

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 383**

51 Int. Cl.:

**C07D 219/04** (2006.01)

**C07D 219/06** (2006.01)

**C07D 401/14** (2006.01)

**A61K 31/473** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2011 E 11701220 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2523938**

54 Título: **Derivados de amidoacridina útiles como inhibidores selectivos de la proteasa 7 específica para la ubiquitina**

30 Prioridad:

**13.08.2010 US 885983**

**13.08.2010 EP 10172844**

**15.01.2010 US 295399 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.11.2014**

73 Titular/es:

**HYBRIGENICS S.A. (100.0%)**

**3/5, Impasse Reille**

**75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LOPEZ, ROMAN y**

**COLLAND, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 523 383 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

Derivados de amidoacridina útiles como inhibidores selectivos de la proteasa 7 específica para la ubiquitina.

- 5 La presente invención se refiere al descubrimiento de nuevos inhibidores selectivos de proteasas específicas de ubiquitina, a su procedimiento de preparación y a su utilización terapéutica.

Las proteasas específicas de ubiquitina (USP) son cisteína proteasas que pertenecen a la familia de enzimas de desubiquitinilación (DUB).

- 10 La desregulación del sistema ubiquitina-proteasoma ha estado implicada en la patogenia de muchas enfermedades humanas, como por ejemplo el cáncer (Hoeller *et al. Nat. Rev. Cancer* 2006, 6(10), 776-788), trastornos neurodegenerativos (Rubinsztein, *Nature* 2006, 443(7113), 780-786) y enfermedades víricas (Gao y Luo *Can J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 84(1), 5-14). El éxito en el mercado del inhibidor del proteasoma Velcade® (bortezomib) para el tratamiento del mieloma múltiple y del linfoma de células del manto ha establecido este sistema como un objetivo válido para el tratamiento del cáncer (Adams, *Nat. Rev. Cancer* 2004, 4(5), 349-360). Una alternativa prometedora a dirigirse al propio proteasoma sería interferir con el mecanismo de conjugación/desconjugación de ubiquitina corriente arriba, para generar agentes anticancerígenos más específicos y menos tóxicos.

- 20 Las enzimas desubiquitinizadoras, que escinden específicamente el enlace isopeptídico en el terminal C de ubiquitina, pueden invertir la mono- y poliubiquitinación. Las enzimas proteasas específicas de ubiquitina e hidrolasas del terminal C de ubiquitina (UCH) son los miembros mejor caracterizados de la familia DUB (Komander *et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009, 10(8), 550-63; Nijman *et al. Cell* 2005, 123(5), 773-786). Se cree que las UCH escinden pequeños sustratos proteicos preferentemente y están involucradas principalmente en el tratamiento y ciclo de ubiquitina, pero sus funciones específicas siguen siendo poco comprendidas. Las USP constituyen la mayor subfamilia de DUB, con más de 60 miembros. Eliminan la ubiquitina de sustratos proteicos específicos, evitando de este modo su orientación al proteasoma o regulando su localización la activación subcelular (Daviet & Colland, *Biochimie* 2008, 90(2), 270-83). Las USP están surgiendo como posibles objetivos para la interferencia farmacológica con el mecanismo de regulación de ubiquitina, basándose en su actividad de proteasa y en la implicación en varias enfermedades humanas.

- USP7 (Proteasa 7 específica para ubiquitina)/HAUSP (Proteasa específica para ubiquitina asociada al herpes) es una proteína de 135 kDa de la familia USP. Se ha demostrado que USP7 interactúa con proteínas víricas, tales como ICP0 (Vmw 110), una iniciación estimulante del ciclo lítico vírico del gen precoz inmediato del virus del herpes simple (Everett *et al., J. Virol.* 73, 1999, 417-426), y EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1/Antígeno-1 nuclear de Epstein-Barr) (Holowaty *et al., J. Biol. Chem.* 2003, 278, 29987-29994 y 47753-47761). Las proteínas humanas, tales como p53 y la E3 ligasa mayor de p53, Mdm2, también se han identificado como asociadas y sustratos de USP7 (Cummins *et al. Nature* 2004, 486, Cummins y Vogelstein, *Cell Cycle*, 2004, 3, 689-692; Li *et al. Mol. Cell* 2004, 13, 879-886.; Li *et al., Nature* 2002, 416, 648-653). Más en general USP7 puede desubiquitinar diferentes objetivos, entre ellos Mdm2 y p53, y la desubiquitinación neta de estos últimos objetivos determina en última instancia, niveles de p53 funcional. Según informes recientes, se ha demostrado también que el silenciamiento de USP7 aumenta los niveles de p53 en estado estacionario al favorecer la degradación de Mdm2. La unión de USP7 a p53 ha demostrado recientemente que está regulada por TSPYL5, una proteína potencialmente implicada en la oncogenia de mama a través de una competencia con p53 para la unión a la misma región de USP7 (Epping *et al., Nat. Cell Biol.* 2011, 13(1):102-8). Más recientemente, tanto el aumento como la disminución de USP7 se ha demostrado que inhiben la proliferación de células de cáncer de colon *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*, dando como resultado niveles constitutivamente elevados de p53 (Becker *et al. Cell Cycle* 2008, 7(9), 1205-13).

- 50 La USP7 altera además el nivel del supresor tumoral p16<sup>INK4a</sup> por estabilización de Bmi1/Mel18 (Maertens *et al., EMBO J.* 2010 29, 2553-2565). Otras proteínas que participan en la integridad /regulación genómica como la DNMT1 ADN metilasa y el adaptador de Claspin también son también estabilizados por USP7 (Du *et al., Science Signaling* 2010, 3(146):ra80; Fastrup *et al., J. Cell. Biol.* 2009,184(1):13-9). Es importante destacar la abundancia de USP7 y DNMT1, una proteína implicada en el mantenimiento de la metilación epigenética requerida para silenciar genes que intervienen en el desarrollo y el cáncer, se correlaciona en el cáncer de colon humano (Du *et al., Science Signaling*, 2010, 3(146): ra80). La USP7 también se ha presentado en células humanas para desubiquitinar el conocido gen supresor de tumores PTEN, lo que provoca su exportación nuclear y por lo tanto su inactivación (Song *et al., Nature* 2008, 455(7214), 813-7). Más significativamente, la sobreexpresión de USP7 se describió por primera vez en cáncer de próstata y esta sobreexpresión se asoció directamente a la agresividad del tumor (Song *et al., Nature* 2008, 455(7214), 813-7).

- 60 La USP7 también se ha presentado en células humanas para desubiquitinar FOXO4, lo que provoca su exportación nuclear y por lo tanto su inactivación; por consiguiente, la vía PI3K/PKB de señalización oncogénica se activó (van der Horst *et al., Nat. Cell Biol.* 2006, 8, 1064-1073). Por último, USP7 desempeña una función importante en las respuestas celulares mediadas por p53 a diversos tipos de estrés, tales como daños en el ADN y estrés oxidativo (Marchenko *et al., EMBO J.* 2007 26, 923-934, Meulmeester *et al. Mol. Cell* 2005, 18, 565-576, van der Horst *et al., Nat. Cell Biol.* 2006, 8, 1064-1073).

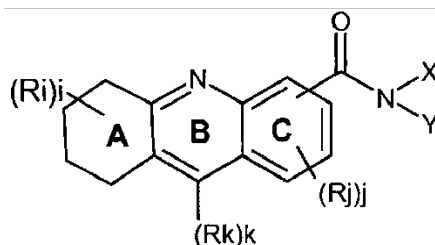
Los inhibidores sintéticos de la proteína de unión USP7 que contiene la porción de polipéptido P<sup>1</sup>-Gly-P<sup>3</sup>-Ser, donde P<sup>1</sup> es un resto de ácido glutámico o un aminoácido con una cadena lateral apolar y P<sup>3</sup> es un resto de glicina o un aminoácido con cadena lateral apolar, se han descrito (documento WO 2006/072048).

Los fenotipos asociados al silenciamiento de USP7 y las conexiones conocidas entre USP7 y las proteínas víricas esenciales y las vías oncogénicas, tales como el p53/Mdm2 y las vías PI3K/PKB, sugieren fuertemente que el objetivo USP7 con inhibidores de molécula pequeña puede ser beneficioso en el tratamiento de cánceres y enfermedades víricas. Un inhibidor contra USP7 se describió recientemente (Colland *et al. Molecular Cancer Therapeutics* 2009, 8, 2286-95 y el documento EP 1 749 822).

Sin embargo, hasta la fecha, no parecen haberse descrito inhibidores de pequeña molécula de USP7 no específicos.

La presente invención se refiere a un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, para el procedimiento de la reivindicación 5 y a la composición de la reivindicación 7, para la utilización de las reivindicaciones 8 a 11 y a la combinación de la reivindicación 12.

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



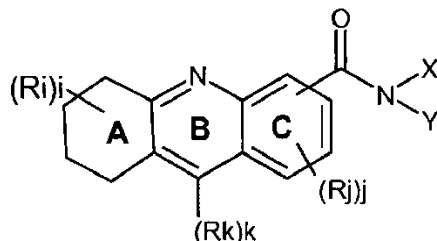
en la que:

- i es un número entero seleccionado de entre 0, 1, 2, 3 o 4;
- j es un número entero seleccionado de entre 0, 1, 2 o 3;
- k es un número entero seleccionado de entre 0 o 1;
- cada Ri situado en cualquier posición disponible del anillo A es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, alquilarilo, OR, NRR', CN, CF<sub>3</sub>, COR, COOR, CONRR';
- cada Rj situado en cualquier posición disponible del anillo C es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, alquilarilo, OR, NRR', CN, COR, COOR, CONRR';
- Rk se selecciona independientemente de entre halógeno;
- X se selecciona de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo, en el que dichos alquilo y/o arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, alquilo, CN, CF<sub>3</sub>, OR, NRR', COR, COOR, CONRR';
- Y se selecciona de entre:
  - (CHT)<sub>p</sub>NRaRb donde
    - Ra y Rb, idénticos o diferentes, se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo o arilalquilo, en los que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, alquilo, CN, CF<sub>3</sub>, =O, OR, NRR', COR, COOR, CONRR';
    - o Ra y Rb forman juntos con el átomo de N al que están unidos un N que comprende un heterociclo de 5 a 7 eslabones que puede comprender uno o dos heteroátomos más seleccionados entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido por uno o más de entre halógeno; =O; alquilo; -alquilarilo o arilo en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno; CN; CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR; CONRR';
  - p es un número entero seleccionado entre 0 a 6;
  - cada uno de los T', idénticos o diferentes se selecciona independientemente de entre H o alquilo;



- X es H e Y es un fenilo sustituido por CN o -C(=O)CH<sub>3</sub>; o
- X e Y juntos forman un anillo de piperazinilo sustituido por un metoxifenilo o fluorofenilo; o
- X e Y juntos forman un anillo piperidilo sustituido por un grupo piperidilo; o
- uno de X es H e Y es un grupo piperidilo sustituido con COOEt.

En especial, los compuestos de la invención pueden presentar la fórmula siguiente:



donde Hal se selecciona de entre F, Cl, Br o I.

Los compuestos especiales son los de fórmula (I), en los que:

- $i = j = 0$ ; y/o
- X se selecciona de entre H, alquilo opcionalmente sustituido por CN;
- Y es como se definió anteriormente;
- o X e Y juntos forman con el átomo de N al que están unidos un heterociclo que comprende dicho átomo de N y opcionalmente uno o dos heteroátomos más, estando dicho heterociclo opcionalmente insaturados y/o
  - estando opcionalmente sustituido por uno o más de entre: =O; Hal, CN, NRR', C(=O)alquilo, alquilo; cicloalquilo; heterociclo; C(=O)-Oalquilo; -alquilheterociclo; arilo o alquilarilo-, donde dicho arilo está opcionalmente fusionado con un heterociclo y/o estando dicho arilo opcionalmente sustituido por alquilo o COalquilo; estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido por un alquilo;
  - estando opcionalmente fusionado con un arilo.

Según una forma de realización, Hal es F, Br o I.

Según otra forma de realización:

- X se define como anteriormente e Y se selecciona de entre:
  - (CT<sub>2</sub>'<sub>p</sub>) NRR<sub>a</sub>R<sub>b</sub> donde
    - Ra y Rb, idénticos o diferentes, se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo, en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por alquilo;
    - p es de 0 a 4,
 o cuando
    - Ra y Rb forman juntos con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 a 7 eslabones que comprende opcionalmente uno o dos heteroátomos más seleccionados de entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido con uno o más de entre halógeno; =O; alquilo; -alquilarilo o arilo, donde arilo está opcionalmente sustituido por halógeno; =O; CN; CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR; CONRR'; estando dicho heterociclo opcionalmente fusionado con un arilo y;
    - p se selecciona de entre 2 o 3;

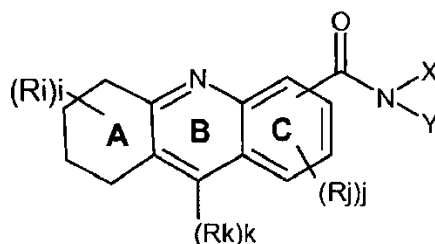
cada uno de los T', idénticos o diferentes, se selecciona independientemente de entre H o un alquilo lineal o ramificado, en el que el alquilo está opcionalmente sustituido por uno o más OR, arilo; en una forma de realización por lo menos uno de T' es diferente de H;











en la que:

- 5
- i es un número entero seleccionado de entre 0, 1, 2, 3 o 4; preferentemente  $i = 0$
  - j es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2 o 3, preferentemente  $j = 0$
- 10
- cada  $R_i$  situado en cualquier posición disponible del anillo A es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, alquilarilo, OR,  $NRR'$ , CN,  $CF_3$ , COR, COOR, CONRR';
  - cada  $R_j$  situado en cualquier posición disponible del anillo C es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, alquilarilo, OR,  $NRR'$ , CN, COR, COOR, CONRR';
- 15
- X es H
  - Y se selecciona de entre:
    - $(CHT)_r$ -arilo en el que:
      - 20
        - dicho arilo es un arilo monocíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de entre alquilo,  $SO_2NRR'$ ;  $-C(=O)-R$ ; CN;  $-NRR'$ , CONRR,  $C(=O)-O$ alquilo; en el que dicho alquilo está sustituido por  $NRR'$  o  $NR''R'''$ ; preferentemente, el arilo es un fenilo sustituido por un grupo alquilo sustituido por  $NR''R'''$
        - 25
          - r es un número entero seleccionado de entre 0 a 6; preferentemente r es 0 o 1;
          - cada uno de los T es H;
- 30
- donde  $R''$  y  $R'''$  juntos forman con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 a 7 eslabones que comprende N que puede comprender uno o dos heteroátomos más seleccionados de entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido por uno o más de entre halógeno; alquilo; CN;  $CF_3$ ; OR;  $NRR'$ ; COR; COOR; CONRR'; preferentemente,  $R''$  y  $R'''$  juntos forman con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 eslabones opcionalmente sustituido con uno o más de entre halógeno; alquilo; CN;  $CF_3$ ; OR;  $NRR'$ ; COR; COOR; CONRR'; preferentemente,  $R''$  y  $R'''$  juntos forman con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 eslabones;
- 35
- donde R y  $R'$ , idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo;
- 40
- preferentemente, el arilo es un fenilo sustituido por un grupo alquilo sustituido por  $NR''R'''$  y  $R''$  y  $R'''$  forman juntos con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 eslabones;
- $(CT_2')_pNRaRb$  donde
    - 45
      - cuando cada uno de los  $T'$  es H,
- Ra y Rb forman juntos con el átomo de N al que están unidos
- un heterociclo monosustituido de 6 eslabones que comprende N en el que el átomo de carbono adyacente al heteroátomo está sustituido por un grupo alquilo; y p es 1, 3 o 4; preferentemente p es 4 o
  - un heterociclo de 6 eslabones que comprende N y p es 1 a 4, preferentemente p es 1 a 3, por ejemplo p es 2; o
  - 55
    - un heterociclo de 5 eslabones que comprende N en el que el átomo de carbono adyacente al heteroátomo está sustituido por un grupo alquilo; y p es 1 a 4, preferentemente p es 1, 2 o 3; preferentemente p es 2 o 3; o

