

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 456**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2006 E 06831646 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1963328**

54 Título: **Inhibidores de cisteína proteasas, las composiciones farmacéuticas de las mismas y sus aplicaciones terapéuticas**

30 Prioridad:

08.12.2005 EP 05292612

08.12.2005 US 296564

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

23.01.2014

73 Titular/es:

HYBRIGENICS S.A. (100.0%)

3/5, IMPASSE REILLE

75014 PARIS, FR

72 Inventor/es:

GUEDAT, PHILIPPE;

BOISSY, GUILLAUME;

BORG-CAPRA, CATHERINE;

COLLAND, FRÉDÉRIC;

DAVIET, LAURENT;

FORMSTECHEER, ETIENNE;

JACQ, XAVIER;

RAIN, JEAN-CHRISTOPHE;

DELANSORNE, RÉMI;

PERETTO, ILARIA y

VIGNANDO, STEFANO

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 439 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de cisteína proteasas, las composiciones farmacéuticas de las mismas y sus aplicaciones terapéuticas

5 **[0001]** La presente invención se refiere nuevos inhibidores de cisteína proteasas, a sus procesos de preparación y sus usos terapéuticos.

10 **[0002]** Las proteasas se pueden clasificar en base a sus especificidades de sustrato o mecanismos de catálisis. En base al mecanismo de hidrólisis de péptidos, se conocen cinco clases principales de proteasas: serina, cisteína, aspártico, treonina y metalo proteasas. Las cisteína proteasas comprenden, entre otras, las enzimas de desubiquitinación, caspasas, catepsinas, calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas o parasitarias.

15 **[0003]** Las enzimas de desubiquitinación incluyen las Proteasas Específicas de Ubiquitina (USP) y a las Carboxi Hidrolasas de Ubiquitina (UCH). En términos generales, la ruta de la ubiquitina regula la degradación de proteínas y está más particularmente implicada en el cáncer, en enfermedades neurodegenerativas tales como, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, en inflamación, en infectividad viral y latencia (en particular para el virus-1 del Herpes simple, el virus de Epstein-Barr, el coronavirus del SARS), o en enfermedades cardiovasculares (Chem. Rev. 1997, 97, pág. 133-171; Chem. Rev. 2002, 102, pág. 4459-4488; J. Biochem. 2003, 134, pág. 9-18; J. Virology, 2005, 79(7), pág. 4550-4551; Cardiovasc. Res. 2004, 61, pág. 11-21).

20 **[0004]** Se ha demostrado que las caspasas están implicadas en la apoptosis y por lo tanto son dianas en la hepatitis, insuficiencia hepática, inflamación, isquemia e insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, neurodegeneración, sordera, diabetes, o apoplejía (J. Pharmacol Exp. Ther., 2004, 308(3), pág. 1191 -1196, J. Cell. Physiol., 2004, 200(2), pág. 177-200; Kidney Int, 2004, 66(2), pág. 500-506; Am. J. Pathol., 2004, 165(2), pág. 353-355; Mini Rev. Chem., 2004, 4(2), pág. 153-165; Otol. Neurotol., 2004, 25(4), pág. 627-632; Ref. 7, 21, 22, 23, 24, 25.

30 **[0005]** Se ha demostrado que las catepsinas generalmente están implicadas en cáncer y metástasis, inflamación, inmunología/inmunorregulación (Eur. Respir. J., 2004, 23(4), pág. 620-628) y aterosclerosis (Ageing Res. Rev.. 2003, 2(4), pág. 407-418). Más particularmente, las catepsinas incluyen a la catepsina B y de tipo B que están implicadas en cáncer y en metástasis, y artritis (Cancer Metastasis Rev., 2003, 22(2-3), pág. 271-286; Biol. Chem., 2003, 384(6), pág. 845-854 y Biochem. Soc. Symp., 2003, 70, pág. 263-276), la catepsina D, implicada en particular en cáncer y metástasis (Clin. Expág. Metastasis, 2004, 21(2), pág. 91-106), la catepsina K que actúa en la osteoporosis y la artritis (Int. J. Pharm., 2004, 277(1-2), pág. 73-79), la catepsina S que se ha demostrado que juega un papel en la presentación de antígenos en inmunología (Drug News Perspective, 2004, 17(6), pág. 357-363).

35 **[0006]** Las calpaínas juegan un papel en el envejecimiento en general (Ageing Res. Rev. 2003, 2(4), pág. 407-418), así como en la diabetes (Mol. Cell. Biochem., 2004, 261(1), pág. 161-167) y en las cataratas (Trends Mol. Med., 2004, 10(2), pág. 78-84), más particularmente.

40 **[0007]** Las cisteínas proteasas virales han sido identificadas en rinovirus, en el virus de la poliomielitis, en el virus de la hepatitis A, en el virus de la hepatitis C, adenovirus, o coronavirus del SARS (Chem. Rev. 1997, 97, pág. 133 -171; Chem. Rev. 2002, 102, pág. 4459 -4488; J. Virology, 2005, 79(7), pág. 4550-4551 y Acta Microbiol. Immunol. Hung., 2003, 50(1). pág. 95-101).

45 **[0008]** Las cisteína proteasas bacterianas incluyen estreptopaina, cisteína proteasa de estafilococo, clostripaina o gingipainas; también se ha demostrado que levaduras, tales como *Aspergillus flavus* expresan cisteína proteasas que pueden constituir un factor de virulencia (Chem. Rev. 1997, 97, pág. 133 -171).

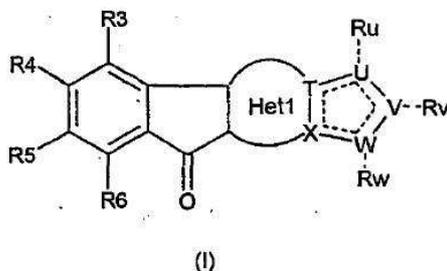
50 **[0009]** Las cisteína proteasas parasitarias han sido revisadas en Molecular & Biochemical Parasitology (2002, 120, pág. 1-21) y Chem. Rev. (2002, 102, pág. 4459-4488), por ejemplo. Cabe señalar que los agentes parasitarios responsables por la mayoría de las enfermedades parasitarias usan sus propias cisteína proteasas en algún momento de sus ciclos infectivos, nutritivos o reproductivos; tales enfermedades incluyen malaria, enfermedad de Chagas, tripanosomiasis africana, leishmaniosis, giardiasis, tricomoniasis, amibiasis, criptosporidiosis, toxoplasmosis, esquistosomiasis, fasciolosis, oncocercosis, y otras infecciones por algunos otros gusanos planos o redondos.

55 **[0010]** Por lo tanto, la identificación de una nueva clase de inhibidores de cisteína proteasas es de significativa importancia en una amplia gama de enfermedades y condiciones patológicas

60 **[0011]** Abd el Basat Hassanein et al., Synthetic communications, 30(21), 3883-3895, 2000 ; Hassan et al., Monatshefte fuer Chemie, 128(1), 61-70, 1997; Beilstein Crossfire Institut zur Foerderung der Chemischen Wissenschaften, DE, BRN 7227978, 1993; Metwally et al., Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B : Anorganische Chemie, Organische Chemie, 41B(4), 486-8, 1986 ; Ali et al., Phosphorus and Sulfur and the related elements, 39(3-4), 211-16, 1988 ; Hassanein et al., Heteroatom Chemistry, 14(6), 491-497, 2003 ; Fischer-Colbrie et al., Monatshefte fuer Chemie, 106(3), 743-53, 1975; Prostakov et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii (6), 794-8, 1979; Krause et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, (1), 115-19, 1990; Prostakov et al., Khimiya

Geterotsiklicheskikh Soedinenii (2), 252-5, 1983 ; Beilstein Crossfire Institut zur Foerderung der Chemischen Wissenschaften, DE, Citation No. 5846828, 1993; US 6.514.972; WO01/79209; WO 00/54772, US 5.726.175 y WO02/02562 dan a conocer compuestos que comprenden 4 ciclos fusionados. Sin embargo, no se sugiere su uso como inhibidores de cisteína proteasas.

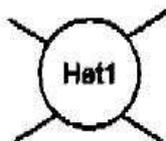
[0012] Según un primer objeto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



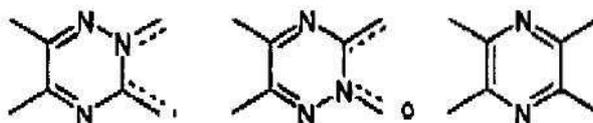
en el que:

— es un enlace simple o doble, según sea apropiado;

----- no es ningún enlace o es un enlace simple, según sea apropiado;



es



T, U, V, W, X son lo mismo o diferentes y se pueden elegir de manera independiente entre C o N.

Rv, Rw son de manera independiente H o están ausentes

Ru, se puede elegir del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, perhalogenoalquilo, NRCN, C(CN)=C(OH) (OAlq), SR, NRR', C(O) NRR', Heterociclo, Arilo, Heteroarilo, Cicloalquilo, en los que Alq, Arilo, Heteroarilo, Heterociclo, Cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo, OAlq o poli(alquilenoxi),

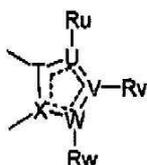
R3, R4, R5, R6 son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF₃, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

R y R' son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

[0013] Preferiblemente, X, T, U, V, W se eligen entre C y N.

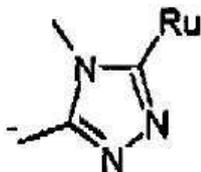
[0014] Preferiblemente,



es

5

10



15 **[0015]** Preferiblemente, Ru se elige entre Arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, Cicloalquilo, -CF₃, -CH₂-(OC₂H₄)₂-OCH₃.

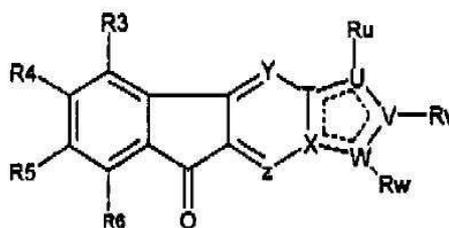
20 **[0016]** Preferiblemente, R₃, R₄, R₅, R₆ son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Hal, Alq, OAlq, OH, OCF₃.

25 **[0017]** Preferiblemente, R y R' son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Alq.

30 **[0018]** Preferiblemente, R_v, R_w son H o están ausentes.

35 **[0019]** Los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos de fórmula (Ia):

40



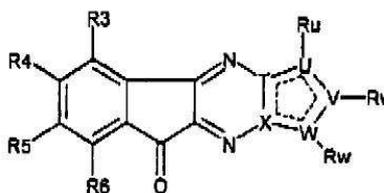
45

(Ia)

50 en los que R₃-R₆ y Ru, R_v, R_w, T, U, V, W, X son tal como se definen anteriormente e Y, Z, idénticos o diferentes, se eligen de manera independiente entre C o N.

Más preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son de fórmula (Ib):

55



60

(Ib)

65 en los que R₃-R₈ y Ru, R_v, R_w, T, U, V, W, X son tal como se definen anteriormente.

[0020] Según aspectos preferidos:

- R_v=R_w=H y Ru se elige entre Arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, Cicloalquilo, -CF₃, -CH₂-(OC₂H₄)₂-OCH₃; y/o

60 - R₄=R₅=H y R₃, R₆ se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Hal, Alq, OAlq, OH, OCF₃, más preferiblemente OAlq.

[0021] Los compuestos preferentes de la invención se eligen del grupo que consiste en:

- 65
- 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Amino-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona

- 3-Etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isobutil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 5 - 3-Hidroximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Metoximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Ciclopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Bencil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-bromo-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 10 - 7-Cloro-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isopropil-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Trifluorometil-1,2, 3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 6, 7-Dimetoxi-3-metil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-6, 7-dimetoxi-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 15 - 6, 7-Dimetoxi-3-propil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-5, 8-dimetoxi-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

20

[0022] Como se utiliza en el presente documento anterior o posteriormente:

Alq representa alquilo, alqueno o alquino.

25

"Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a 12 átomos de carbono en la cadena. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferiores, tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquilo lineal. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, octilo, nonilo, decilo.

30

"Alquenilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquenilo preferidos tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente aproximadamente de 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metil-2-butenilo, n-pentenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo.

35

"Alquinilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo preferidos tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo, octinilo y decinilo.

40

"Átomo de halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo; preferiblemente un átomo de flúor y de cloro.

"Arilo" significa un sistema anular de hidrocarburos multicíclico o monocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono. Los grupos arilo incluyen fenilo o naftilo.

