s, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,56 (d, *J* = 5,5, 2H), 3,73 - 3,52 (m, 6H), 2,31 - 2,18 (m, 1H), 1,99 - 1,78 (m, 4H), 1,53 - 1,21 (m, 4H), 1,07 - 0,94 (m, 3H); ESI MS *m/z* 498 [M + H]⁺; HPLC 97,2 % (AUC), T_R 5,23 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 25.856.

Ejemplo 72

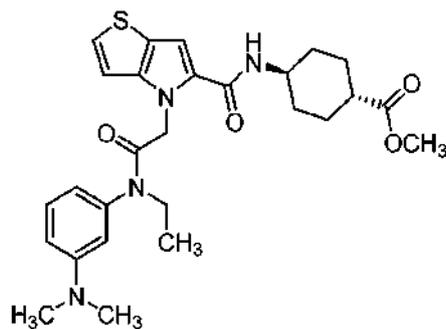
15 **Trans-4-(4-(2-((3-(bromometil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0466)**



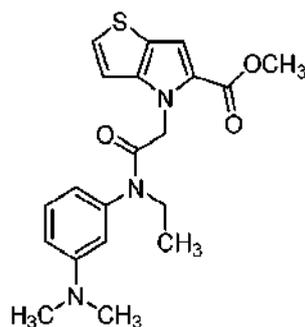
20 A una solución de tetrabromuro de carbono (333 mg, 1,0 mmol) y trifetilfosfina (263 mg, 1,0 mmol) en THF (5 ml), se añadió trans-4-(4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (50 mg, 0,10 mmol) en THF (5 ml). La reacción se agitó a TA durante 48 h. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (11 mg, 20 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,94 - 7,86 (m, 1H), 7,72 - 7,30 (m, 5H), 7,19 - 6,97 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 3,76 - 3,49 (m, 6H), 2,37 - 2,17 (m, 1H), 2,05 - 1,75 (m, 4H), 1,55 - 1,19 (m, 4H), 1,10 - 0,95 (m, 3H); ESI MS *m/z* 562 [M + H]⁺; HPLC 87,2 % (AUC), T_R 6,96 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 20.648.

30 **Ejemplo 73**

Trans-4-(4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0478)



Etapa 1. 4-(2-((3-(Dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0475)

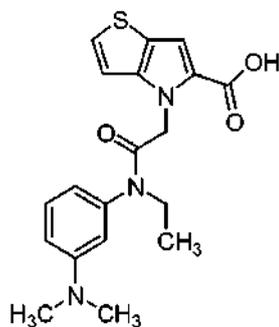


5

A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (115 mg, 0,48 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N1-etil-N3,N3-dimetilbenceno-1,3-diamina (118 mg, 0,72 mmol), HATU (365 mg, 0,96 mmol), y diisopropiletilamina (186 mg, 1,44 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (152 mg, 82 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,35 - 7,23 (m, 2H), 7,14 (s, 1H), 6,85 - 6,60 (m, 4H), 5,05 (s, 3H), 3,89 - 3,61 (m, 5H), 3,02 (s, 6H), 1,29 - 0,97 (m, 3H); ESI MS m/z 386 [M + H]⁺.

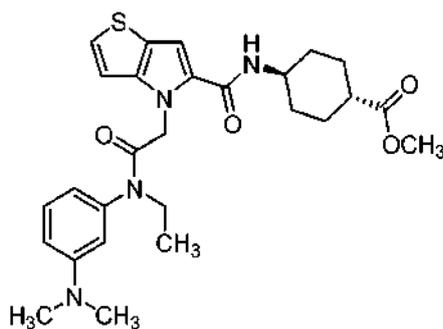
15

Etapa 2. Ácido 4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0476)



20 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (160 mg, 0,42 mmol) con hidróxido de litio (50 mg, 2,1 mmol) para proporcionar el producto en bruto (130 mg) en forma de un sólido de color verde claro. ESI MS m/z 372 [M + H]⁺.

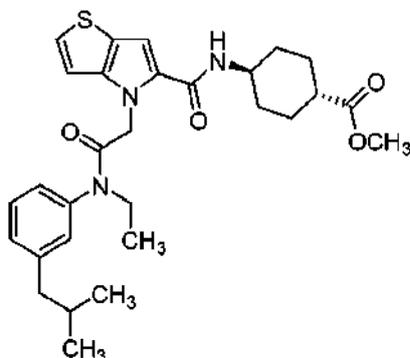
25 **Etapa 3.** Trans-4-(4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0478)



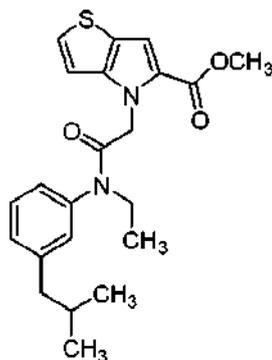
5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (130 mg, 0,35 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (102 mg, 0,53 mmol) para proporcionar el producto deseado (132 mg, 74 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (d, J = 7,9, 1H), 7,35 (d, J = 5,4, 1H), 7,28 (t, J = 7,9, 1H), 7,11 - 7,04 (m, 2H), 6,86 - 6,65 (m, 3H), 5,01 (s, 2H), 3,74 - 3,51 (m, 6H), 2,95 (s, 6H), 2,32 - 2,19 (s, 1H), 2,01 - 1,79 (m, 4H), 1,49 - 1,25 (m, 4H), 1,00 (t, J = 7,1, 3H); ESI MS m/z 511 [M + H]⁺; HPLC 97,8 % (AUC), T_R 5,21 min; UV (MeOH) λ_{máx} 289 nm, ε 29.909.

10 Ejemplo 74

15 **Trans-4-(4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0508)**



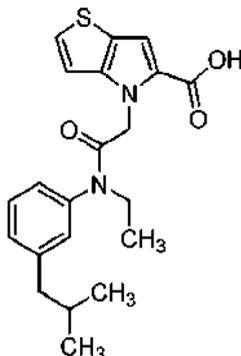
Etapa 1. 4-(2-(Etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0502)



20 A una solución de ácido 2-(5-(metoxicarbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)acético (100 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml), se añadieron N-etil-3-isobutilanilina (89 mg, 0,50 mmol), HATU (318 mg, 0,84 mmol), y diisopropiletilamina (162 mg, 1,25 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (128 mg, 77 %) en forma de un aceite espeso. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (t, J = 7,7, 1H), 7,28 (d, J = 5,4, 1H), 7,21 - 7,13 (m, 3H), 7,13 - 7,09 (m, 1H), 6,79 (d, J = 4,8, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,84 - 3,69 (m,

5H), 2,54 (d, $J = 7,2$, 2H), 1,98 - 1,82 (m, 1H), 1,13 (t, $J = 7,2$, 3H), 0,92 (t, $J = 6,1$, 6H); ESI MS m/z 399 $[M + H]^+$.

Etapa 2. Ácido 4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0505)

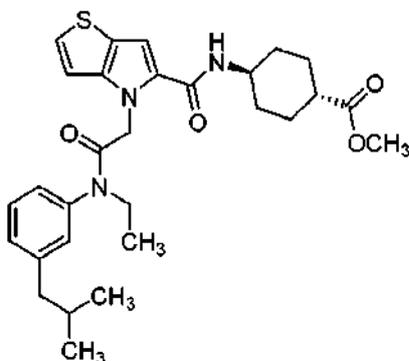


5

Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (120 mg, 0,30 mmol) con hidróxido de litio (36 mg, 1,5 mmol) para proporcionar el producto en bruto (125 mg) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI MS m/z 385 $[M + H]^+$.

10

Etapa 3. Trans-4-(4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0508)

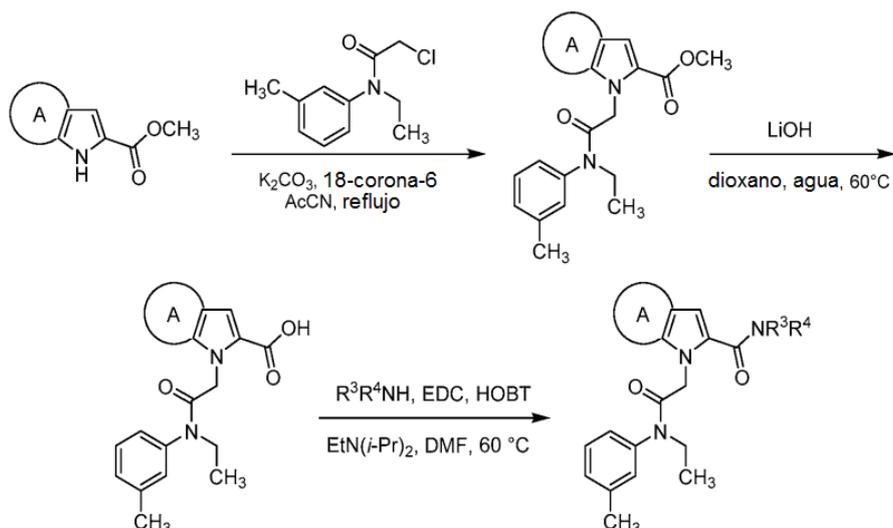


15

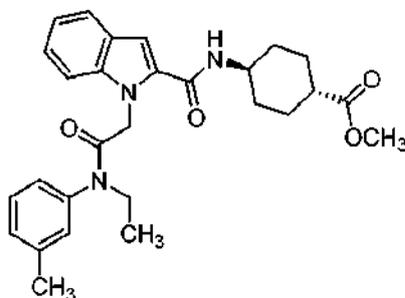
Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (120 mg, 0,42 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (90 mg, 0,47 mmol) para proporcionar el producto deseado (130 mg, 80 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,90 (d, $J = 7,9$, 1H), 7,47 - 7,13 (m, 5H), 7,12 - 7,04 (m, 2H), 4,93 (s, 2H), 3,72 - 3,52 (m, 6H), 2,57 - 2,46 (m, 2H), 2,32 - 2,19 (m, 1H), 2,00 - 1,79 (m, 5H), 1,50 - 1,20 (m, 4H), 1,06 - 0,94 (m, 3H), 0,86 (d, $J = 6,6$, 6H); ESI MS m/z 524 $[M + H]^+$; HPLC > 99 % (AUC), T_R 6,73 min; UV (MeOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ 289 nm, ϵ 19.115.

20

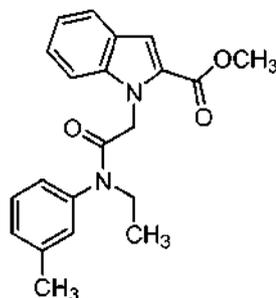
Esquema 6.

**Ejemplo 75**

- 5 **Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0355)** de metilo

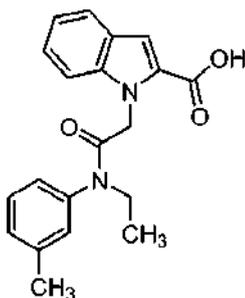


- 10 **Etapa 1.** 1-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxilato de metilo (JRW-0349)

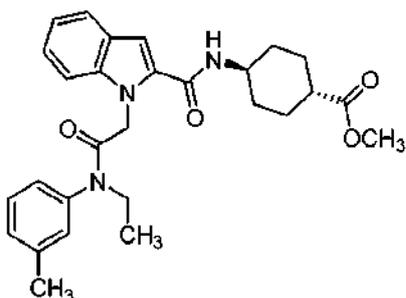


- 15 A una solución de 1H-indol-2-carboxilato de metilo (100 mg, 0,57 mmol) en acetonitrilo (5 ml), se añadieron carbonato de potasio (94 mg, 0,68 mmol), éter 18-corona-6 (7 mg, 0,03 mmol) y 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (120 mg, 0,57 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (108 mg, 54 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,65 (d, J = 8,0, 1H), 7,44 - 7,07 (m, 8H), 5,05 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,78 - 3,68 (m, 2H), 2,43 (s, 3H), 1,12 (t, J = 7,2, 3H); ESI MS m/z 351 [M + H]⁺.
- 20

Etapa 2. Ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico (JRW-0353)



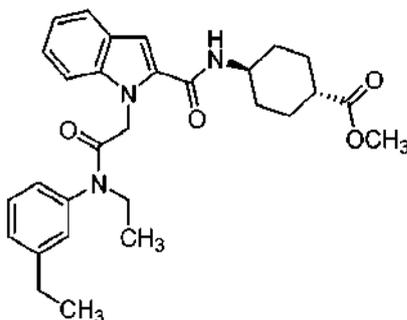
- 5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxilato de metilo (108 mg, 0,31 mmol) con hidróxido de litio (37 mg, 1,54 mmol) para proporcionar el producto en bruto (103 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 337 [M + H]⁺. **Etapas 3.** Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0355)



- 10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico (103 mg, 0,31 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (71 mg, 0,37 mmol) para proporcionar el producto deseado (133 mg, 91 %) en forma de una espuma de color blanco. ESI MS m/z 476 [M + H]⁺.

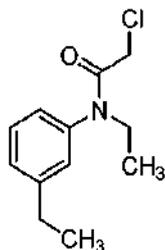
15 **Ejemplo 76**

Trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0424)



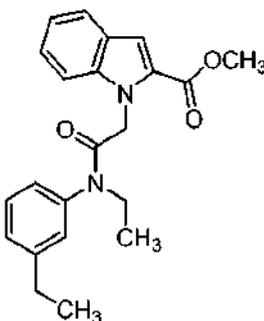
20

Etapas 1. 2-Cloro-N-etil-N-(3-etilfenil)acetamida (JRW-0413)



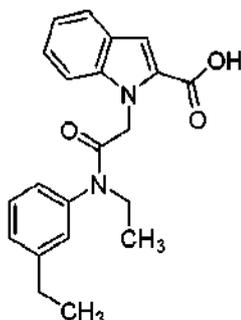
A una solución de *N*-etil-3-etilfenilina (0,97 g, 6,50 mmol) en acetato de etilo (30 ml), se añadió agua (10 ml). La solución bifásica se enfrió a 0 °C, y se añadió hidróxido de potasio (1,09 g, 19,5 mmol) en un movimiento. Se añadió cloruro de 2-cloroacetilo (1,10 g, 0,76 ml, 9,75 mmol) gota a gota durante 10 min. La mezcla se agitó durante 1 h, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. A continuación, el filtrado se concentró para proporcionar el producto en bruto (1,54 g) en forma de un aceite móvil. ESI MS m/z 226 $[M + H]^+$.

10 **Etapa 2.** 1-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxilato de metilo (JRW-0416)



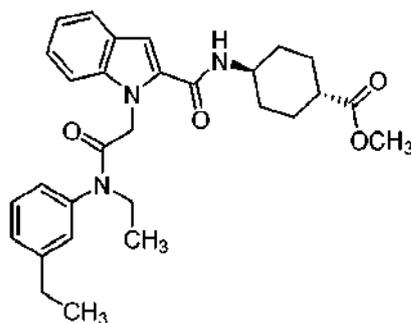
A una solución de 1H-indol-2-carboxilato de metilo (582 mg, 3,3 mmol) en acetonitrilo (20 ml), se añadieron carbonato de potasio (551 mg, 4,0 mmol), éter 18-corona-6 (44 mg, 0,17 mmol), 2-cloro-*N*-etil-*N*-(3-etilfenil)acetamida (750 mg, 3,3 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (0,74 g, 61 %) en forma de un sólido de color pardo claro. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,65 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,50 - 7,07 (m, 8H), 5,06 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,82 - 3,69 (m, 4H), 2,78 - 2,63 (m, 2H), 1,35 - 1,24 (m, 3H), 1,18 - 1,06 (m, 3H); ESI MS m/z 365 $[M + H]^+$.

20 **Etapa 3.** Ácido 1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico (JRW-0419)



25 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxilato de metilo (740 mg, 2,0 mmol) con hidróxido de litio (243 mg, 10,1 mmol) para proporcionar el producto en bruto (690 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 350 $[M + H]^+$.

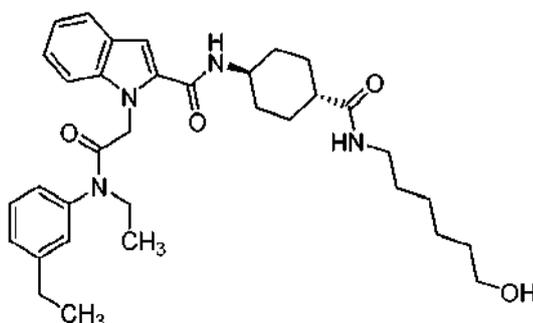
30 **Etapa 4.** Trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0424)



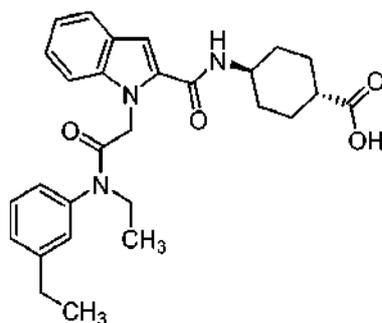
5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico (690 mg, 1,97 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (457 mg, 2,36 mmol) para proporcionar el producto deseado (760 mg, 79 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,20 (d, J = 7,9, 1H), 7,58 (d, J = 7,9, 1H), 7,51 - 7,13 (m, 6H), 7,13 - 7,02 (m, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,77 - 3,54 (m, 6H), 2,69 (d, J = 7,6, 2H), 2,33 - 2,21 (m, 1H), 2,02 - 1,81 (m, 4H), 1,52 - 1,30 (m, 4H), 1,23 (t, J = 7,6, 3H), 1,08 - 0,95 (m, 3H); ESI MS m/z 490 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,56 min; UV (MeOH) λ_{máx} 291 nm, ε 15.737.

10 Ejemplo 77

1-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida (JRW-0430)

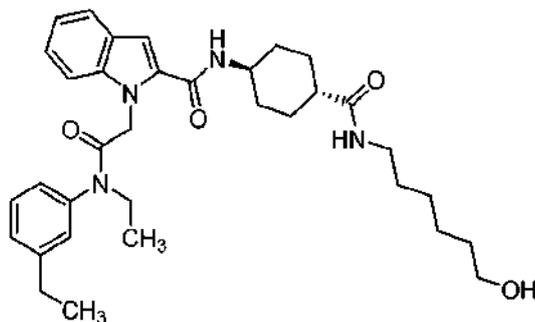


15 **Etap 1.** Ácido trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (JRW-0428)



20 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (720 mg, 1,47 mmol) con hidróxido de litio (105 mg, 4,4 mmol) para proporcionar el producto en bruto (680 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 476 [M + H]⁺.

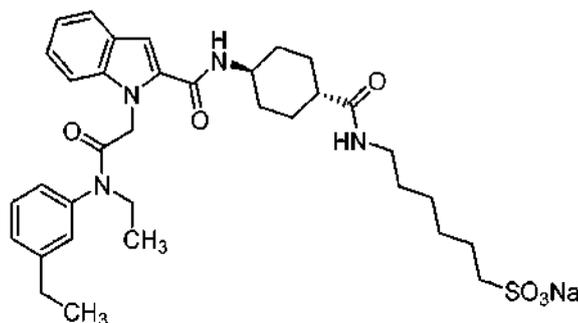
25 **Etap 2.** 1-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi)hexil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida (JRW-0430)



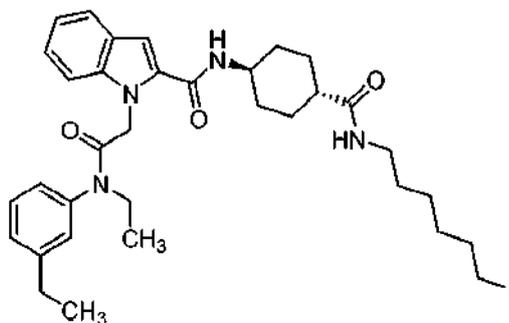
5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico (200 mg, 0,42 mmol) con 6-aminohexan-1-ol (74 mg, 0,63 mmol) para proporcionar el producto deseado (218 mg, 79 %) en forma de una espuma de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,17 (d, J = 8,0, 1H), 7,69 - 7,54 (m, 2H), 7,50 - 7,14 (m, 6H), 7,13 - 7,02 (m, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,27 (t, J = 5,2, 1H), 3,77 - 3,52 (s, 3H), 3,36 (dd, J = 6,4, 11,7, 2H), 3,05 - 2,95 (m, 2H), 2,74 - 2,63 (m, 2H), 2,13 - 1,97 (m, 1H), 1,91 - 1,69 (m, 4H), 1,54 - 1,15 (m, 15H), 1,09 - 0,93 (m, 3H); ESI MS m/z 575 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 6,12 min; UV (MeOH) λ_{máx} 291 nm, ε 17.243.

10 Ejemplo 78

15 **6-(Trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0434)**



20 **Etapla 1.** 1-(2-(Etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodohehil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida (JRW-0433)

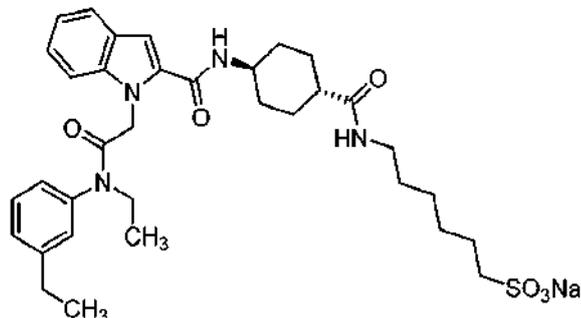


25 Una solución de imidazol (66 mg, 0,97 mmol), trifetilfosfina (254 mg, 0,97 mmol), y yodo (246 mg, 0,97 mmol) en THF (10 ml) se agitó a TA durante 10 min. Se añadió 1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxi-hexil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida (186 mg, 0,32 mmol) disuelta en THF (5 ml). La solución se agitó durante 1 h a TA. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se interrumpió con una solución al 10 % de Na₂S₂O₃. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con una solución al 10 % de Na₂S₂O₃, y solución salina saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z

685 [M + H]⁺.

Etapla 2. 6-(Trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio (JRW-0434)

5

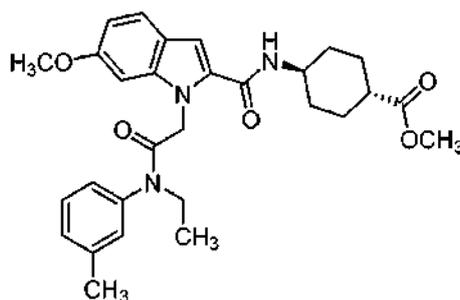


10 A una solución de 1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-yodohexil)carbamoil)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida (0,32 mmol) en etanol (10 ml), se añadieron sulfito de sodio (203 mg, 1,6 mmol) y agua (10 ml). La mezcla se calentó a 75 °C durante 2 h. La reacción se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/metanol) para proporcionar el producto deseado (190 mg, 89 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,21 (d, J = 8,2, 1H), 7,69 (t, J = 5,6, 1H), 7,58 (d, J = 7,8, 1H), 7,51 - 7,14 (m, 6H), 7,12 - 7,03 (m, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,76 - 3,53 (m, 3H), 3,00 (dd, J = 6,6, 12,7, 2H), 2,76 - 2,61 (m, 2H), 2,39 - 2,32 (m, 2H), 2,12 - 1,99 (m, 1H), 1,90 - 1,70 (m, 4H), 1,61 - 1,14 (m, 15H), 1,08 - 0,95 (s, 3H); ESI MS m/z 639 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 5,07 min; UV (MeOH) λ_{máx} 291 nm, ε 15.800.

15

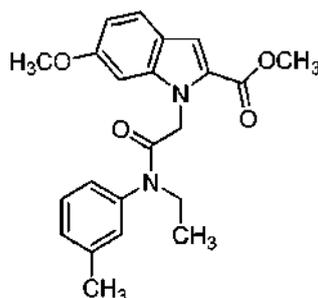
Ejemplo 79

20 **Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0359)**



25

Etapla 1. 1-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxilato de metilo (JRW-0351)

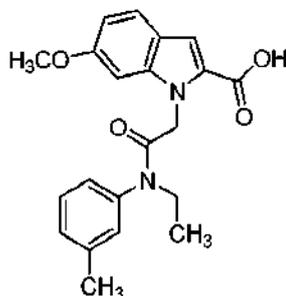


30

A una solución de 6-metoxi-1H-indol-2-carboxilato de metilo (116 mg, 0,57 mmol) en acetonitrilo (5 ml), se añadieron carbonato de potasio (94 mg, 0,68 mmol), éter 18-corona-6 (7 mg, 0,03 mmol) y 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (120 mg, 0,57 mmol). La suspensión se calentó a 70 °C durante 2 d. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para

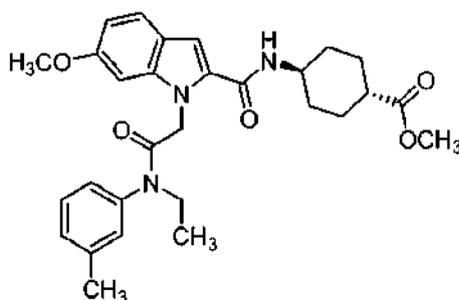
proporcionar el producto deseado (155 mg, 72 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,51 (d, *J* = 8,7, 1H), 7,41 - 7,31 (m, 1H), 7,24 - 7,08 (m, 4H), 6,79 (dd, *J* = 2,2, 8,7, 1H), 6,62 - 6,55 (m, 1H), 5,01 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,81 - 3,68 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 1,18 - 1,09 (m, 3H); ESI MS *m/z* 381 [M + H]⁺.