- un heterociclo de 7 eslabones que comprende N opcionalmente sustituido por un grupo alquilo y p es 1, 2 o 4, preferentemente p es 2;

- 5
- un heterociclo de 5 eslabones que comprende N y p es 1, 2 o 4;
  - un heterociclo de 5 a 7 eslabones que comprende N sustituido con uno o más de entre halógeno, alquilarilo, o arilo, en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por uno o más de entre halógeno, CN, CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR; CONRR';

10 donde R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo;

preferentemente: Ra y Rb forman conjuntamente con el átomo de N al que están unidos

- 15
- un heterociclo monosustituido de 6 eslabones que comprende N en el que el átomo de carbono adyacente al heteroátomo está sustituido por un grupo alquilo; y p es 1, 3 o 4; preferentemente p es 4 o

- 20
- un heterociclo de 6 eslabones que comprende N y p es 1 a 4, preferentemente p es 1 a 3, por ejemplo p es 2; o

- 25
- un heterociclo de 5 eslabones que comprende N en el que el átomo de carbono adyacente al heteroátomo está sustituido por un grupo alquilo; y p es 1 a 4, preferentemente p es 1, 2 o 3; preferentemente p es 2 o 3; o

- un heterociclo de 7 eslabones que comprende N opcionalmente sustituido por un grupo alquilo y p es 1, 2 o 4, preferentemente p es 2;

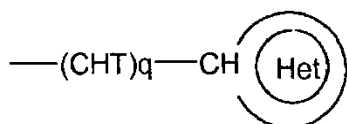
30 donde R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo,

- cuando cada uno de los T', idénticos o diferentes, se selecciona independientemente de H o un alquilo lineal o ramificado, en el que el alquilo está opcionalmente sustituido por uno o más de entre OR, arilo, y por lo menos uno de los T' es diferente de H,

- 35
- Ra y Rb, idénticos o diferentes, se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo o arilalquilo, en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, alquilo, CN, CF<sub>3</sub>, =O, OR, NRR', COR, COOR, CONRR'; y p es un número entero seleccionado de entre 0 a 6; preferentemente Ra y Rb, idénticos o diferentes, son alquilo y p es 2, 3 o 4, preferentemente p es 3 o 4; o

- 40
- Ra y Rb forman juntos con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 a 7 eslabones que comprende N que puede comprender uno o dos heteroátomos más seleccionados de entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido por uno o más de entre halógeno; =O; alquilo; -alquilarilo o arilo en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno; CN; CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR; CONRR'; y p es un número entero seleccionado de entre 0 a 6; preferentemente Ra y Rb forman con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 eslabones que comprende N y p es 2, 3 o 4;

50 donde R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo,



en la que:



- es un heterociclo monocíclico saturado de 5 eslabones que comprende un átomo de nitrógeno y está sustituido por un grupo alquilo, siempre que el alquilo no sea un

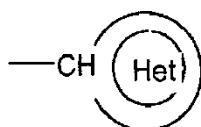
etilo; -alquilarilo; OR; C(=O)OR; =O; CN; CF<sub>3</sub>; COR; NRR'; CONRR'; arilo; en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por alquilo, halógeno, OR, COR o NR'R; o

- un heterociclo monocíclico de 6 eslabones que comprende un átomo de nitrógeno y está opcionalmente sustituido por uno o más de entre -alquilarilo, OR; C(=O)OR; =O; CN; CF<sub>3</sub>; COR; NRR'; CONRR'; arilo; en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, COR, OR o NR'R;

- q es un número entero seleccionado entre 0 a 6; preferentemente 0, 1 o 2; preferentemente 1 o 2;

- cada uno de los T, idénticos o diferentes se selecciona independientemente entre H o alquilo;

donde R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo; preferentemente alquilo;



- preferentemente es un anillo de pirrolidina o una piperidina opcionalmente sustituido por metilo, alquilarilo, donde arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, COR, OR o NR'R, preferentemente por OR o NR'R; q es 1 o 2, T es idéntico o diferente se selecciona independientemente de entre H o alquilo y R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo; preferentemente alquilo;

- o X e Y forman conjuntamente con el átomo de N al que están unidos un heterociclo, preferentemente un heterociclo de 6 o 7 eslabones; que comprende dicho átomo de N y opcionalmente uno o dos heteroátomos más, preferentemente un nitrógeno más; dicho heterociclo está opcionalmente insaturado y/o está opcionalmente sustituido por uno o más heterociclos o

- alquilheterociclo dicho heterociclo, que comprende uno o dos heteroátomos, preferentemente nitrógeno, y que está opcionalmente sustituido por un alquilo;

preferentemente, el heterociclo es un heterociclo de 6 eslabones que comprende opcionalmente un átomo de nitrógeno más, y opcionalmente es insaturado y/o opcionalmente está sustituido por uno o más heterociclos; alquilheterociclo, comprendiendo dicho heterociclo uno o dos heteroátomos, preferentemente nitrógeno, y que está opcionalmente sustituido por un alquilo;

o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Según una forma de realización específica, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de entre:

- [1-(3-metil-bencil)-piperidin-4-ilmetil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (1-etil-pirrolidin-2-ilmetil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (2-dipropilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [2-(butil-etil-amino)-etil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [3-(bencil-etil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (3-dipropilamino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (3-pirrolidin-1-il-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [3-(2,6-dimetil-piperidin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (3-dietilamino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- Azepan-1-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridin-3-il)-metanona
- [3-(4-propil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [3-(bencil-metil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- [1,4']bipiperidinil-1'-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridin-3-il)-metanona
- (3-morfolin-4-il-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico
- 9-cloro-N-(3-(2-metilpiperidin-1-il)propil)-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxamida
- 9-cloro-N-(2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil)-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxamida
- 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxamida
- 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)fenil)-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxamida
- 9-cloro-N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxamida

9-cloro-N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-4-N,N-dimetilbencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-hidroxi-3-fenil-2-pirrolidin-1-ilmetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 5 N-(2-(azepan-1-il)etil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-((1-metilpiperidin-4-il)metil) piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(piperidin-1-il)metanona  
 10 N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-(3-fenilpropil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-fenetilpiperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(5-(dietilamino)pentan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (R)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 15 (S)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-(dimetilamino)-2,2-dimetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida;  
 9-cloro-N-(3-(3,4-dihidroisoquinolina-2(1H)-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida;  
 Hidrocloruro de (2-dietilaminoetil)amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico

o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Preferentemente, la invención se refiere a los compuestos siguientes:

9-cloro-N-(3-(2-metilpiperidin-1-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(2-(1 metilpirrolidin-2-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 25 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-4-N,N-dimetilbencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 30 9-cloro-N-((piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-hidroxi-3-fenil-2-pirrolidin-1-ilmetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (3-pirrolidin-1-il-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico  
 Azepan-1-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)-metanona  
 [1,4']Bipiperidinil-1'-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)metanona  
 35 N-(2-(azepan-1-il)etil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(4-((1-metilpiperidin-4-il)metil)piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(piperidin-1-il)metanona  
 40 N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-(3-fenilpropil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-fenetilpiperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(5 (dietilamino)pentan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (R)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin)metil-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 45 (S)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-(dimetilamino)-2,2-dimetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida;  
 Hidrocloruro de (2-dietilaminoetil)amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico

o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 Preferentemente, la invención se refiere a los compuestos siguientes:

9-cloro-N-(3-(2-metilpiperidin-1-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(2-(1 metilpirrolidin-2-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 55 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-4-N,N-dimetil-bencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 60 9-cloro-N-((piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-hidroxi-3-fenil-2-pirrolidin-1-ilmetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (3-pirrolidin-1-il-propil)amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico  
 Azepan-1-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)metanona  
 [1,4']bipiperidinil-1'-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)metanona  
 65 N-(2 (azepan-1-il)etil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida

9-cloro-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(4-((1-metilpiperidin-4-il)metil)piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)metanona  
 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridin-3-il)(piperidin-1-il)metanona  
 5 N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-((1-(3-fenilpropil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(1-fenetilpiperidin(-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(5-(dietilamino)pentan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 9-cloro-N-(3-(dimetilamino)-2,2-dimetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida  
 10 Hidrocloruro de (2-dietilaminoetil)amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico

o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tal como utiliza en la presente memoria anteriormente o en adelante:

15 "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 1 a 12 átomos de carbono en la cadena. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferior tal como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena de 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.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cicloalquilo" se refiere a un anillo mono, bi- o policíclico de hidrocarburo aromático o no aromático de 3 a 10 átomos de carbono formado por la eliminación de un átomo de hidrógeno. Una denominación tal como "cicloalquilo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>" se refiere a un radical cicloalquilo que contiene de 5 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos comprenden ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, etc., así como los sistemas formados por su condensación o mediante la condensación con un grupo fenilo.

25 "Alqueno" 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 alqueno preferidos tienen 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferentemente de aproximadamente 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alqueno comprenden etenilo, propenilo, *n*-butenil, *i*-butenil, 3-metilbut-2-enilo, *n*-pentenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo.

30 "Átomo de halógeno" se refiere al átomo de flúor, cloro, bromo o yodo; preferentemente al átomo de flúor y cloro.

35 "Perhalogenoalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se definió anteriormente donde todos los átomos de H están sustituidos por átomos de halógeno.

40 "Polihalogenoalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se definió anteriormente donde uno o más átomos de H están sustituidos por átomos de halógeno.

"Ariilo" significa un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico de 6 a 14 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos ariilo comprenden fenilo o naftilo.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a un anillo mono-, bi- o policíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, no aromático estable de 3 a 14, preferentemente de 5 a 10 eslabones en el que al menos un eslabón del anillo es un heteroátomo. Por lo general, los heteroátomos incluyen, pero no se limitan a átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio y fósforo. Los heteroátomos preferidos son oxígeno, nitrógeno y azufre.

50 Los heterociclos adecuados también se describen en *The Handbook of Chemistry and Physics*, 76<sup>a</sup> edición, CRC Press, Inc., 1995-1996, págs. 2-25 a 2-26, cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

55 Los heterocíclicos no aromáticos preferidos comprenden de manera no limitativa pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, oxiranilo, tetrahidrofuranilo, dioxolanilo, tetrahidropiranilo, dioxanilo, dioxolanilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, piranilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiopiranilo, ditianilo, tiomorfolinilo, dihidropiranilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidropiridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridinilo, dihidrotiopiranilo, azepanilo, así como los sistemas condensados resultantes procedentes de la condensación con un grupo fenilo.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroarilo" o heterociclos aromáticos se refiere a un anillo mono-, bi- o policíclico, heteroaromático, con 5 a 14, preferentemente 5 a 10 eslabones. Los ejemplos comprenden 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

"Alquilo", "alquenilo", "cicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" y similares se refieren también a los correspondientes "alquileno", "alquenileno", "cicloalquileno", "arileno", "heteroarileno", "heterociclono" y similares que se forman por eliminación de dos átomos de hidrógeno.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a cualquier animal, tal como un animal útil para la cría, compañía o conservación, o preferentemente un ser humano o un niño, que padece, o puede padecer una o más enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria.

10 Como se utiliza en la presente memoria, 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 afecciones descritas en la presente memoria. El término "control" pretende referirse a todos los procesos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención o suspensión de la evolución de las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de las enfermedades y afecciones, y está destinado a incluir el tratamiento profiláctico.

15 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica preparando sales ácidas o básicas del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos atóxicos. Por ejemplo, dichas sales atóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, con inclusión de las mono-, di- o tri-sales de los mismos; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metansulfónico, bencensulfónico, glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluensulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Otras sales de adición comprenden sales de amonio tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc o magnesio.

25 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 2000, cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

35 Los compuestos de la fórmula general (I) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también constituyen una parte de la invención.

40 Según un objeto adicional, la presente invención también se refiere al procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula (I).

45 Los compuestos y el procedimiento de la presente invención pueden prepararse de numerosas maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los procedimientos descritos a continuación, o variaciones de los mismos como aprecia el experto en la materia. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán muy evidentes y bien conocida o fácilmente obtenibles de la bibliografía científica para los expertos en la materia.

50 En concreto, dichos procedimientos se pueden encontrar en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

55 Se apreciará que los compuestos de la presente invención puedan contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y puedan aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Por lo tanto, se pretenden todas las formas quirales, diastereómeras, racémicas, formas isómeras de una estructura, a menos que la estereoquímica específica o la forma isomérica esté específicamente indicada. Es bien conocido en la técnica cómo preparar y aislar dichas formas ópticamente activas. Por ejemplo, se pueden separar mezclas de estereoisómeros por técnicas convencionales, incluidas, pero no limitadas a, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, en fase inversa y quiral, formación preferida de sales, recristalización, y similares, o por síntesis quiral ya sea a partir de materiales de partida quirales o mediante síntesis deliberada de centros quirales objetivo.

Además, el procedimiento de la invención puede dar lugar a varios regioisómeros que están todos comprendidos en la presente invención. Los regioisómeros se aíslan generalmente por cromatografía.

5 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de rutas de síntesis. Los reactivos y materiales de partida están disponibles en el mercado o se sintetizan fácilmente por técnicas bien conocidas por un experto en la materia. Todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son como se ha definido anteriormente.

10 En las reacciones descritas en adelante, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo los grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, cuando éstos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Pueden utilizarse grupos protectores convencionales según la práctica habitual, para ejemplos, véase T.W. Greene y P.G.M. Wuts en *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª ed., John Wiley and Sons, 1999; J.F.W. McOmie en *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

15 Algunas reacciones pueden llevarse a cabo en presencia de una base. No hay restricción específica en la naturaleza de la base a utilizar en esta reacción, y cualquier base utilizada convencionalmente en reacciones de este tipo puede utilizarse igualmente en la presente memoria, siempre que no tenga ningún efecto adverso en otras partes de la molécula. Los ejemplos de bases adecuadas comprenden: hidróxido de sodio, carbonato de potasio, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, tales como hidruro de sodio e hidruro de potasio; compuestos de alquil-litio, tales como metil-litio y butil-litio; y alcóxidos de metales alcalinos, tales como metóxido de sodio y etóxido de sodio.

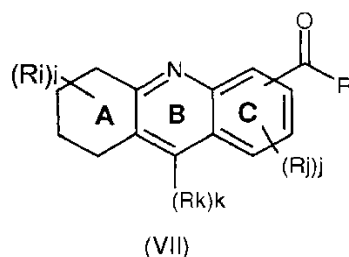
20 Normalmente, las reacciones se llevan a cabo en un disolvente adecuado. Pueden utilizarse diversos disolventes, siempre que no tenga ningún efecto adverso sobre la reacción o sobre los reactivos implicados. Los ejemplos de disolventes adecuados comprenden: hidrocarburos, que pueden ser hidrocarburos aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xileno; amidas, tales como dimetilformamida; alcoholes tales como etanol y metanol y éteres, tales como éter dietílico y tetrahidrofurano.

25 Las reacciones pueden tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas. En general, resulta conveniente llevar a cabo la reacción a una temperatura entre 0°C y 150° C (más preferentemente entre aproximadamente la temperatura ambiente y 100°C). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, principalmente la temperatura de reacción y la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, siempre que la reacción se efectúe en las condiciones preferidas descritas anteriormente, bastará normalmente un periodo entre 3 horas y 20 horas.