45

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a anillos monocíclicos, bicíclicos o multicíclicos saturado, parcialmente insaturado o insaturado, no aromático estable, de 3 a 14, preferiblemente de 5 a 10 miembros en los que al menos un miembro del anillo es un heteroátomo. Habitualmente, los heteroátomos incluyen, pero sin limitación, átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio, y fósforo. Preferiblemente, los heteroátomos son oxígeno, nitrógeno y azufre.

50

[0024] Los heterociclos adecuados también se describen en The Handbook of Chemistry y Physics, 76ª Edición, CRC Press, Inc., 1995 -1996, pág. 2-25 a 2-26, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

55

[0025] Los heterocíclicos no aromáticos preferidos incluyen, pero sin limitación, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, oxiranilo, tetrahidrofurano, dioxolanilo, tetrahidropiranilo, dioxanilo, dioxolanilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, piranilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotipiranilo, ditianilo, tiomorfolinilo, dihidropiranilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidropiridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridinilo, dihidrotipiranilo, azepanilo, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

60

[0026] Como se lo utiliza aquí, el término "heteroarilo" o heterociclos aromáticos se refiere a un anillo heterocíclico, monocíclico, bicíclico o multicíclico aromático de 5 a 14, preferiblemente de 5 a 10 miembros. Los ejemplos incluyen pirrolilo, piridilo, pirazolilo, tienilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, indolilo, quinolinilo, purinilo, imidazolilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, triazoilo, tetrazolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, carbazolilo, bencimidazolilo, isoxazolilo, piridil-N-óxido, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

65

[0027] "Alquilo", "cicloalquilo", "alqueno", "alquino", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" y similares se refieren también al correspondiente "alqueno", "cicloalqueno", "alqueno", "alquino", "arileno", "heteroarileno", "heterociclo" y similares que se forman por la eliminación de dos átomos de hidrógeno.

5 **[0028]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier animal, tal como un animal valioso para cría, compañía o para propósitos de conservación, o preferiblemente un humano o una cría de humano, que padece de, o que potencialmente puede padecer de una o más enfermedades y patologías descritas aquí.

10 **[0029]** Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz en la prevención, reducción, eliminación, tratamiento o control de los síntomas de las enfermedades y patologías descritas aquí. El término "control" tiene por objeto referirse a todos los procesos en los que puede haber una desaceleración, interrupción, paro, o detención del progreso de las enfermedades y patologías descritas aquí, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad y patología, y pretende incluir el tratamiento profiláctico.

15 **[0030]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico, adecuados para contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas proporcionales con una relación razonable riesgo/beneficio.

20 **[0031]** Tal como se utiliza en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que se modifica el compuesto principal haciendo sales ácidas o básicas del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternarias del compuesto principal formado, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maléico, láctico y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio, tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales metálicas, tales como sales de sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio.

25 **[0032]** Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto principal que contiene un grupo funcional básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar mediante reacción de formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o del ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, pág. 1418, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

30 **[0033]** Los compuestos de la fórmula general (I) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también son parte de la invención.

35 **[0034]** Según un objetivo adicional, la presente invención también se refiere al proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I).

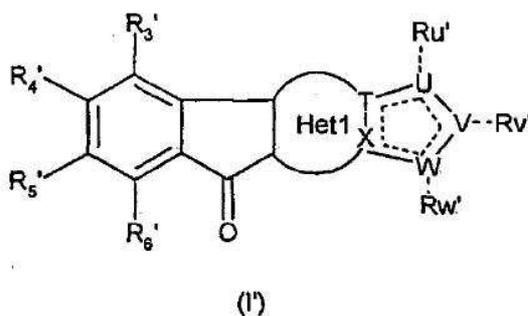
40 **[0035]** Los compuestos y procesos de la presente invención se pueden preparar en una serie de formas conocidas por los expertos en la materia. Los compuestos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante la aplicación o adaptación de los métodos descritos más adelante, o variaciones de los mismos, tal como comprenderá una persona experta en la materia. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán fácilmente evidentes y conocidas o pueden ser fácilmente obtenidas a partir de la literatura científica por los expertos en la materia.

45 **[0036]** En particular, tales métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

50 **[0037]** Se entenderá que los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Por lo tanto, se consideran todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas, formas isoméricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o la forma isomérica específicas. En la técnica se conoce cómo preparar y aislar tales formas ópticamente activas. Por ejemplo, se pueden separar mezclas de estereoisómeros mediante técnicas estándar incluyendo, pero sin limitación, separación de formas racémicas, cromatografía normal, en fase reversa, y quiral, formación preferencial de sales, recristalización, y similares, o mediante síntesis quiral, ya sea a partir de materiales de partida quirales o mediante síntesis deliberada de centros quirales diana.

[0047] En general, la reacción se lleva a cabo en un disolvente prótico orgánico, tal como un alcohol (preferiblemente etanol), en presencia de un ácido, tal como ácido acético.

[0048] Alternativamente y/o adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) se pueden obtener a partir de los siguientes compuestos de fórmula (I')



en los que Het1, T, U, V, W, X se definen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y en el que por lo menos uno de R₃', R₄', R₅', R₆', Ru', Rv', Rw' es un grupo precursor de los correspondientes R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv, Rw y los otros son similares a los R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv, Rw deseados, mediante una o más etapas que permiten que un grupo precursor se transforme en el grupo R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv o Rw deseado, y opcionalmente el aislamiento del compuesto de fórmula (I).

[0049] Según la presente invención, la expresión "grupo precursor" de un grupo funcional se refiere a cualquier grupo que puede conducir, mediante una o más reacciones, a la función deseada, mediante uno o más reactivos adecuados. Estas reacciones incluyen desprotección, así como las reacciones normales de adición, sustitución o funcionalización.

[0050] Los compuestos de fórmula (I') se pueden obtener a partir de los compuestos correspondientes de fórmula (II) y (III) descritos anteriormente.

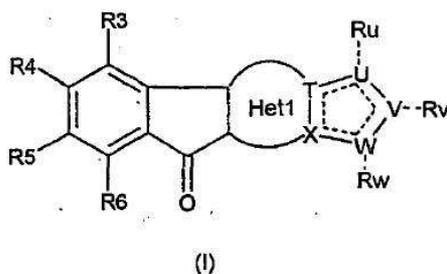
[0051] Las reacciones anteriores se pueden llevar a cabo por el experto en la materia mediante la aplicación o la adaptación de los métodos ilustrados en los ejemplos sucesivos del presente documento.

[0052] Además, el proceso de la presente invención también puede comprender la etapa adicional de aislar el compuesto de fórmula (I). Esto se puede realizar por el experto en la materia mediante cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los métodos de recuperación descritos anteriormente.

[0053] Los productos de partida (II) y (III) están disponibles comercialmente o se pueden obtener mediante la aplicación o la adaptación de cualquiera de los métodos conocidos o los descritos en los ejemplos.

[0054] La síntesis también se puede llevar a cabo en cascada ("one pot") como una reacción multicomponente.

[0055] Según un objetivo adicional, la presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprende un compuesto de fórmula (I) tal como se define a continuación:

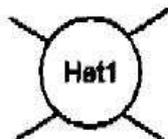


en el que:

== es un enlace simple o doble, según sea apropiado;

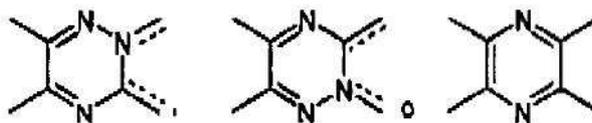
----- no es ningún enlace o es un enlace simple, según sea apropiado;

5



10 es

15



T, U, V, W, X son el mismo o diferentes y son independiente C o N.

Rv, Rw son de manera independiente H o están ausentes

20 Ru, se puede elegir del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, perhalogenoalquilo, NRCN, C(CN)=C(OH) (OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', Heterociclo, Arilo, Heteroarilo, Cicloalquilo, en los que Alq, Arilo, Heteroarilo, Heterociclo, Cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo, OAlq o poli(alquilenoxi),

25 R3, R4, R5, R6 son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF₃, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

R y R' son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

30 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

[0056] Las realizaciones preferidas de fórmula (I) son tal como se definen anteriormente con respecto a los compuestos de la invención.

Los compuestos preferidos para el uso terapéutico según la presente invención se eligen del grupo que consiste en:

35

- 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Amino-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 40 - 3-Butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isobutil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Hidroximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Metoximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Ciclopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 45 - 3- Bencil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-bromo-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 7-Cloro-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Trifluorometil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 50 - 6,7-Dimetoxi-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-6,7-dimetoxi-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 6,7-Dimetoxi-3-propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-5,8-dimetoxi-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona

55 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

[0057] Según un objetivo adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto de fórmula (I), tal como se define anteriormente con respecto a la composición farmacéutica, para la preparación de un medicamento para inhibir la cisteína proteasa.

60

[0058] Los compuestos de la invención son útiles para inhibir cisteína proteasas, en particular enzimas de desubiquitinación (tales como las USP y las UCH), caspasas, catepsinas (en particular catepsina B, D, K, S y similares), calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas o parasitarias en pacientes que necesiten de las mismos.

65

5 [0059] Los compuestos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de cáncer y metástasis, más particularmente cáncer de próstata y/o colon, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, sordera, trastornos asociados con el envejecimiento, trastornos inflamatorios, artritis, osteoporosis, hepatitis, insuficiencia hepática, isquemia e insuficiencia cardíaca, apoplejía, aterosclerosis, insuficiencia renal, diabetes, cataratas; infecciones virales agudas o latentes por el virus-1 del Herpes simplex, el virus de Epstein-Barr, el coronavirus del SARS, rinovirus, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, adenovirus, y similares; infecciones bacterianas o fúngicas por agentes patógenos que pertenecen a los géneros *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Aspergillus sp.*, y similares; infecciones por protozoos por miembros de las especies de los géneros *Trypanosoma sp.*, *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba sp.*, *Giardia sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Cryptosporidium sp.*, y similares; infecciones por gusanos planos o redondos por los miembros de las especies de los géneros *Fasciola sp.*, *Schistosoma sp.*, *Onchocerca sp.*, *Ascaris sp.*, *Taenia sp.*, *Caenorhabditis sp.*, *Toxocara sp.*, *Haemonchus sp.*, *Ancilostoma sp.*, *Trichuris sp.*, *Trichinella sp.*, *Strongiloides sp.*, *Brugia sp.*, y similares; así como trastornos inmunológicos, inmunoreguladores o de presentación de antígenos.

15 [0060] El presente documento también se refiere a los métodos correspondientes de tratamiento que comprenden la administración de un compuesto de la invención junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable a un paciente con necesidad de los mismos.

20 [0061] La identificación de aquellos individuos que necesitan el tratamiento de las enfermedades y patologías descritas aquí está dentro de la capacidad y conocimiento de un experto en la materia. Un veterinario o un médico experto en la materia pueden identificar fácilmente, mediante el uso de ensayos clínicos, exámenes físicos, historial médico/familiar o ensayos biológicos y de diagnóstico, a aquellos individuos que necesitan dicho tratamiento.

25 [0062] Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente por la persona que hace el diagnóstico, como un experto en la materia, mediante el uso de técnicas convencionales y mediante observación de los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz, se consideran una serie de factores por parte de la persona que hace el diagnóstico, incluyendo, pero sin limitación: la especie del individuo; su tamaño, edad, y estado general de salud; la enfermedad específica implicada; el grado de desarrollo o gravedad de la enfermedad; la respuesta de cada individuo; el compuesto particular administrado; la forma de administración; la biodisponibilidad característica de la preparación administrada; el régimen de dosificación seleccionado; el uso concomitante de otro medicamento; y otras circunstancias relevantes.

30 [0063] La cantidad de un compuesto de fórmula (I), que es necesaria para lograr el efecto biológico deseado, variará dependiendo de una serie de factores, incluyendo las características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) de los compuestos empleados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la cual pertenece el paciente, el estado de enfermedad del paciente, la ruta de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la ruta escogida, todos factores que dictan las cantidades de dosis requeridas, el suministro y el régimen a administrar.

35 [0064] "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se las administra a un animal, o a un humano, según sea apropiado.

40 [0065] Tal como se utiliza en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier portador, diluyente, adyuvante, o vehículo, tales como agentes conservantes o antioxidantes, agentes de relleno, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso en que algún medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Se pueden incorporar también principios activos complementarios en las composiciones como combinaciones terapéuticas adecuadas.