5 **Etapa 2.** Ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxílico (JRW-0357)



10 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxilato de metilo (150 mg, 0,39 mmol) con hidróxido de litio (47 mg, 1,97 mmol) para proporcionar el producto en bruto (150 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS *m/z* 367 [M + H]⁺.

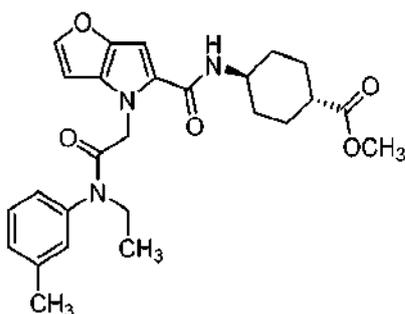
15 **Etapa 3.** Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0359)



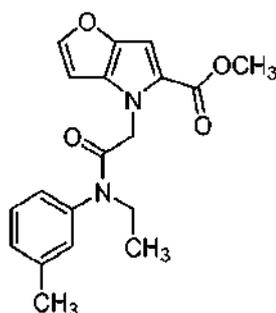
20 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxílico (150 mg, 0,41 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (95 mg, 0,49 mmol) para proporcionar el producto deseado (163 mg, 78 %) en forma de una espuma de color blanco. ESI MS *m/z* 506 [M + H]⁺.

Ejemplo 80

25 **Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-360)**

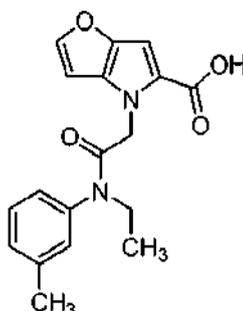


30 **Etapa 1.** 4-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0352)



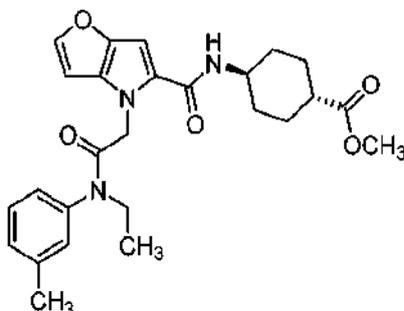
5 A una solución de 4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (94 mg, 0,57 mmol) en acetonitrilo (5 ml), se añadieron carbonato de potasio (94 mg, 0,68 mmol), éter 18-corona-6 (7 mg, 0,03 mmol) y 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (120 mg, 0,57 mmol). La suspensión se calentó a 70 °C durante 2 d. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (166 mg, 86 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,47 (d, J = 2,2, 1H), 7,35 (t, J = 7,7, 1H), 7,24 - 7,17 (m, 1H), 7,16 - 7,07 (m, 2H), 6,81 - 6,78 (m, 1H), 6,38 - 6,36 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 3,85 - 3,67 (m, 5H), 2,40 (s, 3H), 1,12 (t, J = 7,2, 3H); ESI MS m/z 341 [M + H]⁺.

Etapa 2. Ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-358)



15 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (160 mg, 0,47 mmol) con hidróxido de litio (56 mg, 2,35 mmol) para proporcionar el producto en bruto (150 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 327 [M + H]⁺.

20 **Etapa 3.** Trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-360)

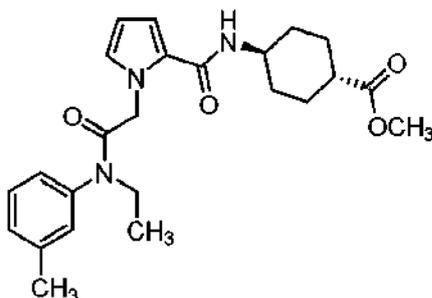


25 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxílico (150 mg, 0,46 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (106 mg, 0,55 mmol) para proporcionar el producto deseado (178 mg, 83 %) en forma de una espuma de color blanco. ESI MS m/z 466 [M + H]⁺.

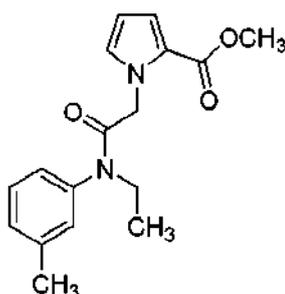
30 **Ejemplo de referencia 81**

Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo

(JRW-0456)

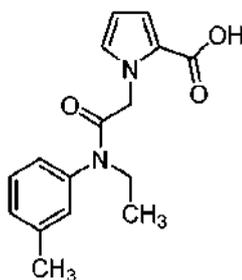


5 **Etapa 1.** 1-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxilato de metilo (JRW-0450)



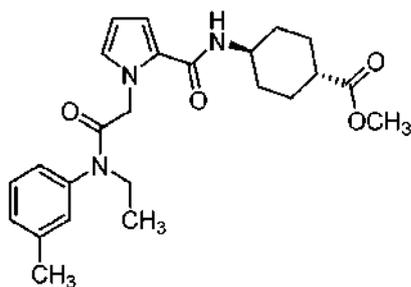
10 A una solución de 1H-pirrol-2-carboxilato de metilo (295 mg, 2,36 mmol) en acetonitrilo (20 ml), se añadieron carbonato de potasio (391 mg, 2,83 mmol), éter 18-corona-6 (31 mg, 0,12 mmol) y 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (500 mg, 2,36 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (530 mg, 75 %) en forma de un aceite transparente. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,35 (t, *J* = 7,5, 1H), 7,24 - 7,10 (m, 3H), 6,93 (dd, *J* = 1,8, 3,9, 1H), 6,78 - 6,70 (m, 1H), 6,13 (dd, *J* = 2,6, 3,9, 1H), 4,77 (s, 2H), 3,85 - 3,61 (m, 6H), 2,41 (s, 3H), 1,13 (t, *J* = 7,2, 3H); ESI MS *m/z* 301 [M + H]⁺.

15 **Etapa 2.** Ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxílico (JRW-0453)



20 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxilato de metilo (530 mg, 1,76 mmol) con hidróxido de litio (211 mg, 8,82 mmol) para proporcionar el producto en bruto (475 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS *m/z* 287 [M + H]⁺. **Etapa 3.** Trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0456)

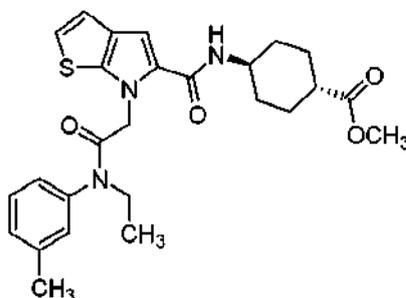
25



5 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxílico (475 mg, 1,66 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (482 mg, 2,49 mmol) para proporcionar el producto deseado (505 mg, 71 %) en forma de una espuma de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,62 (d, *J* = 8,0, 1H), 7,41 - 7,30 (m, 1H), 7,26 - 7,12 (m, 3H), 6,82 - 6,67 (m, 2H), 5,94 (dd, *J* = 2,6, 3,8, 1H), 4,77 (s, 2H), 3,67 - 3,54 (m, 6H), 2,34 (s, 3H), 2,29 - 2,18 (s, 1H), 1,98 - 1,74 (m, 4H), 1,48 - 1,26 (m, 4H), 1,09 - 0,92 (m, 3H); ESI MS *m/z* 426 [M + H]⁺; HPLC 97,5 % (AUC), T_R 6,05 min; UV (MeOH) λ_{máx} 264 nm, ε 11.978.

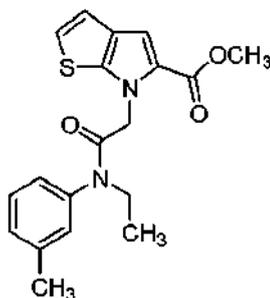
10 Ejemplo 82

Trans-4-(6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0463)



15

Etapla 1. 6-(2-(Etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (JRW-0459)

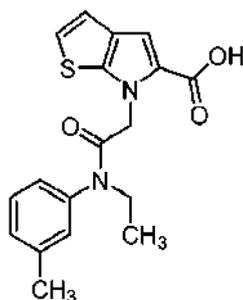


20

A una solución de 6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (171 mg, 0,94 mmol) en acetonitrilo (10 ml), se añadieron carbonato de potasio (157 mg, 1,1 mmol), éter 18-corona-6 (13 mg, 0,047 mmol) y 2-cloro-N-etil-N-(m-tolil)acetamida (200 mg, 0,94 mmol). La suspensión se calentó a 75 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y agua, y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a continuación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, heptano/acetato de etilo) para proporcionar el producto deseado (260 mg, 77 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,37 (t, *J* = 7,6, 1H), 7,25 - 7,09 (m, 4H), 6,99 - 6,95 (m, 1H), 6,91 - 6,85 (m, 1H), 4,93 (s, 2H), 3,92 - 3,64 (m, 5H), 2,43 (s, 3H), 1,14 (t, *J* = 7,2, 4H); ESI MS *m/z* 357 [M + H]⁺.

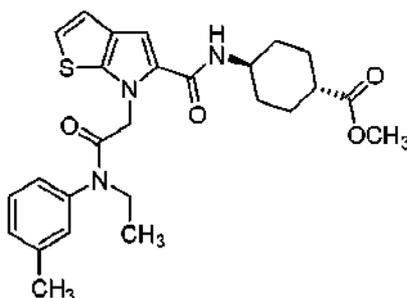
25

30 **Etapla 2.** Ácido 6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxílico (JRW-0462)



5 Siguiendo el procedimiento general A, se hizo reaccionar 6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxilato de metilo (260 mg, 0,73 mmol) con hidróxido de litio (87 mg, 3,6 mmol) para proporcionar el producto en bruto (240 mg) en forma de un sólido de color blanco. ESI MS m/z 342 [M + H]⁺.

Etap 3. Trans-4-(6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo (JRW-0463)



10 Siguiendo el procedimiento general B, se hizo reaccionar ácido 6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxílico (240 mg, 0,70 mmol) con trans-4-aminociclohexano-1-carboxilato de metilo (203 mg, 1,05 mmol) para proporcionar el producto deseado (320 mg, 95 %) en forma de una espuma de color amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,88 (d, J = 8,0, 1H), 7,44 - 7,33 (m, 1H), 7,28 - 7,14 (m, 3H), 7,11 - 6,95 (m, 3H), 4,90 (s, 2H), 3,72 - 3,52 (m, 6H), 2,36 (s, 3H), 2,25 (s, 1H), 2,02 - 1,76 (m, 4H), 1,51 - 1,20 (m, 4H), 1,00 (t, J = 6,9, 3H); ESI MS m/z 482 [M + H]⁺; HPLC > 99 % (AUC), T_R 7,01 min; UV (MeOH) λ_{máx} 287 nm, ε 12.894.

20 Ejemplo 83

Inhibición de luciferasa Nluc

25 Se sembraron K562 en los pocillos de una placa de ensayo Corning 3707 en 20 μl de medio RPMI a 2000 células/pocillo y se incubaron durante una noche. Se preparó una valoración de Trail en 10 μl de medio RPMI y se añadió a las células. A continuación, se añadieron 10 μl de reactivo de Viabilidad celular REALTIME-GLO™ MT 4x (RTCV; Promega Corporation) o medio (control) a cada pocillo. Las reacciones se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ en diversos puntos temporales, y se midió la luminiscencia en un lector de placas Tecan M1000 Pro. A las 5 h, se añadieron 40 μl de reactivo de detección CASPASE-GLO® 3/7 (Promega Corporation) con o sin JRW-0004 200 μM. La reacción se incubó durante 2 h a temperatura ambiente (TA), y se midió la luminiscencia en el lector de placas Tecan M1000 Pro. La Figura 1 demuestra que JRW-0004 puede inhibir la enzima Nluc en reactivo de Viabilidad celular REALTIME-GLO™ MT, y por lo tanto recuperar la ventana de ensayo de CASPASE-GLO® en un ensayo múltiple que combina el ensayo REALTIME-GLO™ y el ensayo CASPASE-GLO®.

35 Ejemplo 84

Inhibición de luciferasa Nluc purificada

40 En una placa de ensayo Corning 3570, se añadieron enzima Nluc purificada (Promega Corporation), DTT 20 mM, y un pro-sustrato de Nluc (PBI-4442, que se describe en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2013/0130289), que se convierte en un sustrato de Nluc tras reducción con DTT. A continuación, se realizaron las valoraciones de compuesto de JRW-0004, JRW-0013, JRW-0006, JRW-0042, JRW-0138, y JRW-0147 (dilución seriada 1:2 en PBS, 11 puntos más control sin inhibidor, comenzando a 200 μM; concentración final 100 μM en la reacción). Se añadieron valoraciones de compuesto en un volumen igual a los pocillos de la placa de ensayo. Las reacciones se incubaron a TA durante 2 h, y se midió la luminiscencia en un lector de placas Tecan M1000 Pro. Se determinaron las concentraciones de inhibidor (compuesto de tienopirrol) semimáximas (CI₅₀) usando GraphPad

Prism 6.03. La Figura 2 demuestra que todos los compuestos son capaces de inhibir la enzima Nluc purificada.

Ejemplo 85

5 Especificidad de la inhibición de luciferasa Nluc

El siguiente ejemplo describe la especificidad de los compuestos de tienopirrol desvelados, JRW-0004, JRW-0013, JRW-0006, JRW-0042, JRW-0138, y JRW-0147, para inhibir la actividad de luciferasa Nluc frente a la actividad de luciferasa de luciérnaga, por ejemplo, luciferasa ULTRAGLO®. En una placa de ensayo Corning 3570 se añadió una solución que contenía luciferina 1 µM en Reactivo de detección de luciferasa (Promega Corporation V865/859) a los pocillos de ensayo. A continuación, se añadió un volumen igual de valoraciones de los compuestos de tienopirrol JRW-0004, JRW-0013, JRW-0006, JRW-0042, JRW-0138, y JRW-0147 a los pocillos. Las reacciones se incubaron a TA durante 2 h, y se midió la luminiscencia en un lector de placas Tecan M1000 Pro. La Figura 3 demuestra que los compuestos de tienopirrol no inhibieron la actividad de la luciferasa de luciérnaga.

Ejemplo 86

Los compuestos de tienopirrol permiten la multiplexación

Los siguientes ejemplos describen el uso de los compuestos de tienopirrol de la presente divulgación para permitir la multiplexación de ensayos que utilizan luciferasa Nluc y otra luciferasa, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga.

A) En una placa de ensayo Corning 3570, se sembraron células MCF7 a 1000 células/pocillo en 20 µl de medio de cultivo celular (EMEM suplementado con 0,01 mg/ml de insulina humana recombinante y suero bovino fetal al 10 %) y se incubaron durante una noche. Se añadieron a los pocillos 10 µl de reactivos de Viabilidad celular REALTIME-GLO™ MT 4x (Promega Corporation) en medio o 10 µl de medio solo. Se añadieron a las células 10 µl de estaurosporina 40 µM en medio o 10 µl de medio solo (control). Las células se incubaron, y la activación de caspasa se monitorizó 5,5 h después de la adición de reactivo. Para monitorizar la activación de caspasa, se añadieron 40 µl de Reactivo de ensayo CASPASE-GLO® 3/7 (Promega Corporation), bien en sí mismo (Caspasa) o bien con JRW-0004, JRW-0013, o JRW-0042 200 µM. Las reacciones se incubaron a TA, y se midió la luminiscencia 1 h 10 min después de la adición de reactivo en un lector de placas Tecan M1000 Pro.

La Tabla 1 muestra que los compuestos inhiben la luminiscencia de fondo de REALTIME-GLO™ en el ensayo múltiple con CASPASE-GLO® (medio que contiene REALTIME-GLO™). Cuando se compara la señal generada del reactivo CASPASE-GLO® en medio solo frente a la señal generada en medio que contiene reactivo REALTIME-GLO™, la señal es mayor en la reacción múltiple. Los compuestos inhiben la enzima Nluc y disminuyen la luminiscencia de fondo del reactivo REALTIME-GLO™.

Tabla 1

	MCF7							
	Medio solo				Medio que contiene RealTime-Glo			
	Control		Estauro 10 µM		Control		Estauro 10 µM	
	Med.	DS	Med.	DS	Med.	DS	Med.	DS
Caspasa	7448	1076	51670	7299	38144	3853	85801	6888
Veces Cont.			6,94				2,25	
JRW-0004	9261	1017	54589	9231	9090	161	50266	3766
Veces Cont.			5,89				5,53	
JRW-0013	8069	2461	55282	13491	8636	1777	54338	6157
Veces Cont.			6,85				6,29	
JRW-0042	10718	1269	62280	6594	10679	1747	53956	4432
Veces Cont.			5,81				5,05	

B) Se sembraron células A549 en placa a 1000 células/pocillo en 20 µl de medio F12K en los pocillos de una placa Corning 3570 (n=4) y se incubaron durante una noche. A continuación, se añadieron reactivos de ensayo de Viabilidad celular REALTIME-GLO™ MT (Promega Corporation) a los pocillos en forma de una solución 2x en 20 µl de medio. La reacción se incubó durante 1 h. Se añadieron 40 µl de una valoración de JRW-0013 o JRW-0147 en reactivo de ensayo CASPASE-GLO® 3/7 (Promega Corporation) a concentraciones 2x. Las reacciones se incubaron a TA, y se determinó la luminiscencia a 1 h.

La Tabla 2 demuestra que estos compuestos pueden inhibir la enzima Nluc en ensayo de Viabilidad celular

REALTIME-GLO™ MT en un ensayo múltiple con un ensayo de CASPASE-GLO® de forma dependiente de la dosis.

Tabla 2

Inhibidor µM, final	Caspasa, JRW-0013			Caspasa, JRW-0147		
	Med.	DS	% Restante	Med.	DS	% Restante
100	3619	454	6,10 %	3389	177	5,71 %
66,67	4017	450	6,77 %	3427	51	5,78 %
44,44	4419	35	7,45 %	4367	189	7,36 %
29,63	5132	145	8,65 %	4394	331	7,41 %
19,75	5095	330	8,59 %	5302	223	8,94 %
13,17	6014	591	10,14 %	5545	401	9,35 %
8,78	6703	406	11,30 %	7125	533	12,01 %
5,85	8059	801	13,59 %	8013	375	13,51 %
3,90	9148	271	15,42 %	9790	1213	16,51 %
2,60	11813	679	19,92 %	11677	189	19,69 %
1,73	12879	1093	21,71 %	15580	1288	26,27 %
0	59313	1970	100,00 %	59313	1970	100,00 %

5 Ejemplo 87

El siguiente ejemplo demuestra que los compuestos JRW-0004, WZ141-88, WZ141-86, WZ141-74, WZ141-84, WZ141-89, WZ141-90, y WZ141-91 inhiben luciferasa Nluc. Una solución de Nluc purificada y un pro-sustrato de Nluc (PBI-4442, que se describe en el documento US 2013/0130289), que se convierte en un sustrato de Nluc tras reducción con DTT, se prepararon en tampón PBS, pH 7,5. También se preparó una solución 40 mM de DTT en PBS, pH 7,5 que contenía un 1 % de TERGITOL. A continuación se prepararon valoraciones de los compuestos de tienopirrol JRW-0004, WZ141-88, WZ141-86, WZ141-74, WZ141-84, WZ141-89, WZ141-90, y WZ141-91 en el tampón que contenían DTT y TERGITOL. Se añadió un volumen igual de la solución de Nluc/pro-sustrato a las valoraciones de compuesto de tienopirrol en los pocillos de una placa de ensayo. Las reacciones se incubaron a TA, y se midió la luminiscencia a diversos puntos temporales en el lector de placas Tecan M100 Pro (tiempo de integración de 200 ms). Los valores de CI_{50} se determinaron usando GraphPad Prism 6.03. Las Figuras 4-6 demuestran que todos los compuestos sometidos a ensayo inhiben la luciferasa Nluc de forma dependiente de la dosis y el tiempo.

20 Ejemplo 88

Permeabilidad celular

El siguiente ejemplo demuestra la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 o HeLa con una proteína de fusión Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc (B2AR-Nluc) para anclar y orientar Nluc citosólicamente. 24 h después de la transfección, las células se trataron con \pm 50 µg/ml de digitonina para simular un escenario vivo y lítico, respectivamente. A continuación, se expusieron células intactas y células permeabilizadas a una curva de respuesta a compuesto de tienopirrol hasta 2 h. Se añadió furimazina 10 µM (Promega Corp.), y se midió la luminiscencia. Si un compuesto de tienopirrol (inhibidor) fue permeable, se superpusieron las curvas de dosis-respuesta tanto para células vivas como para células permeabilizadas. Sin embargo, si un compuesto de tienopirrol fue impermeable, el valor CE_{50} se desplazó a la derecha en las células vivas con respecto a las células permeabilizadas. Véanse las Figuras 7-11.

35 Ejemplo 89

Inhibición de BRET extracelular

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento para inhibir BRET extracelular. Véase la Figura 12A. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con una proteína de fusión Nluc-HDAC6 para orientar Nluc-HDAC6 en el interior de la célula. 24 h después de la transfección, las células se trataron con 10 ng/ml de Nluc purificada-HALOTAG marcada con ligando NANOBRET 618 para simular BRET extracelular parásita. A continuación, las células se expusieron a una curva de respuesta a

compuesto de los compuestos de tienopirrol JRW-0013, JRW-0051, JRW-0147, y JRW-0187 durante 2 h. A continuación se añadió furimazina 10 μ M, y se midió la relación de BRET a 610/450 nm. Si un compuesto de tienopirrol, tal como JRW-0013, fue permeable, la relación de BRET permaneció constante a través de la curva de dosis de compuesto-respuesta. Si un compuesto de tienopirrol, tal como JRW-0051, JRW-0147, o JRW-0187, fue impermeable, la relación de BRET disminuyó a través de la curva de dosis de compuesto-respuesta y mejoró la señal de Nluc intracelular mientras se inhibía BRET extracelular. Véanse las Figuras 12B-12E.

Ejemplo 90

10 Inhibición de la actividad de luciferasa extracelular y mejora de BRET intracelular

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento para inhibir la actividad de luciferasa extracelular mientras se mejora BRET intracelular. Véase la Figura 13A. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con una proteína de fusión Nluc-HALOTAG para orientar Nluc-HALOTAG en el interior de la célula. 24 h después de la transfección, las células se marcaron con ligando NANOBRET 618 para estimular Brett intracelular específica. A continuación las células se trataron con 10 ng/ml de Nluc purificada para simular luminiscencia extracelular parásita. A continuación, las células se expusieron a una curva de respuesta a compuesto de los compuestos de tienopirrol JRW-0013, JRW-0051, JRW-0147, y JRW-0187 durante 2 h. A continuación se añadió furimazina 10 μ M, y se midió la relación de BRET a 610/450 nm. Si un inhibidor, tal como JRW-0013, fue permeable, la relación de BRET permaneció constante a través de la curva de dosis de compuesto-respuesta. Si un compuesto de tienopirrol, tal como JRW-0051, JRW-0147, o JRW-0187, fue impermeable, la relación de BRET intracelular mejoró a través de la curva de dosis de compuesto-respuesta mientras se inhibía la señal de Nluc extracelular parásita. Véanse las Figuras 13B-13F.

25 Ejemplo 91

Permeabilidad celular con formación de imágenes bioluminescentes

Se transfectaron de forma transitoria células HeLa con una proteína de fusión Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc (B2AR-Nluc; Nluc en el extremo C-terminal) o Nluc-Receptor Beta-2 Adrenérgico (Nluc-B2AR; Nluc en el extremo N-terminal) para anclar y orientar Nluc intracelular o extracelularmente, respectivamente. 24 h después de la transfección, las células se trataron con +/- 30 μ M de un compuesto de tienopirrol, JRW-0147, JRW-0051, y JRW-0138. Se añadió furimazina 10 μ M, y se detectó la luminiscencia mediante formación de imágenes en el equipo Olympus LV200. Los compuestos de tienopirrol JRW-0147 y JRW-0051 fueron impermeables e inhibieron Nluc extracelular y mejoraron Nluc intracelular. El compuesto JRW-0138 tuvo permeabilidad celular e inhibió Nluc tanto intracelular como extracelular. Véase la Figura 14.

Ejemplo 92

40 Caracterización de un compuesto de tienopirrol impermeable en un modelo de acoplamiento de diana

Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con una proteína de fusión Src-Nluc. Véase la Figura 15A. 24 h después de la transfección, las células se trataron con +/- 30 μ g/ml de digitonina para simular un escenario vivo y lítico, respectivamente. Las células intactas y las células permeabilizadas se marcaron con un trazador VM Dasatinib-DY605 (impermeable) y se trataron con una curva de respuesta a compuesto de tienopirrol con impermeabilidad celular JRW-0147 durante 2 h. Se añadió furimazina 10 μ M, y se registró una relación de BRET a 610/450 nm. Las Figuras 15B-15C demuestran que JRW-0147 inhibió BRET en los restos celulares, pero no BRET en el interior de las células.