35 El compuesto preparado de este modo puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse separando el disolvente por destilación de la mezcla de reacción o, si es necesario, después de separar por destilación el disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y separando por destilación el disolvente del extracto. Además, el producto puede, si se desea, purificarse más por diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diferentes técnicas cromatográficas, especialmente cromatografía en columna o cromatografía de preparación en capa fina.

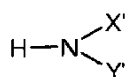
40 El proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I) de la invención es un objeto adicional de la presente invención.

45 Según un primer aspecto, un compuesto de la invención de fórmula (I) se puede obtener haciendo reaccionar un compuesto correspondiente de fórmula (VII):



50 por acoplamiento peptídico

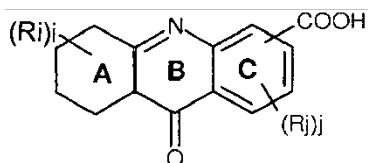
con un compuesto correspondiente de fórmula (VIII):



(VIII)

5 en la que i, j, k, Ri, Rj y Rk se definen como en la fórmula (I), R es OH o un halógeno y X' e Y' son idénticos a X e Y respectivamente, o un precursor de los mismos, o un grupo protector de amino, opcionalmente seguido de alquilación o alquilaciones o desprotección según puede darse el caso, respectivamente.

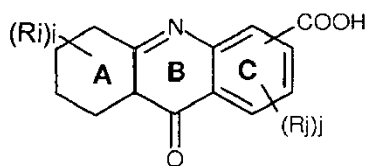
Dicho compuesto de fórmula (VII) puede obtenerse por un compuesto correspondiente de fórmula (VI):



(VI)

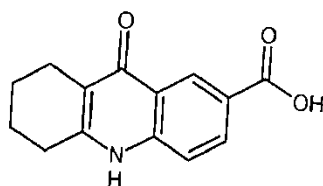
10 en la que i, j, Ri, Rj se definen como en la fórmula (I), por funcionalización, es decir, el grupo Rk se introduce mediante funcionalización conveniente del grupo ceto lo que incluye halogenaciones, reducción a continuación, deshidratación, adición nucleófila seguida de deshidratación. En concreto, para introducir Rk = Hal, esta funcionalización comprende las etapas de halogenaciones, reducción, a continuación deshidratación.

15 La presente invención también se refiere a compuesto de fórmula (VI):

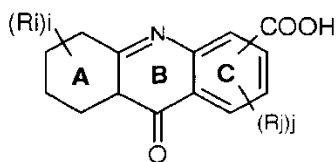


(VI)

20 en la que i, j, Ri, Rj se definen como en la fórmula (I), con la excepción de:

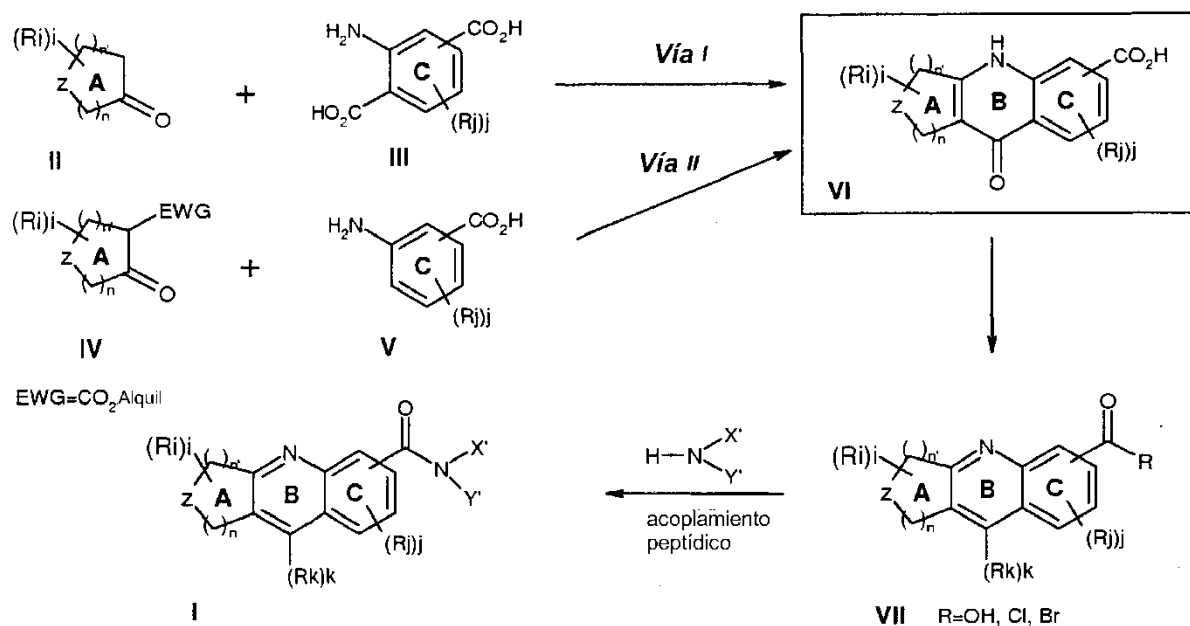


25 Según una forma de realización concreta, los compuestos de fórmula (VI) son los siguientes compuestos:



30 El compuesto de fórmula (VI) puede obtenerse por acoplamiento de los compuestos (II) y (III) o (IV) y (V) según cualquiera de las dos vías siguientes. (Z = CH<sub>2</sub>, n' = 2, n = 1)





En primer lugar, se realiza una condensación entre cetonas (II) o cetonas sustituidas (IV) con una anilina sustituida (III) o (V) que conduce a los ácidos tricíclicos (VI). Los ácidos aminotereftálicos (III) o (V) y las correspondientes cetonas (II) (vía I) o (IV) (vía II) se mezclan y se agitan en el disolvente apropiado. Dependiendo de la reactividad, la mezcla puede calentarse o catalizarse mediante el empleo de condiciones ácidas. En el caso de la vía (II), la reacción se lleva a cabo a través de la ciclación de una enamina intermedia de (IV) y (V).

Además, la funcionalización de (VI) proporciona los compuestos (VII) como haluros de acilo o ácidos carboxílicos. El acoplamiento peptídico se realiza utilizando condiciones estándares dependiendo de la naturaleza de (VII). Las aminas HNX<sub>2</sub> pueden estar disponibles en el mercado o prepararse utilizando procedimientos clásicos antes del acoplamiento a los compuestos (VII).

Un método alternativo se utilizó en el caso en que -NX<sub>2</sub> es una diamina. Incluye el acoplamiento de los compuestos (VII) con precursores de aminas monoprotectadas -secundarias o primarias- seguido de desprotección y una o dos alquilaciones sucesivas utilizando reactivos electrófilos tales como derivados de haluros o aldehídos.

El término "precursor" se utiliza en la presente memoria para referirse a compuestos que difieren de los compuestos indicados o deseados por la presencia y/o ausencia de grupos o funciones. Dichos grupos o funciones pueden introducirse, transformarse y/o omitirse por reacciones de funcionalización comunes, conocidas por los expertos en la materia.

La reacción de funcionalización puede llevarse a cabo por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos.

El experto en la materia puede llevar a cabo las reacciones anteriores mediante la aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrados en los ejemplos que siguen más adelante.

Además, el procedimiento de la invención también puede comprender la etapa adicional de aislamiento del compuesto de fórmula (I). El experto en la materia puede hacerlo por cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los procedimientos de recuperación descritos anteriormente.

Generalmente, los productos de partida (II), (III), (IV), (V) y (VIII) están disponibles en el mercado principalmente en Aldrich o Acros u otro proveedor de productos químicos típico o puede obtenerse por aplicación o adaptación de cualesquiera de los procedimientos conocidos o los descritos en los ejemplos.

Según un objeto adicional, la presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente o un tautómero del mismo y/o a sus sales farmacéuticamente aceptables, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las formas de realización preferidas de fórmula (I) son como se definieron anteriormente con respecto de los compuestos de la invención.

Según todavía un objeto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) de la invención para inhibir la proteasa de cisteína.

Los compuestos de la invención son útiles para la inhibición de cisteína proteasas, en concreto, enzimas específicas de desubiquitinación tales como las USP, y más concretamente USP-7 en pacientes que los necesitan.

5 Los compuestos de la invención son especialmente útiles para tratar y/o prevenir el cáncer y la metástasis, más concretamente de próstata y/o cánceres de colon, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos inmunitarios, enfermedades óseas y de las articulaciones, osteoporosis, trastornos inflamatorios de artritis, enfermedades cardiovasculares, infecciones y enfermedades víricas, y/o infecciosidad y/o latencia vírica, infecciones y enfermedades bacterianas.

10 En concreto, dichas infecciones y enfermedades víricas se seleccionan de entre infecciones víricas por herpes simple-1 o -2, hepatitis A, hepatitis C, infección y enfermedad por coronavirus del SARS, virus de Epstein-Barr, infecciones y enfermedades rinovíricas, infecciones y enfermedades adenovíricas, poliomielitis.

15 Según un aspecto, dichos compuestos inhiben una o más cisteína proteasas víricas.

Las cisteína proteasas bacterianas pueden seleccionarse de entre estreptopaina, clostripaina, cisteína proteasa estafilocócica, gingipaina.

20 La presente invención también se refiere a las combinaciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más agentes activos seleccionados de entre agentes anticancerosos, agentes neurológicos, agentes trombolíticos, agentes antioxidantes, antiinfecciosos, agentes antihipertensores, agentes diuréticos, agentes trombolíticos, agentes inmunosupresores, agentes cardiovasculares, agentes  
25 inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, agentes antibacterianos.

La identificación de los pacientes que necesitan tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria está comprendida en la capacidad y conocimiento de un experto en la materia. Un veterinario o un médico experto en la materia puede identificar fácilmente, mediante la utilización de pruebas clínicas, examen  
30 físico, antecedentes médico/familiares o ensayos biológicos y de diagnóstico, los pacientes que necesitan dicho tratamiento.

El médico de cabecera puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz, como experto en la materia, mediante la utilización de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos bajo  
35 circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz, el médico encargado considera numerosos factores, como por ejemplo, pero sin limitarse a: la especie del paciente; su talla, edad, y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta de cada paciente; el compuesto concreto administrado; el modo de administración; la característica de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; la utilización de medicación simultánea; y otras  
40 circunstancias relevantes.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I), que se requiere para conseguir el efecto biológico deseado, variará en función de numerosos factores, incluidas las características químicas (por ejemplo hidrofobia) de los compuestos  
45 utilizados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la que pertenece el paciente, el estado de enfermedad del paciente, la vía de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la vía seleccionada, todos los factores que dictan las cantidades de dosis requeridas, la administración y el régimen que debe administrarse.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no  
50 producen una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable cuando se administra a un animal, o un ser humano, según corresponda.

Como se utiliza en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquier excipientes, diluyentes, adyuvantes, o vehículos, tales como agentes conservantes o antioxidantes, cargas, agentes  
55 disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocida en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su utilización en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios  
60 activos complementarios en las composiciones como combinaciones terapéuticas adecuadas.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se utiliza en la presente memoria, significa invertir, aliviar, inhibir la evolución de, o evitar el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más  
65 síntomas de dicho trastorno o afección.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto/medicamento según la presente

invención eficaz en la prevención o el tratamiento de una afección patológica que requiere la inhibición de una cisteína proteasa activa implicada en su patogenia.

5 Según la invención, los términos "paciente" o "paciente que lo necesita", están destinados a un animal o un ser humano afectado o que pueda verse afectado por una afección patológica que involucra a una proteasa cisteína activa en su patogenia. Preferentemente, el paciente es un ser humano.

10 En términos generales, los compuestos de esta invención pueden suministrarse en una solución tampón fisiológica acuosa que contiene 0,1 a 10% p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicos están comprendidos entre 1 µg/kg y 0,1 g/kg de peso corporal al día; un intervalo de dosis preferido está comprendido entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal al día o una dosis equivalente en un niño. La dosis preferida de fármaco que se debe administrar es probable que dependa de variables tales como el tipo y grado de evolución de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general de cada paciente, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación de la compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la vía de administración seleccionada, y la velocidad (inyección i.v. rápida o infusión continua) y el programa de administraciones (número de repeticiones en un período dado).

20 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosis unitaria, en las que la expresión "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, como se describe a continuación en la presente memoria. Como tal, los intervalos típicos de dosis diaria total van desde 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de orientación general, las dosis unitarias para los seres humanos están comprendidas entre 1 mg y 3000 mg al día. Preferentemente, el intervalo de dosis unitaria está comprendido entre 1 y 500 mg administrados una a seis veces al día, y aún más preferentemente entre 10 mg y 500 mg, una vez al día. Los compuestos proporcionados en la presente memoria pueden formularse en composiciones farmacéuticas por mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones en dosis unitarias pueden prepararse para su utilización por administración oral, especialmente en forma de comprimidos, cápsulas corrientes o cápsulas de gelatina blanda; o por vía intranasal, especialmente en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, por vía tópica en ungüentos, cremas, lociones, geles o aerosoles, o por medio de parches transdérmicos.

35 Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse por cualesquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

40 Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que se formula un compuesto de la presente invención para administración oral o parenteral.

45 Para administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, grageas y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina o goma de tragacanto; un diluyente tal como almidón o lactosa; un disgregador tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un fluidificante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de cápsula dura o de cápsula blanda, que generalmente están hechas de mezclas de gelatina opcionalmente mezcladas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, las formas farmacéuticas unitarias pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, revestimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otros formas farmacéuticas orales, jarabe o elixir pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparados y formulaciones de disolución rápida, de liberación modificada o de liberación lenta, y en las que dichas formulaciones de liberación lenta son preferentemente bimodales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio o talco en cualquier combinación.

60 Los preparados líquidos para administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Las composiciones líquidas también pueden incluir aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes colorantes y similares. Los disolventes no acuosos comprenden alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los excipientes acuosos comprenden mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. En especial, polímero de lactida biocompatible, biodegradable, copolímero de lactida/glicolida, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos. Los vehículos intravenosos pueden incluir recargadores de líquidos y nutrientes, recargadores de electrolitos, tales como los de dextrosa de Ringer y similares. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos comprenden partículas de

copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Los modos alternativos de administración comprenden formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para su administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado por vía intranasal. Las formulaciones para administración bucal comprenden, por ejemplo, comprimidos o pastillas y pueden incluir también una base aromatizada, tal como sacarosa o goma arábiga, y otros excipientes tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para administración rectal se presentan preferentemente como supositorios en dosis unitaria, con un excipiente sólido, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica para la piel toman preferentemente la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, espray, aerosol o aceite. Los excipientes que pueden utilizarse comprenden vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches específicos y pueden ser emulsiones lipófilas o soluciones acuosas, tamponadas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

La invención está más ilustrada pero no restringida por la descripción en los siguientes ejemplos y figuras como una ilustración no restringida para la inhibición selectiva de la actividad de desubiquitinación de USP7 en un grupo de DUB activas en condiciones fisiológicas.

## Parte experimental

Los compuestos representativos de la invención se pueden sintetizar según los siguientes procedimientos.

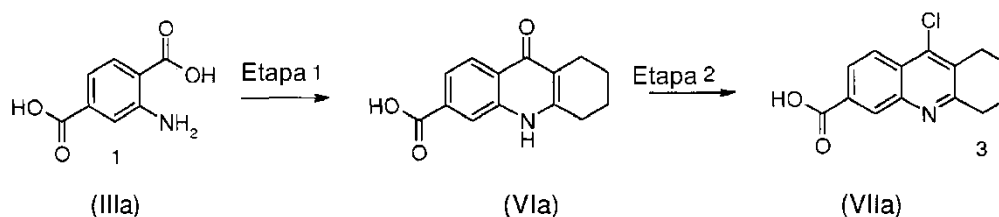
### Procedimientos analíticos generales

Los espectros de RMN se registraron a 300 o 400 MHz para  $^1\text{H}$  y al 75 o 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  en un espectrómetro Bruker o Varian con  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$  como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, con referencia al TMS interno o señal del disolvente deuterado.