45 [0066] En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se utiliza aquí, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o patología al cual se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o patología.

50 [0067] "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto/medicamento según la presente invención eficaz en la prevención o el tratamiento de una condición patológica que requiere la inhibición de una cisteína proteasa activa implicada en su patogénesis.

55 [0068] Según la invención, el término "paciente", o "paciente que necesita el mismo", es utilizado para un animal o un humano que esté afectado o probablemente se verá afectado con una condición patológica que implica una cisteína proteasa activa en su patogénesis. Preferiblemente, el paciente es humano.

60 [0069] En términos generales, los compuestos de la presente invención se pueden proporcionar en una solución acuosa de tampón fisiológico que contiene 0,1 a 10 % p/v del compuesto para administración parenteral. Los

intervalos de dosis habituales son de 1 µg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día o una dosis equivalente para un niño humano. La dosis preferida de medicamento a administrar probablemente depende de variables, tales como el tipo y el grado de progreso de la enfermedad o trastorno, del estado general de salud del paciente particular, de la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, de la formulación del compuesto, de la ruta de administración (intravenosa, intramuscular, u otra), de las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la ruta de administración escogida, y la velocidad (bolo o infusión continua) y las pautas de administración (el número de repeticiones en un período de tiempo determinado).

[0070] Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de dosis unitarias; donde el término "dosis unitaria" significa una dosis única que puede administrarse a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el propio compuesto activo o como una composición farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en lo sucesivo en la presente invención. Por tanto, los intervalos de dosis diarias totales habituales son de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de orientación general, las dosis unitarias para humanos varían de 1 mg a 3000 mg por día. Preferiblemente, el intervalo de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrada de una a seis veces por día, e incluso más preferiblemente de 10 mg a 500 mg, una vez al día. Los compuestos dados a conocer aquí se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones de dosis unitarias se pueden preparar para uso mediante administración oral, particularmente en forma de comprimidos, cápsulas simples o cápsulas de gelatina blanda; o por vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, tópicamente en pomadas, cremas, lociones, geles o pulverizadores, o a través de parches transdérmicos.

[0071] Las composiciones se pueden administrar convenientemente en forma de dosis unitarias y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la industria farmacéutica, por ejemplo, tal como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

[0072] Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las cuales un compuesto de la presente invención es formulado para administración oral o parenteral.

[0073] Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, pastillas y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, o goma tragacanto; un diluyente, tal como almidón o lactosa; un disgregante, tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta, o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de una cápsula dura o cápsula blanda, que se elaboran generalmente de mezclas de gelatina opcionalmente mezcladas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, las formas de las unidades de dosificación pueden contener otros materiales diferentes que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca, o agentes entéricos. Otras formas de dosificación oral, jarabe o elixir pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes, y saborizantes. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de disolución rápida, liberación modificada o controlada, y en los que dichas formulaciones de liberación controlada son preferiblemente bimodales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio, o talco en cualquier combinación.

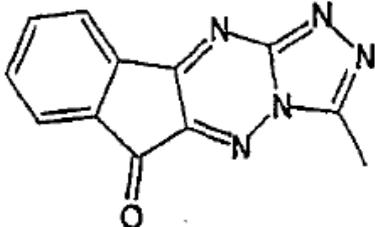
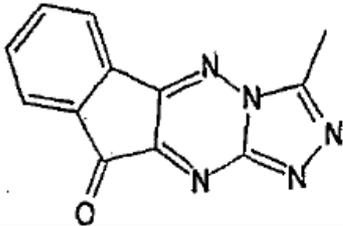
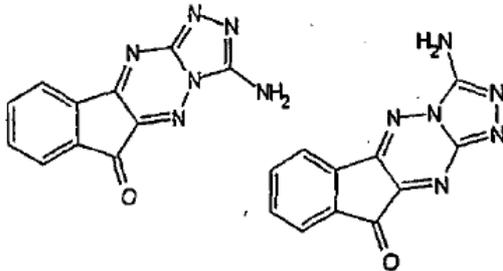
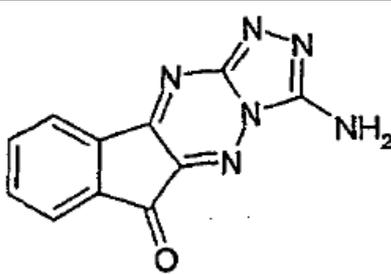
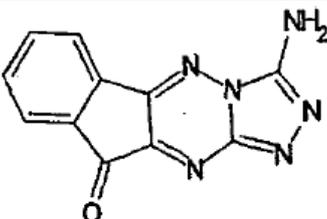
[0074] Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Las composiciones líquidas pueden incluir también aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, saborizantes y agentes colorantes, y similares. Los disolventes no acuosos incluyen alcoholes, propilén glicol, polietilén glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medio tamponado y solución salina. En particular, un polímero láctido biocompatible, biodegradable, un copolímero láctido/glicólido, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tal como aquellos con base de dextrosa de Ringer, y similares. Otros sistemas de suministro parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos incluyen partículas del copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de perfusión implantables, y liposomas.

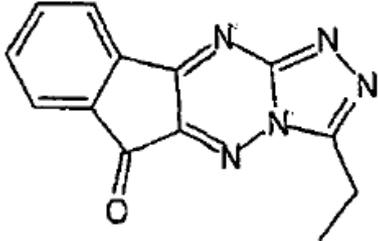
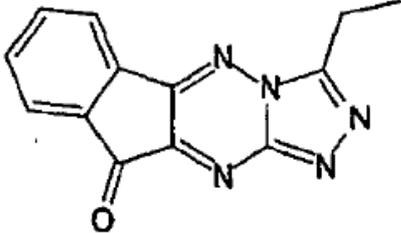
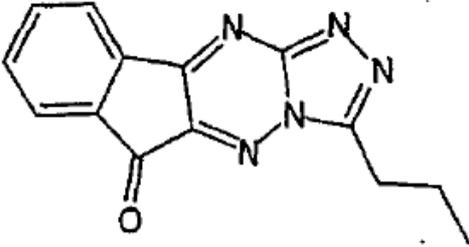
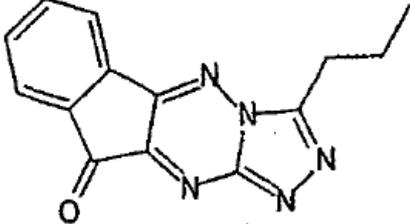
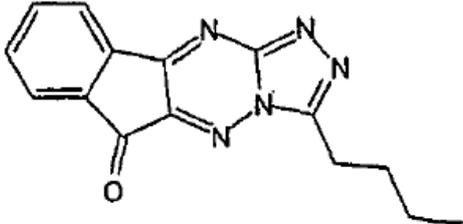
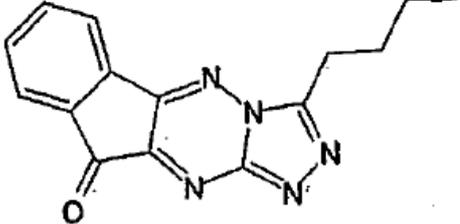
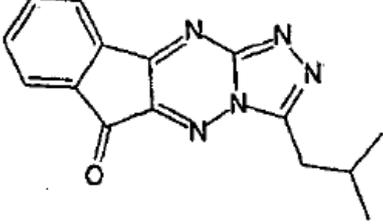
[0075] Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios, tales como polvo seco, aerosol, o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado en forma intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, grageas o pastillas y pueden incluir también una base saborizada, tal como sacarosa o acacia, y otros excipientes, tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios en dosis unitarias, con un portador de base sólida, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las

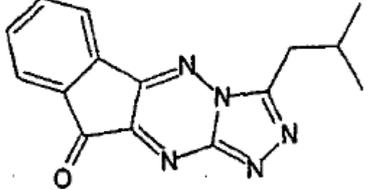
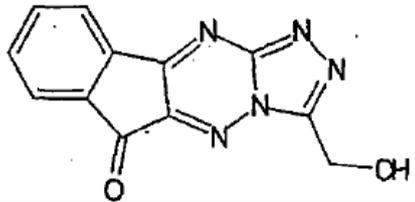
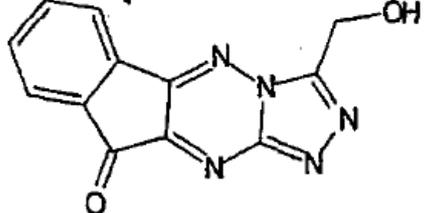
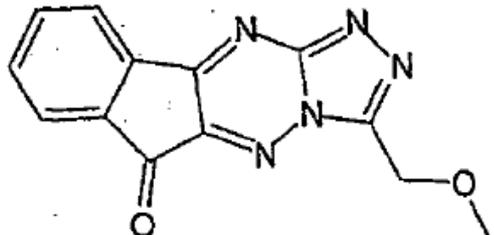
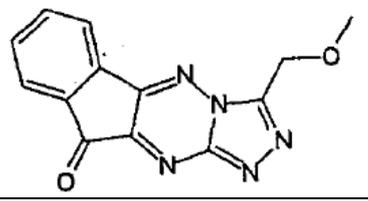
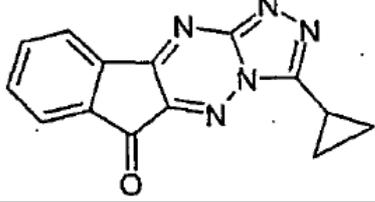
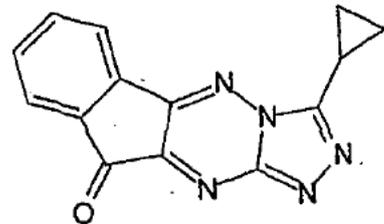
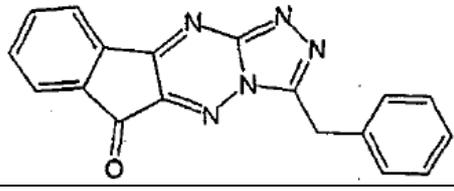
5 formulaciones para aplicación tópica para la piel preferiblemente tienen forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverizador, aerosol, o aceite. Los portadores que pueden utilizarse incluyen jalea de petróleo, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipofílicas o tamponadas, soluciones acuosas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

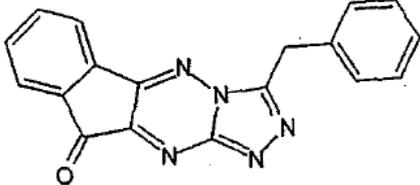
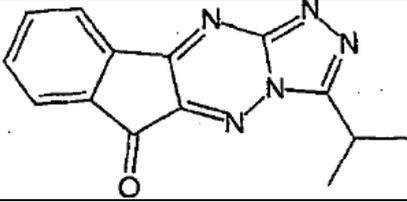
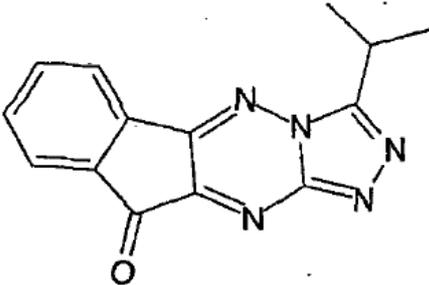
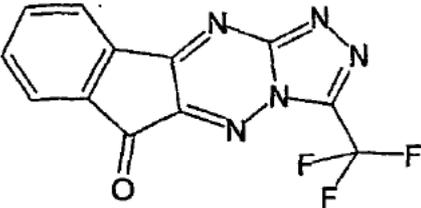
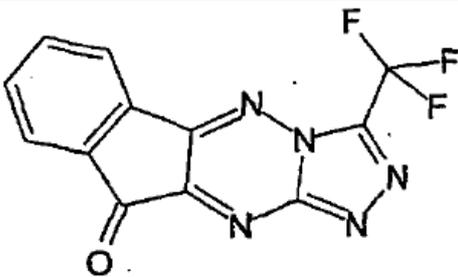
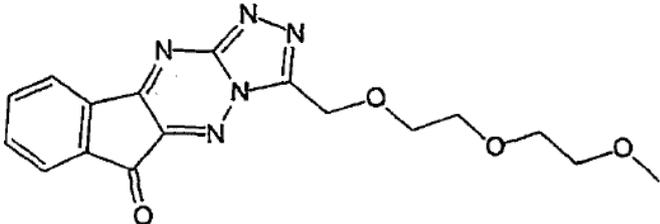
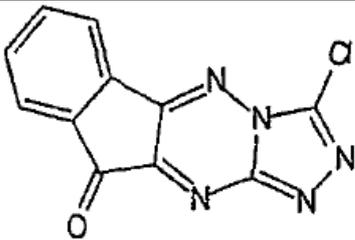
[0076] La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por la descripción en los siguientes ejemplos.