50 Ejemplo 93

Curso temporal de permeabilidad celular

El siguiente ejemplo demuestra la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con luciferasa Nluc para expresarla en el citosol. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se expusieron a una curva de respuesta a compuesto del compuesto de tienopirrol JRW-0147 o JRW-0013 durante 10 minutos, 30 minutos, o 120 minutos. A continuación se añadió furimazina 10 μ M, y se midió la luminiscencia.

Si el compuesto de tienopirrol (inhibidor) fuera permeable, el compuesto entraría pasivamente en la célula y disminuiría RLU de Nluc de forma dependiente de la dosis e independiente del tiempo, tal como se observó en JRW-0013 (Figura 16). Si el compuesto de tienopirrol (inhibidor) fuera impermeable, el compuesto no entraría activamente o pasivamente en la célula, y no se observaría ningún cambio significativo en RLU de Nluc de forma dependiente de la dosis e independiente del tiempo, tal como se observó en JRW-0147 (Figura 16).

Ejemplo 94

Medición de endocitosis mediante conjugación química o fusión molecular a Nluc

5 Anticuerpos, proteínas, receptores, fármacos, vehículos farmacológicos, péptidos, azúcares, ácidos grasos, nanopartículas, u otras biomoléculas se podrían condensar químicamente o bien fusionar a Nluc para medir endocitosis en combinación con el compuesto de tienopirrol (inhibidor) con impermeabilidad celular descrito en el presente documento.

10 Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, Nluc-Trastuzumab) se podría conjugar químicamente y unir al receptor HER2 expresado en la superficie de células SKBR3. El inhibidor de Nluc con impermeabilidad celular se podría aplicar para inhibir Nluc-Trastuzumab extracelular. Después de la adición de un sustrato de coelenterazina, se podría usar una ganancia de ensayo de señal para medir cinéticamente receptor de Trastuzumab-Nluc-HER2 internalizado activa/pasivamente, que se puede extender a otros anticuerpos, proteínas, receptores, fármacos, vehículos farmacológicos, péptidos, azúcares, ácidos grasos, nanopartículas, u otras biomoléculas conjugadas químicamente a Nluc.

15 En otro ejemplo, se podrían fusionar genéticamente y expresar Nluc-GPCR (por ejemplo, Nluc-B2AR) en células de mamífero. Un compuesto de tienopirrol (inhibidor) con impermeabilidad celular como se describe en el presente documento se podría aplicar para inhibir Nluc-B2AR extracelular o unido a membrana. Después de la adición del sustrato de coelenterazina, se podría usar una ganancia de un ensayo de señal para medir cinéticamente Nluc-GPCR internalizado activa/pasivamente o reciclado, que puede extender a otras proteínas o receptores fusionados genéticamente a Nluc.

Ejemplo 95

25

Especificidad de inhibición de luciferasa Nluc

30 El siguiente ejemplo describe la especificidad de compuestos de tienopirrol desvelados, JRW-0251, JRW-0344, y JRW-0147, para inhibir la actividad de luciferasa Nluc frente a la actividad de luciferasa de luciérnaga, por ejemplo, luciferasa ULTRAGLO®. En una placa de ensayo Corning 3570, se añadió una solución que contenía luciferina 1 µM en Reactivo de detección de luciferasa (Promega Corporation V865/859) a los pocillos de ensayo. A continuación se añadió un volumen igual de valoraciones de los compuestos de tienopirrol JRW-0251, JRW-0344, y JRW-0147 a los pocillos. Las reacciones se incubaron a TA durante 2 h, y se midió la luminiscencia en un lector de placas Tecan M1000 Pro. La Tabla 3 demuestra que los compuestos de tienopirrol no inhibieron la actividad de luciferasa de luciérnaga.

35

Tabla 3

[comp.], µM	Nluc								
	JRW-0147			JRW-0251			JRW-0344		
	Med.	DS	S/B	Med.	DS	S/B	Med.	DS	S/B
200	23722	4826	0,20	23311	208	0,20	16291	559	0,15
100	32702	7220	0,27	34389	977	0,30	23445	1930	0,21
50	42630	9430	0,36	44219	809	0,39	32113	3215	0,29
25	54498	13398	0,46	55210	1757	0,48	40392	3250	0,36
12,5	66480	17301	0,56	68664	2710	0,60	52627	5302	0,47
6,25	79191	19070	0,67	81193	1762	0,71	65136	4742	0,59
3,125	96256	5190	0,81	86555	1625	0,76	71976	4730	0,65
1,5625	103399	1432	0,87	96602	2280	0,84	83141	6007	0,75
0,78125	111603	2902	0,94	105881	4664	0,92	95060	6457	0,86
0,390625	113278	2111	0,95	106075	788	0,93	99851	5327	0,90
0,1953125	115442	1723	0,97	108634	436	0,95	102409	6375	0,92
0	119061	5586	1,00	114494	1203	1,00	110876	6347	1,00
[comp.], µM	Luciferasa UltraGlo								

	JRW-0147			JRW-0251			JRW-0344		
	Med.	DS	S/B	Med.	DS	S/B	Med.	DS	S/B
200	78035	4010	0,90	77788	618	0,92	77230,33	1326	0,93
100	80636	3824	0,93	79556	842	0,94	79847,67	842	0,96
50	81106	3963	0,94	81930	632	0,97	81805,00	791	0,98
25	84033	3435	0,97	83382	780	0,99	83084,00	711	1,00
12,5	83291	2687	0,97	83569	583	0,99	82454,67	723	0,99
6,25	83282	2956	0,97	83665	969	0,99	83064,33	805	1,00
3,125	82252	1230	0,95	81125	240	0,96	80134,33	350	0,96
1,5625	83668	949	0,97	82370	308	0,98	81368,33	812	0,98
0,78125	84072	1686	0,97	82812	745	0,98	82135,67	1203	0,99
0,390625	84087	1748	0,97	82723	1752	0,98	82945,67	1154	1,00
0,1953125	85561	2108	0,99	83059	1024	0,98	83526,33	832	1,00
0	86300	1882	1,00	84426	1289	1,00	83352,67	1781	1,00

Ejemplo 96

Los compuestos de tienopirrol permiten la multiplexación

5 Los siguientes ejemplos describen el uso de los compuestos de tienopirrol de la presente invención para permitir multiplexación de ensayos que utilizan luciferasa Nluc y otra luciferasa, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga.

10 En una placa de ensayo Corning 3570, se preparó reactivo de ensayo de Viabilidad celular REAL-TIME-GLO™ MT 1x en 40 µl de medio DMEM (n = 3) y se incubó durante una noche. A continuación, se añadieron 40 µl de una valoración de JRW-0147 o JRW-0344 (concentración 2x en Reactivo de ensayo CASPASE-GLO® 3/7 (Promega Corporation)). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente, y se determinó la luminiscencia a 1 hora.

15 La Tabla 4 muestra que los compuestos inhiben la luminiscencia de fondo del ensayo REALTIME-GLO™ en el ensayo múltiple con el ensayo CASPASE-GLO® (medio que contiene reactivo REALTIME-GLO™). Los compuestos inhiben la enzima Nluc y disminuyen la luminiscencia de fondo del reactivo REALTIME-GLO™.

Tabla 4

1 hora	JRW-0147			JRW-0344		
	[comp.], final µM	Med.	DS	S/B	Med.	DS
100	6568	1159	0,05	5523	956	0,03
50	8136	700	0,06	6790	802	0,04
25	10699	1130	0,08	9761	674	0,06
12,5	17293	2129	0,12	15547	3856	0,10
6,25	27817	3812	0,20	19560	3555	0,12
3,125	45167	579	0,32	33523	3740	0,21
1,5625	65173	1320	0,47	65097	6521	0,41
0,78125	106867	8866	0,77	95993	7772	0,61
0,390625	117833	5829	0,85	138900	31425	0,88
0,1953125	124500	7192	0,89	126333	20215	0,80
0,09765625	117067	8214	0,84	112533	14372	0,71
0	139367	11254	1,00	158067	13180	1,00

20 **Ejemplo 97**

Permeabilidad celular

5 El siguiente ejemplo demuestra la permeabilidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con una proteína de fusión Receptor Beta-2 Adrenérgico-Nluc (B2AR-Nluc) para anclar y orientar Nluc en el citosol y ADN portador de pGEM-3z (1:100). 24 h después de la transfección, las células se trataron con +/- 50 µg/ml de digitonina para simular un escenario vivo y lítico, respectivamente. A continuación, se expusieron células intactas y células permeabilizadas a una curva de respuesta a compuesto de compuesto de tienopirrol hasta 2 h. Se añadió furimazina 10 µM (Promega Corp.), y se midió la luminiscencia. Si un compuesto de tienopirrol (inhibidor) fue permeable, se superpusieron las curvas de respuesta a dosis tanto para las células vivas como para las células permeabilizadas. Sin embargo, si un compuesto de tienopirrol fue impermeable, CE₅₀ se desplazó a la derecha en las células vivas con respecto a las células permeabilizadas. Las Figuras 17A-17C demuestran que JRW-0147 y JRW-0344 presentan impermeabilidad celular caracterizada por CE₅₀ desplazada a la derecha en células vivas frente a líticas. JRW-0013 sirvió como control de permeabilidad celular caracterizado por CE₅₀ similar en células vivas frente a líticas.

Ejemplo 98**Viabilidad celular y toxicidad**

20 El siguiente ejemplo demuestra la viabilidad celular y toxicidad de JRW-0344. Se sembraron en placa células HEK293 a 20k células/pocillo y se expusieron a vehículo (DMSO), digitonina (control positivo para muerte celular), o JRW-0344 durante 10 min/30 min/120 min/240 min/o 18 h. Se añadió CellTiter-Glo (Promega Corp.), y se midió la luminiscencia. Las Figuras 18A-18C demuestran que no hubo toxicidad evidente de vehículo o JRW-0344 hasta 100 µM después de 18 h. Las células tratadas con digitonina experimentaron muerte casi en su totalidad a concentraciones mayores de 2 µg/ml.

Ejemplo 99**Permeabilidad celular con formación de imágenes bioluminescente**

30 Se transfectaron de forma transitoria células HeLa con Nluc-ADRB2 (Nluc extracelular) o ADRB2-Nluc (Nluc intracelular) para anclar y orientar Nluc extracelular o intracelularmente, respectivamente. 24 h después de la transfección, las células se trataron con +/- 30 µM de un compuesto de tienopirrol, JRW-0147, JRW-0013, y JRW-0344. Se añadió furimazina 10 µM, y se detectó la luminiscencia por formación de imágenes en el equipo Olympus LV200. Se usó DMSO (sin tratar) como control negativo y no inhibió Nluc en ninguna orientación. JRW-0013 es un control positivo con permeabilidad celular e inhibió Nluc en cualquier orientación. Sin embargo, cuando Nluc está orientada extracelularmente, JRW-0344 o JRW-0147 inhibe la estructura de tipo anillo clásica, pero no cuando Nluc está orientada intracelularmente. Véase la Figura 19.

Ejemplo 100**Inhibición de la actividad de luciferasa extracelular**

45 El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de los compuestos de tienopirrol descritos en el presente documento para inhibir la actividad de luciferasa extracelular mientras mejora BRET intracelular. Véase la Figura 20A. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con SRC-Nluc o Nluc-HaloTag. 24 h después de la transfección, se sembraron en placa 20k células/pocillo en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Costar 3600). Se añadió 1 µM del trazador con impermeabilidad celular Dasatinib-DY605 a las células HEK293 que expresan SRC-Nluc, y se añadió 100 nM del trazador con permeabilidad celular NanoBRET-618, a las células que expresan Nluc-HaloTag. Se expusieron células HEK293 tanto SRC-Nluc como Nluc-HaloTag a una curva de respuesta a dosis de JRW-0344. Las Figuras 20A-20C demuestran que JRW-0344 inhibe BRET en los residuos celulares en las células HEK293 que expresan SRC-Nluc, pero no en las células HEK293 que expresan Nluc-HaloTag.

Ejemplo 101**Determinación de CI₅₀ del inhibidor**

60 El siguiente ejemplo proporciona los valores de CI₅₀ para los compuestos desvelados en el presente documento. Véase la Tabla 5. Se diluyó la enzima NANOLUC[®] hasta 0,4 ng/ml en medio independiente de CO₂ + FBS al 10 % para preparar el reactivo de detección. A continuación se realizó una dilución seriada 3x de cada inhibidor en el reactivo de detección. También se preparó un control "sin inhibidor" para cada muestra. Se mezclaron 50 ul de cada dilución de inhibidor con 50 ul de tampón NanoGlo que contenía furimazina 20 uM (la concentración final de furimazina es 10 uM que es a Km), y se midió la luminiscencia. Cada muestra se normalizó respecto al control "sin inhibidor". A continuación se determinaron los valores de CI₅₀ usando GraphPad Prism (log [inhibidor] frente a respuesta normalizada).

Tabla 5

Inhibidor	CI ₅₀ (uM)
jrwl-0004	1,1
wz-141-74	16,4
wz-141-84	5,5
wz-141-88	0,54
jrwl-0013	0,14
jrwl-0009	2,7
jrwl-0008	1,1
jrwl-0006	0,26
jrwl-0034	0,059
jrwl-0041	0,2
jrwl-0042	0,31
jrwl-0043	0,84
jrwl-0044	16,8
jrwl-0051	0,74
jrwl-0052	1,3
jrwl-0081	19,4
jrwl-0109	10,1
jrwl-0110	3
jrwl-0138	0,13
jrwl-0143	2,8
jrwl-0143	2,6
jrwl-0145	0,12
jrwl-0147	0,094
jrwl-0148	5,3
jrwl-0149	2,5
jrwl-0151	7
jrwl-0152	4,3
jrwl-0188	0,022
jrwl-0195	0,48
jrwl-0198	1
jrwl-0200	0,078
jrwl-0208	0,82
jrwl-0241	0,063
jrwl-0242	0,035
jrwl-0243	0,21
jrwl-0251	0,077
jrwl-0344	0,077
jrwl-0264	0,24

jrw-0268	4,3
jrw-0318	0,11
jrw-0321	0,16
jrw-0322	0,2
jrw-0326	0,0039
jrw-0327	0,11
jrw-0330	0,7
jrw-0331	16,9
jrw-0334	1,3
jrw-0335	1,9
jrw-0355	0,052
jrw-0359	3
jrw-0360	0,61
jrw-0424	0,005
jrw-0429	0,0021
jrw-0430	0,0021
jrw-0432	0,0031
jrw-0434	0,0019
jrw-0456	7,4
jrw-0460	0,12
jrw-0461	0,077
jrw-0463	0,71
jrw-0466	0,0018
jrw-0478	0,065
jrw-0508	0,027

APÉNDICE

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de luciferasa de *Oplophorus* madura nativa
 FTLADFDVGDWQQTAGYNQDQVLEQGGSSLFQALGVSVTPIQKVVLSGENGLKADI
 HVIIPYEGLSGFQMGLIEMIFKVVYPVDDHHFKIILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRYPY
 GIAVFDGKQITVTGTLWNGNKIYDERLINPDGSLLFR- VTIN GVTGWRLCENILA

5

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de Nluc
 MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID
 IHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP
 YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PROMEGA CORPORATION

<120> COMPUESTOS DE TIENOPIRROL Y USOS DE LOS MISMOS

15

<130> 016026-9573-WO00

<140> Nueva solicitud de patente internacional PCT
<141> 24-06-2016

5

<150> US 62/206.525
<151> 18-08-2015

10

<150> US 62/184.714
<151> 25-06-2015

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1
<211> 169
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Péptido sintético - Luciferasa de *Oplophorus* madura nativa

<400> 1

ES 2 809 208 T3

Phe Thr Leu Ala Asp Phe Val Gly Asp Trp Gln Gln Thr Ala Gly Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gln Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Leu Ser Ser Leu Phe Gln
 20 25 30
 Ala Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Lys Val Val Leu Ser Gly
 35 40 45
 Glu Asn Gly Leu Lys Ala Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr Glu Gly
 50 55 60
 Leu Ser Gly Phe Gln Met Gly Leu Ile Glu Met Ile Phe Lys Val Val
 65 70 75 80
 Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Ile Ile Leu His Tyr Gly Thr
 85 90 95
 Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly Arg
 100 105 110
 Pro Tyr Pro Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Gln Ile Thr Val Thr
 115 120 125
 Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Tyr Asp Glu Arg Leu Ile Asn
 130 135 140
 Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val Thr Gly
 145 150 155 160
 Trp Arg Leu Cys Glu Asn Ile Leu Ala
 165

<210> 2
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético - Nluc

<400> 2

ES 2 809 208 T3

Met Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala
 1 5 10 15

Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu
 20 25 30

Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu
 35 40 45

Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr
 50 55 60

Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys
 65 70 75 80

Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr
 85 90 95

Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe
 100 105 110

Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr
 115 120 125

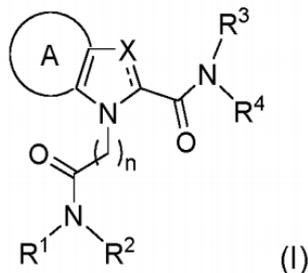
Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu
 130 135 140

Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val
 145 150 155 160

Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala
 165 170

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I), o una sal del mismo:



5

en la que:

- 10 la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;
 X es CH, N, O, o S;
 en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;
 R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxialquilo opcionalmente sustituido y alcoxialcoxialquilo opcionalmente sustituido; y
 15 R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y
 20 A es un anillo de heteroarilo de 5 miembros, opcionalmente un anillo de tienilo o un anillo de furanilo;

25 R² es un arilo opcionalmente sustituido; y
 n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es 1.

30 3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la línea discontinua representa la presencia de un enlace, y X es CH.

35 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈, halo-alquilo C₁-C₈, alcoxialcoxialquilo y arilalquilo; opcionalmente en el que R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, etilo, n-hexilo, 2-(2-metoxietoxi)etilo y bencilo; además opcionalmente en el que R¹ es etilo.

40 5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es fenilo sustituido; opcionalmente en el que R² es fenilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, ciano, amido, alcoxi C₁-C₄, e hidroxialquilo; además opcionalmente en el que R² es fenilo sustituido con un grupo metilo.

45 6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; opcionalmente en el que el anillo es un heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido; además opcionalmente, en el que el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina, piperidina y piperazina opcionalmente sustituidas, aún más opcionalmente en el que el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en pirrolidina sin sustituir, piperidina sin sustituir, piperidina sustituida con un sustituyente, o piperazina sustituida con un sustituyente.

50 7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R³ es hidrógeno.

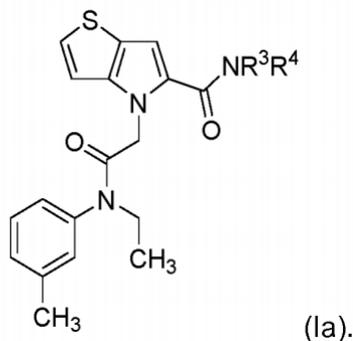
8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ sin sustituir, halo-alquilo C₁-C₈, carboxi-alquilo C₁-C₈, alcoxycarbonil C₁-C₄-alquilo C₁-C₈, fenilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₅-C₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₅-C₆ opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo

opcionalmente sustituido; opcionalmente en el que R^4 es fenilo que está sin sustituir o sustituido con un sustituyente; además opcionalmente en el que el sustituyente se selecciona entre el grupo que consiste en alcóxicarbonilo C_1-C_4 y alcóxicarbonil C_1-C_4 -alquilo C_1-C_4 .

5 9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^4 es ciclohexilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en carboxi, alcóxicarbonilo C_1-C_4 , alquilamido C_1-C_8 , hidroxialquilamido C_1-C_8 , amido, aminoalquilamido C_1-C_8 opcionalmente sustituido, dialquilamino C_1-C_4 -alquilamido C_1-C_8 , carboxialquilamido C_1-C_8 , ácido sulfónicoalquilamido C_1-C_8 , sulfonatoalquilamido C_1-C_8 , alquilcarbonil C_1-C_4 -alquilamido C_1-C_8 , cicloalquilamido C_3-C_6 opcionalmente sustituido, y heterocicilamido opcionalmente sustituido.

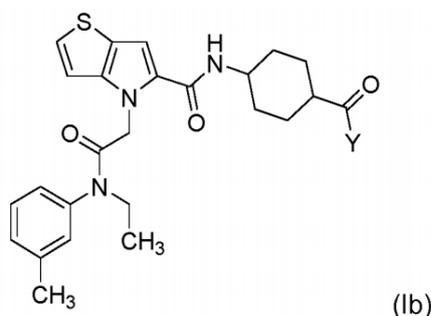
10

10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la fórmula (Ia):



15

11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la fórmula (Ib):



en la que:

20 Y se selecciona entre el grupo que consiste en $-NR^aR^b$ y $-OR^c$;
 R^a y R^b se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_8 opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_8 opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido; o R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y

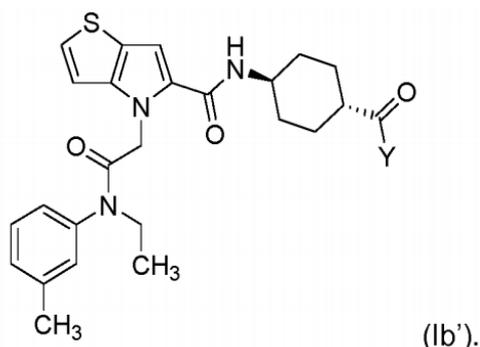
25 R^c se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido.

12. El compuesto de la reivindicación 11, en el que Y es $-OR^c$, opcionalmente en el que R^c se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y metilo o Y es $-NR^aR^b$; opcionalmente en el que R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; además opcionalmente en el que el anillo es un heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido; además opcionalmente en el que el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido es piperidina opcionalmente sustituida, opcionalmente en el que el heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en piperidina sin sustituir y piperidina sustituida con un sustituyente.

35 13. El compuesto de la reivindicación 12, en el que R^a es hidrógeno opcionalmente en el que R^b se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_8 opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_8 opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido; alquilo C_1-C_6 , hidroxialquilo, aminoalquilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo, ácido sulfónicoalquilo, sulfonatoalquilo, alquilcarbonilalquilo, y heterociclilo de seis miembros opcionalmente sustituido.

40

14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que el compuesto tiene la siguiente fórmula (Ib')



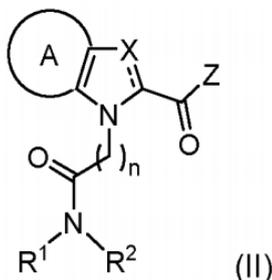
15. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 5 N-ciclohexil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-etil-2-(5-(pirrolidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 N-etil-2-(5-(piperidina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 1-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-fenil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 10 2-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)fenil)acetato de etilo;
 3-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)benzoato de metilo;
 cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido 8-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)octanoico;
 ácido 6-(4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)piperidin-1-il)-6-oxohexanoico;
 15 trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
 N-(trans-4-(butilcarbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((2-hidroxietil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 20 carboxamida;
 N-(trans-4-((2-(dimetilamino)etil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 carboxamida;
 ácido 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 25 carboxamido)butanoico;
 N-(trans-4-carbamoilciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(hexilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carbonil)piperidina-4-carboxilato de etilo;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 30 carboxamido)hexanoato de metilo;
 ácido 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carboxamido)hexanoico;
 ácido 1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carbonil)piperidina-4-carboxílico;
 35 ácido 8-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carboxamido)octanoico;
 N-(trans-4-(ciclohexilcarbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((1-metilpiperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 carboxamida;
 4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 40 carboxamido)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-(piperidin-4-ilcarbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 carboxamida;
 N-(trans-4-((1-acetilpiperidin-4-il)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 45 carboxamida;
 (6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-
 carboxamido)hexil)carbamato de terc-butilo;
 N-(trans-4-((6-(3',6'-dihidroxi-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5(6)-
 carboxamido)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 50 clorhidrato de N-(trans-4-((6-amino)hexil)carbamoil)ciclohexil)-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-
 b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxihexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-
 carboxamida;
 trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-

- carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 ácido trans-4-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
 ácido (11S,14S,17S)-17-acetamido-11,14-bis(carboximetil)-1-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexil)-1,10,13,16-tetraoxo-2,9,12,15-tetraazanonadecan-19-oico;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-metil-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-ciclopentil-4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(piridin-4-ilmetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-N-(3-morfolinopropil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-etil-2-(5-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-4-il)-N-(m-tolil)acetamida;
 4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
 N-ciclohexil-4-(2-oxo-2-(m-tolilamino)etil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 N-ciclohexil-4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 trans-4-(4-(2-((2-(2-metoxietoxi)etil)(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
 N-ciclohexil-4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 4-(2-(bencil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxilato de metilo;
 ácido 6-(cis-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico;
 6-(trans-4-((4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoato de metilo;
 ácido 6-(trans-4-((4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)metil)ciclohexano-1-carboxamido)hexanoico;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de potasio;
 ácido trans-4-(4-(2-(hexil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxílico;
 trans-4-(4-(2-(etil(fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-((3-cianofenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-((3-carbamoilfenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(o-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(6-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(p-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(4-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(1-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6-metoxi-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-4H-furo[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxihexil)carbamoil)ciclohexil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamida;
 6-(trans-4-(4-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-sulfonato de sodio;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-isopropilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-(hidroximetil)fenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-((3-(bromometil)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-((3-(dimetilamino)fenil)(etil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(4-(2-(etil(3-isobutilfenil)amino)-2-oxoetil)-4H-tieno[3,2-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;
 trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de metilo;

1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-N-(trans-4-((6-hidroxiheptil)carbamoyl)ciclohexil)-1H-indol-2-carboxamida;
 6-(trans-4-(1-(2-(etil(3-etilfenil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxamido)ciclohexano-1-carboxamido)hexano-1-
 sulfonato de sodio; y
 trans-4-(6-(2-(etil(m-tolil)amino)-2-oxoetil)-6H-tieno[2,3-b]pirrol-5-carboxamido)ciclohexano-1-carboxilato de
 metilo.