Se utilizó el análisis LC-MS para analizar y purificar compuestos diana. Los análisis LC-MS se realizaron utilizando espectrómetros de masas Waters Micromass, Bruker Esquire 3000 (ESI-IT) o Agilent Iontrap XCT-Plus y sistemas Waters Alliance 2790 o Agilent 1100 Serie LC con detección UV y/o DAD. Columnas: Waters Xterra MS C18, 30 x 2,1 mm (3,5  $\mu\text{m}$ ), Atlantis T3 C18, 3  $\mu\text{m}$ , 50 mm x 2,1 mm o Inertsil C8, 250 mm, 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ . Velocidad de flujo: 0,8-1,2 ml/min, gradientes: a) 10% de MeOH en agua, formiato de amonio 10 mM, a 100% de MeOH o b) 95% de agua-acetonitrilo, HCOOH al 0,1% a 95% de acetonitrilo). Detección UV: 190 a 400 nm. Todos los compuestos eran > 95% de pureza.

Procedimiento general 1: preparación de los compuestos (VII)

### Preparación del compuesto intermedio de fórmula (VIIa):



Etapa 1: condensación

### Ácido 9-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-3-carboxílico (VIa)

A una suspensión de ácido 2-amino tereftálico (12 g, 6,6 mmoles) en éter difenílico (120 ml), se le añadió ciclohexanona (25 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante 10 min. La terminación de la reacción se siguió por LC/MS (se observó el 75% del material de partida y el 25% de formación del producto). Se añadió ciclohexanona (25 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante otros 10 min. (LC/MS mostró la formación de 50% del producto). El procedimiento anterior se repitió hasta que LC/MS mostró la formación completa del producto (Material de partida <2%). La mezcla de reacción se enfrió a 25°C, el producto se filtró, se lavó con hexano (100 ml) y se secó al vacío para obtener 15,8 g de (VIa) (98%) como un sólido amarillo.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  13,27 (s, 1H), 11,54 (s, 1H), 8,14-8,11 (d, 2H,  $J = 8,4$  Hz), 7,72-7,70 (m, 1H), 2,72 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 1,76-1,72 (m, 4H).

MS: calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ , 243,09; encontrado 243,8 (M+H) $^+$ .

*Etapa 2: halogenación***Ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico (VIIa)**

Una suspensión de ácido 9-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-3-carboxílico (VIa) (10 g, 4,1 mmol) en oxocloruro de fósforo (50 ml) se calentó a 100°C durante 1 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. Después de la terminación, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C y el exceso de oxocloruro de fósforo se eliminó al vacío. El residuo se mezcló con hielo (50 g) y el pH se ajustó a 4-5 con bicarbonato sódico sólido. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua (250 ml) y se secó al vacío para obtener 9,6 g (88%) del compuesto (VIIa) como un sólido blanco.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO) δ 13,37 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,19-8,16 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz), 8,9-8,07 (dd, 1H, *J* = 8,7 Hz, 1,5 Hz), 3,06 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 1,99-1,89 (m, 4H).

MS: calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>, 261,06; encontrado 261,8 (M+H)<sup>+</sup>.

*Etapa 3: Formación de amidas*

A una solución 0,1 M en DMF de los ácidos heterocíclicos VII, se le añadió trietilamina (2 equiv.) seguido de las aminas correspondientes (1 equiv.) y agente de acoplamiento (TBTU, HATU, OHBT, 1 equiv.). Las mezclas correspondientes se agitaron durante 1-12 horas a 20°C. Se añadió HCl concentrado y después de 5 minutos de agitación, las mezclas sometieron al vacío. Se extrajeron los compuestos en bruto con 20 ml de AcOEt, se lavaron con 10 ml de solución acuosa 0,5 M de NaHCO<sub>3</sub> y 10 ml de agua. Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y después se evaporaron al vacío. La purificación utilizando gel de sílice (gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1) o LC/MS de preparación proporciona las correspondientes amidas puras.

Los datos seleccionados de algunos de los compuestos que se prepararon por aplicación o adaptación del método descrito anteriormente se muestran a continuación:

**Ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico [1-(3-metil-bencil)-piperidin-4-ilmetil]-amida del ácido (1)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,77 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,47 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,17 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,04 (dd, *J* = 1,7, 8,7 Hz, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,18 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,09 (s, 1H), 7,07 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,38 (s, 2H), 3,32-3,29 (m, 2H), 3,21 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,79 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,94-1,84 (m, 6H), 1,69 (s, 1H), 1,66 (s, 1H), 1,63-1,53 (m, 1H), 1,28-1,14 (m, 2H).

MS: calculado para C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>3</sub>O, 461,22; encontrado 462,17 (M+H)<sup>+</sup>.

**[3-(bencil-etil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (5)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,72 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 8,43 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,02 (dd, *J* = 1,7, 8,8 Hz, 1H), 7,29 (m, 4H), 7,18 (m, 1H), 3,54 (s, 2H), 3,32 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,46 (m, 4H), 1,89 (m, *J* = 3,73 Hz, 4H), 1,74 (m, *J* = 7,2 Hz, 2H), 0,97 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

MS: calculado para C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O, 435,21; encontrado 436,17 (M+H)<sup>+</sup>.

**(3-dipropil-amino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (6)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,75 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 8,45 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,17 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,04 (dd, *J* = 1,8, 8,7 Hz, 1H), 3,37-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,44 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 4H), 1,9 (m, *J* = 3,7 Hz, 4H), 1,68 (m, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,39 (m, *J* = 7,3 Hz, 4H), 0,83 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H).

MS: calculado para C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>3</sub>O, 401,22; encontrado 402,22 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2-dietil-amino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (7)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm): 8,69 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,04 (dd, *J* = 1,8, 8,7 Hz, 1H), 3,41-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,59 (dd, *J* = 6,8, 8,2 Hz, 2H), 2,52 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,9 (m, *J* = 3,7 Hz, 4H), 0,98 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

MS: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>O, 359,18; encontrado 360,19 (M+H)<sup>+</sup>.

**(3-pirrolidin-1-il-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (8)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,86 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,17 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,04 (dd, *J*

= 1,8, 8,7 Hz, 1H), 3,40-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,50-2,40 (m, 6H), 1,9 (m,  $J = 3,7$  Hz, 4H), 1,78-1,64 (m, 6H).

MS: calculado para  $C_{21}H_{26}ClN_3O$ , 371,18; encontrado 372,17 (M+H)<sup>+</sup>.

5

**(3-dietilamino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (10)**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-  $d_6$ )  $\delta$  8,8 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,44 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,03 (dd,  $J = 1,7, 8,7$  Hz, 1H), 3,38-3,26 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,46 (q,  $J = 7,2$  Hz, 5H), 1,90 (m, 4H), 1,68 (m,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,1$ Hz, 6H).

10

MS: calculado para  $C_{21}H_{28}ClN_3O$ , 373,93; encontrado 374,19 (M+H)<sup>+</sup>.

**Azepan-1-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)-metanona (12)**

15

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-  $d_6$ )  $\delta$  8,17 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,85 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 7,6 (dd,  $J = 1,7, 8,6$  Hz, 1H), 3,61 (dd,  $J = 5,6, 6,6$  Hz, 2H), 3,35-3,28 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,89 (m, 4H), 1,76 (m,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,53 (m, 4H).

20

MS: calculado para  $C_{22}H_{23}ClN_2O$ , 342,15; encontrado 343,17 (M+H)<sup>+</sup>.

**[3-(4-propil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (13)**

25

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,84 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,45 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,04 (dd,  $J = 1,8, 8,7$  Hz, 1H), 3,38-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,36 (m,  $J = 7,0$  Hz, 9H), 2,19 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 1,9 (m,  $J = 4,0$  Hz, 4H), 1,71 (m,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,4 (m,  $J = 7,4$ Hz, 2H), 0,83 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H).

MS: calculado para  $C_{24}H_{33}ClN_4O$ , 428,23; encontrado 429,20 (M+H)<sup>+</sup>.

30

**[3-(bencil-metil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (14)**

35

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,76 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 8,44 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,02 (dd,  $J = 1,7, 8,8$  Hz, 1H), 7,33-7,16 (m, 5H), 3,47 (s, 2H), 3,38 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 3,34 (d,  $J = 6,8$  Hz, 1H), 3,33-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,99 (m, 2H), 2,42 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 1,90 (m,  $J = 3,1$ Hz, 1H), 1,77 (m,  $J = 7,0$  Hz, 2H).

MS: calculado para  $C_{25}H_{28}ClN_3O$ , 421,19; encontrado 422,14 (M+H)<sup>+</sup>.

**[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (15)**

40

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,82 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,45 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,04 (dd,  $J = 1,7, 8,7$  Hz, 1H), 3,38-3,28 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,36 (m,  $J = 7,0$  Hz, 8,5H), 2,14 (s, 3H), 1,9 (m,  $J = 4,1$ Hz, 4H), 1,71 (m,  $J = 7,0$  Hz, 2H).

45

MS: calculado para  $C_{22}H_{29}ClN_4O$ , 400,20; encontrado 401,20 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-(2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridino-3-carboxamida**

50

<sup>1</sup>H RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1,50 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,90 (m, 4H), 1,95 (m, 2H), 2,05 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,95 (m, 3H), 3,03 (m, 2H), 3,34 (m, 2H), 8,00 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 8,13 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,43 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,79 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H).

MS: calculado para  $C_{21}H_{26}ClN_3O$ , 371,18; encontrado 371,95 (M+H)<sup>+</sup>.

55

**9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

60

<sup>1</sup>H RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,71 (m, 4H), 1,85 (m, 4H), 2,50 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 3,66 (m, 2H), 4,54 (d,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 7,28 (m, 4H), 8,09 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,52 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 9,36 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H).

MS: calculado para  $C_{26}H_{28}ClN_3O$ , 433,19; encontrado 433,93 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

65

<sup>1</sup>H RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,71 (m, 4H), 1,91 (m, 4H), 2,54 (m, 2H), 3,00 (m, 2H), 3,09 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,61 (s, 2H), 7,07 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,31 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,75 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,84 (s, 1H), 8,15

(dd,  $J = 9,0$  Hz,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 8,23 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 8,65 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H).

MS: calculado para  $C_{25}H_{26}ClN_3O$ , 419,18; encontrado 419,94 (M+H)<sup>+</sup>.

5 **9-cloro-N-(3-(2-metilpiperidin-1-il)propil)-516,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 0,99 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H), 1,21 (m, 2H), 1,40 (m, 1H), 1,57 (m, 3H), 1,70 (m, 2H), 1,90 (m, 4H), 2,08 (m, 1H), 2,28 (m, 2H), 2,72 (m, 1H), 2,82 (m, 1H), 2,95 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,30 (m, 2H), 8,03 (dd,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,44 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,80 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H).

10

MS: calculado para  $C_{22}H_{30}ClN_3O$ , 399,21; encontrado 400,00 (M+H)<sup>+</sup>.

**N-(2-(azepan-1-il)etil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

15 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,60 (m, 4H), 1,75 (m, 4H), 1,90 (m, 4H), 2,97 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 3,14 (m, 6H), 3,75 (m, 2H), 8,06 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,49 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,95 (m, 1H).

20

MS: calculado para  $C_{22}H_{28}ClN_3O$ , 385,19; encontrado 385,96 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

25 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1,37 (m, 2H), 1,48 (m, 4H), 1,88 (m, 4H), 2,39 (m, 4H), 2,49 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 3,43 (m, 2H), 8,03 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,14 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,69 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H).

25

MS: calculado para  $C_{21}H_{26}ClN_3O$ , 371,18; encontrado 371,95 (M+H)<sup>+</sup>.

**(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-((4-il-1-metilpiperidin)metil)piperazin-1-il)metanona**

30

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,08 (m, 2H), 1,42 (s, 1H), 1,63 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,88 (m, 4H), 2,10 (s, 3H), 2,12 (m, 2H), 2,35 (m, 4H), 2,71 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 3,03 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 3,53 (m, 2H), 7,61 (dd,  $J = 8,6$  Hz,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 7,87 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,16 (d, 8,6 Hz, 1H).

35

MS: calculado para  $C_{25}H_{33}ClN_4O$ , 440,23; encontrado 441,02 (M+H)<sup>+</sup>.

**(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)metanona**

40 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,40 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,83 (m, 2H), 1,88 (m, 4H), 2,11 (s, 3H), 2,16 (m, 1H), 2,51 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 7,62 (dd,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz, 1H), 7,88 (s, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H).

40

MS: calculado para  $C_{24}H_{31}ClN_4O$ , 426,22; encontrado 427,01 (M+H)<sup>+</sup>.

45 **(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(piperidin-1-il)metanona**

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,63 (m, 6H), 1,89 (m, 4H), 2,98 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,34 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 7,61 (dd,  $J = 8,6$  Hz,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,87 (d,  $J = 1,3$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H).

50

MS: calculado para  $C_{19}H_{21}ClN_2O$ , 328,13; encontrado 328,97 (M+H)<sup>+</sup>.

**N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

55 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,21 (m, 2H), 1,61 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,90 (m, 6H), 2,80 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,52 (s, 2H), 7,24 (m, 1H), 7,31 (m, 4H), 8,04 (dd,  $J = 8,6$  Hz,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 8,46 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,78 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H).

55

MS: calculado para  $C_{27}H_{30}ClN_3O$ , 447,21; encontrado 447,98 (M+H)<sup>+</sup>.

60 **9-cloro-N-((1-(3-fenilpropil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 1,21 (m, 3H), 1,50 (m, 1H), 1,70 (m, 4H), 1,90 (m, 6H), 2,27 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 3,21 (m, 2H), 7,17 (m, 3H), 7,27 (m, 2H), 8,04 (dd,  $J = 8,6$  Hz,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 8,16 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 8,47 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,77 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H).

65

MS: calculado para  $C_{29}H_{34}ClN_3O$ , 475,24; encontrado 476,01 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-((1-fenilpiperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

5  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,18 (m, 2H), 1,60 (m, 1H), 1,72 (m, 2H), 1,93 (m, 6H), 2,53 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 2,97 (m, 4H), 3,06 (m, 2H), 3,22 (m, 2H), 7,20 (m, 5H), 8,05 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,78 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H).

MS: calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}$ , 461,22; encontrado 462,01 (M+H) $^+$ .

**9-cloro-N-(5-(dietilamino)pentan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

10  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 0,97 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H), 1,20 (m, 4H), 1,52 (m, 5H), 1,90 (m, 4H), 2,53 (m, 4H), 2,98 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 4,10 (m, 1H), 8,05 (dd,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,16 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,48 (d,  $J = 1,3$  Hz, 1H), 8,50 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H).

15 MS: calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}$ , 401,22; encontrado 401,96 (M+H) $^+$ .

**(R)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

20  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,11 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,74 (m, 3H), 1,90 (m, 4H), 2,83 (m, 1H), 2,50 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,99 (m, 3H), 3,07 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,25 (m, 1H), 3,55 (m, 2H), 8,06 (dd,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 8,48 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,80 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H).

25 MS: calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}$ , 371,18; encontrado 371,92 (M+H) $^+$ .

**(S)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

30  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,11 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,74 (m, 3H), 1,90 (m, 4H), 2,83 (m, 1H), 2,50 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,99 (m, 3H), 3,07 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,25 (m, 1H), 3,55 (m, 2H), 8,06 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,48 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,80 (m, 1H).