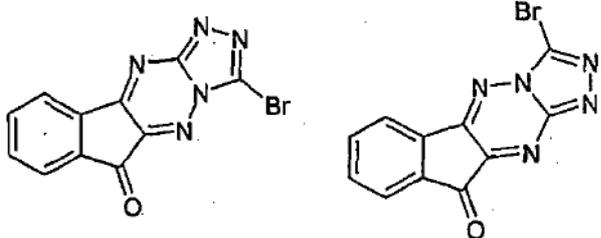
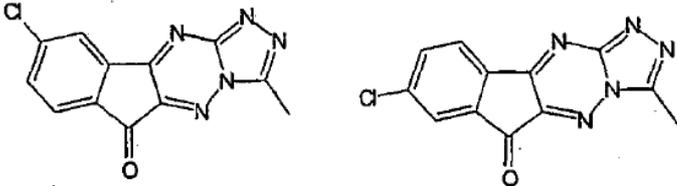
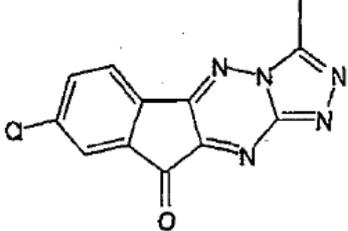
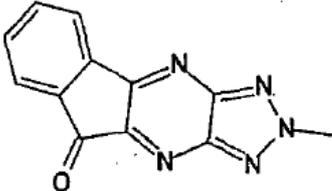
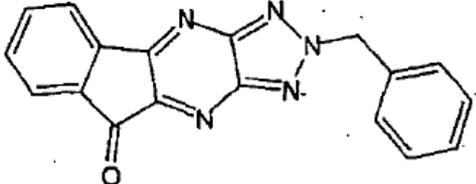
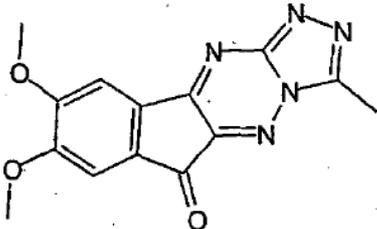
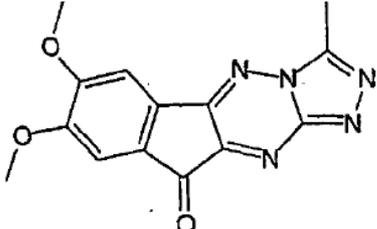
10 [0077] Los compuestos representativos de la invención están resumidos en la tabla siguiente. Los compuestos de referencia se identifican con una estrella (*)

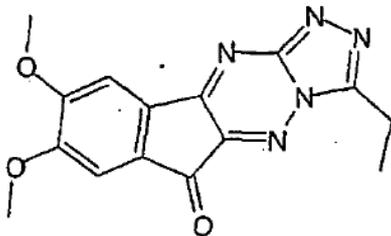
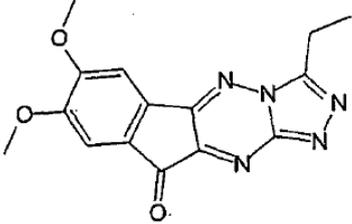
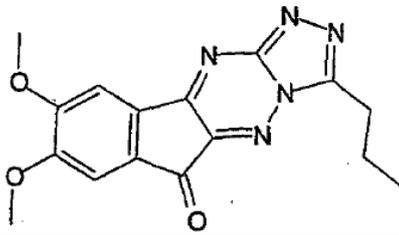
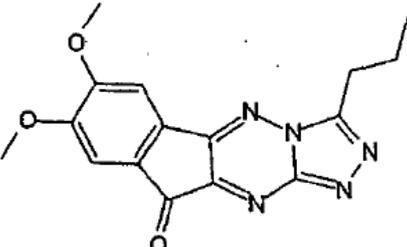
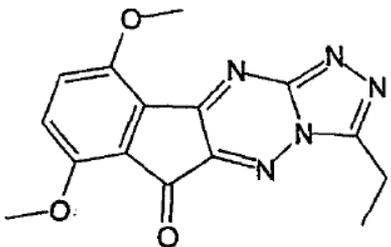
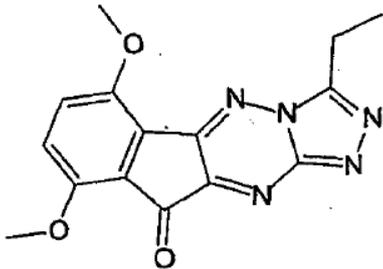
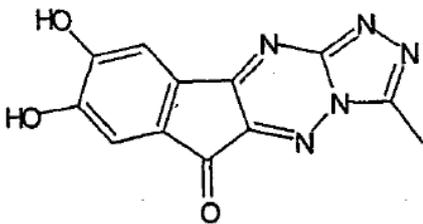
Fórmula	Procedimiento de preparación
	Ejemplo 1b/A*
	Ejemplo 1b/B
	Ejemplo 1c
	Ejemplo 1c/A*
	Ejemplo 1c/B

	<p>Ejemplo 1d/A*</p>
	<p>Ejemplo 1d/B</p>
	<p>Ejemplo 1e/A*</p>
	<p>Ejemplo 1e/B</p>
	<p>Ejemplo 1f/A*</p>
	<p>Ejemplo 1f/B</p>
	<p>Ejemplo 1g/A*</p>

	Ejemplo 1g/B
	Ejemplo 1h/A*
	Ejemplo 1h/B
	Ejemplo 1i/A*
	Ejemplo 1i/B
	Ejemplo 1j/A*
	Ejemplo 1j/B
	Ejemplo 1k/A*

	Ejemplo 1k/B
	Ejemplo 1l/A*
	Ejemplo 1l/B
	Ejemplo 1m/A*
	Ejemplo 1m/B
	Ejemplo 1n/A*
	Ejemplo 2a/A

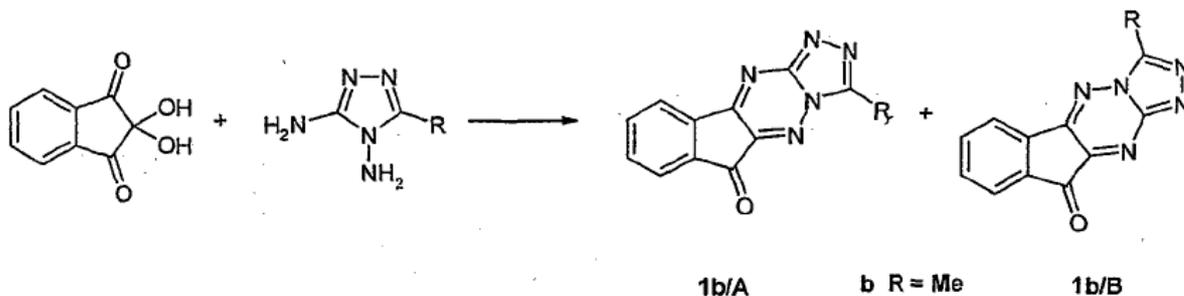
	<p>Ejemplo 2b</p>
	<p>Ejemplo 3/A*</p>
	<p>Ejemplo 3/B</p>
	<p>Ejemplo 4a*</p>
	<p>Ejemplo 4b*</p>
	<p>Ejemplo 5a/A*</p>
	<p>Ejemplo 5a/B</p>

	Ejemplo 5b/A*
	Ejemplo 5b/B
	Ejemplo 5c/A*
	Ejemplo 5c/B
	Ejemplo 6/A*
	Ejemplo 6/B
	Ejemplo 7*

[0078] Los compuestos representativos de la invención se pueden sintetizar según los siguientes procedimientos:

Procedimiento general A: síntesis de pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:

[0079]



[0080] Se puso a reflujo una mezcla de (1,2,4)-triazol-3,4-diamina sustituida (8,8 mmol) y ninhidrina (1,57 g, 8,8 mmol) en EtOH (10 ml) y AcOH (1,5 ml) durante 2-16 horas. Se extrajo el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con una solución saturada de K_2CO_3 y una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se extrajeron los disolvente mediante evaporación a presión reducida. El crudo se filtró de la siguiente manera: cromatografía flash en gel de sílice (tolueno/MeOH 95:5 a 8:2 o CH_2Cl_2 /EtOAc 9:1 a 1:1) para la purificación de la mezcla regioisomérica, a continuación, alúmina neutra (grado II) (CH_2Cl_2 /EtOAc 7:3 a CH_2Cl_2 / MeOH 1:1 + 5% HCOOH o AcOH) para la separación de los regioisómeros.

1-Metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1b/A).

[0081] Preparado según el procedimiento general A con un 13% de rendimiento como un sólido amarillo.

1H RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.23 (d, 1 H), 8.02 (m, 2H), 7.89 (ddd, 1H), 2.72 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para $C_{12}H_7N_5O$: 237,22; hallado: 238,2 (MH^+).

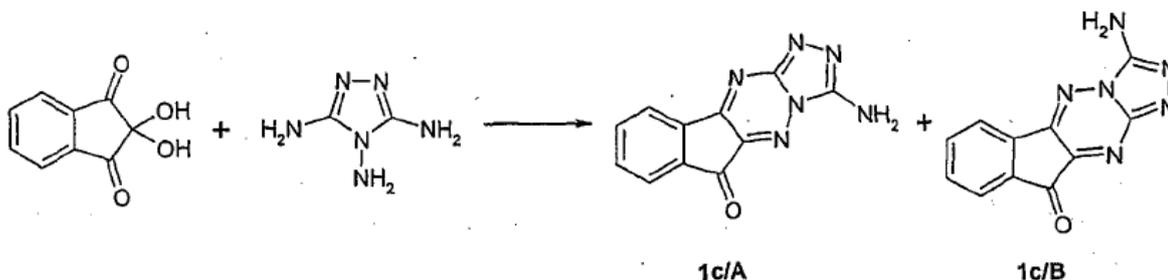
3-Metil-9,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1b/B):

[0082] Preparado según el procedimiento general A con un 30% de rendimiento como un sólido amarillo.

1H RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.16 (d, 1H), 8.05-7.95 (m, 2H), 7.85 (ddd, 1 H), 2.77 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para $C_{12}H_7N_5O$: 237,22; hallado: 238,2 (MH^+).

Síntesis de amino-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1c):

[0083]



[0084] Se calentó una mezcla de (1,2,4)-triazol-3,4,5-triamina (2,5 g, 21,9 mmol) en 1:1 AcOH/ H_2O (80 ml) hasta 70°C. Se disolvió ninhidrina (3,9 g, 21,9 mmol) en 1:1 AcOH/ H_2O (80 ml), se calentó a 50°C y posteriormente se añadió a la solución de triamina. La reacción se calentó a 70°C durante 3 horas y a continuación se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió hasta 0°C y se agitó durante 1 hora. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua fría y se secó al vacío, conduciendo a 3,9 g de 1c como mezcla regioisomérica (proporción 6:4, rendimiento del 82%). Los regioisómeros se separaron siguiendo el procedimiento general A.

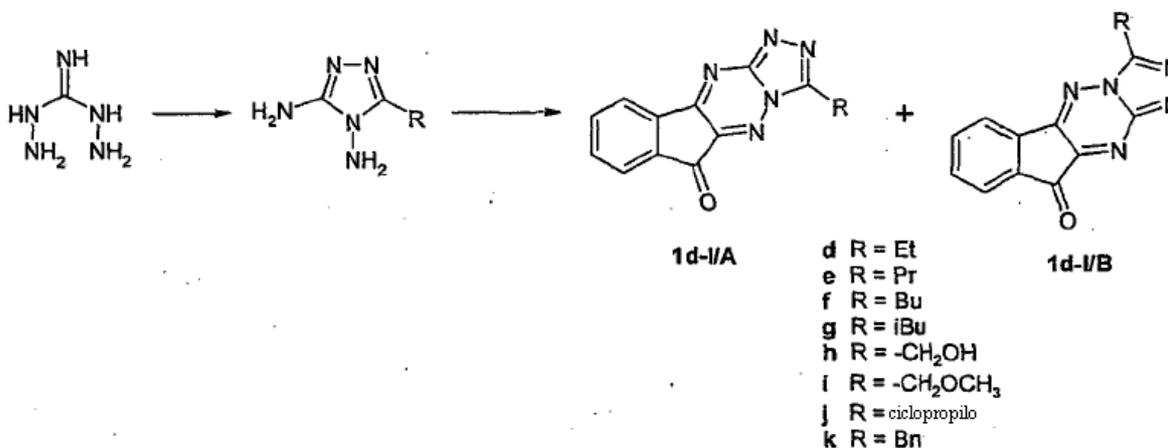
1-Amino-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona (1c/A)

Sólido rojo. ^1H RMN (300 MHz, DMSO d_6): δ 8.15 (d, 1H), 8.01-7.95 (m, 2H), 7.83 (ddd, 1 H), 6.98 (s, 2H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_6\text{O}$: 238,21; hallado: 239,1 (MH^+).