16. Un método de inhibición de una luciferasa procedente de *Oplophorus*, comprendiendo el método poner en contacto la luciferasa procedente de *Oplophorus* con un compuesto de fórmula (II):



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

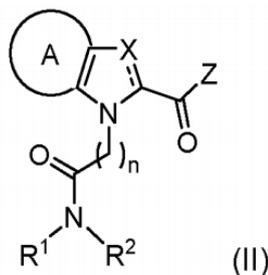
R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido;

Z es -NR³R⁴; y

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido.

17. Un método para modular la luminiscencia de una luciferasa procedente de *Oplophorus* en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido;

Z es -NR³R⁴; y

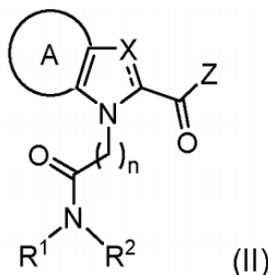
R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido; y

(b) detectar luminiscencia en la muestra,

en el que el compuesto de fórmula (II) causa una disminución en la luminiscencia de la luciferasa procedente de *Oplophorus*.

18. Un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S; A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxilalquilo opcionalmente sustituido y alcoxilalcoxilalquilo opcionalmente sustituido;

Z es -NR³R⁴; y

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido,

en el que la muestra comprende:

(i) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de fusión comprende un primer fragmento de una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera proteína; y

(ii) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína de fusión comprende un segundo fragmento de la luciferasa procedente de *Oplophorus* y una segunda proteína; y

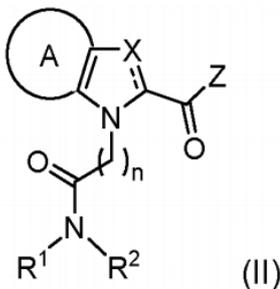
(b) detectar luminiscencia en la muestra,

en el que la detección de luminiscencia indica una interacción entre la primera proteína y la segunda proteína.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-18, que comprende poner en contacto la muestra con el sustrato de coelenterazina antes de poner en contacto la muestra con el compuesto de fórmula (II); opcionalmente en el que cuando interactúan la primera proteína y la segunda proteína, el primer fragmento de la luciferasa procedente de *Oplophorus* y el segundo fragmento de la luciferasa procedente de *Oplophorus* reconstituyen una enzima de longitud completa capaz de unirse establemente al sustrato de coelenterazina.

20. Un método para detectar una interacción entre una primera proteína y una segunda proteína en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra con un sustrato de coelenterazina y un compuesto de fórmula (II):



en la que:

la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un enlace;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X es CH, N, O, o S;

en la que, cuando la línea discontinua representa la presencia de un enlace, X es CH o N, y cuando la línea discontinua representa la ausencia de un enlace, X es O o S;

A es un anillo de fenilo opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido;

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxialquilo opcionalmente sustituido y alcoxialcoxialquilo opcionalmente sustituido;

Z es -NR³R⁴; y

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo opcionalmente sustituido; o R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman juntos un anillo opcionalmente sustituido,

en el que la muestra comprende:

(i) un primer polinucleótido que codifica una primera proteína de fusión, en el que la primera proteína de fusión comprende una luciferasa procedente de *Oplophorus* y una primera proteína, en el que la luciferasa procedente de *Oplophorus* es un donador bioluminescente; y

(ii) un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión, en el que la segunda proteína de fusión comprende una molécula aceptora fluorescente y una segunda proteína;

(b) detectar transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) en la muestra, indicando una interacción o proximidad del donador bioluminescente y el aceptador de fluorescencia.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en el que la muestra comprende una célula; opcionalmente en el que la célula comprende o expresa la luciferasa procedente de *Oplophorus*.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en el que el sustrato de coelenterazina es sustrato de coelenterazina es una coelenterazina, derivados de coelenterazina, análogos de coelenterazina, pro-coelenterazina, o coelenterazina enmascarada con quinona.

23. Un sistema de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) que comprende: una primera proteína de fusión que incluye una primera proteína diana y una molécula donadora de bioluminiscencia, en el que la molécula donadora de bioluminiscencia es una luciferasa procedente de *Oplophorus*; una segunda proteína de fusión que incluye una segunda proteína diana y una molécula aceptora fluorescente; un sustrato de coelenterazina; y un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

24. Un kit que comprende:

(a) un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y
(b) una luciferasa procedente de *Oplophorus*;

5

comprendiendo además opcionalmente dicho kit:

un sustrato de coelenterazina y/o instrucciones para llevar a cabo un ensayo luminiscente.

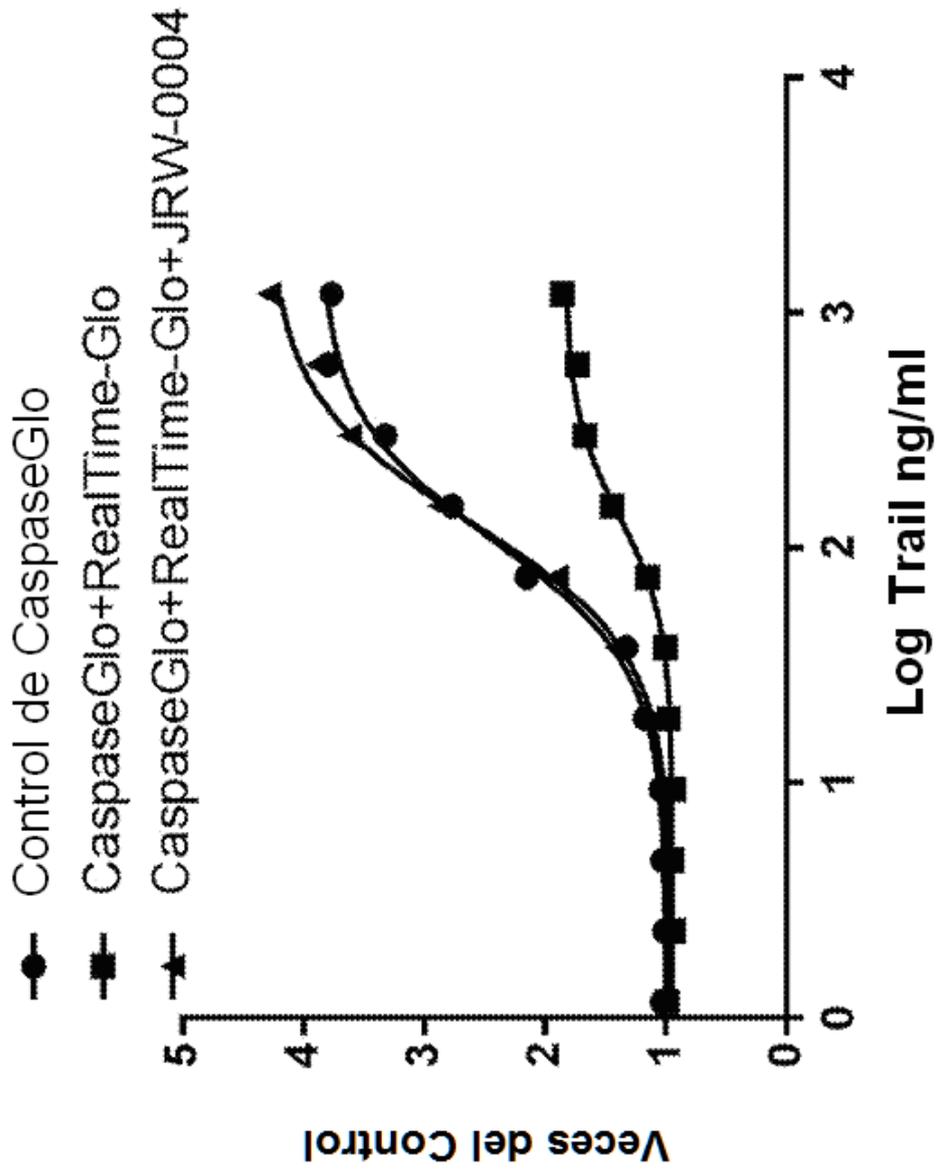


FIG. 1

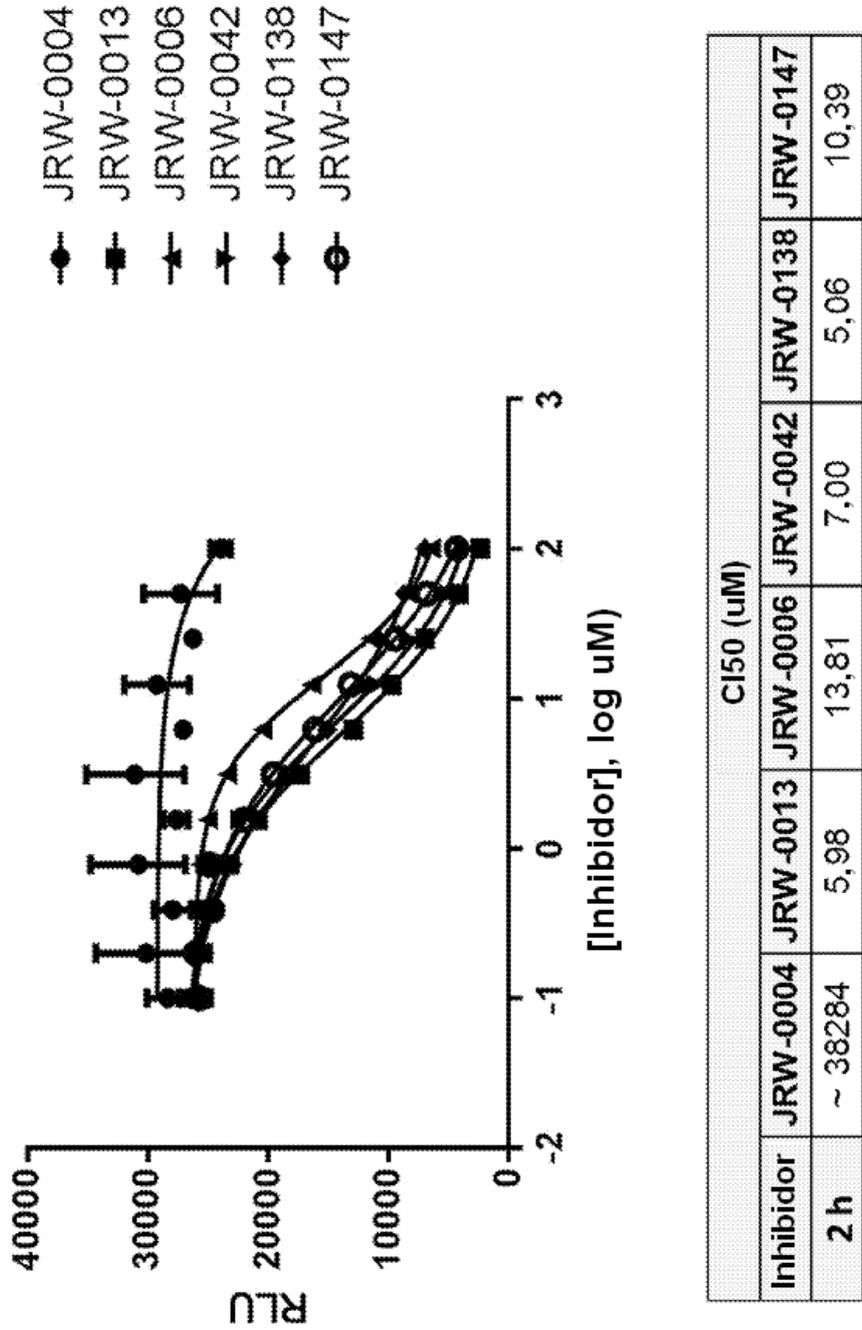


FIG. 2

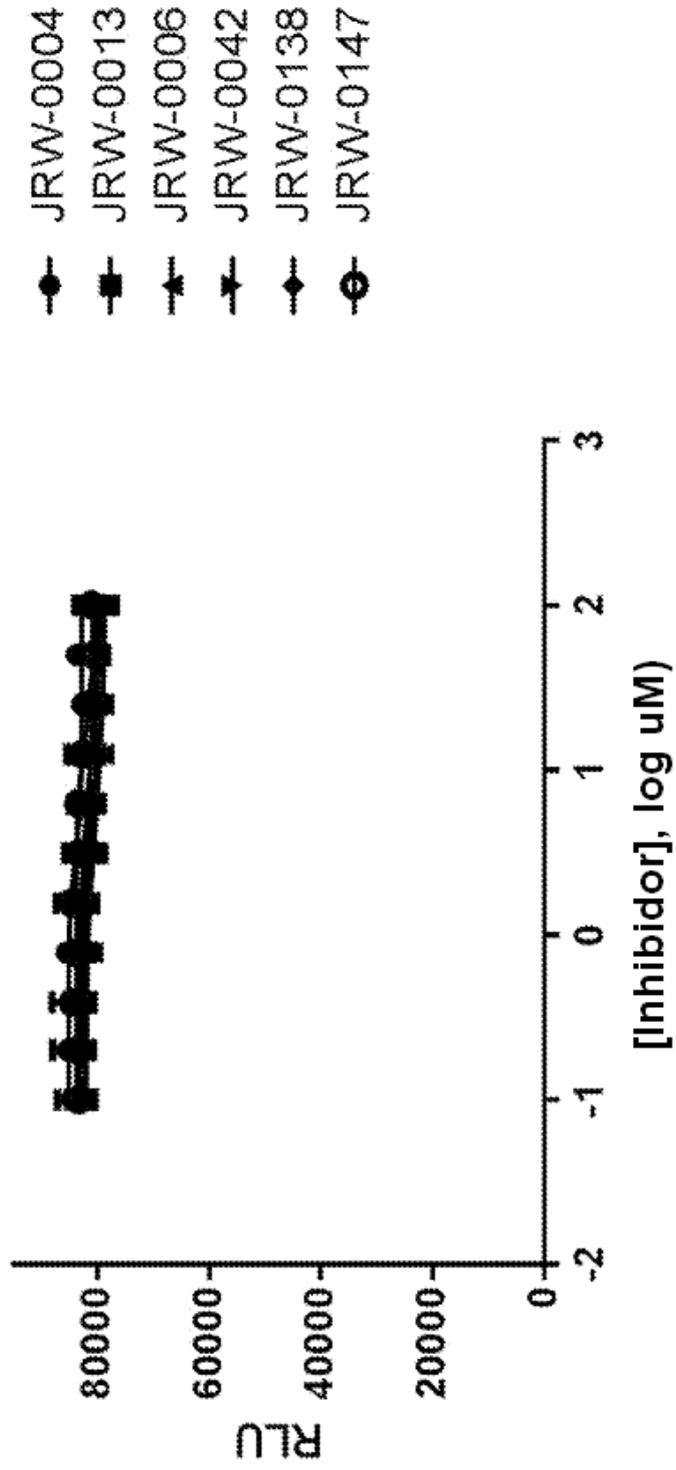
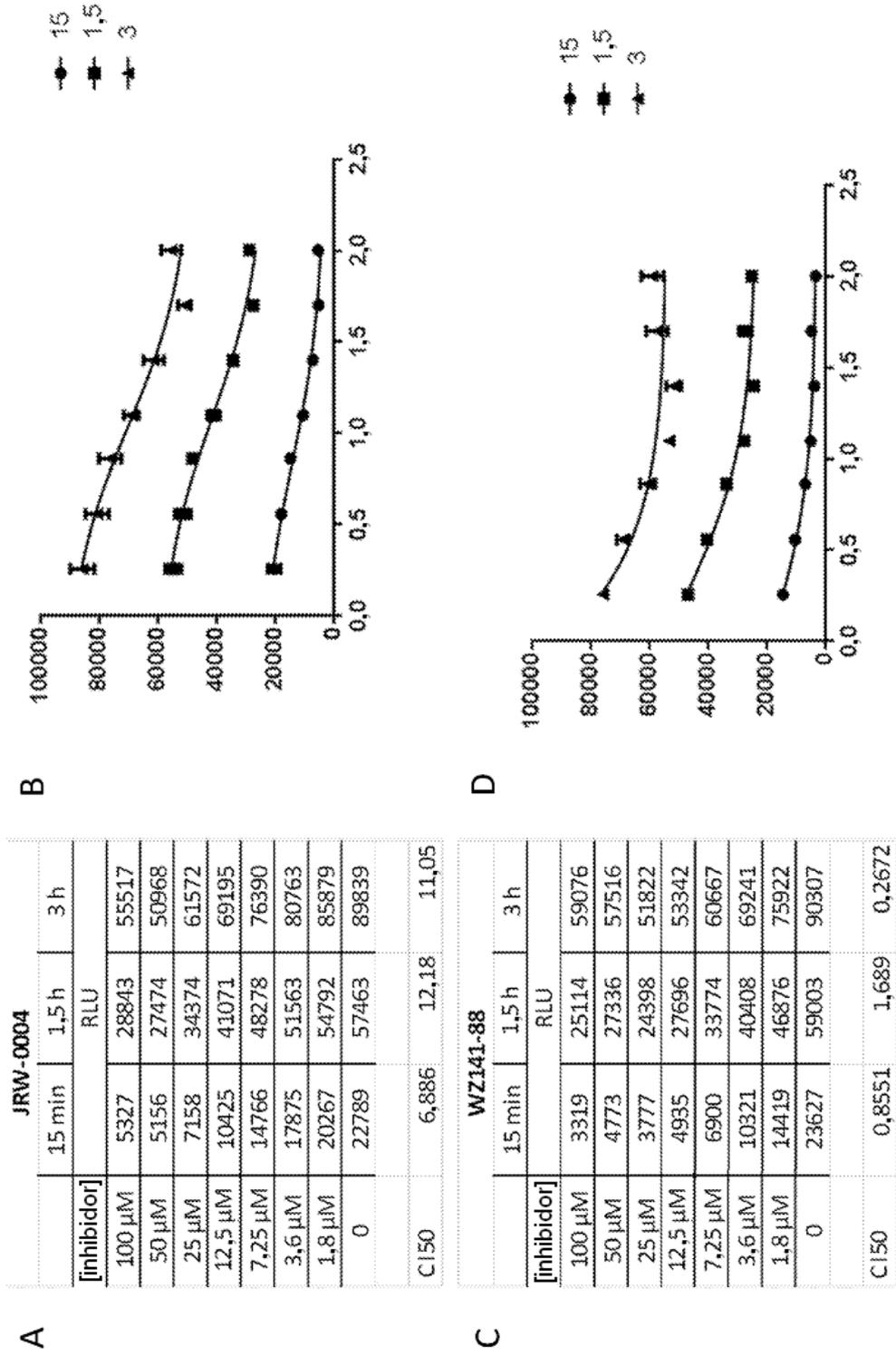
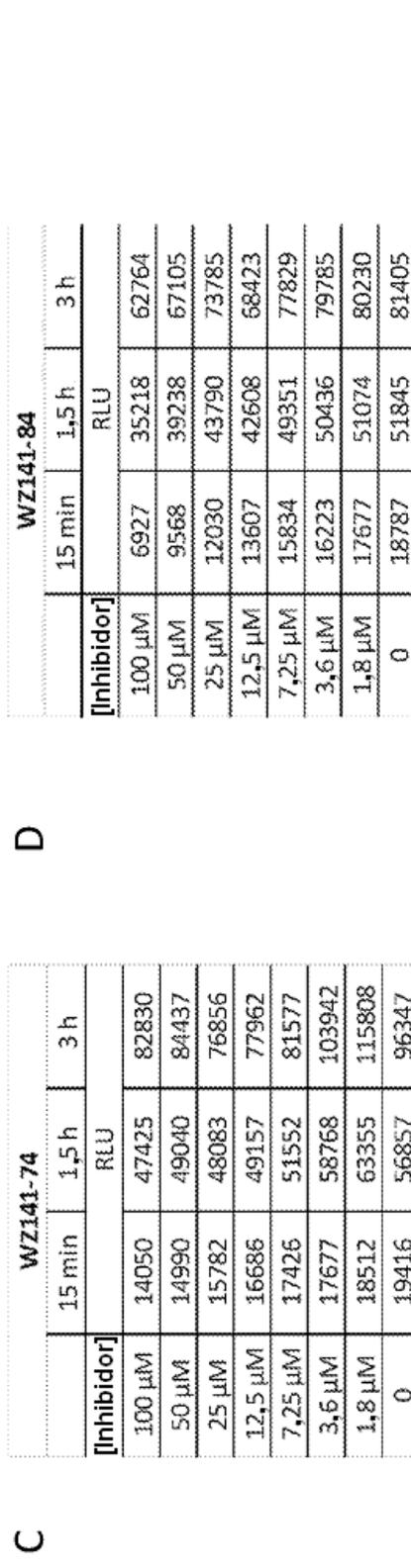
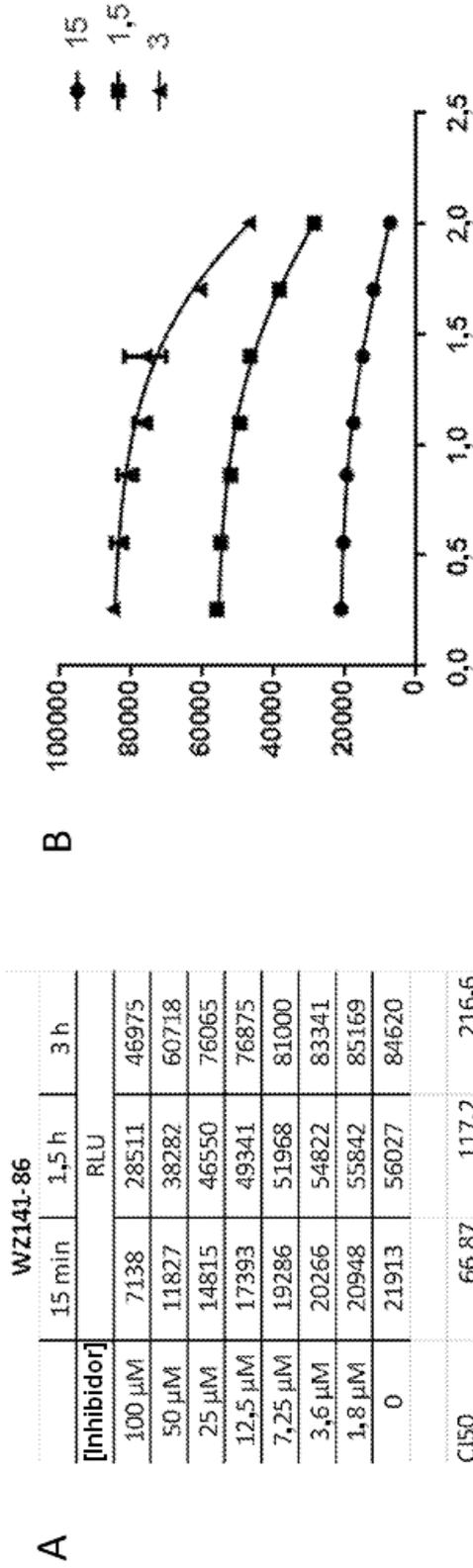


FIG. 3



FIGS. 4A-4D



FIGS. 5A-5D

WZ141-91			
	15 min	1,5 h	3 h
[Inhibidor]	RLU		
100 µM	14121	50681	90633
50 µM	15454	48257	82610
25 µM	17075	47086	80557
12,5 µM	17805	47103	78131
7,25 µM	18562	46951	77770
3,6 µM	19657	48447	79251
1,8 µM	19120	48316	80070
0	20326	49779	80791

WZ141-90			
	15 min	1,5 h	3 h
[Inhibidor]	RLU		
100 µM	12525	41624	72121
50 µM	13879	40551	69451
25 µM	15885	41834	67746
12,5 µM	17152	42802	68130
7,25 µM	18265	44364	70010
3,6 µM	18786	45342	70609
1,8 µM	19968	48547	74874
0	21272	49474	75982