MS: calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}$ , 371,18; encontrado 371,92 (M+H) $^+$ .

**9-cloro-N-(3-(dimetilamino)-2,2-dimetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

35  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 0,94 (s, 6H), 1,89 (m, 4H), 2,29 (m, 2H), 2,34 (s, 6H), 2,96 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,26 (d,  $J = 5,9$  Hz, 2H), 8,01 (dd,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,16 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 8,43 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,77 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H).

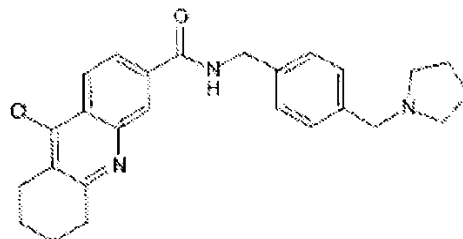
40 MS: calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ , 373,19; encontrado 373,92 (M+H) $^+$ .

**9-cloro-N-(3-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

45  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,84 (m, 6H), 2,55 (m, 2H), 2,67 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 3,57 (s, 2H), 7,09 (m, 4H), 7,99 (dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 8,09 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,44 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 8,86 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H).

MS: calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ , 433,19; encontrado 433,94 (M+H) $^+$ .

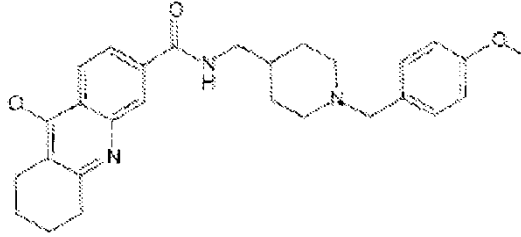
50 Los siguientes compuestos también se sintetizaron utilizando el procedimiento mencionado anteriormente:

**9-cloro-N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**

55 MS: calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ , 433,19; encontrado 433,91 (M+H) $^+$ .

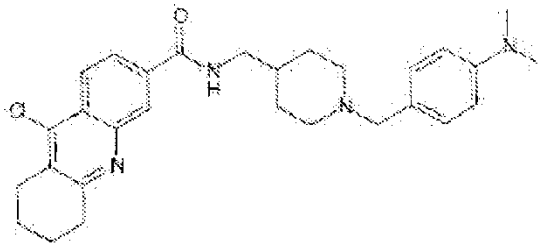


**9-cloro-N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**



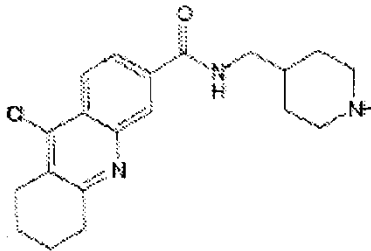
5 MS: calculado para  $C_{28}H_{32}ClN_3O_2$ , 477,22; encontrado 477,99 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-((1-(4-N,N-dimetil-bencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**



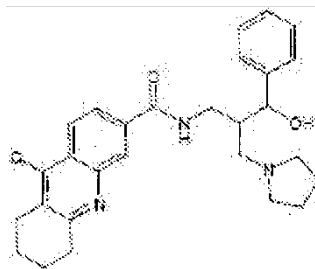
10 MS: calculado para  $C_{29}H_{35}ClN_4O$ , 490,25; encontrado 491,00 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-((piperidin-4-il) metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**



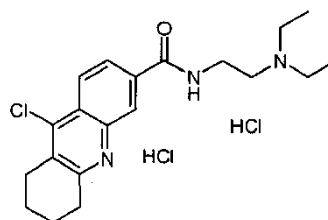
15 MS: calculado para  $C_{20}H_{24}ClN_3O$ , 357,16; encontrado 357,93 (M+H)<sup>+</sup>.

**9-cloro-N-(3-hidroxi-3-fenil-2-pirrolidin-1-ilmetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida**



MS: calculado para  $C_{26}H_{32}ClN_3O_2$ , 477,22; encontrado 477,99 (M+H)<sup>+</sup>.

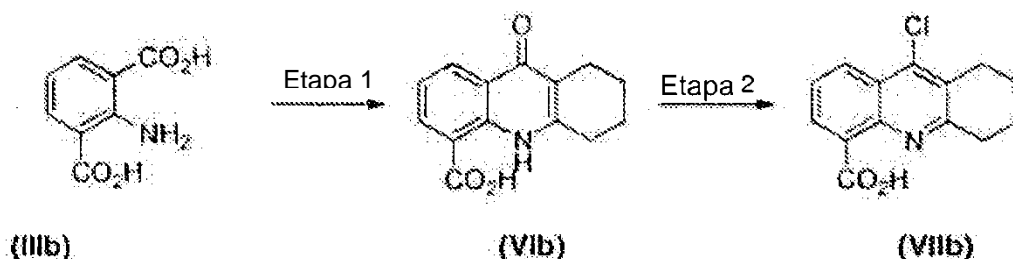
**25 Hidrocloruro de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico**



MS: calculado para  $C_{22}H_{26}ClN_2O \cdot 2 HCl$ , 359,18; encontrado 360,01 (M+H)<sup>+</sup>.

5 Se sintetizaron otros compuestos intermedios de fórmula (VII) para proporcionar los compuestos de fórmula (I) mediante un acoplamiento peptídico:

Preparación del compuesto intermedio de fórmula (VIIb)



10

*Etapa 1: condensación*

#### Ácido 9-oxo-5-6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-2-carboxílico (VIb)

15 A una suspensión de aminoácido en difenil éter (3 ml), se le añadió ciclohexanona y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante 10 min. La terminación de la reacción se controló por LC/MS que mostró el producto deseado, el hidrato intermedio, pero todavía material de partida. Se añadió ciclohexanona (0,63 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante otros 10 min (controlada por LC/MS, todavía material de partida). El proceso anterior se repitió hasta que LC/MS mostró la formación completa del producto (5 veces en total). El exceso de ciclohexanona llevó al menor punto de ebullición de la mezcla de reacción porque el punto de ebullición de ciclohexanona = 155°C. Al final, el exceso de ciclohexanona se eliminó al vacío (rota) y el residuo se calentó a 250°C durante otros 10 min. (esto permite alcanzar una temperatura más alta en la mezcla de reacción, la temperatura de la mezcla se controló), LCMS mostró el producto deseado, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C; el producto se filtró, se lavó con pentano y se secó al vacío para obtener 549 mg como un sólido marrón (exceso de masa podría ser éter difenílico ya que <sup>1</sup>H RMN mostró demasiados protones aromáticos). El producto en bruto se utilizó sin purificación adicional.

20

25

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ = 1,90-2,00 (m, 4H), 2,98-3,07 (m, 2H), 3,13-3,22 (m, 2H), 7,87 (dd, 1H, J = 7,5 Hz y J = 9,0 Hz), 8,47 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y J = 9,0 Hz), 8,57 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y J = 7,5 Hz)

30

<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ = 21,2 y 21,4 (2C), 26,8 (1C), 32,8 (1C), 123,5 y 124,7 (2C), 127,4-134,1 (4C), 142,7 y 142,9 (2C), 159,8 (1C), 165,9 (1C)

*Etapa 2: halogenación*

35

#### Ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-2-carboxílico (VIIb)

40 Se calentó durante 1 hora a 100°C una suspensión de ácido carboxílico en bruto en POCl<sub>3</sub>. La reacción se controló con LCMS que no mostró más material de partida sino el producto deseado. El exceso de POCl<sub>3</sub> se eliminó al vacío y el residuo se vertió en hielo, se disgregó el residuo acuoso obtenido, el pH se ajustó a 4 con NaHCO<sub>3</sub>, y el sólido obtenido se filtró para dar 127 mg de producto alterado secando al vacío. El producto deseado se purificó por cromatografía inversa en columna ultrarrápida (utilizando Biotage flash+, MeCN/H<sub>2</sub>O 40/60). Se obtuvieron 90 mg del producto puro deseado como un sólido de color beige (28%).

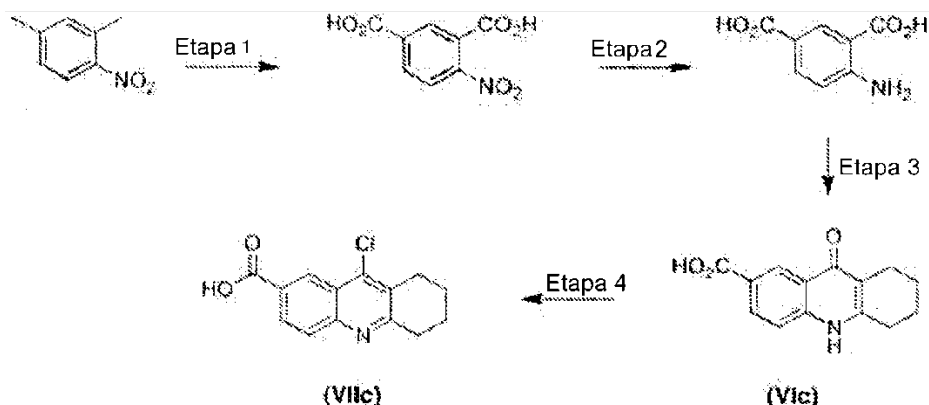
45

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ = 1,90-2,00 (m, 4H), 2,98-3,07 (m, 2H), 3,13-3,22 (m, 2H), 7,87 (dd, 1H, J = 7,5 Hz y J = 9,0 Hz), 8,47 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y J = 9,0 Hz), 8,57 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y J = 7,5 Hz)

50

<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ = 21,2 y 21,4 (2C), 26,8 (1C), 32,8 (1C), 123,5 y 124,7 (2C), 127,4-134,1 (4C), 142,7 y 142,9 (2C), 159,8 (1C), 165,9 (1C)

## Preparación del compuesto intermedio de fórmula (VIIc)

5 *Etapa 1: Oxidación***Ácido 4-nitroisoftálico**

10 Se disolvió permanganato potásico en agua (400 ml) en un matraz equipado con un termómetro y un condensador de reflujo. Se añadió 4-nitro-m-xileno. La mezcla se calentó con cuidado a 85°C.

15 Fue necesaria la refrigeración para mantener la mezcla de reacción a 85°C (se retiró el baño caliente y se puso de nuevo). Después de 20 min., la mezcla se calentó a reflujo suavemente durante 3 h (el color púrpura había desaparecido y la mezcla era casi negro). La mezcla caliente se filtró a través de Celite. El filtrado frío se acidificó con ácido sulfúrico concentrado y se obtuvo una suspensión lechosa. La extracción con EtOAc (3x0,5 l). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron para proporcionar un sólido blanco; la purificación por cromatografía ultrarrápida utilizando EtOAc/heptano/AcOH 10:10:1 como eluyente proporcionó 2 fracciones de sólido blanco (42% de rendimiento total).

20 *Etapa 2: nitrorreducción***Ácido 4-aminoisoftálico**

25 Se inyectó una solución de ácido nitro-isoftálico en EtOH (absoluto, 40 ml) en el H-Cube (50°C, Pd/C al 10%, Full H<sub>2</sub>, 1 ml/min).

La solución resultante se controló con LCMS que mostró conversión completa en el producto deseado.

30 A fin de evitar vestigios de productos secundarios nitrosos, el resultante se inyectó una segunda vez en el H-Cube utilizando el procedimiento descrito anteriormente. EtOH se separó al vacío y se obtuvieron 0,83 g en anilina pura deseada como un sólido blanco (rendimiento del 97%). La anilina limpia se usó sin purificación adicional en la etapa de condensación.

35 *Etapa 3: condensación***Ácido 9-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-4-carboxílico (VIc)**

40 A una suspensión de ácido 2-amino-isoftálico en éter de difenilo (8 ml) se le añadió ciclohexanona (1,5 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante 10 min. La terminación de la reacción se controló por LCMS. Se añadió ciclohexanona y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante otros 10 min. El procedimiento anterior se repitió hasta que la LCMS mostró la formación completa del producto. Pero después de 6 ciclos la LCMS no mostró más evolución por eso la ciclohexanona se eliminó completamente al vacío. El exceso de ciclohexanona llevó a menor punto de ebullición de la mezcla de reacción debido al punto de ebullición de la ciclohexanona = 155°C. El exceso de ciclohexanona se eliminó al vacío (rota), a continuación, se añadieron 1,5 ml de ciclohexanona al residuo y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante 10 min. (esto permite alcanzar una temperatura más alta en la mezcla de reacción). La LCMS mostró la conversión completa en el producto deseado.

50 La mezcla de reacción se enfrió a 25°C, se filtró el producto, se lavó con pentano y después con MeOH, se secó al vacío para obtener el producto deseado puro como un sólido de color beige (700 mg, 63%).

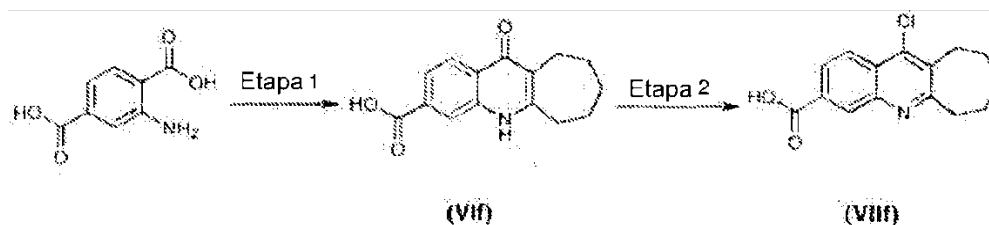
*Etapa 4: halogenación***Ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-4-carboxílico (VIIC)**

5 Una suspensión de ácido carboxílico en bruto en POCl<sub>3</sub> se calentó durante 1 hora a 100°C. La reacción se siguió con LCMS que mostró la conversión completa en el producto deseado. La reacción se enfrió a t.a. y el exceso de POCl<sub>3</sub> se eliminó al vacío. El residuo se vertió en hielo y el pH se ajustó a 4 con NaHCO<sub>3</sub>. Se disgregó la mezcla acuosa y se dejó toda la noche a 5°C (frigorífico). El sólido obtenido se filtró y se lavó con agua para obtener un polvo gris oscuro. La cromatografía ultrarrápida (AcOEt/MeOH 95/5) proporcionó 76 mg del producto deseado puro (sólido de color beige, rendimiento del 44%). <sup>1</sup>H RMN mostró vestigios de EtOAc, por lo que el producto se secó durante la noche a alto vacío y 1/2 h a 120°C a presión ambiente.

15 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ = 1,85-1,95 (m, 4H), 2,93-3,02 (m, 2H), 3,03-3,10 (m, 2H), 8,01 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,20 (dd, 1H, J = 2,0 Hz y J = 9,0 Hz), 8,75 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 13,35 (s amplio, 1H)

<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ = 22,2 (2C), 27,4 (1C), 34,1 (1C), 124,2 (1C), 126,1 (1C), 129,2-130,2 (4C), 141,4 (1C), 148,1 (1C), 162,5 (1C), 167,1 (1C)

20 Preparación del compuesto intermedio de fórmula (VIIf)

*Etapa 1: condensación***Ácido 11-oxo-6,7,8,9,10,11-hexahidro-5H-ciclohepta[b]quinolina-3-carboxílico (VIIf)**

25 A una suspensión de ácido 2-aminotereftálico al (1 g, 0,005 moles) en éter de difenilo (15 ml) se le añadió cicloheptanona (40 ml) a 25°C y la mezcla de reacción se calentó a 250°C durante 15 min. La LC/MS mostró la formación de 95% del producto. La mezcla de reacción se enfrió entre 23 y 25°C y se añadió hexano (20 vol) y se agitó durante 20 min. El precipitado sólido se filtró, se lavó con hexano (20 vol) y se secó al vacío. El producto en bruto (1,39 g) se tomó como tal para la siguiente etapa.