3-Amino-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1c/B)

[0085] Sólido marrón. ^1H RMN (300 MHz, DMSO d_6): δ 8.05-7.93 (m, 3H), 7.82 (ddd, 1H), 7.14 (s, 2H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_6\text{O}$: 238,21; hallado: 239,1 (MH^+).

Procedimiento general B: Síntesis de pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:

[0086]

[0087] La preparación de diaminotriazoles sigue el procedimiento descrito en Eur. J. Med. Chem.-chim. Ther. 1986, 21, 235. Se agitó una mezcla de clorhidrato de diaminoguanidina (1 g, 8 mmol) en exceso (10 g) del ácido carboxílico apropiado y se calentó a 120-130°C durante 12-24 horas. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió HCl al 37% (10 ml). La mezcla se puso a reflujo durante 2-3 horas y a continuación se concentró a sequedad al vacío. El crudo obtenido se lavó con Et₂O (x3) y se utilizó sin purificación adicional. Para la condensación entre el diaminotriazol crudo y la ninhidrina, véase el Procedimiento general A.

1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1d/A)

[0088] Preparado según el procedimiento general B con el 48% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.21 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.90 (ddd, 1H), 7.77 (ddd, 1 H), 3.21 (q, 2H), 1.49 (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$: 251,25; hallado: 252,1 (MH^+).

3-Etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1d/B)

[0089] Preparado según el procedimiento general B con el 32% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (d, 1 H), 8.02 (d, 1H), 7.88 (ddd, 1H), 7.75 (ddd, 1H), 3.25 (q, 2H), 1.53 (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$: 251,25; hallado: 252,1 (MH^+).

1-Propil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1e/A)

[0090] Preparado según el procedimiento general B con el 14% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (d, 1 H), 7.97 (d, 1 H), 7.87 (ddd, 1 H), 7.75 (ddd, 1H), 3.12 (dd, 2H), 1.91 (m, 2H), (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$: 265,28; hallado: 266,2 (MH^+).

3-Propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1e/B)

[0091] Preparado según el procedimiento general B con el 12% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (ddd, 1H), 8.00 (ddd, 1H), 7.86 (ddd, 1H), 7.74 (ddd, 1 H), 3.19 (dd, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.06 (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$: 265,28; hallado: 266,2 (MH^+).

1-Butil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1f/A)

ES 2 439 456 T3

[0092] Preparado según el procedimiento general B con el 6% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, DMSO d₆): δ 8.23 (d, 1 H), 8.02 (m, 2H), 7.89 (ddd, 1 H), 3.10 (dd, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 0.94 (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para C₁₅H₁₃N₅O: 279,30; hallado: 280,2 (MH⁺).

5 *3-Butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1f/B)*

[0093] Preparado según el procedimiento general B con el 10% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, DMSO d₆): δ 8.16 (d, 1H), 7.99 (m, 2H), 7.85 (dd, 1H), 3.16 (dd, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.44 (m, 2H), 0.96 (t, 3H). ESI⁺MS: calculado para C₁₅H₁₃N₅O: 279,30; hallado: 280,3 (MH⁺).

10 *1-Isobutil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1g/A)*

[0094] Preparado según el procedimiento general B con el 17% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (d, 1 H), 7.99 (d, 1 H), 7.89 (ddd, 1H), 7.76 (ddd, 1H), 3.06 (d, 2H), 2.34 (m, 1H), (d, 6H). ESI⁺MS: calculado para C₁₅H₁₃N₅O: 279,30; hallado: 280,2 (MH⁺).

15 *3-Isobutil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1g/B)*

[0095] Preparado según el procedimiento general B con el 12% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 7.86 (ddd, 1 H), 7.74 (ddd, 1H), 3.11 (d, 2H), 2.38 (m, 1H), 1.04 (d, 6H). ESI⁺MS: calculado para C₁₅H₁₃N₅O: 279,30; hallado: 280,2 (MH⁺).

20 *1-Hidroximetil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1h/A)*

[0096] Preparado según el procedimiento general B con el 10% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, DMSO d₆): δ 8.24 (d, 1 H), 8.02 (m, 2H), 7.90 (ddd, 1 H), 5.85 (t, 1 H), 4.92 (d, 2H). ESI⁺MS: calculado para C₁₂H₇N₅O₂: 253,22; hallado: 254,1 (MH⁺)

30 *3-Hidroximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1h/B)*

[0097] Preparado según el procedimiento general B con el 1% de rendimiento como un sólido marrón.
¹H RMN (300 MHz, DMSO d₆): δ 8.15 (d, 1 H), 8.06-7.96 (m, 2H), 7.86 (ddd, 1 H), 5.84 (t, 1 H), 4.98 (d, 2H). ESI⁺MS: calculado para C₁₂H₇N₅O₂: 253,22; hallado: 254,2 (MH⁺).

35 *1-Metoximetil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1i/A)*

[0098] Preparado según el procedimiento general B con el 2% de rendimiento como un sólido amarillo.
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (ddd, 1H), 7.96 (ddd, 1H), 7.87 (ddd, 1H), 7.75 (ddd, 1H), 4.92 (s, 2H), 3.42 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para C₁₃H₉N₅O₂: 267,25; hallado: 268,1 (MH⁺).

40 *3-Metoximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1i/B)*

[0099] Preparado según el procedimiento general B con el 2% de rendimiento como un sólido marrón.
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.13 (d, 1 H), 8.01 (d, 1 H), 7.87 (ddd, 1 H), 7.76 (ddd, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.49 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para C₁₃H₉N₅O₂: 267,25; hallado: 268,1 (MH⁺).

45 *1-Ciclopropil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1j/A)*

[0100] Preparado según el procedimiento general B con el 6% de rendimiento como un sólido amarillo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (dd, 1H), 8.04 (dd, 1H), 7.93 (ddd, 1H), 7.80 (ddd, 1 H), 2.51 (m, 1 H), 1.44 (m, 2H), 1.26 (m, 2H). ESI⁺MS: calculado para C₁₄H₉N₅O: 263,26; hallado: 264,2 (MH⁺).

50 *3-Ciclopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1j/B)*

[0101] Preparado según el procedimiento general B con el 4% de rendimiento como un sólido amarillo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (dd, 1H), 8.05 (dd, 1 H), 7.90 (ddd, 1 H), 7.78 (ddd, 1 H), 2.55 (m, 1 H), 1.52 (m, 2H), 1.31 (m, 2H). ESI⁺MS: calculado para C₁₄H₉N₅O: 263,26; hallado: 264,1 (MH⁺).

60 *1-Benzil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1k/A)*

[0102] Preparado según el procedimiento general B con el 12% de rendimiento como un sólido amarillo brillante. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (dd, 1H), 8.03 (dd, 1 H), 7.92 (ddd, 1H), 7.79 (ddd, 1 H), 7.46 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 4.56 (s, 2H). ESI⁺MS: calculado para C₁₈H₁₁N₅O: 313,32; hallado: 314,2 (MH⁺).

65 *3-Benzil-1,2, 3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1k/B)*

[0103] Preparado según el procedimiento general B con el 6% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.11 (dd, 1H), 8.04 (dd, 1H), 7.90 (ddd, 1H), 7.77 (ddd, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 4.62 (s, 2H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$: 313,32; hallado: 314,1 (MH^+).

5 *1-Isopropil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1I/A).*

[0104] Preparado según el procedimiento general B con el 39% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.19 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 7.89 (ddd, 1H), 7.76 (ddd, 1H), 3.62 (m, 1H), 1.51 (d, 6H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$: 265,28; hallado: 266,2 (MH^+).

10

3-Isopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1I/B).

[0105] Preparado según el procedimiento general B con el 10% de rendimiento como un sólido amarillo-marrón. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.16 (dd, 1H), 8.07 (dd, 1H), 7.93 (ddd, 1H), 7.80 (ddd, 1H), 3.73 (dq, 1H), 1.62 (d, 6H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$: 265,28; hallado: 266,2 (MH^+).

15

1-Trifluorometil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1m/A).

[0106] Preparado según el procedimiento general B con el 21% de rendimiento como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.39 (dd, 1H), 8.12 (dd, 1H), 8.03 (ddd, 1H), 7.92 (ddd, 1H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$: 291,19; hallado: 292,3 (MH^+).

20

3-Trifluorometil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1m/B).

[0107] Preparado según el procedimiento general B con el 14% de rendimiento como un sólido amarillo-verde. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (dd, 1H), 8.13 (dd, 1H), 7.99 (ddd, 1H), 7.88 (ddd, 1H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$: 291,19; hallado: 292,2 (MH^+).

25

1-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoximetil]-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1n/A).

30

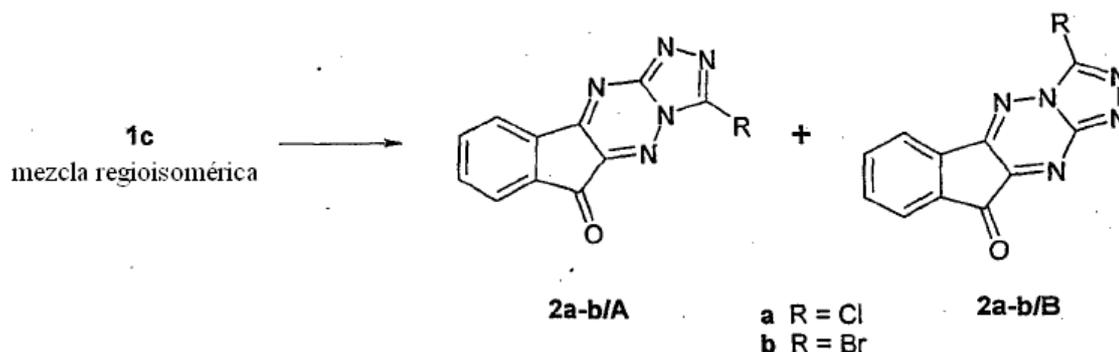
[0108] Preparado según el procedimiento general B con un 14% de rendimiento (sobre 2 etapas) como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.29 (dd, 1H), 8.07 (dd, 1H), 7.97 (ddd, 1H), 7.84 (ddd, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.88 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.34 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$: 355,36; hallado: 356,2 (MH^+).

35

Procedimiento general C: Síntesis de halo-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:

[0109]

40



50

[0110] Se añadió una mezcla regioisomérica de aminas 1c (400 mg, 1,68 mmol) en partes a una solución de nitrato de tert-butilo (300 μl , 2,52 mmol) y haluro de cobre (II) (2,52 mmol) en acetonitrilo (8 ml) a 60°C. La mezcla se calentó a 80°C durante dos horas, a continuación se enfrió y se evaporaron los disolventes. El crudo se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/MeOH 99:1 o CH_2Cl_2 /acetona 95:5).

55

1-Cloro-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (2a/A)

60

[0111] Preparado según el procedimiento general C con un 49% de rendimiento como un sólido amarillo como un único regioisómero. ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.29 (d, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.95 (dd, 1H). ESI⁺MS: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_4\text{ClN}_5\text{O}$: 257,64; hallado: 258,1 (MH^+).