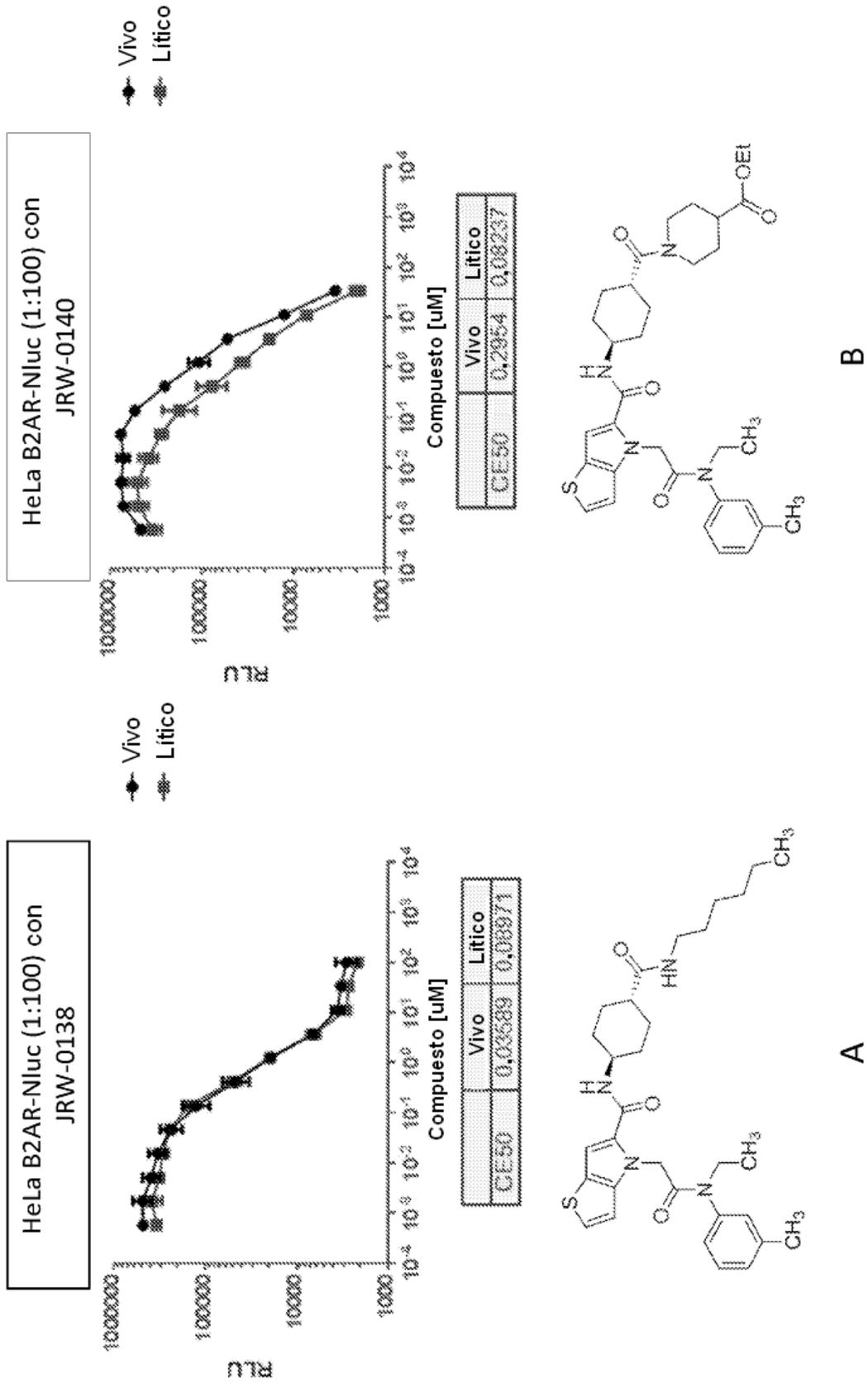
WZ141-89			
	15 min	1,5 h	3 h
[Inhibidor]	RLU		
100 µM	9199	39835	78109
50 µM	12384	43739	78050
25 µM	14868	48293	86555
12,5 µM	15802	45203	76954
7,25 µM	16667	47168	83983
3,6 µM	19679	53187	86724
1,8 µM	20849	54163	88151
0	23061	54281	84519

A

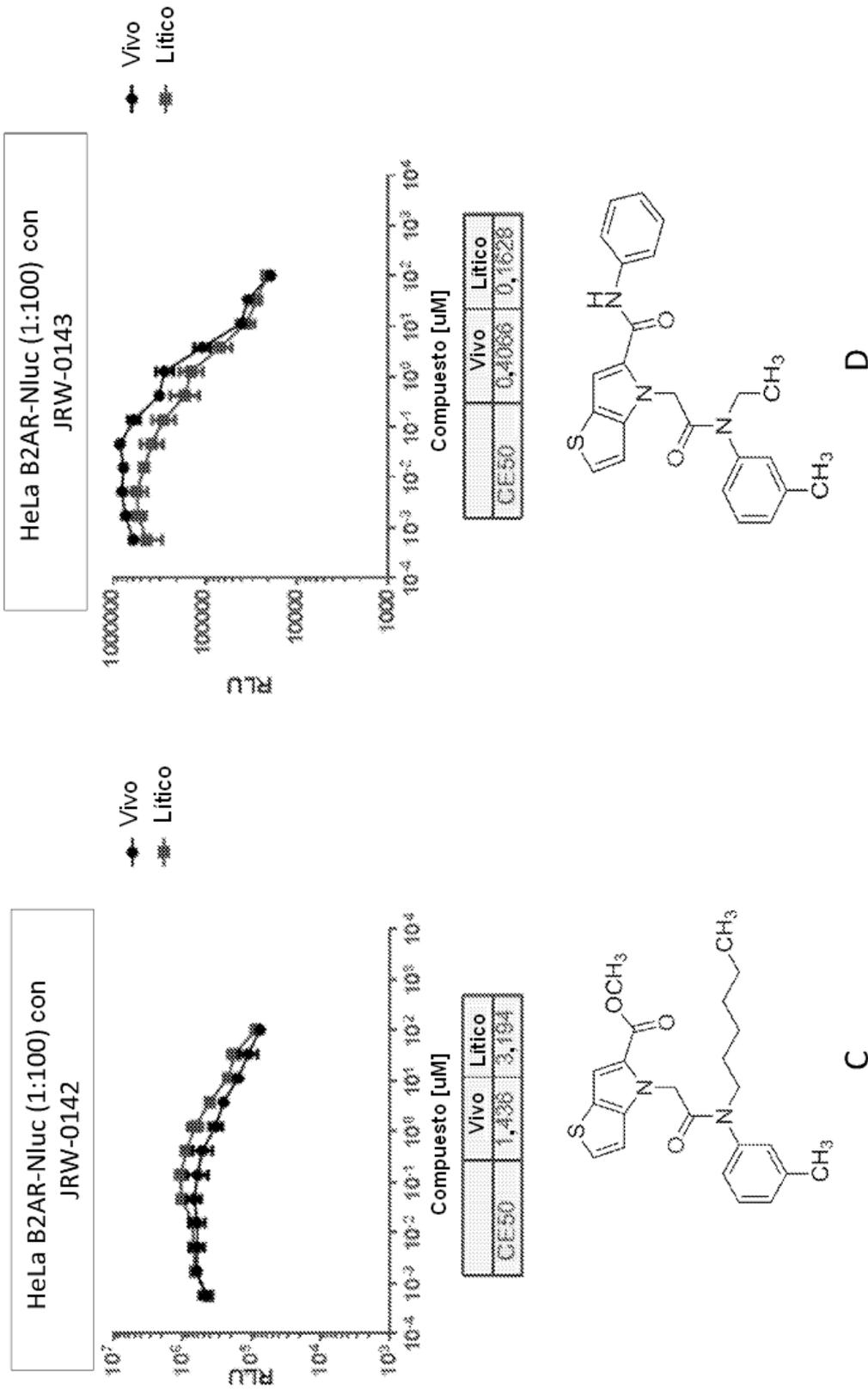
B

C

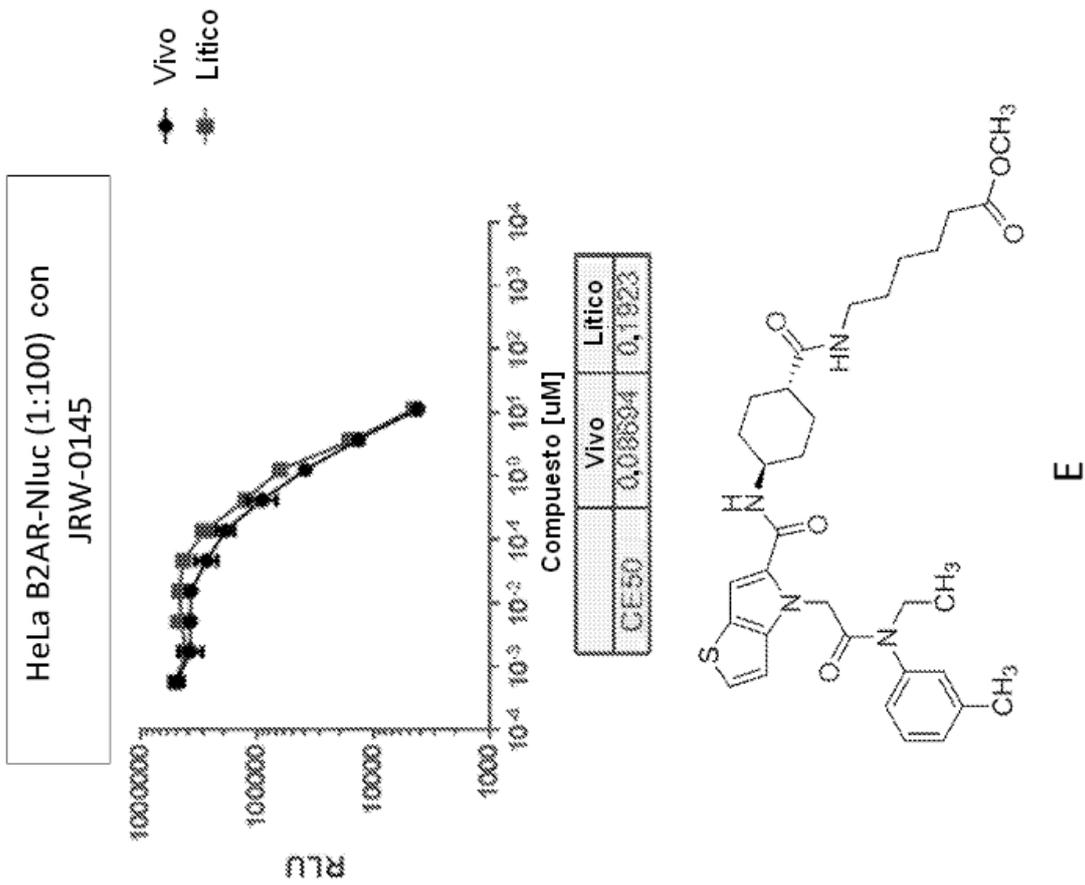
FIGS. 6A-6C



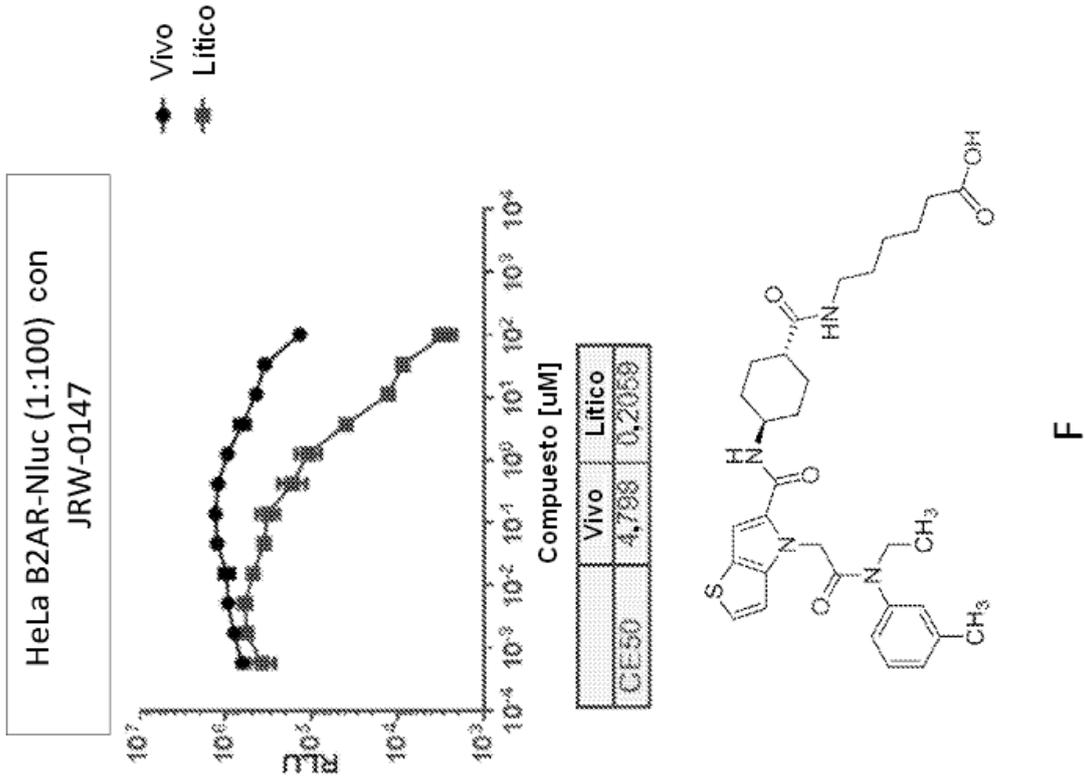
FIGS. 7A-7B



FIGS. 7C-7D

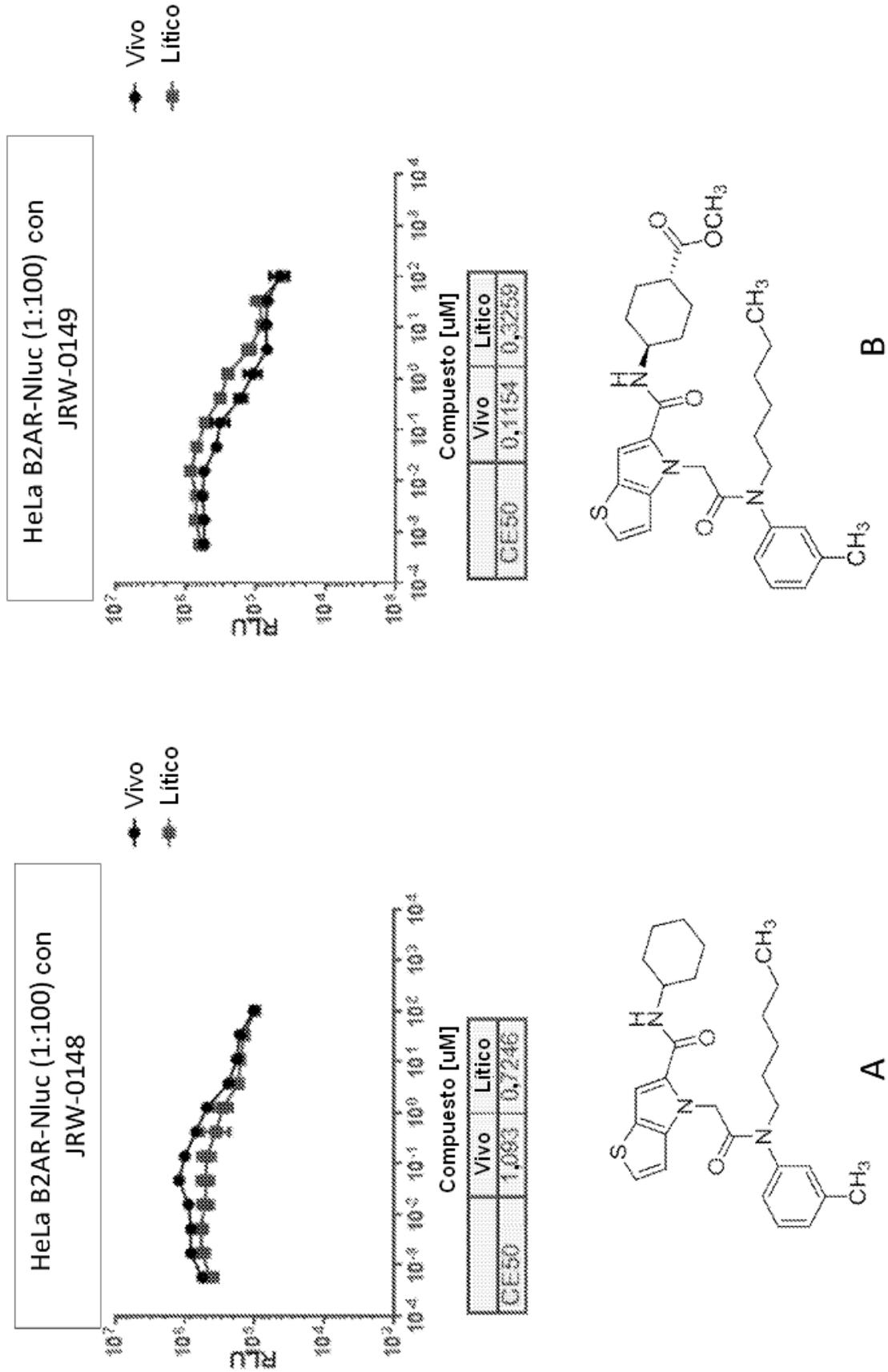


E

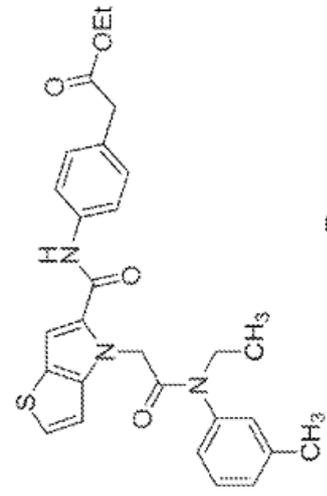
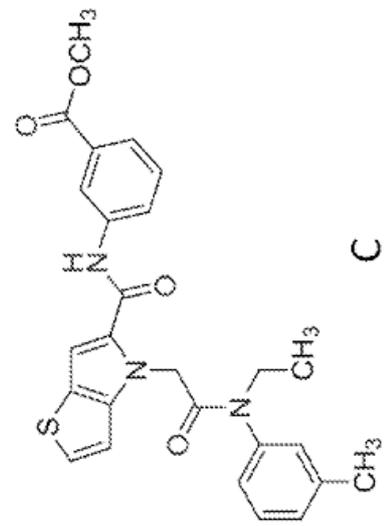
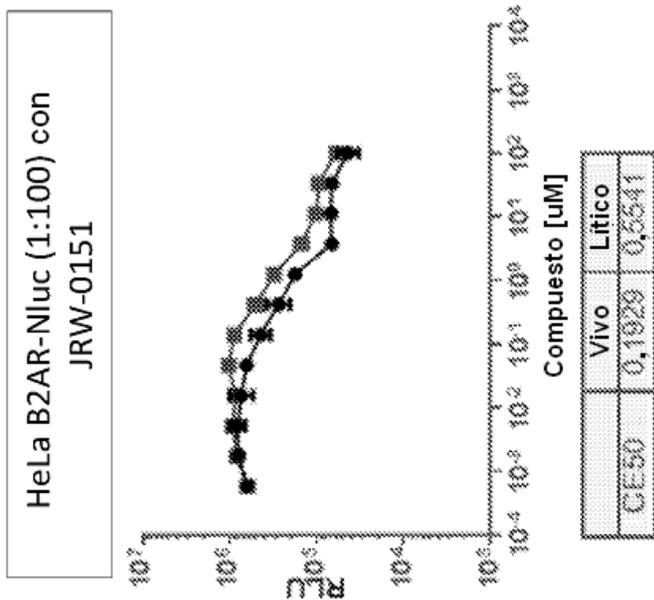
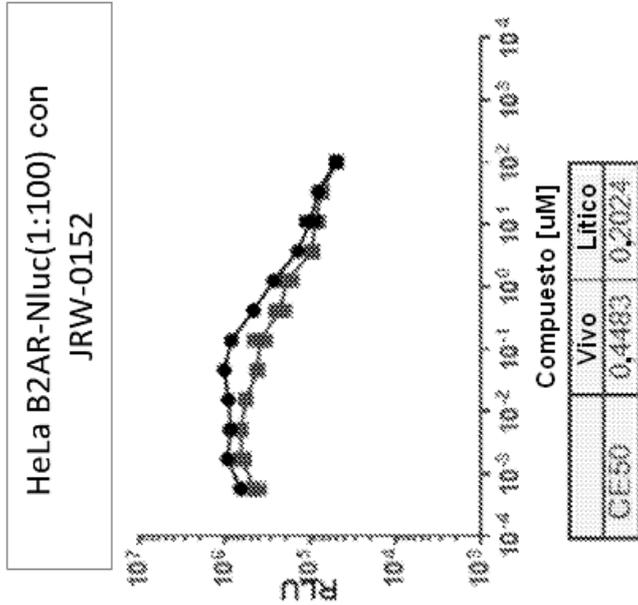


F

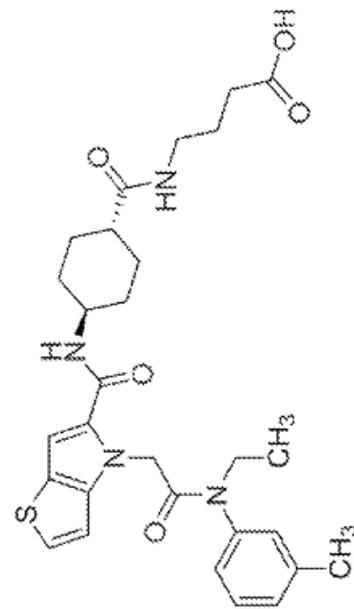
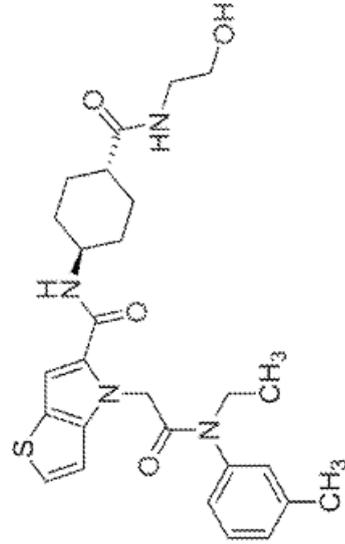
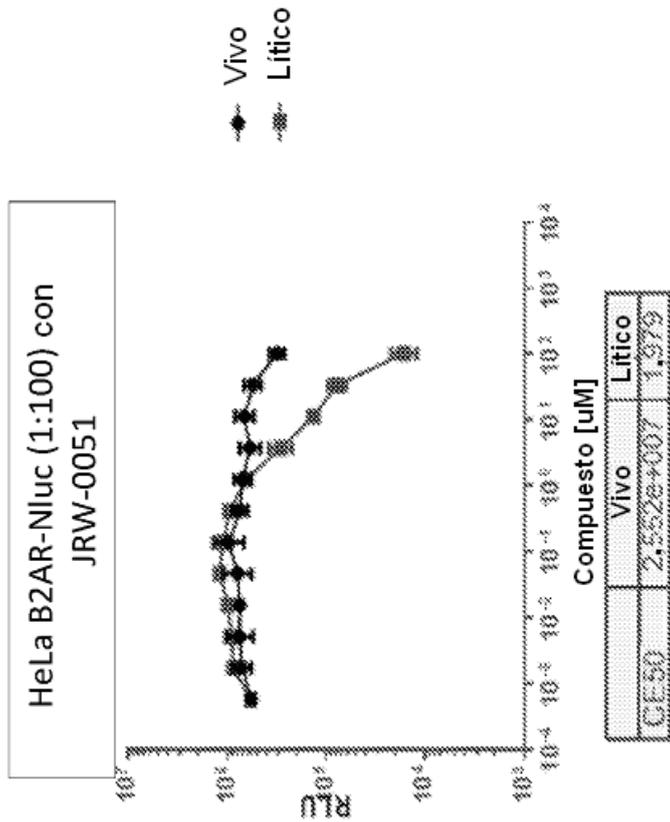
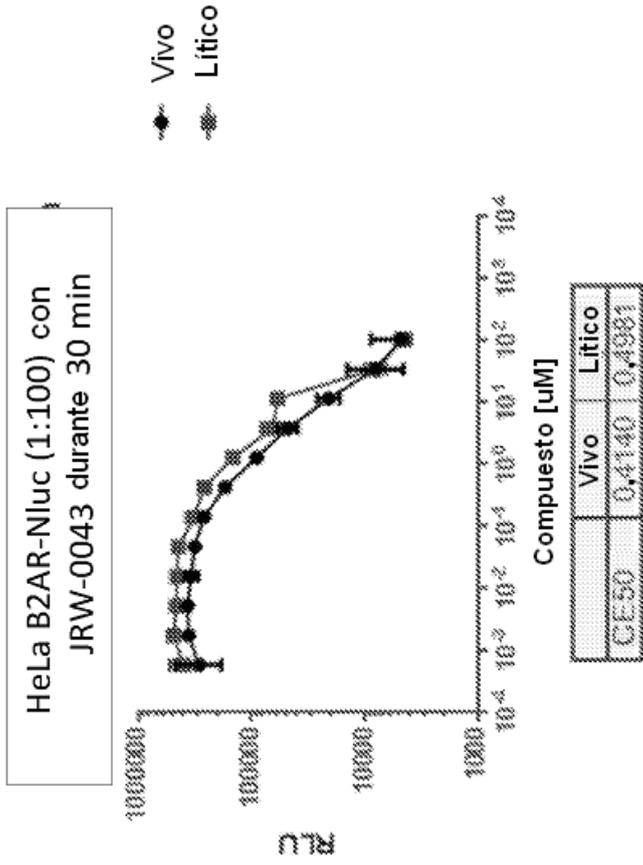
FIGS. 7E-7F