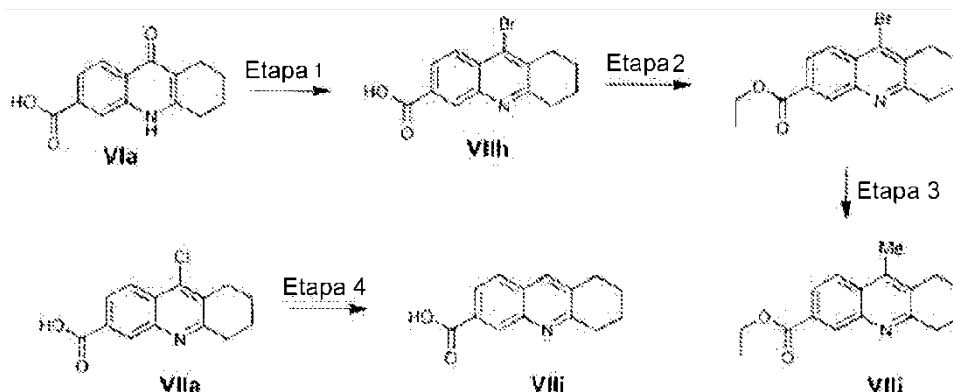
35 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO): δ = 13,28 (s amplio, 1H), 11,61 (s amplio, 1H), 8,14-8,16 (d, 2H, J = 8,1Hz), 7,73-7,757 (m, 1H), 2,77-2,84 (m, 4H), 1,69-1,81 (m, 4H), 1,46 (m, 2H).

*Etapa 2: halogenación***Ácido 11-cloro-7,8,9,10-tetrahidro-6H-ciclohepta[b]quinolina-3-carboxílico**

40 Se tomó el compuesto VIIf (200 mg, 0,0007 moles) en oxicluro de fósforo (10 vol) y se calentó a reflujo a 95°C durante 8 h. La reacción se controló por TLC. Tras la terminación, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C y se inactivó la masa de reacción con hielo picado y se basificó a un pH de 4 a 5 utilizando solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub>. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 vol x 3). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico y se concentró para obtener un sólido amarillo (180 mg, 86%).

45 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO): δ = 8,456-8,460 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 8,18-8,21 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 8,104-8,138 (d, 1H, 8,7 Hz), 3,20-3,25 (m, 4H), 1,85-1,86 (m, 2H), 1,70-1,73 (m, 4H).

## Preparación de los compuestos intermedios de fórmula (VIIh, VIIi, VIIj)

5 *Etapa 1: Halogenación***Ácido 9-bromo-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxílico**

10 Una suspensión de ácido 9-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-3-carboxílico (1 g, 0,42 mmoles) en tolueno (10 ml) se calentó con oxibromuro de fósforo (3,54 g, 1,2 mmoles) a 100°C durante 4 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. Tras la terminación, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C, se inactivó con hielo sólido (50 g) y el pH se ajustó entre 4 y 5 con bicarbonato sódico sólido. El sólido precipitado se filtró, se lavó con agua (250 ml) y se secó al vacío para gelificar el producto en bruto en forma de sólido blanco. El producto en bruto se purificó por HPLC de preparación para obtener el compuesto de bromo puro como sólido blanquecino (65 mg, 5%).

15  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8,44 (s, 1H), 8,19-8,16 (d, 1H,  $J$  = 9 Hz), 8,08-8,11 (d, 1H,  $J$  = 9 Hz), 3,07 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 1,89 (m, 4H).

20 *Etapa 2: Esterificación*20 **9-bromo-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxilato de etilo**

25 Una suspensión de ácido 9-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-acridina-3-carboxílico (1 g, 0,42 mmoles) en tolueno (10 ml) se calentó con oxibromuro de fósforo (3,54 g, 1,2 mmoles) a 100°C durante 4 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. Tras la terminación, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C, se inactivó con metanol (10 ml), se concentró la mezcla de reacción al vacío y se purificó el producto en bruto con una columna de gel de sílice (60:120). El producto se eluyó con 2% de metanol en cloroformo. Las fracciones se recogieron y se concentraron para obtener el producto puro como sólido blanquecino. Este compuesto se tomó como tal para la etapa siguiente.

30  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8,47-8,49 (m, 1H), 8,21-8,27 (t, 1H,  $J$  = 7,5 Hz), 8,09-8,13 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,08 (m, 2H), 2,99 (m, 2H), 1,91 (m, 4H).

35 *Etapa 4: Metilación*35 **9-metil-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxilato de etilo**

40 A una solución del éster metílico del ácido 9-bromo-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxílico (1 g, 0,42 mmoles) en DME (15 ml) y THF (10 ml), se le añadió carbonato potásico (450 mg, 0,32 mmoles), ácido metilbórico (150 mg, 0,23 mmoles) y la mezcla de reacción se desgasificó con argón. El tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) añadido (130 mg, 0,016 mmoles) y la mezcla de reacción se calentó a 90°C durante 8 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. Tras la terminación, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C, se diluyó con acetato de etilo y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró y se purificó en columna de gel de sílice (60: 120). El producto se eluyó con 10% de acetato de etilo en éter. Las fracciones se recogieron y se concentraron para obtener el producto como sólido blanquecino con 70% de pureza. El producto se purificó más por HPLC de preparación.

45  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8,73 (s, 1H), 8,00-8,08 (m, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,01-3,18 (m, 2H), 2,93 (m, 2H), 2,59 (s, 3H), 1,90-2,03 (m, 4H).

50 *Etapa 4: Saponificación***Ácido 9-metil-5,6,7,8-tetrahydroacridina-3-carboxílico**

A una solución de éster metílico de 9-metil-5,6,7,8-tetrahydro-acridina-3-carboxilato (120 mg, 0,04 mmoles) en

THF:agua (6 ml:4 ml) se le añadió hidróxido sódico sólido (75 mg, 0.16 mmoles) y se calentó la mezcla de reacción a 70°C durante 3 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. Tras la terminación, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se lavó con acetato de etilo. La capa acuosa se acidificó a pH 3-4 utilizando solución de ácido clorhídrico 1,5 N. El producto precipitado se filtró y se secó para obtener el producto puro en forma de sólido blanquecino (25 mg, 22%). El compuesto se purificó por HPLC de preparación.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz DMSO, TFA): δ = 8,69 (s, 1H), 8,57-8,60 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,26- 8,29 (d, 1H, J = 9 Hz), 3,32 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,85 (s, 3H), 1,94 (m, 4H).

#### 10 Etapa 4: Hidrogenación

#### Ácido 5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxílico

15 A una solución de ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico (1 g, 0,2 mmoles) en etanol (10 ml), se le añadió 50% de paladio húmedo sobre carbono al 10% (200 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó a 3 kg durante 12 h. La terminación de la reacción se controló por TLC. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con etanol y se concentró al vacío para obtener el producto en bruto. (51% por LC/MS). La purificación por cromatografía en gel de sílice (60:120) con 5% de metanol en cloroformo proporcionó 80 mg (15%) de producto puro.

20 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO): δ = 13,15 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,91-7,98 (t, 1H, J = 9,6 Hz), 2,965-3,072 (m, 4H), 1,878-1,972 (m, 4H).

#### Ejemplos

#### 25 Denominaciones

- 1 [1-(3-metil-bencil)-piperidin-4-ilmetil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 2 (1-etil-pirrolidin-2-ilmetil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 30 3 (2-dipropilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 4 [2-(butil-etil-amino)etil]amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 5 [3-(bencil-etil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 6 (3-dipropilamino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 7 (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 35 8 (3-pirrolidin-1-il-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 9 [3-(2,6-dimetil-piperidin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 10 (3-dietilamino-propil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 11 (2-dimetilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 40 12 Azepan-1-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)-metanona
- 13 [3-(4-propil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 14 [3-(bencil-metil-amino)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 15 [3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 16 [1,4']bipiperidinil-1'-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)-metanona
- 45 17 9-cloro-N-(2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 18 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 19 9-cloro-N-(3-(pirrolidin-1-ilmetil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 20 9-cloro-N-(3-(2-metilpiperidin-1-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 21 9-cloro-N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 22 9-cloro-N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 50 23 9-cloro-N-((1-(4-N,N-dimetil-bencil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 24 9-cloro-N-((piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 25 9-cloro-N-(3-hidroxi-3-fenil-2-pirrolidin-1-ilmetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 26 Hidrocloruro de (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxílico
- 27 N-(2-(azepan-1-il)etil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridina-3-carboxamida
- 55 28 9-cloro-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 29 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-((1-metilpiperidin-4-il)metil)piperazin-1-il)metanona
- 30 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)metanona
- 31 (9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-il)(piperidin-1-il)metanona
- 32 N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-9-cloro-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 60 33 9-cloro-N-((1-(3-fenilpropil)piperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 34 9-cloro-N-((1-fenilpiperidin-4-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 35 9-cloro-N-(5(dietilamino)pentan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 36 (R)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 37 (S)-9-cloro-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 65 38 9-cloro-N-(3-(dimetilamino)-2,2-dimetilpropil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida
- 39 9-cloro-N-(3-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propil)-5,6,7,8-tetrahidroacridina-3-carboxamida

Cisteína proteasas representativasProducción y purificación de la proteína USP7

5 El ADNc que codifica USP7 se obtuvo por ampliación por PCR a partir de ARNm de placenta. USP7 ADNc se subclonó por PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). La USP7 completa natural humana y su mutante catalítica (cisteína 223 sustituida por alanina, C223A) se produjeron como fusiones marcadas con His en el terminal N en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Invitrogen), utilizando el sistema de Baculovirus Bac-to-Bac de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Se utilizó pFastBac-HT-B-USP7 para transformar células DH10Bac (Invitrogen), y la selección azul/blanco se llevó a cabo en placas X-gal/IPTG de agar-agar. Se preparó ADN bácido por un procedimiento de lisis alcalina. La integridad de los minipreparados de bácido y su orientación se comprobaron por PCR, utilizando cebadores genéricos y específicos. Se cultivaron células de insecto Sf9 en medio InsectXpress (Cambrex) a 27°C y se transfectoron con el bácido correspondiente, utilizando GeneShuttle 40 (Q-Biogen). Los virus se recuperaron en el sobrenadante 72 h después de la transfección. Los virus se ampliaron infectando células de insecto (Sf9 o células High Five; Invitrogen) en 50 ml de medio InsectXpress en un matraz de cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> con 500 µl del sobrenadante de células Sf9 transfectadas. Después de la segunda ronda de ampliación, las células infectadas se recuperaron por lisis rápida SDS, se hirvieron durante 5 min a 100°C, se sometieron a ultrasonidos brevemente y se centrifugaron durante 20 min a 14000 g. Los niveles de expresión en las células Sf9 infectadas, se compararon con los de las células no infectadas. A continuación se dejó que las proteínas de fusión se unieran a perlas TALON (BD Biosciences, resina de afinidad a metales TALON) durante 30 min a 4°C con agitación suave. Las perlas se lavaron exhaustivamente (tampón de fosfato sódico 50 mM pH 7,0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM Triton X-100, al 0,5% y glicerol al 10%) y las proteínas unidas se eluyeron en tampón de lavado enriquecido con imidazol 250 mM (Sigma). Las fracciones eluidas se resolvieron en geles NuPAGE al 4-12% (Novex, Invitrogen). Las fracciones que contenían altas concentraciones de proteínas purificadas (pureza > 95%) se dializaron (Tris HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 10%) se dividieron en alícuotas y se congelaron al instante en nitrógeno líquido antes de su almacenamiento a -80°C.

Ensayo de actividad de USP7

30 USP7 se diluyó en tampón USP (Tris HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; 0,05 mg·ml<sup>-1</sup> de albúmina de suero bovino pH 7,6). Las soluciones madre de compuestos (10 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

35 Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP7 fue de 300 nM de Ub-AMC (*Chem. Biol.*, 2003, 10, págs. 837-846) (Boston Biochem.). Las concentraciones de la enzima (USP7) en ensayos de especificidad fue de 100 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración fijada de sustrato. Se preincubaron compuestos con enzimas durante 40 30 minutos a 25°C. Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de análisis. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión 380 nm; λ de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de referencia (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

Ensayo de actividad de USP5

50 Se diluyó USP5 en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; 0,05 mg·ml<sup>-1</sup> de albúmina de suero bovino pH 7,6). Las soluciones madre de compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

55 Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP5 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). Las concentraciones de la enzima (USP5) en ensayos de especificidad de 300 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración fijada de sustrato. Se preincubaron compuestos con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión 380 nm; λ excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de referencia (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

65

Clonación y purificación de USP8

El ADNc que codifica USP8 se obtuvo mediante ampliación por PCR a partir de ARNm de placenta. USP8 ADNc se subclonó por PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). Un ADNc que codifica una USP8 mutada se generó por PCR mutágena. La proteína correspondiente codifica una sustitución de cisteína a alanina en el resto 786. Las secuencias se determinaron por secuenciación de todo el marco de lectura abierto. Se generaron bácmidos que codifican USP8 después de la transposición de DH10Bac. Los bácmidos correspondientes se transfirieron en células de insecto (Sf9). Se recuperaron virus del sobrenadante del cultivo y se ampliaron dos veces. Se infectaron células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) durante 72 horas. Los lisados de células totales se recogieron 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; mezcla de inhibidor de proteasa; 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AEBSF; 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de aprotinina). Las proteínas se purificaron por afinidad de resinas de afinidad a metales (resina de afinidad a metales Talon; BD Biosciences). Los materiales ligados se lavaron exhaustivamente en tampón de lavado (fosfato sódico 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; Triton X-100 al 0,5%; 10% de glicerol) y se eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía imidazol 250 mM. Las proteínas se dializaron en tampón de diálisis (Tris HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM; DTT 1 mM, EDTA 1 mM; glicerol al 10%). Las purificaciones de proteínas se analizaron en NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

Ensayo de actividad de USP8

Se diluyó USP8 en tampón USP (Tris HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; 0,05  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de albúmina de suero bovino pH 8,8). Se almacenaron soluciones madre de compuestos (100 mM) a  $-20^{\circ}\text{C}$  en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200  $\mu\text{M}$  a 91 nM.

Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP8 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (USP8) en ensayos de especificidad fue de 1,36 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración de sustrato fijada. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG).  $\lambda$  de emisión = 380 nm;  $\lambda$  de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de la referencia (sin compuesto) y se representaron en porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

Ensayo de actividad de UCH-L1

Se diluyó UCH-L1 en tampón USP (Tris HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; 0,05  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de albúmina de suero bovino pH 7,6). Se almacenaron soluciones madre de los compuestos (100 mM) a  $-20^{\circ}\text{C}$  en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200  $\mu\text{M}$  a 91 nM.

Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para UCH-L1 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (UCH-L1) en ensayos de especificidad fue de 2,5 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración de sustrato fijada. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG).  $\lambda$  de emisión = 380 nm;  $\lambda$  de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de la referencia (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

Ensayo de actividad de UCH-L3

Se diluyó UCH-L3 en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 al 0,01%; 0,05  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de albúmina de suero bovino pH 7,6). Se almacenaron soluciones madre de compuestos (100 mM) a  $-20^{\circ}\text{C}$  en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200  $\mu\text{M}$  a 91 nM.

Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para UCH-L3 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (UCH-L3) en ensayos de especificidad fue de 13 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración fijada de sustrato. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en



tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Se realizaron lecturas en un lector fluorescente Pherastar (BMG).  $\lambda$  de emisión = 380 nm;  $\lambda$  excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de la referencia (sin compuesto) y se representaron en porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

### Ensayo de actividad de caspasa 3

La caspasa 3 se diluyó en tampón de caspasa 3 (Hepes 100 mM pH 7,5; sacarosa al 10%; CHAPS al 0,1%). Unas soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a diferentes concentraciones: de 200  $\mu$ M a 91 nM.

Las reacciones se realizaron por duplicado en placas Black de 384 pocillos (microplacas de pequeño volumen; Greiner, 10  $\mu$ l de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para el ensayo de especificidad de la caspasa 3 fue de 250 nM (Ac-DEVD-AMC; Promega). La concentración de la enzima (Caspasa 3) en ensayos de especificidad era 1,6 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a la concentración fijada de sustrato. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a 25°C. Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones se interrumpieron añadiendo ácido acético (100 mM final). Se realizaron lecturas en un lector fluorescente Pherastar (BMG).  $\lambda$  de emisión = 380 nm;  $\lambda$  de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de la referencia (sin compuesto) y se representaron en porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable).

### Métodos de viabilidad y proliferación celular

#### Ensayo de viabilidad y proliferación de células HCT116

Se obtuvieron células de cáncer de colon HCT116 en ATCC (American Type Culture Collection), y se mantuvieron en medio 5A de Mc Coy que contiene FBS al 10%, glutamina 3 mM y penicilina al 1%/estreptomomicina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub>.

Se ensayó la viabilidad celular utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (CellTiter 96® Ensayo de proliferación celular acuoso no radiactivo, Promega) según las instrucciones del fabricante. MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio) es un tetrazolio derivado de MTT que se reduce en células metabólicamente activas en un formazán soluble penetrante en células. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas, metabólicamente activas.

Se sembraron 10<sup>3</sup> células HCT116 por pocillo. 24 horas después, se cambió el medio y las células se trataron por triplicado con las concentraciones de cada compuesto de 100  $\mu$ M a 50 nM. Los compuestos se diluyeron en DMSO al 100%, cuya concentración final en las células se mantuvo al 0,5%.

Se incubaron células con los compuestos durante 72 horas, y su viabilidad se ensayó a continuación mediante la adición de MTS durante 2 horas. Se midió la absorbancia a 492 nm directamente de las placas de cultivo de 96 pocillos. Las concentraciones GI50 (Inhibición del 50 de crecimiento) de cada compuesto se calcularon utilizando un ajuste de pendiente variable sigmoideo (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

#### Métodos para la evaluación de la selectividad de compuestos de un grupo de enzimas desubiquitinizantes activas en lisados celulares

El derivado sulfona de vinilo modificado en el terminal C de la ubiquitina, UbVS, fue claramente útil para una visualización directa de las DUB activas en las células. Esta herramienta, que se une por enlace covalente a la zona activa de la cisteína de las enzimas desubiquitinizantes, se aplicó con éxito para descubrir y caracterizar nuevas proteasas de tipo ubiquitina/ubiquitina y al perfil de enzimas desubiquitinizantes activas en células normales, infectadas por virus y cancerosas (Borodovsky *et al.*, *Cell Biol.* 2002, 9, 1149-1159, Hemelaar *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 2004, 24, 84-95, Ovaa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004 101, 2253-2258).

La sonda HA-Ub-VS (Hemaglutinina etiqueta-Ubiquitina-Vinil Sulfona) se utilizó en este estudio para visualizar directamente la actividad de todas las enzimas desubiquitinizantes a partir de lisados celulares. Esta herramienta se utilizó para evaluar la actividad/especificidad de nuestros compuestos de moléculas pequeñas en USP7 con relación a todas las enzimas desubiquitinizantes activas en condiciones fisiológicas.

Unas células inducibles USP7 ARNsh HCT116 (previamente tratadas con o sin doxiciclina (2  $\mu$ g/ml) durante 4 días), así como células HEK293 se recogieron y se lisaron en hielo con un tampón no desnaturante que contenía Tris,

50 mM, pH 7,4; NaCl, 150 mM; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM; EDTA, 0,5 mM; DTT, 2 mM; ATP, 2 mM; NP40, 0,5% y glicerol, 10%. Las muestras se incubaron a 4°C durante 1 hora y se aclararon. Las proteínas se analizaron cuantitativamente por el método de Bradford (ensayo de proteínas Bio-Rad). Se trataron 25 µg de proteínas de lisados de células naturales con compuestos de los ejemplos 14 y 5 (de 100 µM a 3 µM) o con NEM (N-etilmaleimida, compuesto reactivo con tiol, 5 mM) durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de marcaje de ubiquitina se inició mediante la adición de HA-Ub-VS (8 µg/ml) en tampón de marcaje (Tris 50 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM; EDTA, 0,5 mM; DTT, 2 mM; ATP, 2 mM; sacarosa, 250 mM) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se calentaron a continuación a 100°C durante 10 minutos y se sometieron a ultrasonidos brevemente. Se resolvieron por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpos contra USP7 (Bethyl Lab, A300-034A), HA (BabCO, MMS-101P) y actina (Sigma, A2066). Se utilizaron como anticuerpos secundarios anticuerpos antirratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Laboratories, 115-035-003) o anticonejo conjugados con HRP (*Cell Signaling*, 7074). Las señales se detectaron por quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham) según las instrucciones del fabricante de los reactivos.

## Resultados

### 1. Inhibición selectiva de la actividad desubiquitinizante de USP7

Los resultados se resumen en la tabla siguiente (µM):

Ejemplo	P.M.	USP7	USP8	USP5	Uch-L1	Uch-L3	Caspasa 3
1	462,04	9,1	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
2	371,91	11,5	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
3	387,96	12,4	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
4	387,96	23,5	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
5	436,00	22,6	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
6	401,98	23,8	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
7	359,90	24,9	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
8	371,91	25,6	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
9	414,00	28,7	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
14	421,97	28,1	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
10	373,93	29,2	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
11	331,85	29,8	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
12	342,87	37,9	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
13	429,01	37,9	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
15	400,96	43,0	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
16	411,98	46,0	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
17	371,91	13,7	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
18	433,98	18,3	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
19	419,96	8,2	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
20	399,97	45,5	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
21	433,98	16,3	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
22	478,04	27,4	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
23	491,08	33,1	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
24	357,88	45,2	~ 200	> 200	> 200	> 200	> 200
25	478,04	59,5	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
26	432,82	30,5	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

### 2. Inhibición de la viabilidad/proliferación celular

Los resultados se resumen en la tabla siguiente (µM):

Ejemplo	P.M.	MLogP	Viabilidad celular (MTS): GI <sub>50</sub> de HCT116 Día 3 (µM)
1	462,04	4,5	2,0
2	371,91	3,3	5,0
3	387,96	3,5	3,5
4	387,96	3,5	4,0
5	436,00	4,1	4,0
6	401,98	3,7	3,9
7	359,9	3,0	4,3
8	371,91	3,3	5,9
9	414,00	3,9	3,6
10	373,93	3,3	5,0
11	331,85	2,6	7,8

Ejemplo	P.M.	MLogP	Viabilidad celular (MTS): GI <sub>50</sub> de HCT116 Día 3 (µM)
12	342,87	3,9	20
13	429,01	3,1	5,9
14	421,97	3,9	4,1
15	400,96	2,7	7,4
16	411,98	3,9	13,5
17	371,91	3,3	6,9
18	433,98	4,1	4,3
19	419,96	4,1	4,1
20	399,97	3,7	8,4
21	433,98	4,1	3,5
22	478,04	4	3,3
23	491,08	4,1	1,8
24	357,88	3	8,3
25	478,04	3,7	5,6
26	432,82	3,5	5,6
27	385,94	3,5	10,0
28	371,91	3,3	8,8
29	441,02	3,3	7,3
30	426,99	3,1	12,5
31	328,84	3,6	11,4
32	448,01	4,3	3,1
33	476,06	4,7	2,0
34	462,04	4,5	2,8
35	401,98	3,7	8,2
36	371,91	3,3	9,1
37	371,91	3,3	8,7
38	373,93	3,3	11
39	433,98	4,1	7,6

3. *Inhibición selectiva de la actividad desubiquitinizante de USP7 en un grupo de DUB activas en condiciones fisiológicas:*

- 5 Como se resume en la figura 1A, el derivado de vinil sulfona modificado en el terminal C de ubiquitina (Ub-HA-VS), se une por enlace covalente a la zona activa de cisteína de enzimas desubiquitinizantes. Este marcaje seguido por inmunotransferencia con el anticuerpo anti-HA permitió la identificación de todas las enzimas desubiquitinizantes activas en lisados de células HCT116 (Figura 1B). Además, en este ensayo se identificó USP7 activa según se indica por el cambio de movilidad observada después de la inmunotransferencia con anticuerpo anti-USP7. Este marcaje, específico para la forma activa de las DUB, está inhibido por un compuesto reactivo con tiol (NEM) de una manera no específica (Figura 1B).

15 Para localizar la señal correspondiente a USP7 activa en el grupo de DUB activas etiquetado después del marcaje de HA-Ub-VS, la estirpe celular shRNA USP7 HCT116 inducible se trató con doxiciclina (Dox) permitiendo de este modo la expresión de USP7 shRNA. Curiosamente, sólo se redujo una banda tras el silenciamiento de USP7 lo que indica claramente que esta banda corresponde a HA-Ub-VS-USP7 (Figura 2A). Una cuantificación que muestra esta disminución específica se presenta en la figura 2B (cuantificación realizada utilizando el programa informático de análisis de imagen, GeneTools, Syngene). El silenciamiento de USP7 inducido por el tratamiento con doxiciclina se confirmó con el anticuerpo anti-USP7.

20 Un estudio con compuesto de molécula pequeña se realizó en primer lugar con una dosis fija de compuesto del ejemplo 14 (50 µM) en lisados de células HCT116. Curiosamente, sólo se redujo una banda tras el tratamiento en el tamaño correspondiente a HA-Ub-VS-USP7 (Figura 3A). Una cuantificación que muestra esta disminución específica se presenta en la figura 3B (cuantificación realizada utilizando el programa informático de análisis de imagen, GeneTools, Syngene). Este efecto sobre la actividad USP7 se confirmó con el anticuerpo anti-USP7 como se indica por el cambio de movilidad observada entre las muestras tratadas y no tratadas.

30 Se trataron a continuación células HCT116 con diferentes dosis de compuestos de los ejemplos 14 y 5 o con doxiciclina para inducir silenciamiento de USP7. El silenciamiento específico de USP7 facilitó la localización de la proteína HA-Ub-VS-USP7 como se indica en presencia de doxiciclina (Figura 4A, + Dox). Una vez identificada esta banda, los lisados celulares se trataron con diferentes dosis de compuestos de los ejemplos 14 y 5 y una disminución específica y dependiente de la dosis de la concentración de proteína HA-Ub-VS-USP7 se observó claramente (Figuras 4A y B). Este efecto sobre la actividad USP7 se confirmó con el anticuerpo anti-USP7 como se indica por el cambio de movilidad observado entre las muestras tratadas y no tratadas. Curiosamente, estos resultados también se confirmaron en lisados celulares preparados a partir de células HEK293 (Figuras 5A y B). Estos resultados demuestran que los compuestos diferentes de esta nueva serie química (compuestos de los

ejemplos 14 y 5) inhiben específicamente y en función de la dosis la actividad desubiquitinizante de USP7 en un grupo de DUB activas en condiciones fisiológicas.

#### 4. Utilización de Ub52 como sustrato de USP7 y USP8 para la evaluación de moduladores de USP

Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* en USP7 y USP8 para los compuestos 26 a 38, según el procedimiento siguiente

##### *Preparación de fusiones de proteínas ribosómicas-ubiquitina*

Un ADNc que codifica la proteína de fusión entre la ubiquitina y la proteína ribosómica L40 (ub52 o uba52 o ubiquitina-L40) se amplió a partir de ARN humano utilizando una biblioteca de placenta humana privada. El ADNc se subclonó en un vector de expresión bacteriano (pGEX-2T, GE Healthcare), incluida una etiqueta de bandera adicional en el extremo carboxilo de la proteína codificada. Los siguientes cebadores se utilizaron para la subclonación en el marco con la etiqueta GST la ubiquitina-L40 en pGEX-2T: 5'-cgtggatccatgcagatctttgtgaagaccctc-3' (SEC. ID. n° 10) y 5'-gcgaattcttatcgcacatcgctctttgtagctcttgacctctcttgggacg-3' (SEC. ID. n° 11) en las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.

Para la producción y purificación de proteínas recombinantes, el plásmido pGEX-2T-Ub52-bandera se transformó en *E. coli* BL21 (Stratagene), se cultivó en medio LB enriquecido con 100 mg/ml de ampicilina (LB ampi) a 37°C durante la noche y después se diluyó 1/100 en LB ampi. Las células se incubaron a 37°C hasta que se alcanzó una A600 = 0,6-0,8. Después de la inducción con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM, se incubó el cultivo a 30°C durante 180 min.

Las células se recogieron por centrifugación durante 15 min a 7000x g a 4°C. Los sedimentos bacterianos se lisaron en NETN (Tris HCl pH 8,0; EDTA 1 mM; NP40 al 0,5%; mezcla inhibidora de proteasa, PMSF 1 mM) y se sometió a ultrasonidos brevemente. El material insoluble se eliminó por centrifugación 30 min a 14000x g. Las proteínas GST-Ub52-bandera se purificaron según Everett R.D. *et al.*, *EMBO J.* (1997) 16, 1519-1530. En pocas palabras, la fracción soluble se incubó en perlas de glutatión preequilibradas en tampón NETN + 0,5% de leche durante 120 min a 4°C. Se recuperó el flujo a través. Las perlas se lavaron exhaustivamente: el último lavado se realizó en Tris HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 12 mM. Se realizaron eluciones utilizando glutatión reducido 20 mM en Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 120 mM. Todas las fracciones se resolvieron en un NuPAGE al 4-12% después de tratamiento con TDT 0,1 M y desnaturalización y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Las eluciones se dializaron durante la noche a 4°C en Tris HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 50 mM; DTT 0,5 mM.

##### *Ensayo de la proteína de fusión (GST-Ub52-bandera) utilizando el método de medición homogéneo de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF®)*

Los presentes ejemplos 26 a 38 hacen que sea posible para validar la utilización de GST-Ub52-bandera en un análisis basado en la medición resuelta en el tiempo de la fluorescencia emitida por transferencia radiactiva en medio homogéneo.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Conjugado de anticuerpo-criptato de europio anti-bandera denominado anti-bandera-K (CIS bio international), solución a 0,2 μM en KF 0,8 M, albúmina de suero bovino al 0,1%, Tris HCl 25 mM pH 7,6.
- Conjugado de anticuerpo-XL665 anti-GST (CIS bio international), solución a 2,6 μM en KF 0,8 M, albúmina de suero bovino al 0,1%, Tris HCl 25 mM pH 7,6.
- Solución de GST-Ub52-bandera en 14,75 μM y MBP\_Ub52 a 37,7 μM preparada a partir de la solución madre descrita anteriormente en Tris HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 0,5 mM, albúmina de suero bovino al 0,05%, DTT 5 mM.

El análisis se llevó a cabo en placas de análisis multipocillo. Las placas se analizaron en un fluorímetro PHERAstar (BMG) después de una incubación durante la noche a 4°C (excitación 337 nm, emisión 620 y 665 nm).

##### *Ensayo de la actividad de las enzimas del tipo desubiquitinizante con proteína de fusión ubiquitina-ribosómica*

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Solución de USP7 a 200 pM y USP8 a 400 pM en Tris HCl 50 mM pH 7,6, albúmina de suero bovino al 0,05%, DTT 5 mM.
- Anti-bandera-K (CIS bio international), solución a 0,2 μM en 0,8 M KF, albúmina de suero bovino al 0,1%, Tris HCl 25 mM pH 7,6.