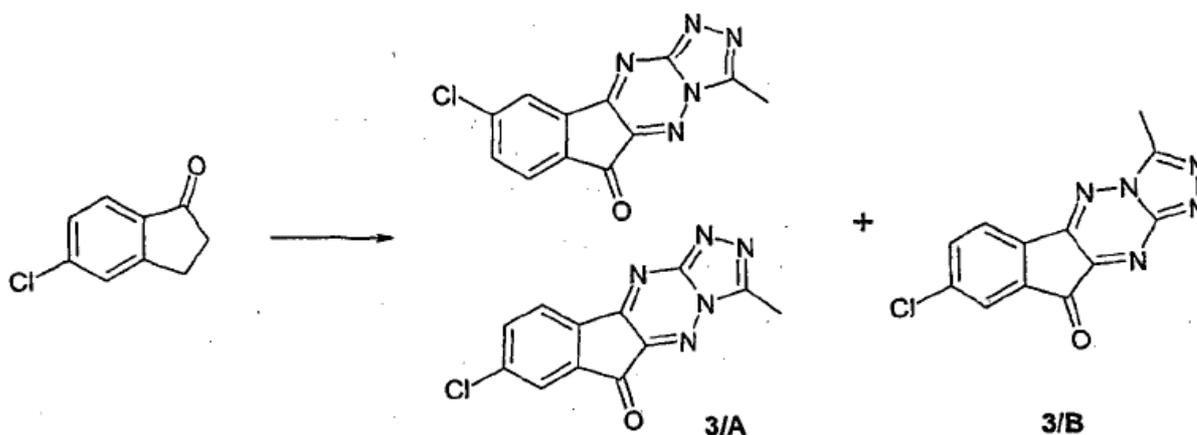
65

1-Bromo-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y 3-bromo-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (2b)

[0112] Preparado según el procedimiento general C con un 69% de rendimiento como un sólido amarillo como una mezcla regioisomérica 6:4. ^1H RMN (300 MHz, DMSO d_6) (mezcla de isómeros): δ 8.28 and 8.23 (d, 1H), 8.10-7.86 (m, 3H). ESI $^+$ MS: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_4\text{BrN}_5\text{O}$: 302,09; hallado: 302,0 (MH^+).

Síntesis de 6-(7)-cloro-metil-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (3):

[0113]



[0114] Se agitó una solución de 5-cloro-1-indanona (0,97 g, 5,8 mmol) y N-bromo succinimida (2,1 g, 11,6 mmol) en DMSO (23 ml) durante 16 horas a 40°C y 4 horas a 80° C al vacío. Se añadió una solución saturada de cloruro de sodio (25 ml) y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (4x25 ml). Las fases orgánicas recogidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó. El crudo se utilizó sin ninguna purificación adicional. Para la condensación entre el diaminotriazol crudo y ninhidrina, véase el procedimiento general A.

6-(7)-Cloro-9-metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (3/A)

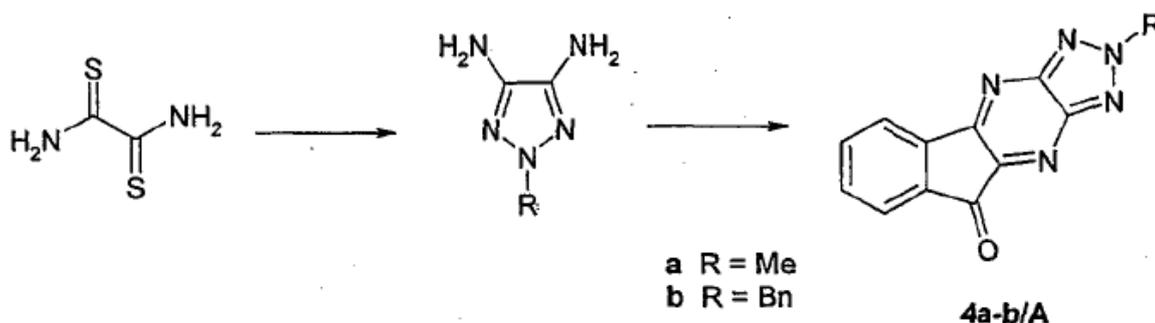
[0115] Rendimiento: 13%, sólido amarillo, mezcla regioisomérica 1:1: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de isómeros): δ 8.19 (d, 1H), 7.96 (d, 1H), 7.74 (dd, 1H), 2.84 (s, 3H), 8.17 (d, 1 H), 7.97 (d, 1 H), 7.86 (dd, 1H), 2.83 (s, 3H). ESI $^+$ MS: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{ClN}_5\text{O}$: 271,67; hallado: 272,0 (MH^+).

7-Cloro-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (3/B)

[0116] Rendimiento: 3%, sólido amarronado: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (d, 1H), 7.90 (d, 1 H), 7.65 (dd, 1 H), 2.79 (s, 3H). ESI $^+$ MS: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{ClN}_5\text{O}$: 271,67; hallado: 272,0 (MH^+).

Procedimiento general D: Síntesis de 2-alkil-2H-1,2,3,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:

[0117]



[0118] Se prepararon 1-metil-3,4-diamino-1,2,5-triazol y 1-bencil-3,4-diamino-1,2,5 según el procedimiento descrito en Chem. Heterocycl. Compd. 1992, 803, partiendo de ditiooxamida. Para la condensación entre el diaminotriazol crudo y ninhidrina, véase el procedimiento general A. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

adición de H₂O. Después de secarse, se recuperó 7 como un sólido marrón con un 79% de rendimiento (68 mg). ¹H RMN (300 MHz, DMSO d₆): δ 7.37 (s, 1 H), 7.24 (s, 1H), 2.63 (s, 3H). ESI⁺MS: calculado para C₁₂H₇N₅O₃: 269,22; hallado: 270,1 (MH⁺).

5 Cisteína proteasas representativas

Ensayo de actividad de USP5

10 **[0135]** Se diluyó USP5 en tampón de USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7,6). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

15 **[0136]** Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 µl). La concentración del sustrato para USP5 fue de 400 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (USP5) en ensayos de especificidad fue de 300 pM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas
20 (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a
25 un modelo sigmoideal (pendiente variable).

Clonación y purificación de USP7

30 **[0137]** Se obtuvo el ADNc que codifica USP7 mediante amplificación por PCR de ARNm de placenta. Se subclonó el ADNc de USP7 mediante PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). Se generó un ADNc que codifica una USP7 mutada mediante PCR mutagénica. La proteína correspondiente codifica una sustitución de cisteína por alanina en el residuo 223. Se verificaron las secuencias mediante la secuenciación del marco de lectura abierto completo. Se generaron bácmidos que codifican USP7 después de la transposición de DH10bac. Se transfectoron los correspondientes bácmidos en células de insectos (Sf9). Se recuperaron los virus del sobrenadante del cultivo y se amplificaron dos veces. Se infectaron las células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) durante 72 horas. Se recogieron los lisados de células completos y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,6; NP40 al 0,75 %; NaCl 500 mM; glicerol al 10%; DTT 1 mM; imidazol 10 mM; Coctel de Inhibidores de Proteasas; AEBSF 20 µg.ml⁻¹; Aprotinina 10 µg.ml⁻¹). Se purificaron por afinidad las proteínas sobre resinas de afinidad de metales (resina de afinidad Talon Metal; BD Biosciences). Se lavaron exhaustivamente los materiales
35 unidos en tampón de lavado (Fosfato de Sodio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; Triton X-100 al 0,5%; glicerol al 10%) y eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía imidazol 250 mM. Se dializaron las proteínas en tampón de diálisis (Tris HCl pH 7,6 20 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; Glicerol al 10%). Se analizaron las purificaciones de proteína sobre NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

45 Ensayo de actividad de USP7

[0138] Se diluyó USP7 en tampón de USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7,6). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

55 **[0139]** Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 µl). La concentración del sustrato para USP7 fue de 400 nM de Ub-AMC (Chem. Biol., 2003, 10, pág. 837-846) (Boston Biochem). La concentración de la enzima (USP7) en ensayos de especificidad fue de 152 pM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

65 Clonación y purificación de USP8

[0140] Se obtuvo el ADNc que codifica USP8 mediante amplificación por PCR de ARNm de placenta. Se subclonó el ADNc de USP8 mediante PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). Se generó un ADNc que codifica una USP8 mutada mediante PCR mutagénica. La proteína correspondiente codifica una sustitución de cisteína por alanina en el residuo 786. Se verificaron las secuencias mediante la secuenciación del marco de lectura abierto completo. Se generaron bácmidos que codifican USP7 después de la transposición de DH10bac. Se transfectaron los correspondientes bácmidos en células de insectos (Sf9). Se recuperaron los virus del sobrenadante del cultivo y se amplificaron dos veces. Se infectaron las células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) durante 72 horas. Se recogieron los lisados de células completos y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,6; NP40 al 0,75 %; NaCl 500 mM; glicerol al 10%; DTT 1 mM; imidazol 10 mM; Cóctel de Inhibidores de Proteasas; AEBSF 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Aprotinina 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Se purificaron por afinidad las proteínas sobre resinas de afinidad de metales (resina de afinidad Talon Metal; BD Biosciences). Se lavaron exhaustivamente los materiales unidos en tampón de lavado (Fosfato de Sodio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; Triton X-100 al 0,5%; glicerol al 10%) y eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía imidazol 250 mM. Se dializaron las proteínas en tampón de diálisis (Tris HCl pH 7,6 20 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; Glicerol al 10%). Se analizaron las purificaciones de proteína sobre NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

Ensayo de actividad de USP8

[0141] Se diluyó USP8 en tampón de USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; albúmina de suero bovino 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pH 8,8). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 μM ; 33,3 μM ; 11,1 μM ; 3,7 μM ; 1,23 μM ; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

[0142] Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 μl). La concentración del sustrato para USP8 fue de 400 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (USP8) en ensayos de especificidad fue de 630 pM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C . Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C . Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Ensayo de actividad de UCH-L3

[0143] Se diluyó Uch-L3 en tampón de USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; albúmina de suero bovino 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pH 7,6). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 μM ; 33,3 μM ; 11,1 μM ; 3,7 μM ; 1,23 μM ; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

[0144] Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 μl). La concentración del sustrato para Uch-L3 fue de 400 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (Uch-L3) en ensayos de especificidad fue de 13 pM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C . Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C . Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Clonación y purificación de SENP1

[0145] Se obtuvo el ADNc que codifica SENP1 mediante amplificación por PCR de ARNm de placenta. Se subclonó el ADNc de SENP1 mediante PCR en un vector de expresión de baculovirus (pMAL-C2X; New England BioLabs, Inc). Se verificaron las secuencias mediante la secuenciación del marco de lectura abierto completo. Se transformó pMAL-C2-SENP1 en células BL21 y se desarrollaron en medio LB-ampicilina complementado con glucosa (2 g/l) La expresión de la proteína de fusión se indujo por IPTG (0,5 mM). Se recogieron los lisados de células bacterianas y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,4; DTA 1 mM; NaCl 200 mM; Triton X-100 al 0,5%; glicerol al 10%; Cóctel de Inhibidores de Proteasas), seguido de sonicación. Se purificaron por afinidad las proteínas sobre resinas de afinidad de amilosa (New England BioLabs, Inc). Se lavaron exhaustivamente los materiales unidos en

tampón de lavado (Tris HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 al 0,5%; glicerol al 10%) y eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía maltosa 10 mM. Se dializaron las proteínas en tampón de diálisis (Tris HCl pH 7,6 20 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; Glicerol al 10%). Se analizaron las purificaciones de proteína sobre NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

5

Ensayo de actividad de SENP1

[0146] Se diluyó MBP-SENP1 en tampón de SENP1 (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7,6). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

10

[0147] Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 µl). La concentración del sustrato para SENP1 fue de 200 nM de SUMO-AMC (Chem. Biol., 2003, 10, p. 837-846) (Boston Biochem). La concentración de la enzima (SENP1) en ensayos de especificidad fue de 1,8 pM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

15

20

25

Ensayo de actividad de Caspasa 3

[0148] Se diluyó Caspasa 3 en tampón de Caspasa 3 (Hepes 100 mM pH 7,5; sacarosa al 10%; CHAPS al 0,1%). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM. Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 µl). La concentración del sustrato para el ensayo de especificidad de caspasa 3 fue de 500 nM (Ac-DEVD-AMC; Promega). La concentración de la enzima (Caspasa 3) en ensayos de especificidad fue de 3,2 nM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

30

35

40

45

Ensayo de actividad de catepsina B

[0149] Se diluyó Catepsina B en tampón de Catepsina B (Tris HCl 20 mM pH 6,8; EDTA 1 mM; DTT 1 mM). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Se analizaron los compuestos a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM. Se llevaron a cabo las reacciones por duplicado en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; volumen final de reacción 20 µl). La concentración del sustrato para el ensayo de especificidad de Catepsina B fue de 36 µM (z-RR-AMC; Calbiochem). La concentración de la enzima (Catepsina B) en ensayos de especificidad fue de 3,6 nM. Se determinaron las concentraciones con el propósito de llevar a cabo los ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales con una concentración fija de sustrato. Se incubaron previamente los compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Se incubaron las reacciones durante 60 minutos a 37°C. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido acético (concentración final 100 mM). Se llevaron a cabo las lecturas en un Lector de Fluorescencia Pherastar (BMG). Emisión λ 380 nm; Excitación λ = 460 nm. Se analizaron los datos (valores promedio +/- desviación estándar) como el % de control (sin compuesto) y se representaron como el porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Se ajustaron los datos a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

50

55

60

Métodos de viabilidad y proliferación celular

65

Ensayo de viabilidad y proliferación de células HCT116

[0150] Las células de cáncer de colon HCT116 se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection), y se mantuvieron en medio 5A de McCoy que contenía FBS al 10%, glutamina 3 mM y penicilina/estreptomicina al 1%. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂.