FIGS. 8A-8B



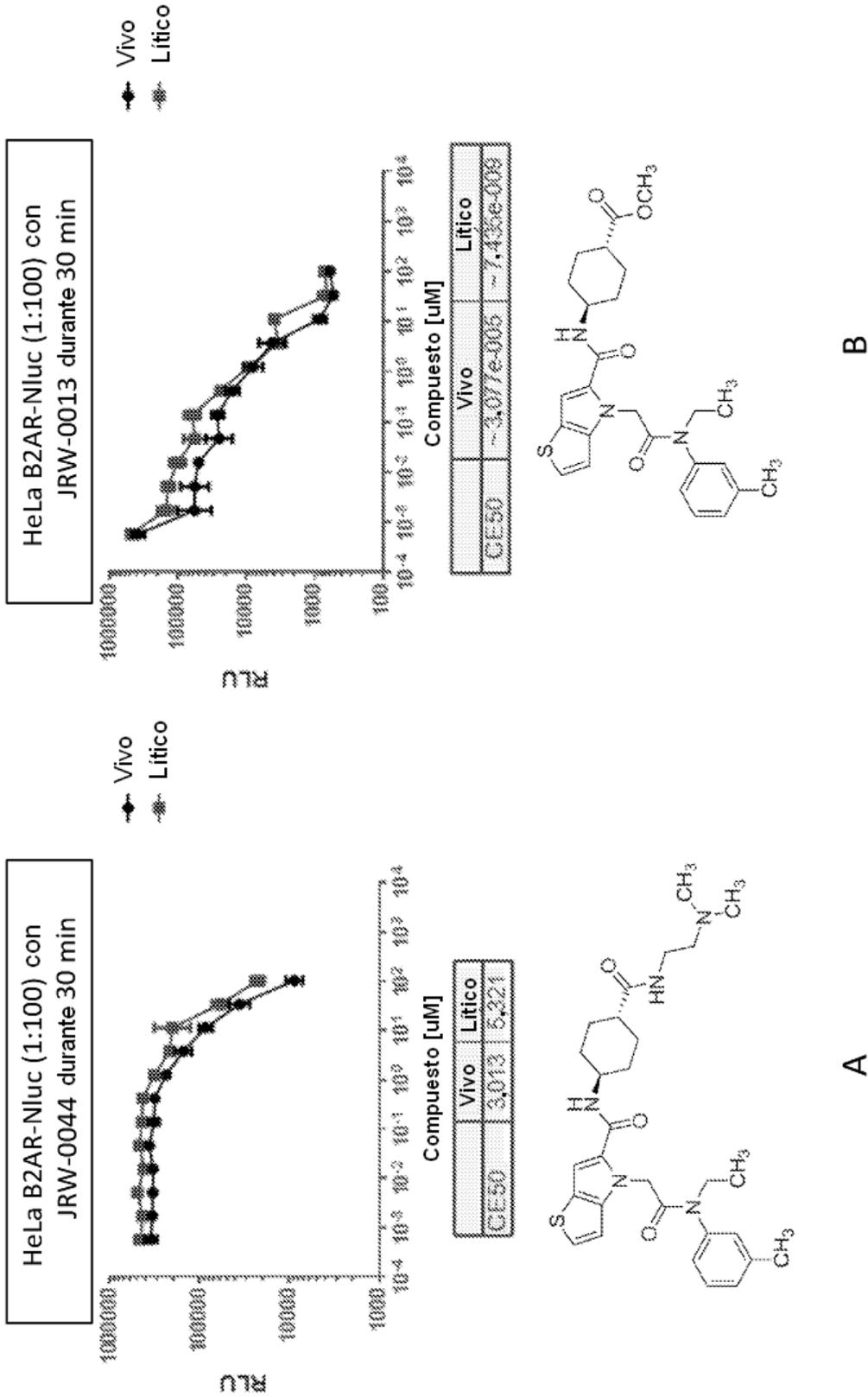
FIGS. 8C-8D



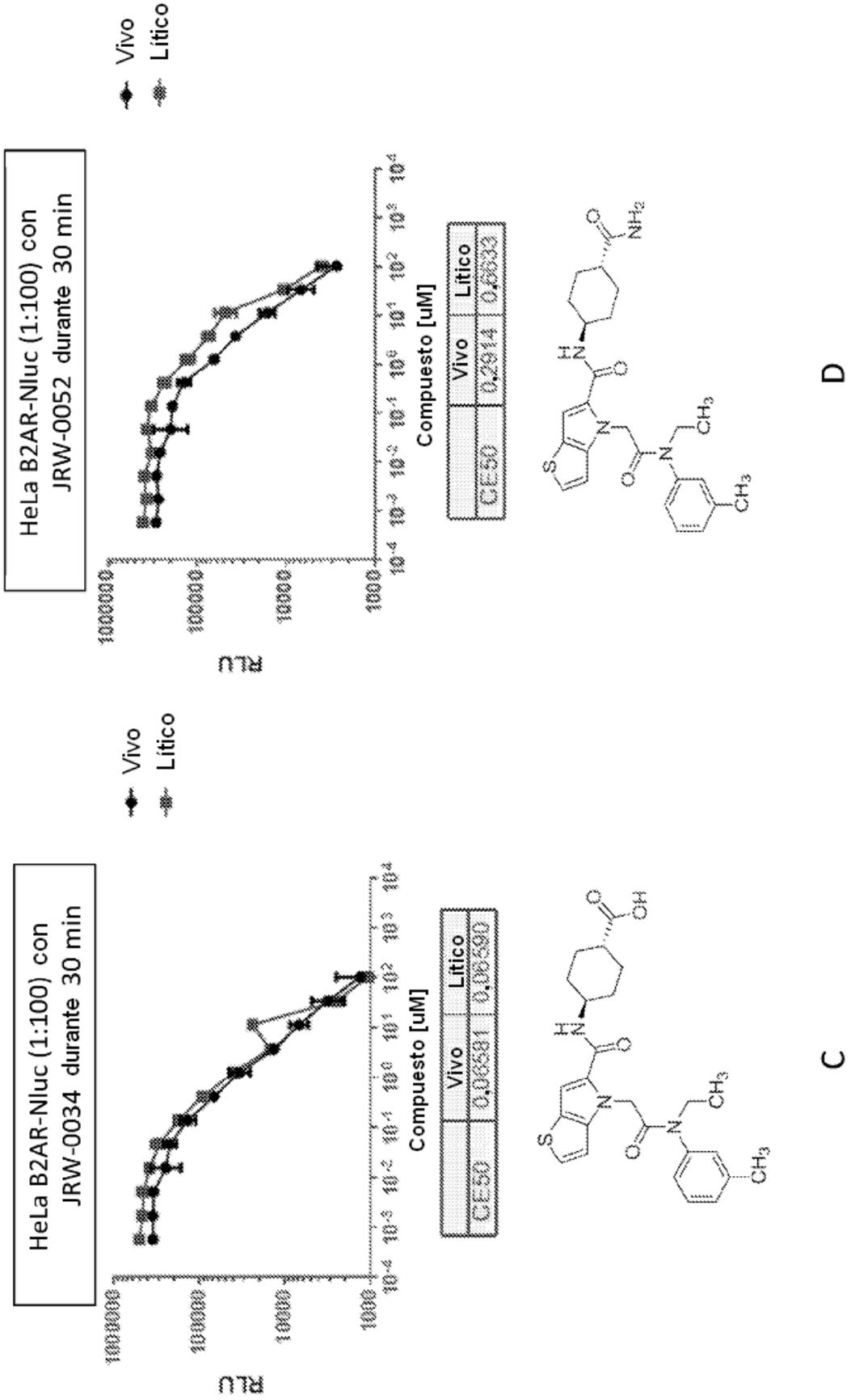
F

E

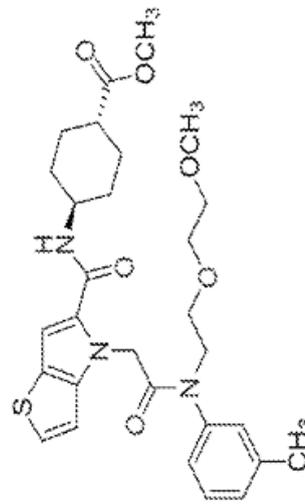
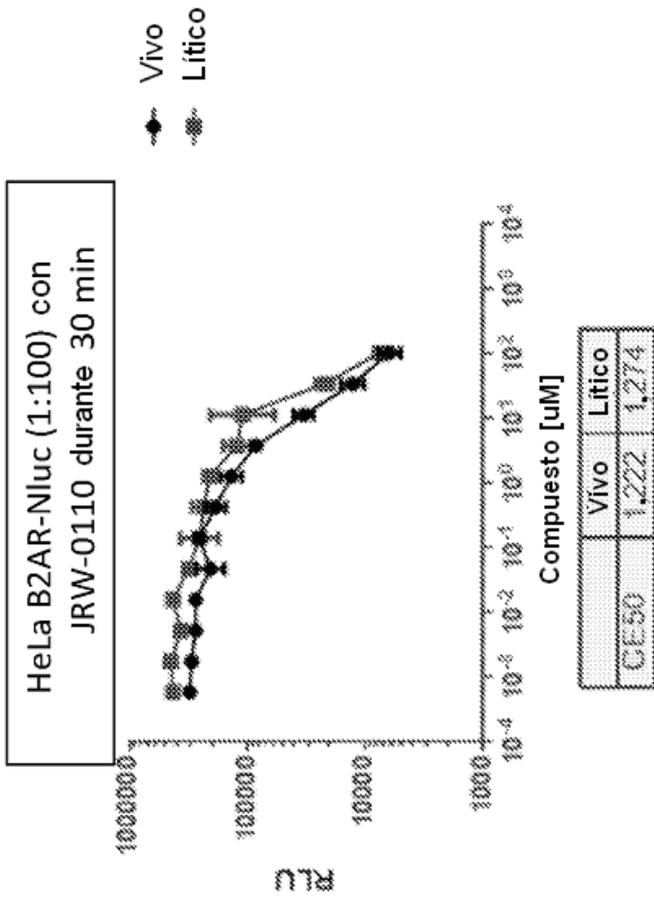
FIGS. 8E-8F



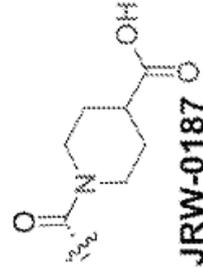
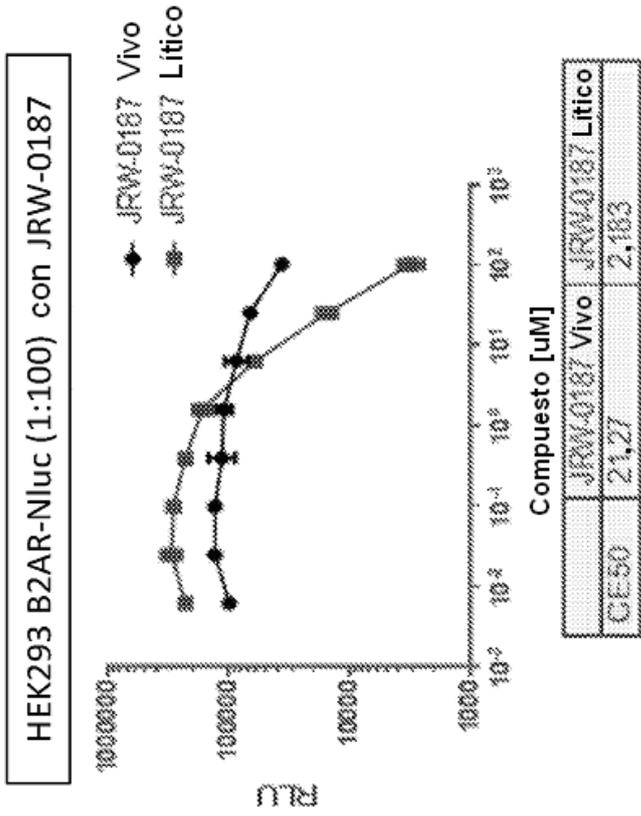
FIGS. 9A-9B



FIGS. 9C-9D

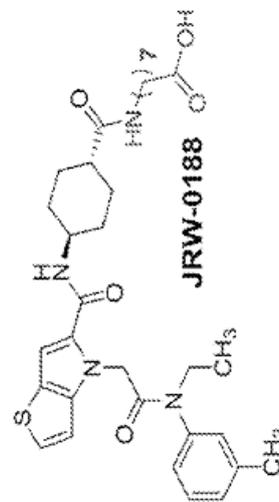
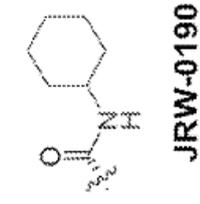
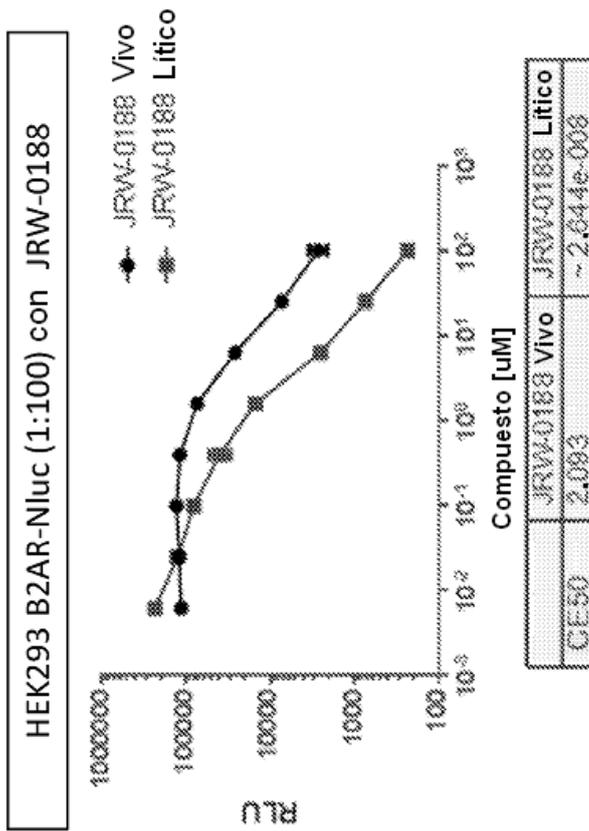
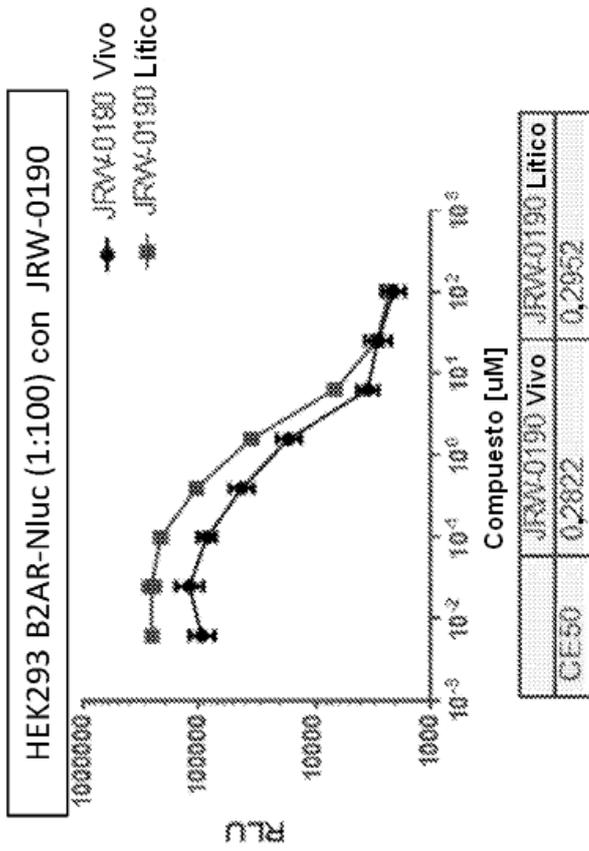


E



F

FIGS. 9E-9F

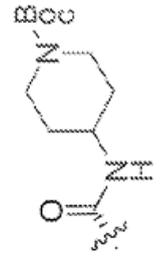
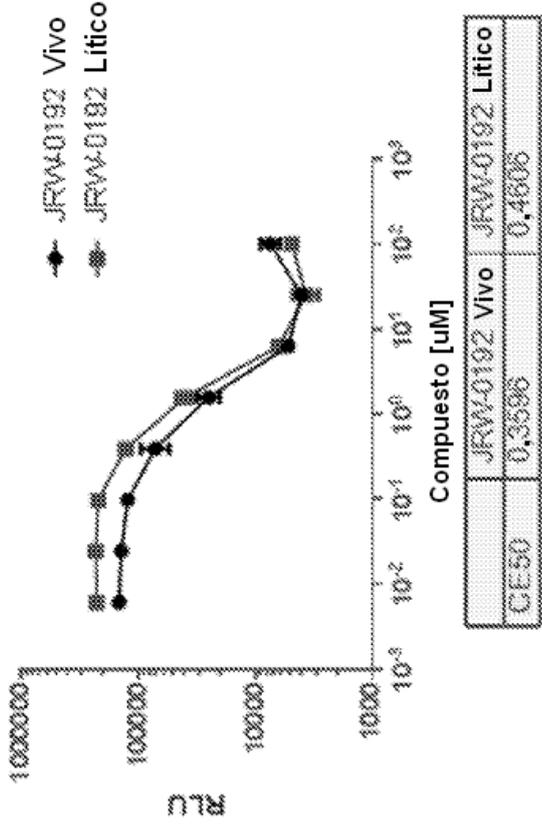