[0151] Se analizó la viabilidad de las células utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) según las instrucciones del fabricante. El MTS (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un tetrazolio derivado de MTT que se reduce en células metabólicamente activas en formazán soluble permeante en células. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas.

[0152] Se cultivaron 10³ células HCT116 por pocillo. 24 horas después, se cambió el medio y se trataron las células por triplicado con las concentraciones siguientes de cada compuesto: 10 µM -3.33 µM -1.11 µM -370 nM -123 nM -41 nM -14 nM y 5 nM. Se diluyeron los compuestos en DMSO al 100%, cuya concentración final sobre las células se mantuvo en 0,5%.

[0153] Se incubaron las células con los compuestos durante 72 horas, y a continuación se analizó su viabilidad mediante la adición de MTS durante 2 horas. Se midió la absorbancia a 492 nm directamente de las placas de cultivo de 96 pocillos. Se calcularon las concentraciones GI50 (Inhibición de Crecimiento 50) para cada compuesto utilizando un ajuste sigmoïdal de pendiente variable (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes.

Ensayo de viabilidad y proliferación de células PC3

[0154] Las células de cáncer de próstata PC-3 se obtuvieron de la ATCC y se mantuvieron en medio F-12K que contenía FBS al 7% y penicilina/estreptomicina al 1%. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂.

[0155] Se analizó la viabilidad de las células utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) según las instrucciones del fabricante. El MTS (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un tetrazolio derivado de MTT que se reduce en células metabólicamente activas en formazán soluble permeante en células. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas.

[0156] Se cultivaron 2x10³ células PC3 por pocillo. 24 horas después, se cambió el medio y se trataron las células por triplicado con las concentraciones siguientes de cada compuesto: 10 µM -3.33 µM -1.11 µM -370 nM -123 nM -41 nM -14 nM y 5 nM. Se diluyeron los compuestos en DMSO al 100%, cuya concentración final sobre las células se mantuvo en 0,5%.

[0157] Se incubaron las células con los compuestos durante 72 horas, y a continuación se analizó su viabilidad mediante la adición de MTS durante 2 horas. Se midió la absorbancia a 492 nm directamente de las placas de cultivo de 96 pocillos. Se calcularon las concentraciones GI50 (Inhibición de Crecimiento 50) para cada compuesto utilizando un ajuste sigmoïdal de pendiente variable (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes.

RESULTADOS

1. Inhibición de las actividades de cisteína proteasas

USPs

[0158]

Experimento No.	USP 5
Ejemplo 1b/A	7,6 µM
Ejemplo 1b/B	0,234 µM
Ejemplo 1c	0,700 µM
Ejemplo 1c/A	2,8 µM
Ejemplo 1c/B	0,390 µM
Ejemplo 1d/A	3,23 µM
Ejemplo 1d/B	0,253 µM
Ejemplo 1e/B	0,363 µM
Ejemplo 1f/A	3,9 µM
Ejemplo 1f/B	0,237 µM

ES 2 439 456 T3

Ejemplo 1g/B	0,423 µM
Ejemplo 1h/A	2,5 µM
Ejemplo 1h/B	0,546 µM
Ejemplo 1i/B	0,487 µM
Ejemplo 1j/A	3,1 µM
Ejemplo 1j/B	0,317 µM
Ejemplo 1k/A	34,8 µM
Ejemplo 1k/B	0,206 µM
Ejemplo 1l/A	3,9 µM
Ejemplo 2a/A	0,549 µM
Ejemplo 3/A	1,54 µM
Ejemplo 3/B	0,260 µM
Ejemplo 4a	23 µM
Ejemplo 4b	> 100 µM
Ejemplo 5b/A	4,8 µM
Ejemplo 5b/B	0,276 µM

Experimento No.	USP 7
Ejemplo 1b/A	16,7 µM
Ejemplo 1b/B	0,55 µM
Ejemplo 1c	1,4 µM
Ejemplo 1c/A	15,3 µM
Ejemplo 1c/B	0,7 µM
Ejemplo 1d/A	16,5 µM
Ejemplo 1d/B	0,225 µM
Ejemplo 1e/A	> 100 µM
Ejemplo 1e/B	0,662 µM
Ejemplo 1f/A	23 µM
Ejemplo 1f/B	0,604 µM
Ejemplo 1g/A	> 100 µM

Experimento No.	USP 8
Ejemplo 1b/A	0,701 µM
Ejemplo 1b/B	0,056 µM
Ejemplo 1c	0,170 µM
Ejemplo 1c/A	0,840 µM
Ejemplo 1c/B	0,081 µM
Ejemplo 1d/A	0,537 µM
Ejemplo 1d/B	0,055 µM
Ejemplo 1e/A	0,952 µM
Ejemplo 1e/B	0,169 µM
Ejemplo 1f/A	0,830 µM
Ejemplo 1f/B	0,151 µM
Ejemplo 1g/A	0,538 µM

5

Experimento No.	USP 7
Ejemplo 1g/B	0,789 µM
Ejemplo 1h/A	9,7 µM
Ejemplo 1h/B	1,61 µM
Ejemplo 1i/A	> 100 µM
Ejemplo 1i/B	0,461 µM
Ejemplo 1j/A	-
Ejemplo 1j/B	0,207 µM
Ejemplo 1k/A	3,3 µM
Ejemplo 1k/B	0,425 µM
Ejemplo 1l/B	0,820 µM
Ejemplo 1m/B	0,226 µM
Ejemplo 1n/A	1,2 µM
Ejemplo 2a/A	2,6 µM
Ejemplo 3/A	2,8 µM
Ejemplo 3/B	0,522 µM
Ejemplo 4a	51 µM
Ejemplo 4b	> 100 µM
Ejemplo 5a/B	0,525 µM
Ejemplo 5b/A	13,3 µM
Ejemplo 5b/B	1,05 µM
Ejemplo 5c/B	0,936 µM
Ejemplo 6/B	3,08 µM

Experimento No.	USP 8
Ejemplo 1g/B	0,167 µM
Ejemplo 1h/A	0,67 µM
Ejemplo 1h/B	0,164 µM
Ejemplo 1i/A	0,256 µM
Ejemplo 1i/B	0,188 µM
Ejemplo 1j/A	2,5 µM
Ejemplo 1j/B	0,046 µM
Ejemplo 1k/A	0,663 µM
Ejemplo 1k/B	0,166 µM
Ejemplo 1l/B	0,186 µM
Ejemplo 1jmB	0,162 µM
Ejemplo 1knA	0,347 µM
Ejemplo 2a/A	0,28 µM
Ejemplo 3/B	0,119 µM
Ejemplo 3/A	0,301 µM
Ejemplo 4a	10 µM
Ejemplo 4b	15 µM
Ejemplo 5a/B	0,046 µM
Ejemplo 5b/A	0,805 µM
Ejemplo 5b/B	0,065 µM
Ejemplo 5c/B	0,104 µM
Ejemplo 6/B	0,360 µM

UCH-L3

[0159]

Experimento No.	Uch-L3
Ejemplo 1b/A	0.516 μ M
Ejemplo 1b/B	0.143 μ M
Ejemplo 1c	0.240 μ M
Ejemplo 1c/A	0.860 μ M
Ejemplo 1c/B	0.133 μ M
Ejemplo 1d/A	0.430 μ M
Ejemplo 1d/B	0.095 μ M
Ejemplo 1e/A	1.27 μ M
Ejemplo 1e/B	0.168 μ M
Ejemplo 1f/A	0.364 μ M
Ejemplo 1f/B	0.091 μ M
Ejemplo 1g/A	0.636 μ M
Ejemplo 1g/B	0.183 μ M
Ejemplo 1h/A	0.39 μ M
Ejemplo 1h/B	0.158 μ M
Ejemplo 1i/A	0,261 μ M
Ejemplo 1i/B	0.202 μ M
Ejemplo 1j/A	1.9 μ M
Ejemplo 1j/B	0.055 μ M
Ejemplo 1k/A	0.598 μ M
Ejemplo 1k/B	0.164 μ M
Ejemplo 1l/A	0.8 μ M
Ejemplo 2a/A	0.133 μ M
Ejemplo 2b	-
Ejemplo 3/BA	0.071 323 μ M
Ejemplo 3/AB	0.323 071 μ M
Ejemplo 4a	3.4 μ M
Ejemplo 4b	7.8 μ M
Ejemplo 5b/A	1.8 μ M
Ejemplo 5b/B	0.131 μ M

SENp1

5

[0160]

Experimento No.	SENp1
Ejemplo 1b/A	> 100 μ M
Ejemplo 1b/B	0,706 μ M
Ejemplo 1c/B	0,731 μ M
Ejemplo 1d/B	0,415 μ M
Ejemplo 1e/A	5,88 μ M
Ejemplo 1e/B	0,694 μ M
Ejemplo 1f/B	0,229 μ M
Ejemplo 1g/B	0,954 μ M
Ejemplo 1h/A	> 100 μ M
Ejemplo 1h/B	1,02 μ M
Ejemplo 1i/A	22,1 μ M
Ejemplo 1i/B	1,09 μ M
Ejemplo 1j/B	0,299 μ M
Ejemplo 1k/B	1,21 μ M
Ejemplo 3/A	> 100 μ M
Ejemplo 3/B	0,855 μ M
Ejemplo 5b/A	35,7 μ M
Ejemplo 5b/B	1,28 μ M

Caspasa

10

[0161]

Experimento No.	Uch-L3
Ejemplo 1b/A	4,1 μM
Ejemplo 1b/B	0,424 μM
Ejemplo 1c/A	3,7 μM
Ejemplo 1c/B	0,212 μM
Ejemplo 1d/A	11,6 μM
Ejemplo 1d/B	0,467 μM
Ejemplo 1e/B	0,727 μM
Ejemplo 1f/A	4,6 μM
Ejemplo 1f/B	0,475 μM
Ejemplo 1g/B	0,629 μM
Ejemplo 1h/A	3,9 μM
Ejemplo 1h/B	1,02 μM
Ejemplo 1i/A	0,926 μM
Ejemplo 1i/B	0,556 μM
Ejemplo 1j/A	1,9 μM
Ejemplo 1j/B	0,188 μM
Ejemplo 1k/A	0,598 μM
Ejemplo 1k/B	0,164 μM
Ejemplo 1l/A	5,0 μM
Ejemplo 3/A	1,51 μM
Ejemplo 3/B	0,743 μM
Ejemplo 5b/A	5,2 μM
Ejemplo 5b/B	0,314 μM

Catepsina B

5

[0162]

Experimento No.	Uch-L3
Ejemplo 1b/A	24 μM
Ejemplo 1b/B	0,182 μM
Ejemplo 1c/A	5,0 μM
Ejemplo 1c/B	0.103 μM
Ejemplo 1d/B	0,150 μM
Ejemplo 1e/A	5,41 μM
Ejemplo 1e/B	0.267 μM
Ejemplo 1f/A	6,5 μM
Ejemplo 1f/B	0.233 μM
Ejemplo 1g/A	4,62 μM
Ejemplo 1g/B	0.264 μM
Ejemplo 1h/A	30 μM
Ejemplo 1h/B	0.547 μM
Ejemplo 1i/A	1,02 μM
Ejemplo 1i/B	0.314 μM
Ejemplo 1j/B	0.181 μM
Ejemplo 1k/B	0.363 μM
Ejemplo 1l/A	9,2 μM
Ejemplo 2a/A	12 μM
Ejemplo 3/A	17,4 μM
Ejemplo 3/B	0.147 μM

2. Inhibición de la viabilidad y proliferación celular

10

[0163]