B

A

FIGS. 10A-10B

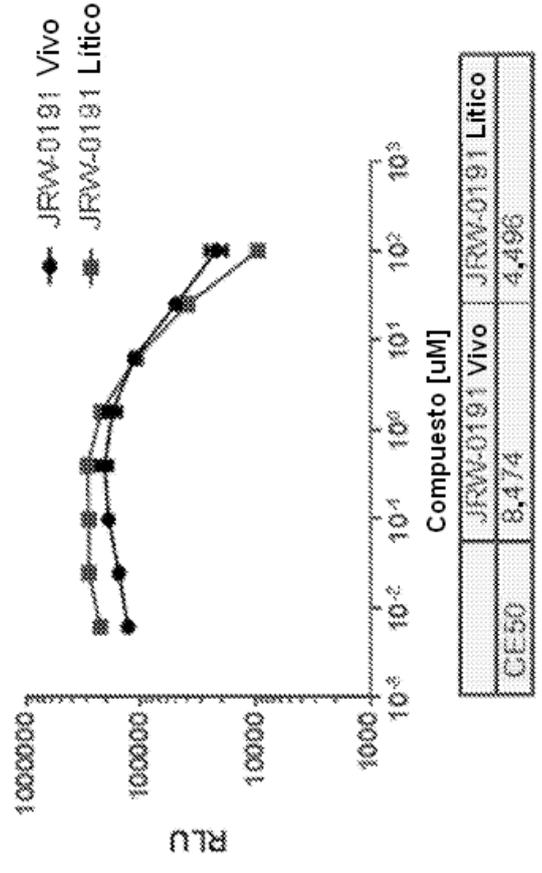
HEK293 B2AR-Nluc (1:100) con JRW-0192



JRW-0192

D

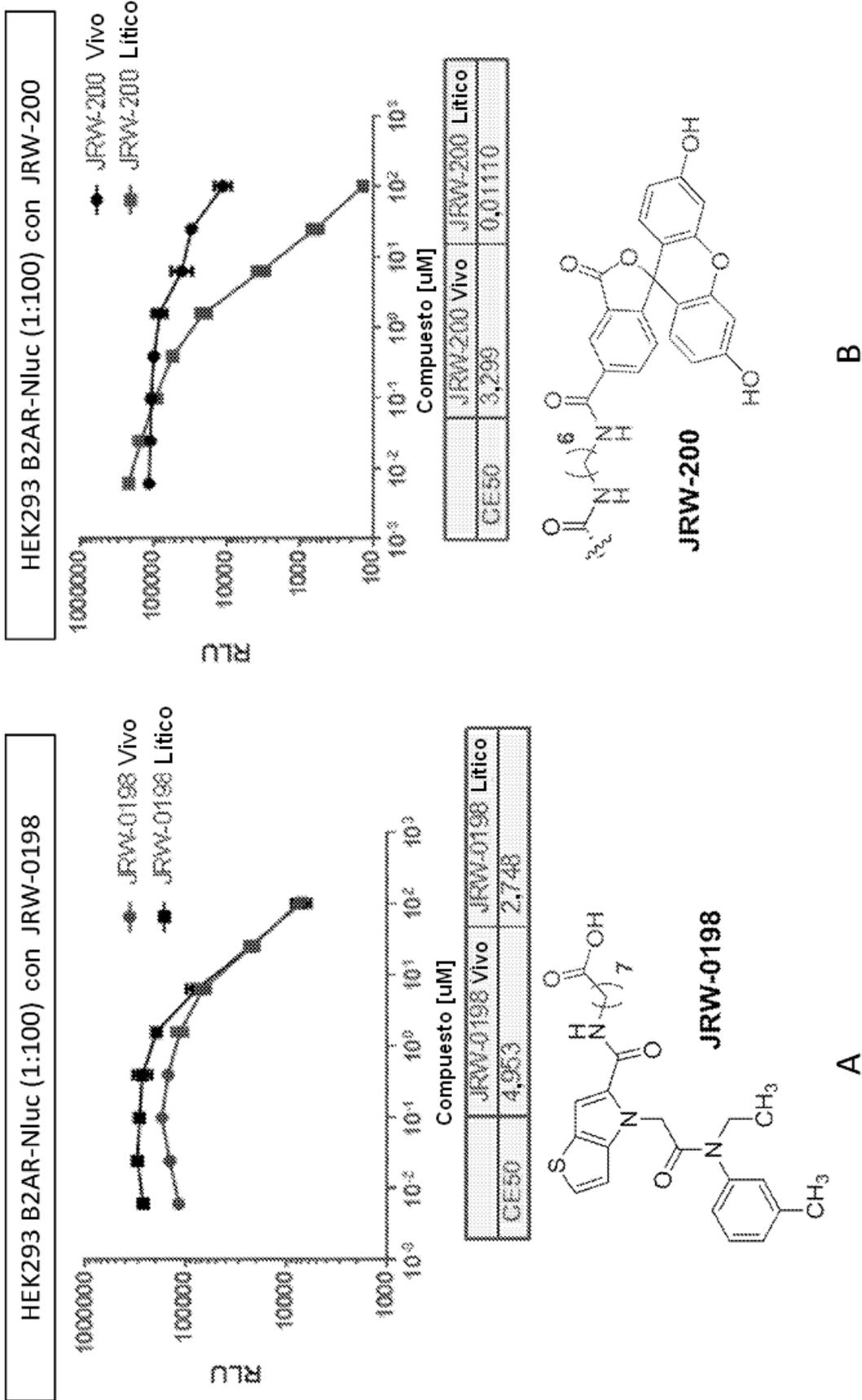
HEK293 B2AR-Nluc (1:100) con JRW-0191



JRW-0191

C

FIGS. 10C-10D



FIGS. 11A-11B

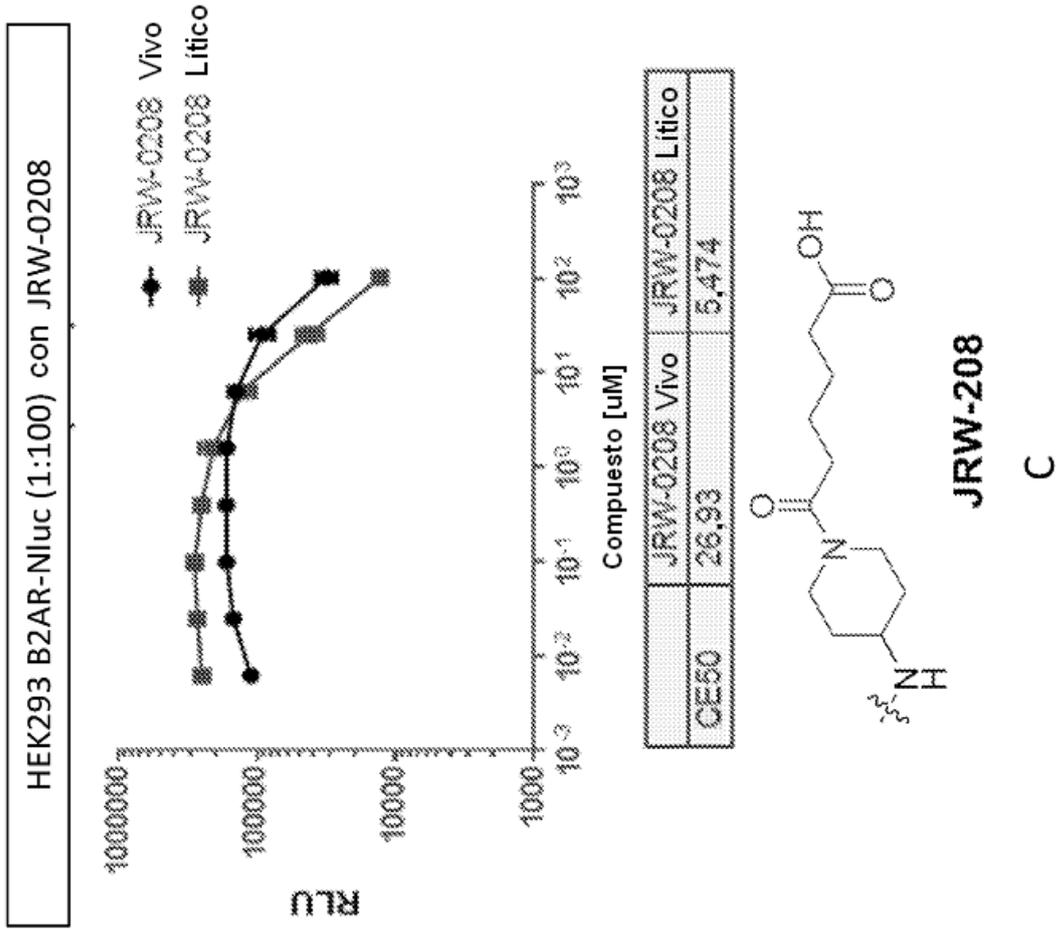


FIG. 11C

BRET extracelular parásita

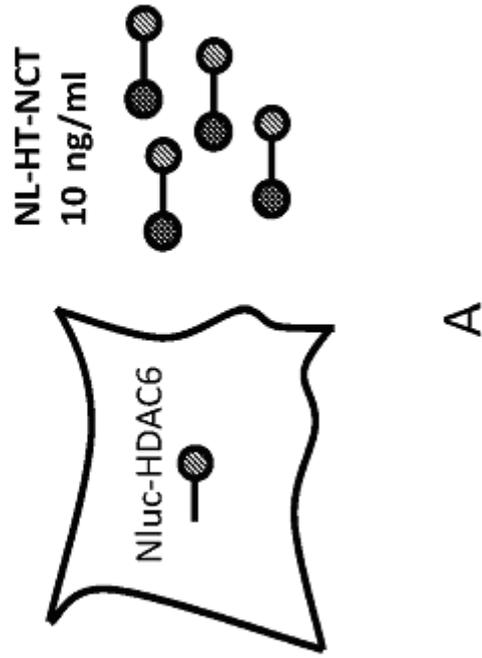
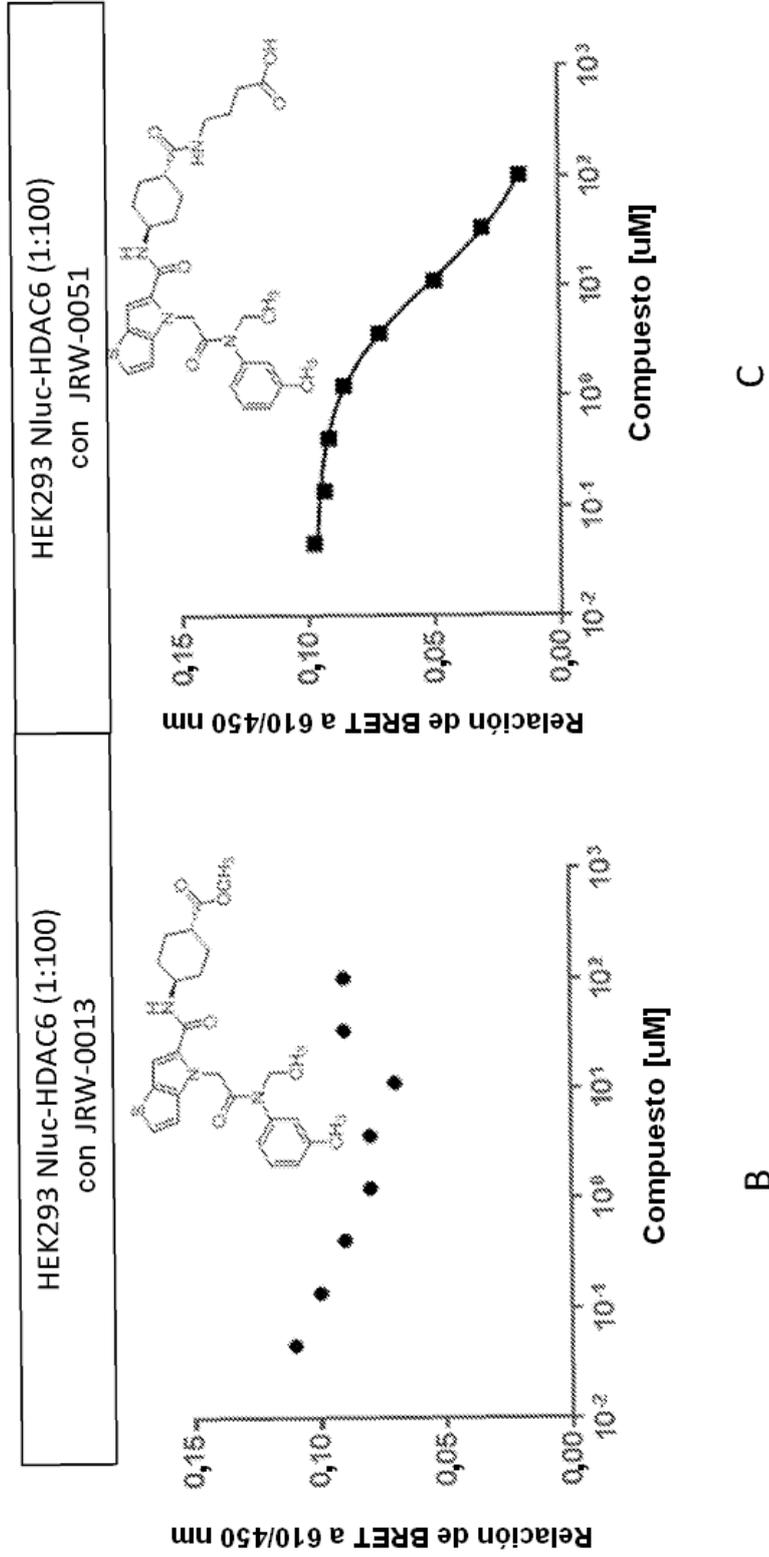
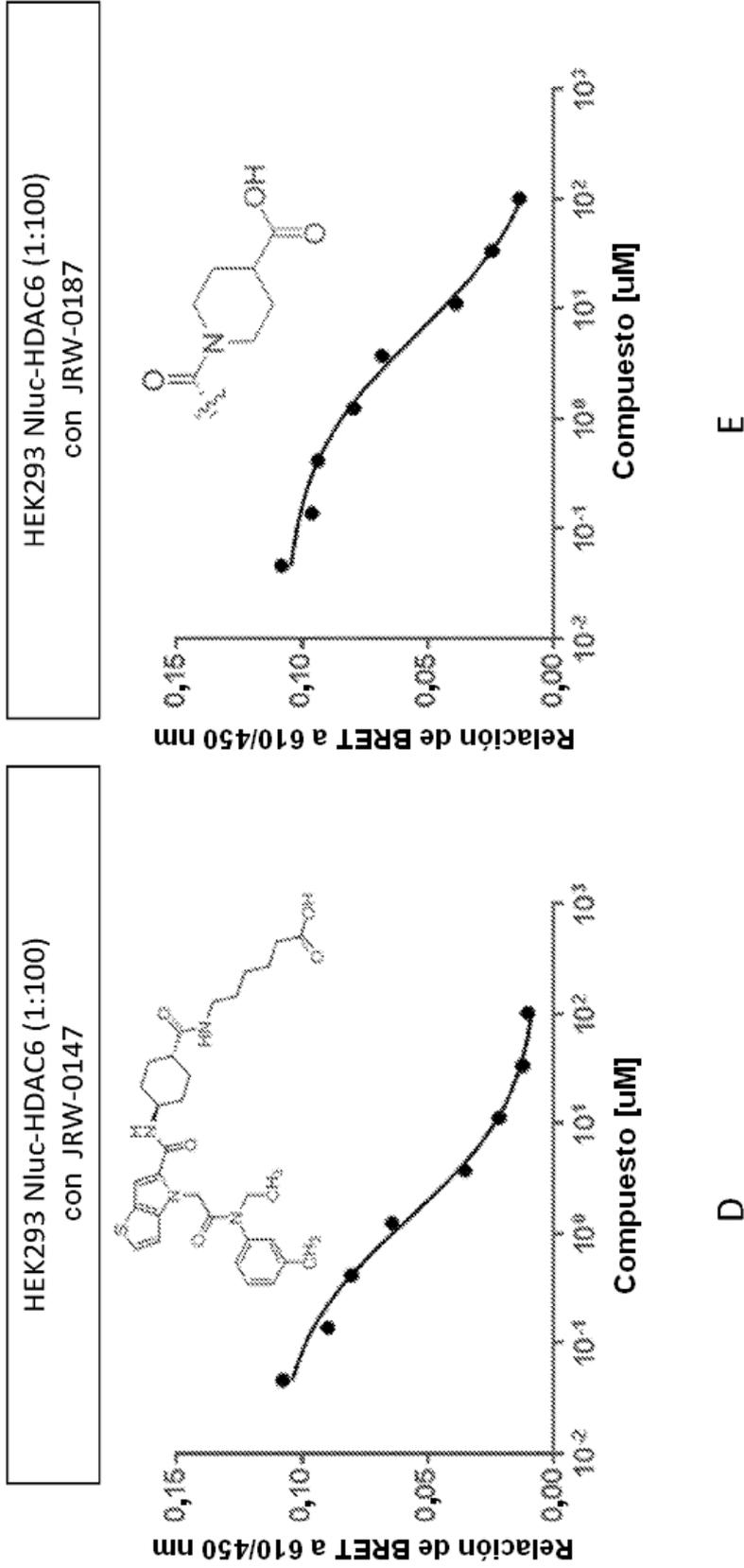


FIG. 12A

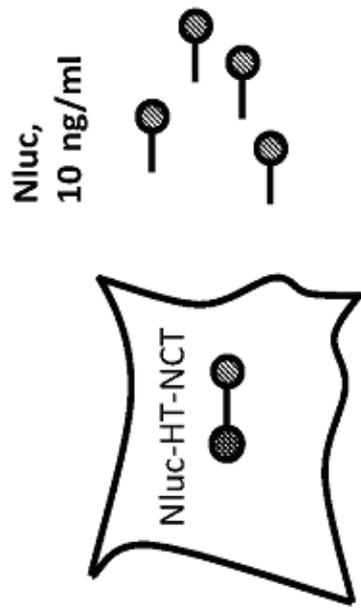


FIGS. 12B-13C



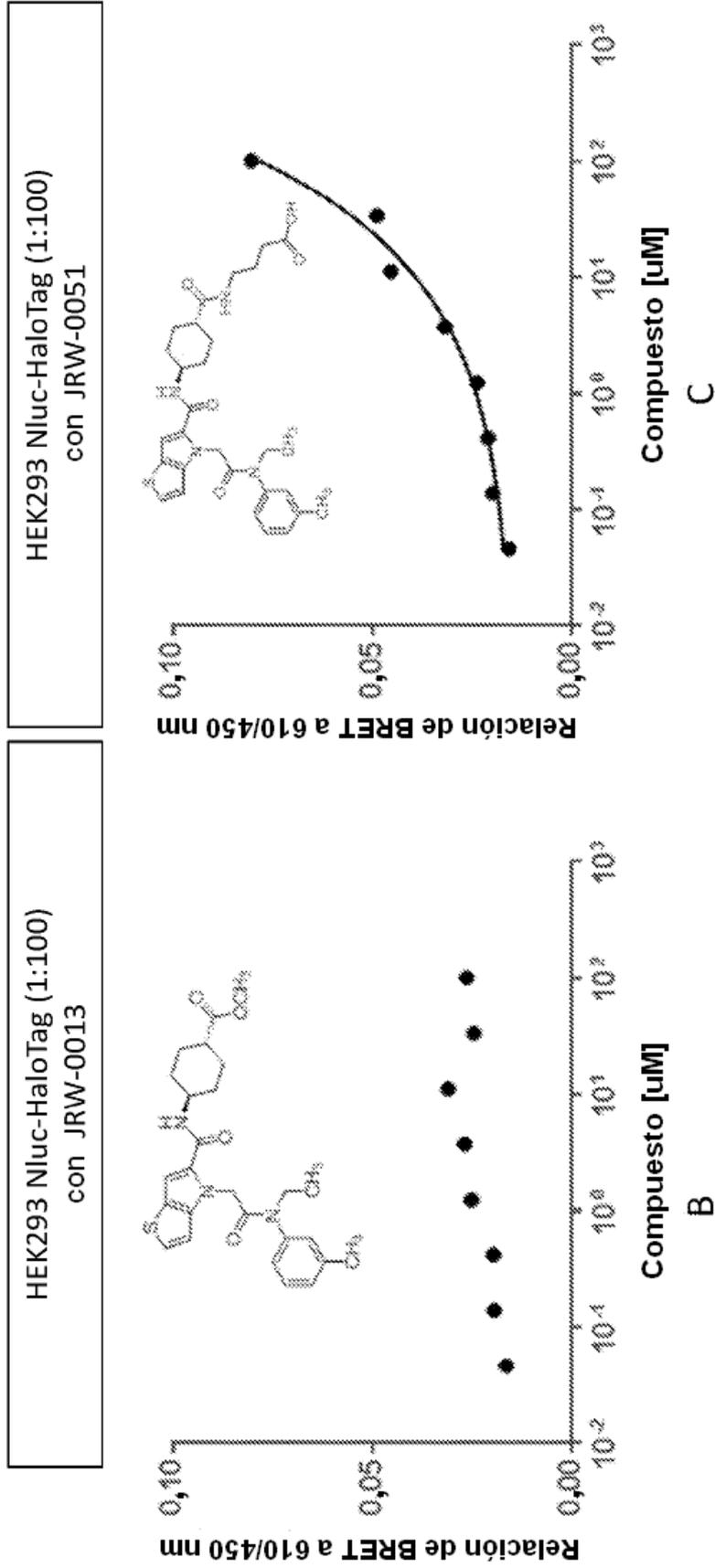
FIGS. 12D-12E

Nluc extracelular parásita



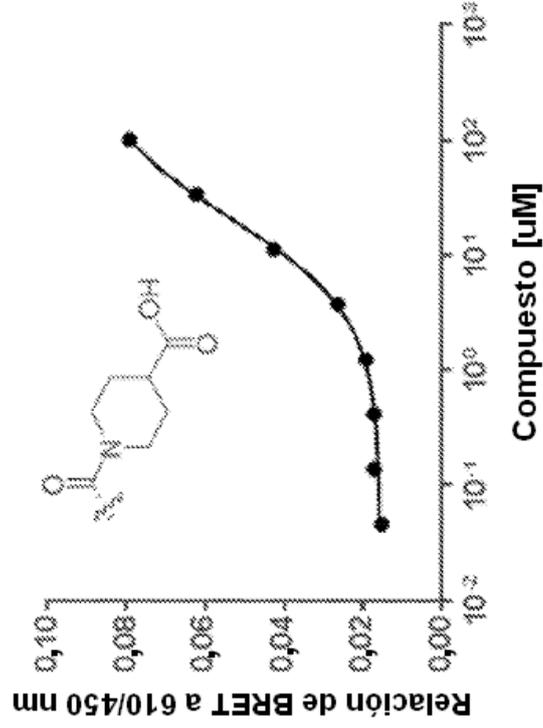
A

FIG. 13A



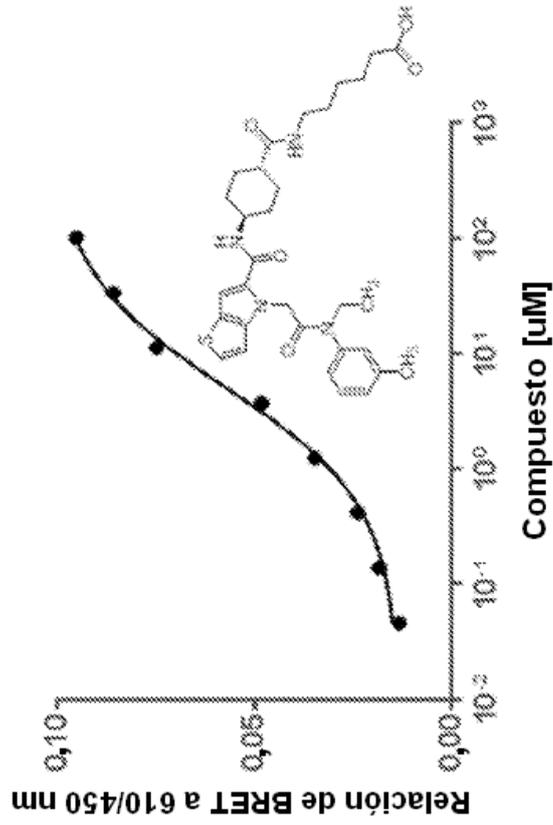
FIGS. 13B-13C

HEK293 Nluc-HaloTag (1:100)
con JRW-0187



E

HEK293 Nluc-HaloTag (1:100)
con JRW-0147



D

FIGS. 13D-13E

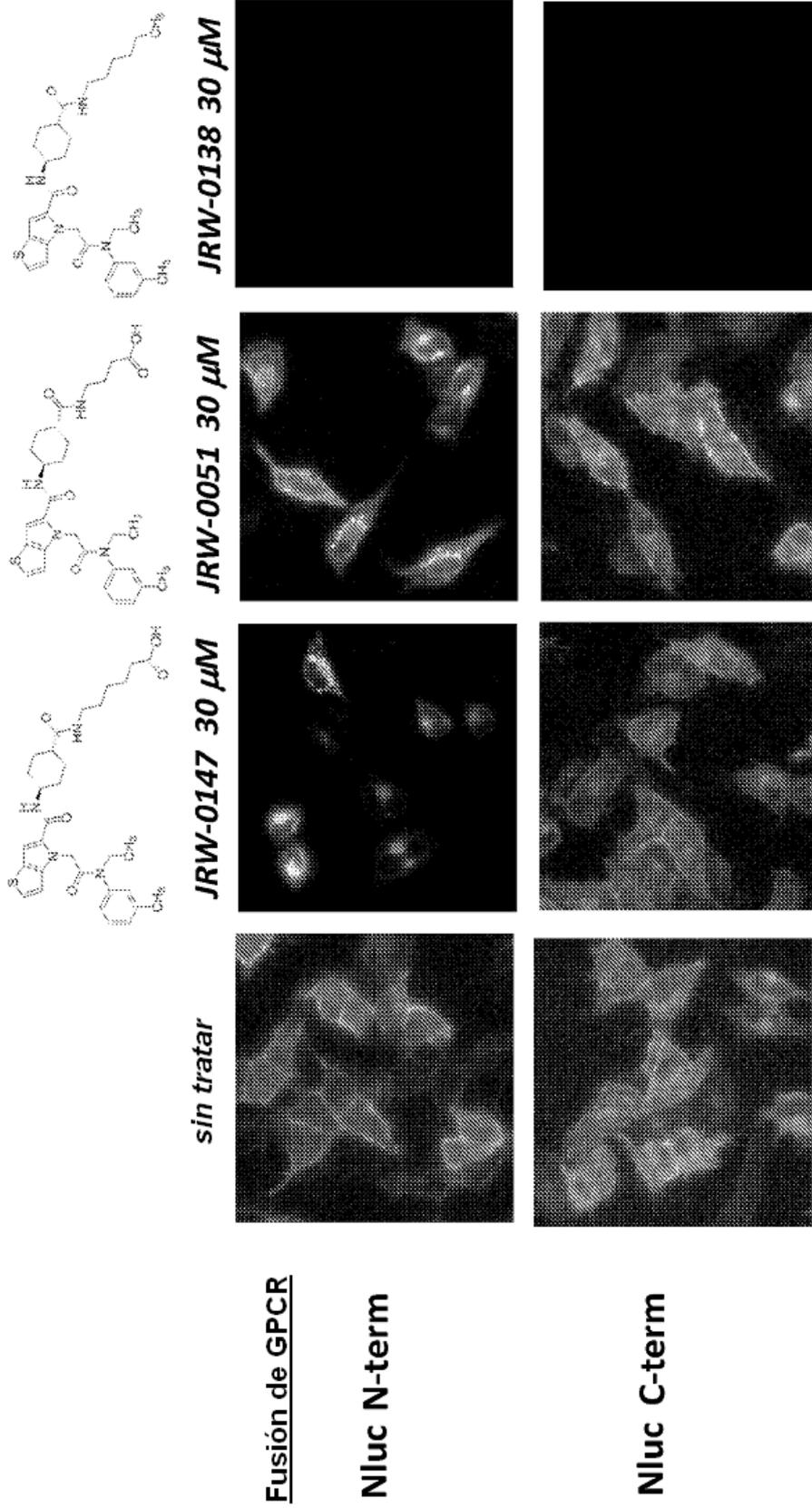
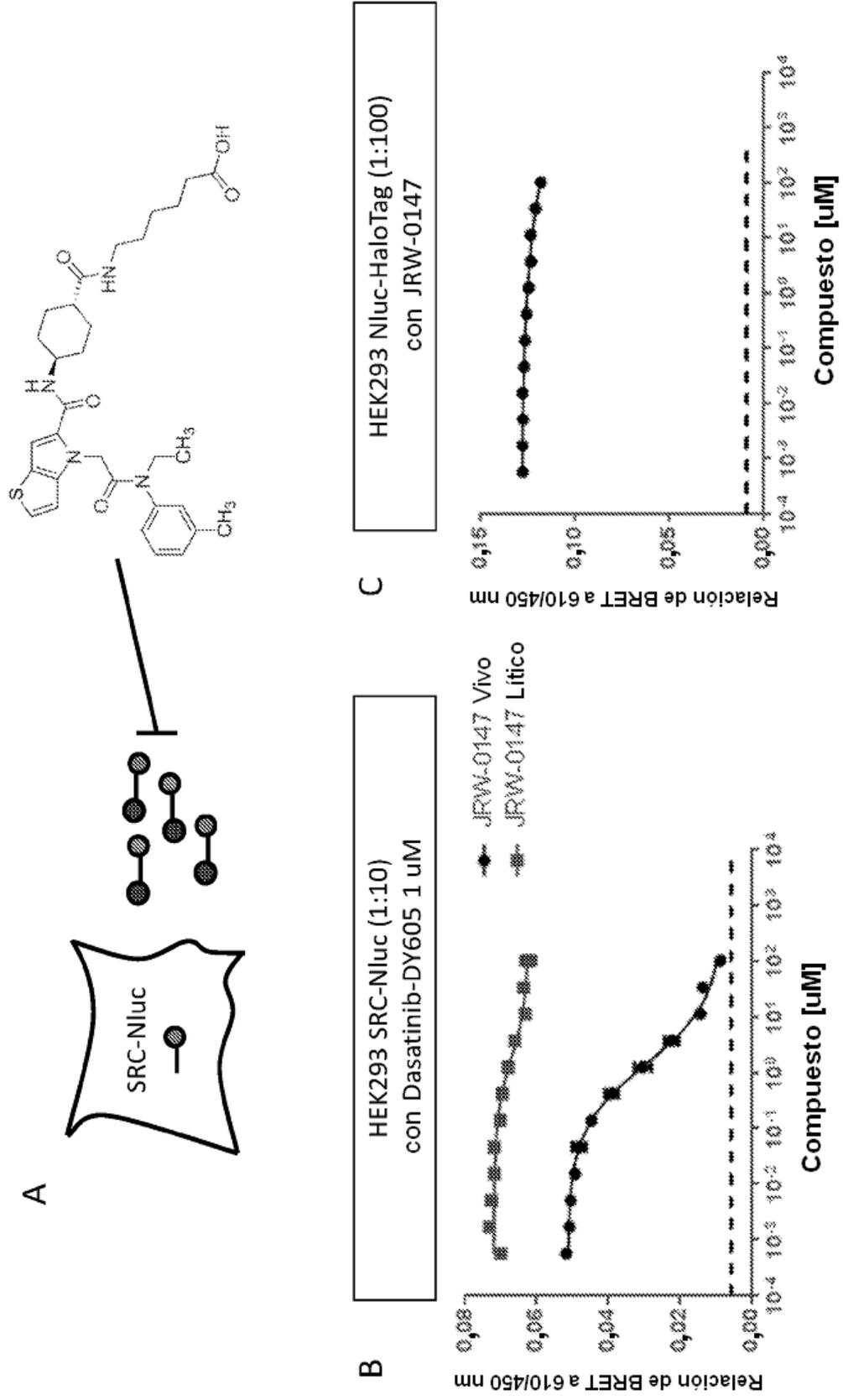


FIG. 14



FIGS. 15A-15C

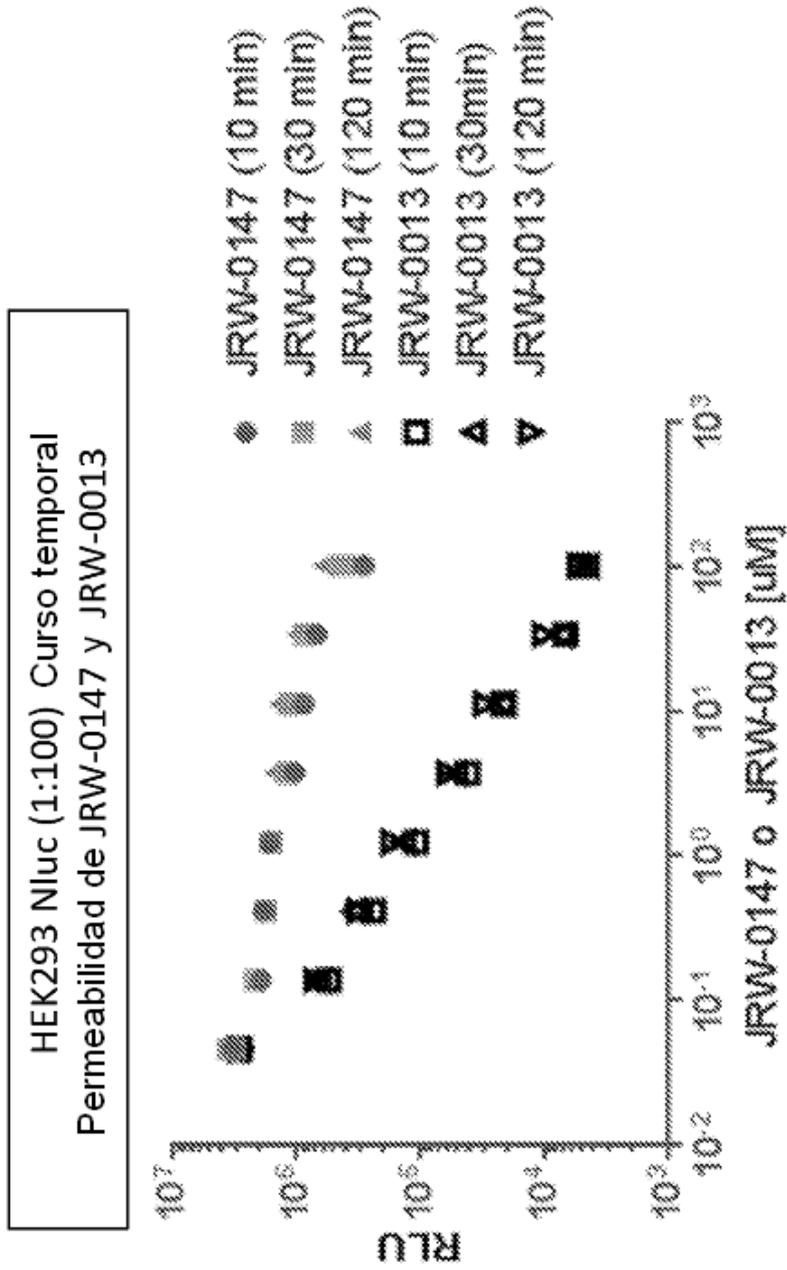
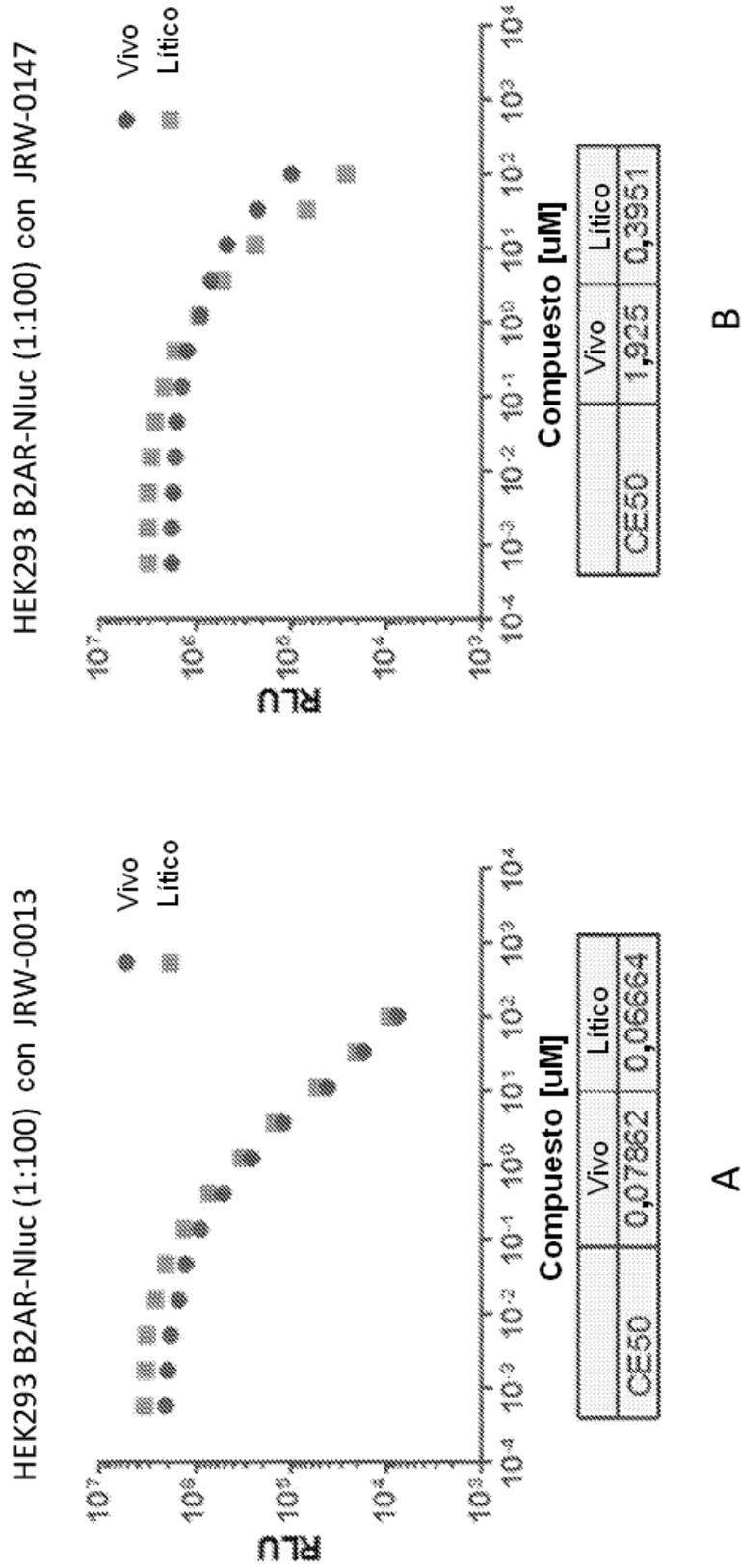


FIG. 16



A

B

FIGS. 17A-17B

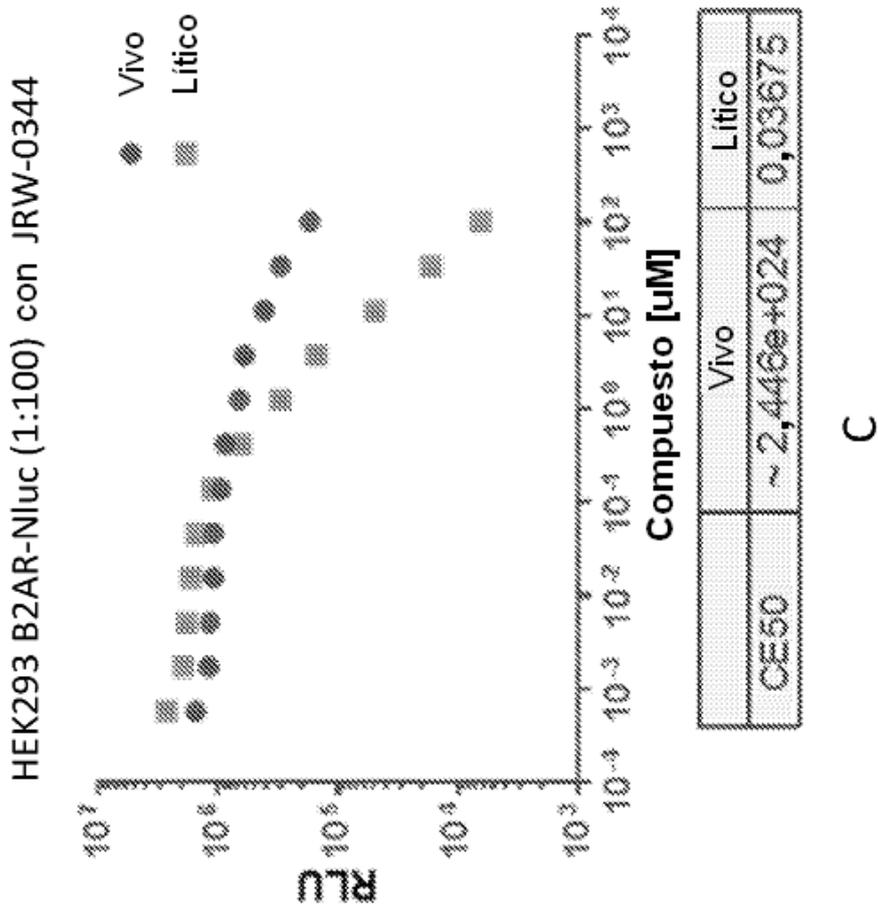


FIG. 17C

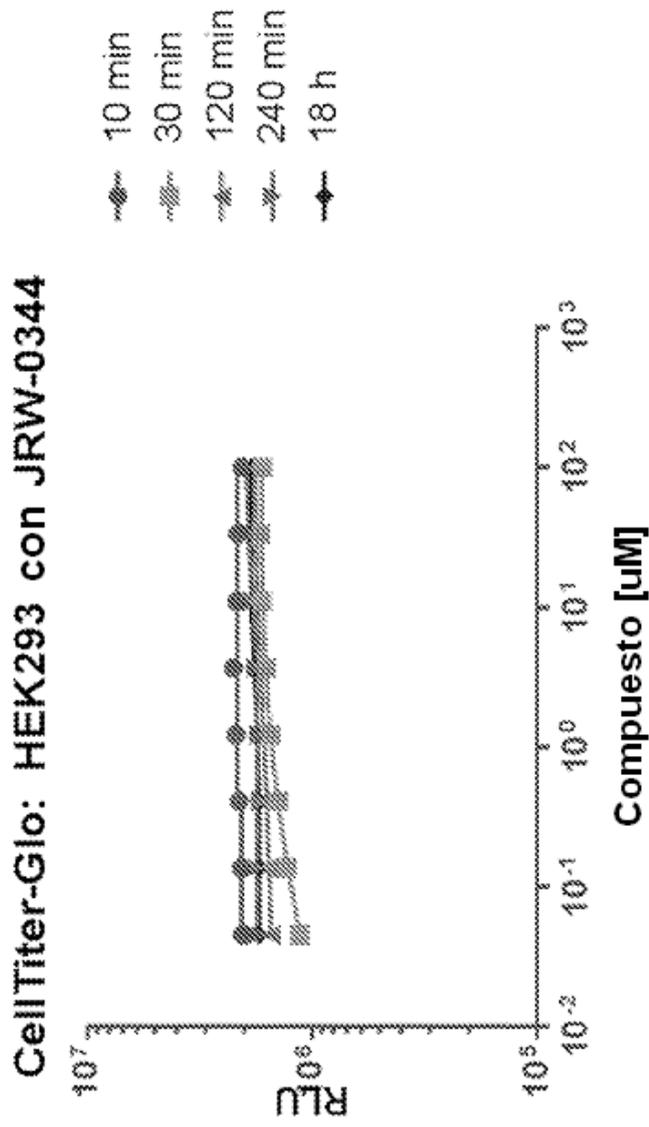


FIG. 18A

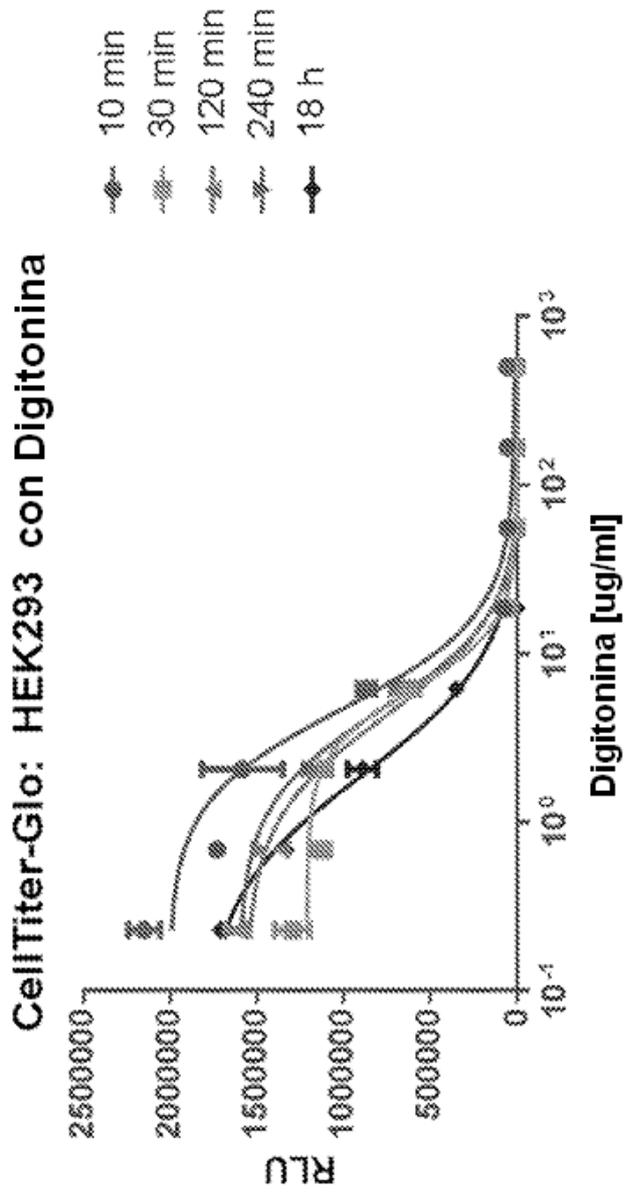


FIG. 18B

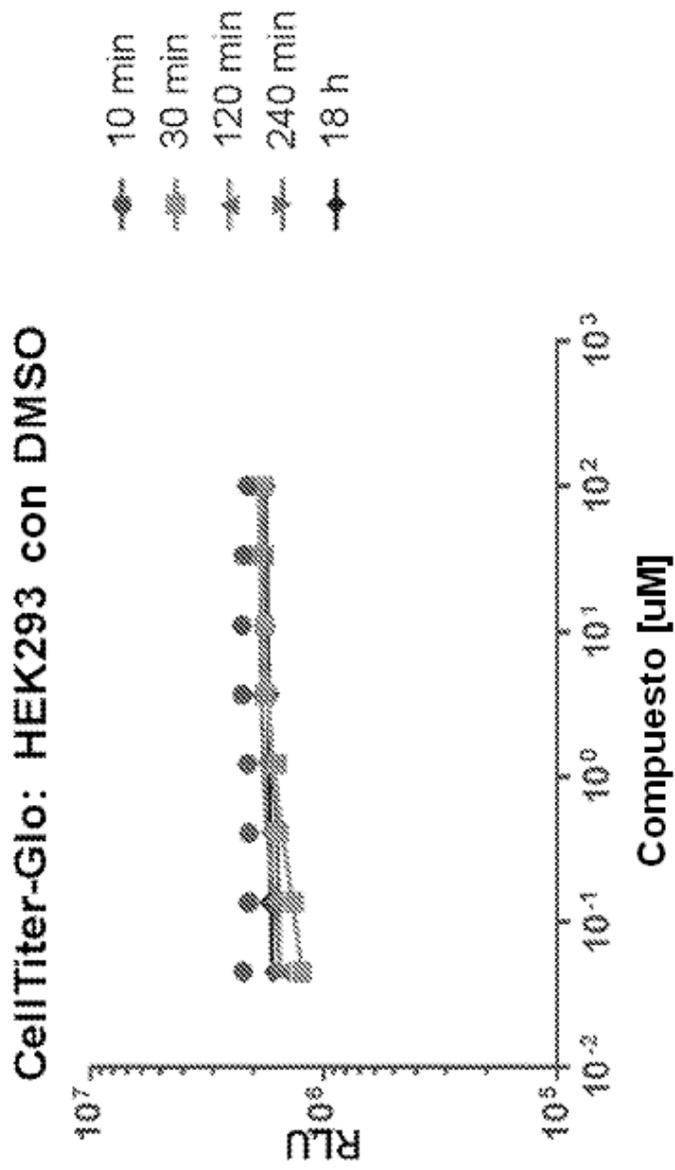
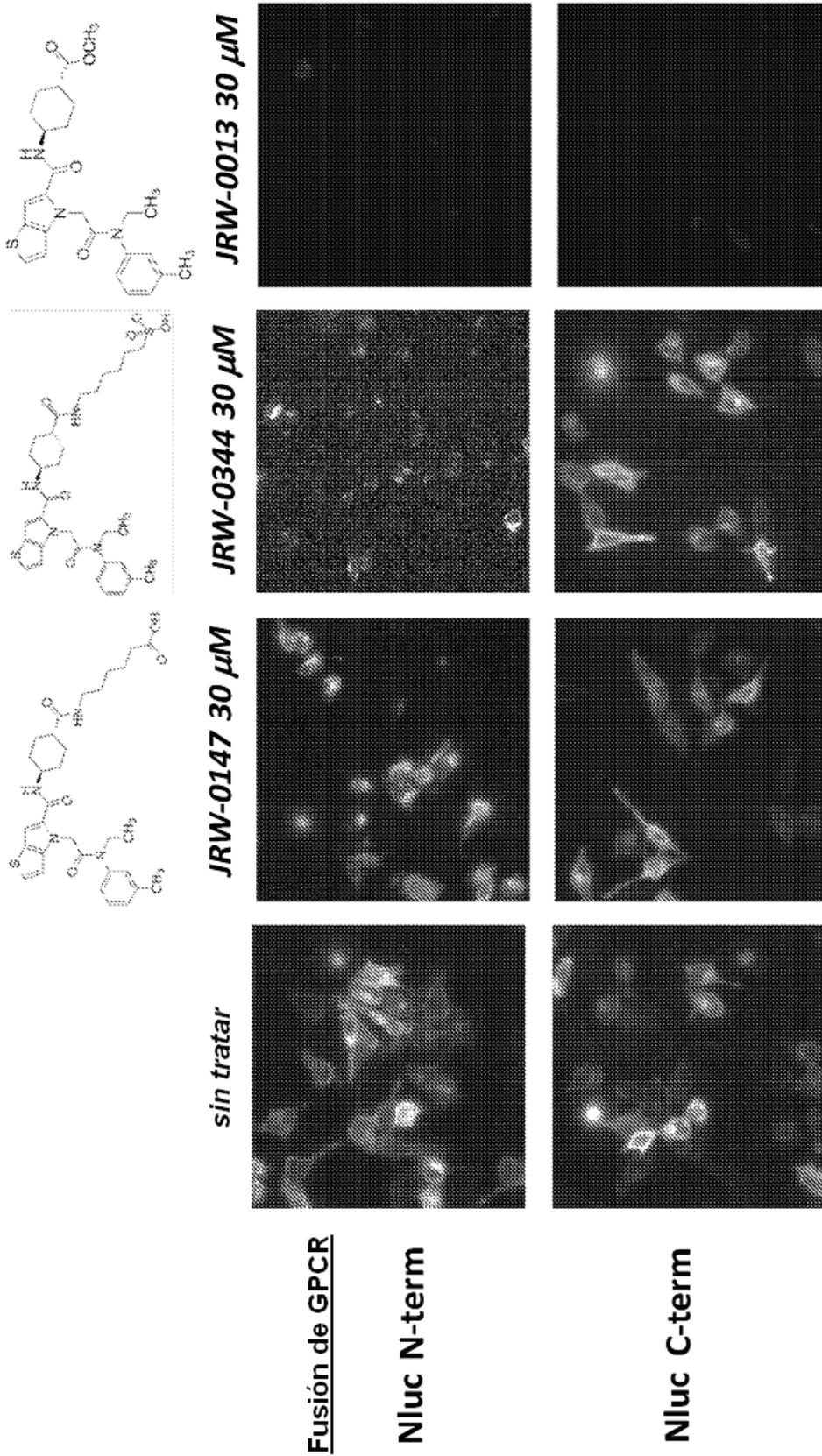
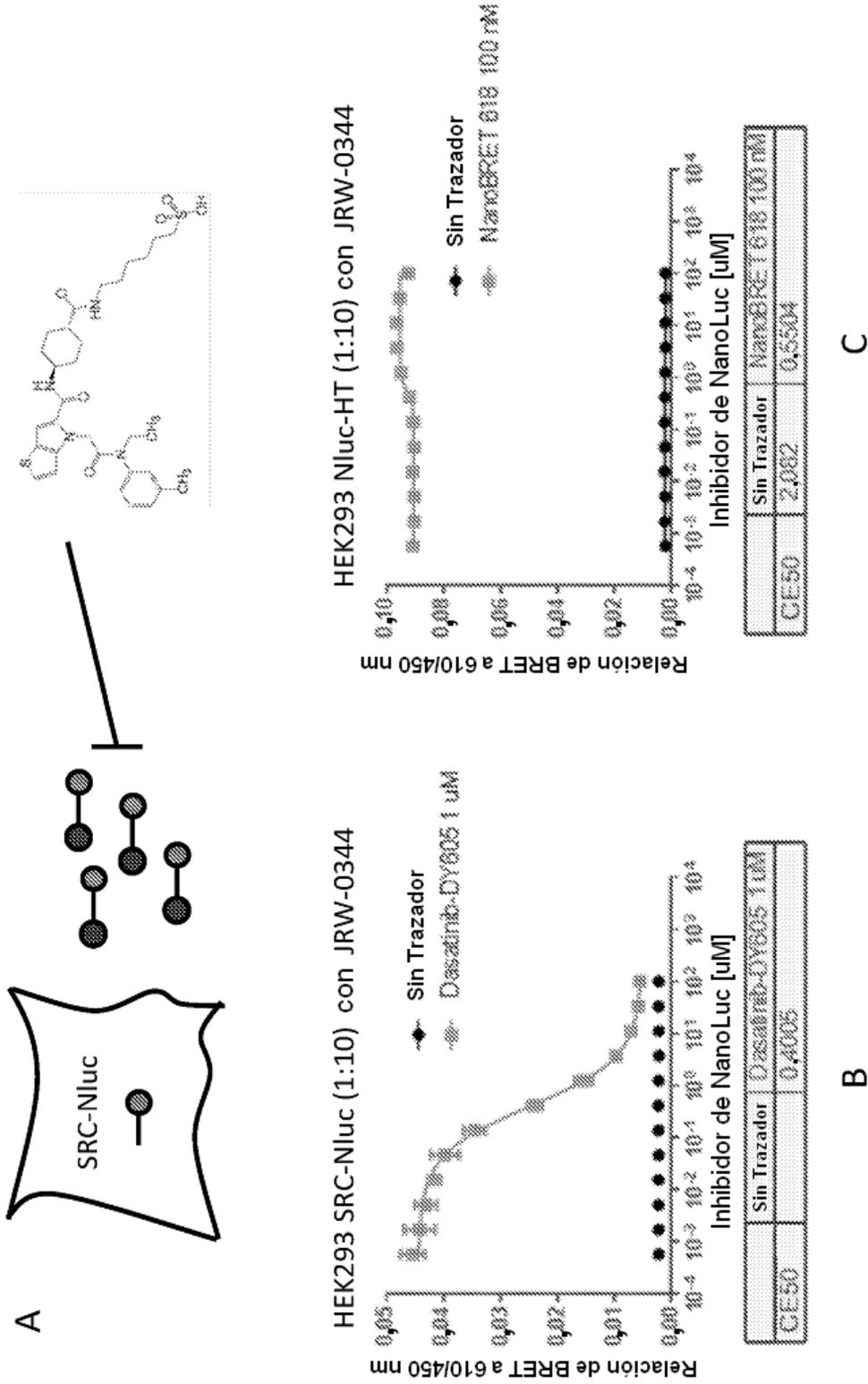


FIG. 18C



ADRB2 en células Hela / Inhibidores de Nluc

FIG. 19



FIGS. 20A-20C