Experimento No.	HCT116 GI50 D3
Ejemplo 1b/A	1,3 μM

Ejemplo 1b/B	0,084 μ M
Ejemplo 1c	1,5 μ M
Ejemplo 1c/A	8,5 μ M
Ejemplo 1c/B	0,981 μ M
Ejemplo 1d/A	1,4 μ M
Ejemplo 1d/B	0,059 μ M
Ejemplo 1e/A	3,1 μ M
Ejemplo 1e/B	0,067 μ M
Ejemplo 1f/A	1,357 μ M
Ejemplo 1f/B	0,040 μ M
Ejemplo 1g/A	3,0 μ M
Ejemplo 1g/B	0,053 μ M
Ejemplo 1h/A	2,05 μ M
Ejemplo 1h/B	0,323 μ M
Ejemplo 1i/A	1,285 μ M
Ejemplo 1i/B	0,065 μ M
Ejemplo 1j/B	0,160 μ M
Ejemplo 1k/B	0,149 μ M
Ejemplo 1l/A	2,25 μ M
Ejemplo 1l/B	0,157 μ M
Ejemplo 1m/A	0,028 μ M
Ejemplo 1n/A	1,91 μ M
Ejemplo 2a/A	0,581 μ M
Ejemplo 3/B	0,098 μ M
Ejemplo 3A	0,361 μ M
Ejemplo 5a/B	0,818 μ M
Ejemplo 5b/B	1,18 μ M
Ejemplo 5c/B	0,594 μ M
Ejemplo 6/B	0,257 μ M

PC3

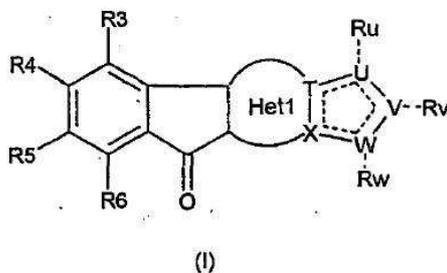
[0164]

5

Experimento No.	PC3 GI50 D3
Ejemplo 1b/A	7,09 μ M
Ejemplo 1b/B	0,334 μ M
Ejemplo 1c	4,0 μ M
Ejemplo 1c/B	3,17 μ M
Ejemplo 1d/A	5,4 μ M
Ejemplo 1d/B	0,256 μ M
Ejemplo 1e/A	4,2 μ M
Ejemplo 1e/B	0,175 μ M
Ejemplo 1f/A	3,8 μ M
Ejemplo 1f/B	0,096 μ M
Ejemplo 1g/A	4,0 μ M
Ejemplo 1g/A	4,0 μ M
Ejemplo 1g/B	0,162 μ M
Ejemplo 1h/A	4,0 μ M
Ejemplo 1h/B	1,442 μ M
Ejemplo 1i/A	1,751 μ M
Ejemplo 1i/B	0,238 μ M
Ejemplo 1j/B	0,107 μ M
Ejemplo 1k/B	0,235 μ M
Ejemplo 2a/A	0,983 μ M
Ejemplo 3/B	0,286 μ M
Ejemplo 3A	0,994 μ M

REIVINDICACIONES

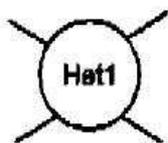
1. Compuesto de fórmula (I):



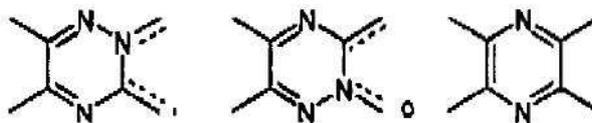
en el que:

== es un enlace simple o doble, según sea apropiado;

----- no es ningún enlace o es un enlace simple, según sea apropiado;



es



T, U, V, W, X son lo mismo o diferentes y se pueden elegir entre C o N.

Ru, se puede elegir del grupo que consiste en CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, perhalogenoalquilo, NRCN, C(CN)=C(OH) (OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', Heterociclo, Arilo, Heteroarilo, Cicloalquilo, en los que Alq, Arilo, Heteroarilo, Heterociclo, Cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo, OAlq o poli(alquilenoxi),

Rv y Rw son de manera independiente H o están ausentes

R3, R4, R5, R6 son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF₃, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

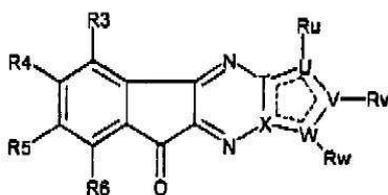
R y R' son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

2. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, en el que Ru se elige entre Arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, Cicloalquilo, -CF₃, -CH₂-(OC₂H₄)₂-OCH₃.

3. Compuesto, según la reivindicación 1 ó 2, en el que R3, R4, R5, R6 son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Hal, Alq, OAlq, OH, OCF₃.

4. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que es de fórmula (Ib):



(b)

en el que R3-R6 y Ru, Rv, Rw, T, U, V, W, X son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Rv=Rw=H y Ru se elige entre Arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, Cicloalquilo, -CF₃, -CH₂-(OC₂H₄)₂-OCH₃.

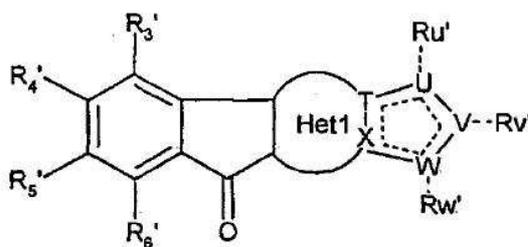
6. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R4=R5=H y R3, R6 se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Hal, Alq, OAlq, OH, OCF₃.

7. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, elegido del grupo que consiste en:

- 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Amino-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isobutil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Hidroximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Metoximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Ciclopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Bencil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-bromo-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 7-Cloro-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Isopropil-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Trifluorometil-1,2, 3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 6, 7-Dimetoxi-3-metil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-6, 7-dimetoxi-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 6, 7-Dimetoxi-3-propil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
- 3-Etil-5, 8-dimetoxi-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

8. Proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa de reaccionar un compuesto correspondiente de fórmula (I')



(I')

en los que Het1, T, U, V, W, X se definen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y en el que por lo menos uno de R₃', R₄', R₅', R₆', Ru', Rv', Rw' es un grupo precursor de los correspondientes R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv, Rw y los otros son similares a los R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv, Rw deseados, mediante una o más etapas que permiten que un

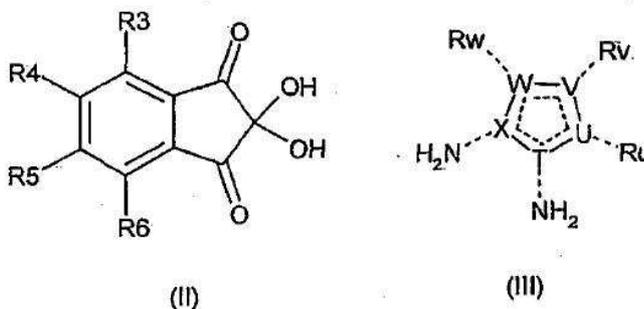
grupo precursor se transforme en el grupo R₃, R₄, R₅, R₆, Ru, Rv o Rw deseado, y opcionalmente el aislamiento del compuesto de fórmula (I).

9. Proceso de preparación de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa de reaccionar los correspondientes compuestos de fórmula (II) y (III):

5

10

15



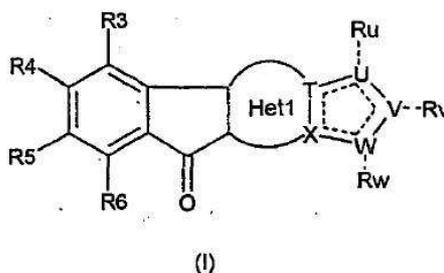
20 en los que R₃, R₄, R₅, R₆, T, U, V, W, X, Ru, Rv, Rw se definen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10. Proceso, según la reivindicación 9, en el que la reacción se lleva a cabo en un disolvente prótico orgánico en presencia de un ácido.

25 11. Composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I)

30

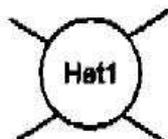
35



en el que:

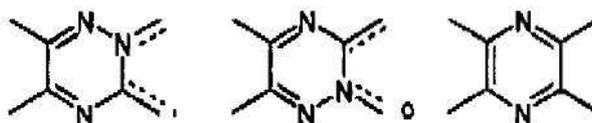
40 --- es un enlace simple o doble, según sea apropiado;
 - - - - no es ningún enlace o es un enlace simple, según sea apropiado;

45



50 es

55



T, U, V, W, X son el mismo o diferentes y se pueden elegir entre C o N.

60 Ru se puede elegir del grupo que consiste en CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, perhalogenoalquilo, NRCN, C(CN)=C(OH) (OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', Heterociclo, Arilo, Heteroarilo, Cicloalquilo, en los que Alq, Arilo, Heteroarilo, Heterociclo, Cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo, OAlq o poli(alquilenoxi),

Rv y Rw son de manera independiente H o están ausentes

65 R₃, R₄, R₅, R₆ son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF₃, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

R y R' son cada uno idéntico o diferente y se eligen de manera independiente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por uno o más de Hal, NRR', CN, OH, CF₃, Arilo, Heteroarilo;

5 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 12. Composición farmacéutica, según la reivindicación 11, en la que la fórmula (I) se define según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

13. Composición farmacéutica, según la reivindicación 11 ó 12, en la que dicho compuesto de fórmula (I) se elige del grupo que consiste en:

- 15 - 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Amino-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Propil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 20 - 3-Isobutil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Hidroximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Metoximetil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Ciclopropil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Bencil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 25 - 3-bromo-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 7-Cloro-3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Isopropil-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Trifluorometil-1,2, 3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 6, 7-Dimetoxi-3-metil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 30 - 3-Etil-6, 7-dimetoxi-1, 2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 6, 7-Dimetoxi-3-propil-1,2,3a, 4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona
 - 3-Etil-5, 8-dimetoxi-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b] fluoren-9-ona

35 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

14. Compuesto de fórmula (I), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para utilizar en un método para inhibir una o más cisteína proteasas.

40 15. Compuesto, según la reivindicación 14, en el que dichas cisteína proteasas pertenecen a uno o más grupos de enzimas de desubiquitinación, caspasas, catepsinas, calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas o parasitarias.

45 16. Compuesto de fórmula (I), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para utilizar en un método de tratamiento y/o prevención de cáncer y metástasis, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y/o infectividad viral y/o latencia, en particular para el virus-1 del Herpes simplex, virus de Epstein-Barr, coronavirus de SARS, trastornos inflamatorios, trastornos neurodegenerativos, preferiblemente daño de las células nerviosas causado por apoplejía, daño hepático e insuficiencia hepática resultante de una lesión hepática infecciosa, isquémica o química aguda o crónica, daño renal e insuficiencia renal resultante de una lesión renal infecciosa, isquémica o química aguda o crónica, daño cardíaco e insuficiencia cardíaca resultante de una lesión cardíaca infecciosa, isquémica o química aguda o crónica, diabetes resultante de una lesión autoinmune, química, oxidativa, metabólica aguda o crónica en las células beta de insulina de los islotes pancreáticos, cáncer y metástasis, enfermedades cardiovasculares, trastornos inmunológicos, enfermedades óseas y de las articulaciones, osteoporosis, artritis, trastornos del envejecimiento, diabetes de inicio tardío, cataratas, infecciones y enfermedades virales, infecciones y enfermedades bacterianas, infecciones y enfermedades fúngicas, infecciones y enfermedades parasitarias por protozoos, infecciones y enfermedades parasitarias por gusanos planos, infecciones y enfermedades parasitarias por gusanos redondos.

60 17. Compuesto, según la reivindicación 16, en el que dichas infecciones y enfermedades virales se eligen entre hepatitis A, hepatitis C, infección y enfermedad por el coronavirus de SARS, infecciones y enfermedades rinovirales, infecciones y enfermedades adenovirales, poliomielitis.

65 18. Compuesto, según la reivindicación 16, en el que dichas infecciones o enfermedades bacterianas se eligen entre infecciones y enfermedades por estreptococos, infecciones y enfermedades causadas por bacterias del género *Clostridium sp.*, infecciones y enfermedades por estafilococos, gingivitis y enfermedades periodontales.

- 5 19. Combinación que comprende un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, con una o más terapias elegidas entre terapias anticáncer, terapias neurológicas, terapias trombolíticas, terapias antioxidantes, terapias antiinfecciosas, terapias antihipertensivas, terapias diuréticas, terapias trombolíticas, terapias inmunosupresoras, terapias cardiovasculares, terapias inmunomoduladoras, terapias antiinflamatorias, terapias antivirales, terapias antibacterianas, terapias antifúngicas, terapias antiprotozoos, terapias antiparasitarias.