- Conjugado de anticuerpo anti-GST-XL665 (CIS bio internacional), solución a 2,6  $\mu\text{M}$  en KF 0,8 M, albúmina de suero bovino al 0,1%, Tris HCl 25 mM pH 7,6.
- Solución de GST-Ub52-bandera en 14,75  $\mu\text{M}$  y MBP\_Ub52 a 37,7  $\mu\text{M}$  se preparan mediante diluciones de la solución madre descritas anteriormente en Tris HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 0,5 mM, albúmina de suero bovino al 0,05%, DTT 5 mM.

La reacción enzimática se lleva a cabo mezclando solución de GST-Ub52-bandera con 5  $\mu\text{l}$  de solución de USP7 (200 pM final) o 5  $\mu\text{l}$  de USP8 (400 pM final). Esta mezcla se incuba durante una hora a temperatura ambiente en una placa de análisis de pocillos múltiples. Una mezcla de 10  $\mu\text{l}$  de 5  $\mu\text{l}$  de solución de anti-bandera-K (0,2  $\mu\text{M}$ ) más 5  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-GST-XL665 (2,6  $\mu\text{M}$ ) se añadió a cada pocillo de la placa de análisis de pocillos múltiples. La placa se lee después de una incubación durante la noche a 4°C en un fluorímetro PHERAstar (BMG).

La disminución en la señal se correlaciona con el aumento de la actividad enzimática es decir, la escisión del sustrato GST-Ub52-bandera. El formato utilizado es por lo tanto totalmente adecuado para un método de análisis de una enzima de tipo desubiquitinizante tal como proteasa específica para ubiquitina, sino también para determinar un modulador de esta actividad enzimática.

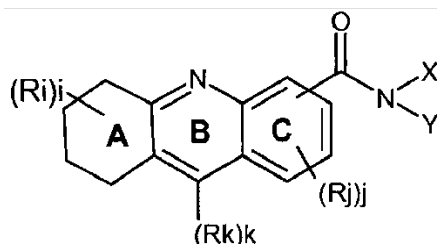
*Determinación de un modulador de actividad enzimática de tipo desubiquitinizante*

Los mismos procedimientos mencionados anteriormente para analizar la actividad de las enzimas de tipo desubiquitinizante se llevan a cabo pero las diversas mezclas de reacción se incuban con la concentración enzimática idéntica, en presencia o ausencia de los compuestos analíticos 26 a 38. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como % de la referencia (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al logaritmo de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo (pendiente variable) e  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) se determinó y se presenta en la tabla siguiente.

Ejemplo	P.M.	USP7	USP8
27	385,94	15,4	> 200
28	371,91	11,9	> 200
29	441,02	8,5	> 200
30	426,99	23	> 200
31	328,84	24,5	> 200
32	448,01	17,6	> 200
33	476,06	16,4	> 200
34	462,04	24,5	> 200
35	401,98	36,9	> 200
36	371,91	44,4	> 200
37	371,91	25,9	> 200
38	373,93	49,2	> 200
39	433,98	38,5	> 200

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



5

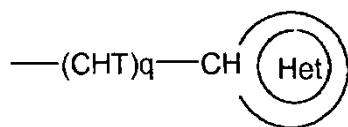
en la que:

- i es un número entero seleccionado de entre 0, 1, 2, 3 o 4;
- j es un número entero seleccionado de entre 0, 1, 2 o 3;
- k es un número entero seleccionado de entre 0 o 1;
- cada Ri situado en cualquier posición disponible del anillo A es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, -alquilarilo, OR, NRR', CN, CF<sub>3</sub>, COR, COOR, CONRR';
- cada Rj situado en cualquier posición disponible del anillo C es idéntico o diferente y se selecciona de entre halógeno, alquilo, arilo, -alquilarilo, OR, NRR', CN, COR, COOR, CONRR';
- Rk se selecciona independientemente de entre halógeno;
- X se selecciona de entre H, alquilo, arilo, -alquilarilo, en el que dichos alquilo y/o arilo están opcionalmente sustituidos por halógeno, alquilo, CN, CF<sub>3</sub>, OR, NRR', COR, COOR, CONRR';
- Y se selecciona de entre:
  - (CHT)<sub>p</sub>NRaRb en el que
    - Ra y Rb, idénticos o diferentes, se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo o arilalquilo, en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno, alquilo, CN, CF<sub>3</sub>, =O, OR, NRR', COR, COOR, CONRR';
    - o Ra y Rb forman conjuntamente con el átomo de N al que están unidos un N que comprende un heterociclo de 5 a 7 eslabones que puede comprender uno o dos heteroátomos más seleccionados de entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido por uno o más de entre halógeno; =O; alquilo; -alquilarilo o arilo en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por halógeno; CN; CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR; CONRR';
    - p es un número entero seleccionado de entre 0 a 6;
  - cada T', idéntico o diferente se selecciona independientemente de entre H o alquilo;

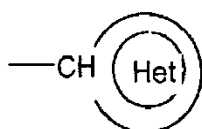
30

35

40



en la que:



45

- es un heterociclo saturado o parcialmente insaturado o heteroarilo, mono o bicíclico, que comprende 1, 2 o 3 heteroátomo(s) seleccionado(s) de entre N, O o S, opcionalmente sustituido por uno o más de entre alquilo; -alquilarilo; OR; C(=O)OR; =O; CN; CF<sub>3</sub>; COR; NRR'; CONRR'; arilo o -alquilarilo en el que dicho arilo está opcionalmente sustituido por alquilo, halógeno, OR o COR;

- q es un número entero seleccionado de entre 0 a 6;
- cada T, idéntico o diferente se selecciona independientemente de entre H o alquilo;
- 5 - (CHT)<sub>r</sub>-arilo en el que:
  - dicho arilo mono o bicíclico está opcionalmente sustituido por uno o más de alquilo; OR; CF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>NRR'; -C(=O)R; halógeno; CN; -NRR'; CONRR; C(=O)-Oalquilo en el que dicho alquilo está opcionalmente sustituido por NRR'; y/o dicho arilo mono o bicíclico está opcionalmente fusionado con un heterociclo monocíclico de 5 a 7 eslabones;
  - r es un número entero seleccionado de entre 0 a 6;
  - cada T, idéntico o diferente se selecciona independientemente de entre H o alquilo;
  - 15 - (CHT)<sub>s</sub>-(C3-C7)cicloalquilo en el que
    - s es un número entero seleccionado de entre 0 a 6;
    - cada T, idéntico o diferente se selecciona independientemente de entre H o alquilo;
    - dicho cicloalquilo es monocíclico, o está fusionado con un arilo;
    - 25 - alquilo opcionalmente sustituido por CN, Oalquilo;
    - U-S(O)<sub>t</sub>-alquilo en el que
      - t es un número entero seleccionado de entre 0, 1 o 2;
      - -U- es un alquileo opcionalmente sustituido por uno o más de entre OR; =O; CF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>NRR'; -C(=O)R; halógeno; CN; NRR'; CONRR; C(=O)OR;
    - 30 - o X e Y forman conjuntamente con el átomo de N al que están unidos un heterociclo que comprende dicho átomo de N y opcionalmente uno o dos heteroátomos más, estando dicho heterociclo opcionalmente insaturado y/o
      - estando opcionalmente sustituido por uno o más de entre: =O; Hal, CN, NRR', C(=O)alquilo, alquilo; cicloalquilo; heterociclo; C(=O)-Oalquilo; arilo o -alquilarilo en el que dicho arilo está opcionalmente fusionado con un heterociclo y/o estando dicho arilo opcionalmente sustituido por alquilo o COalquilo;
      - estando opcionalmente fusionado con un arilo;

en el que R y R', idénticos o diferentes se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, alquilarilo, o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que k = 1.

50 3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- X se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 e Y se selecciona de entre:
- 55 - (CHT)<sub>p</sub>NRaRb en el que
  - Ra y Rb, idénticos o diferentes, se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, arilo, -alquilarilo, en los que dicho arilo está opcionalmente sustituido por alquilo;
  - p es de 0 a 4;
  - 60 o cuando
    - Ra y Rb forman conjuntamente con el átomo de N al que están unidos un heterociclo de 5 a 7 eslabones que comprende opcionalmente uno o dos heteroátomos más seleccionados de entre N, O o S, estando dicho heterociclo opcionalmente sustituido con uno o más de entre halógeno; =O; alquilo; -alquilarilo o arilo, en el que arilo está opcionalmente sustituido por halógeno; =O; CN; CF<sub>3</sub>; OR; NRR'; COR; COOR;
    - 65

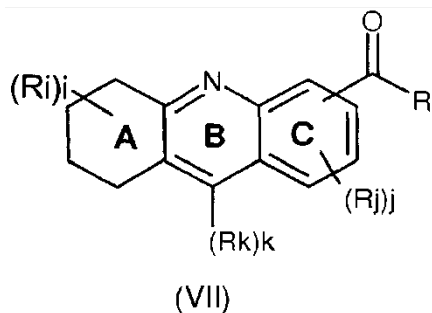




[1,4']bipiperidinil-1'-il-(9-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-acridin-3-il)-metanona

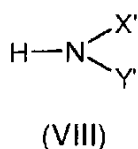
o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Procedimiento para la preparación de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula (VII):



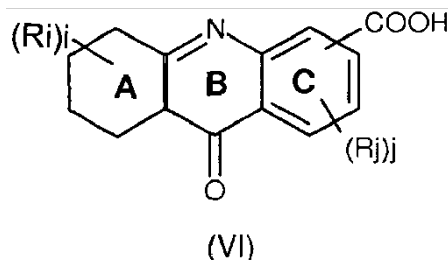
10 por acoplamiento peptídico

con un compuesto correspondiente de fórmula (VIII):

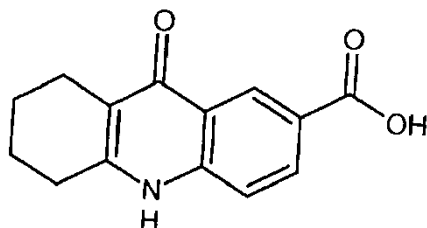


15 en la que i, j, k, Ri, Rj y Rk se definen como en las reivindicaciones 1 a 4, R es OH o un halógeno y X' e Y' son idénticos a X e Y respectivamente, o un precursor de los mismos, o un grupo protector de amino, opcionalmente seguido de alquilación, alquilaciones o desprotección.

20 6. Compuesto de fórmula (VI):



25 en la que i, j, Ri, Rj se definen como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la excepción de



30 7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un excipiente farmacéutico aceptable.

8. Compuesto de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su utilización para inhibir una USP.

9. Compuesto para su utilización según la reivindicación 8 para inhibir la USP7.

- 5 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su utilización para tratar y/o prevenir el cáncer y la metástasis, enfermedades neurodegenerativas, tal como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos inmunitarios, enfermedades óseas y de las articulaciones, osteoporosis, trastornos inflamatorios de la artritis, enfermedades cardiovasculares, infecciones y enfermedades víricas, y/o infecciosidad y/o latencia víricas, infecciones y enfermedades bacterianas.
- 10 11. Compuesto para su utilización según la reivindicación 10, en el que dichas infecciones y enfermedades víricas se seleccionan de entre las infecciones víricas por herpes simple-1 o -2, hepatitis A, hepatitis C, infección y enfermedad por coronavirus del SARS, virus de Epstein-Barr, infecciones y enfermedades rinovíricas, infecciones y enfermedades adenovíricas, poliomielitis.
- 15 12. Combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un tautómero del mismo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más agentes activos seleccionados de entre agentes anticancerosos, agentes neurológicos, agentes trombolíticos, agentes antioxidantes, antiinfecciosos, agentes antihipertensores, agentes diuréticos, agentes trombolíticos, agentes inmunosupresores, agentes cardiovasculares, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, agentes antibacterianos.
- 20



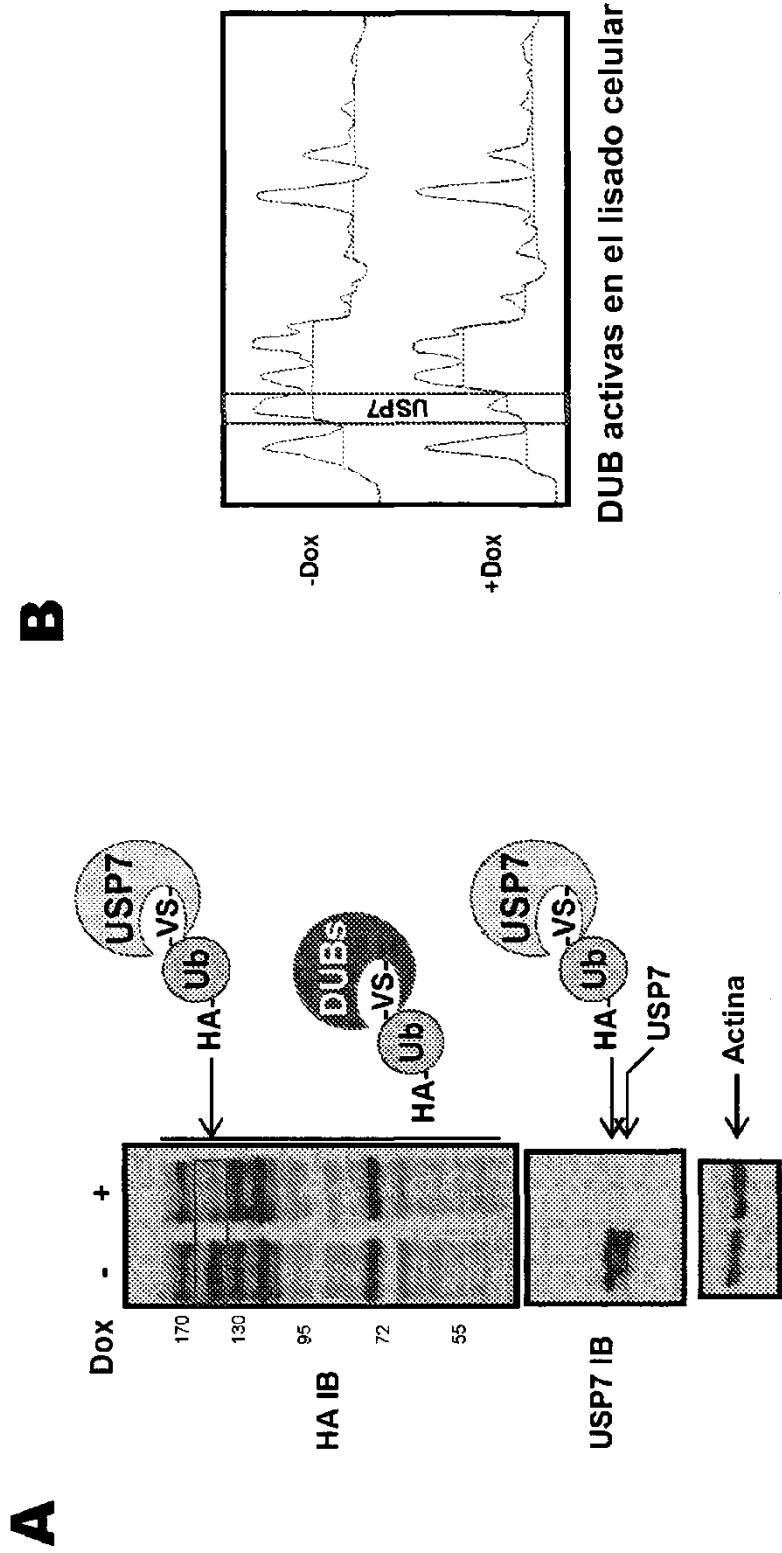
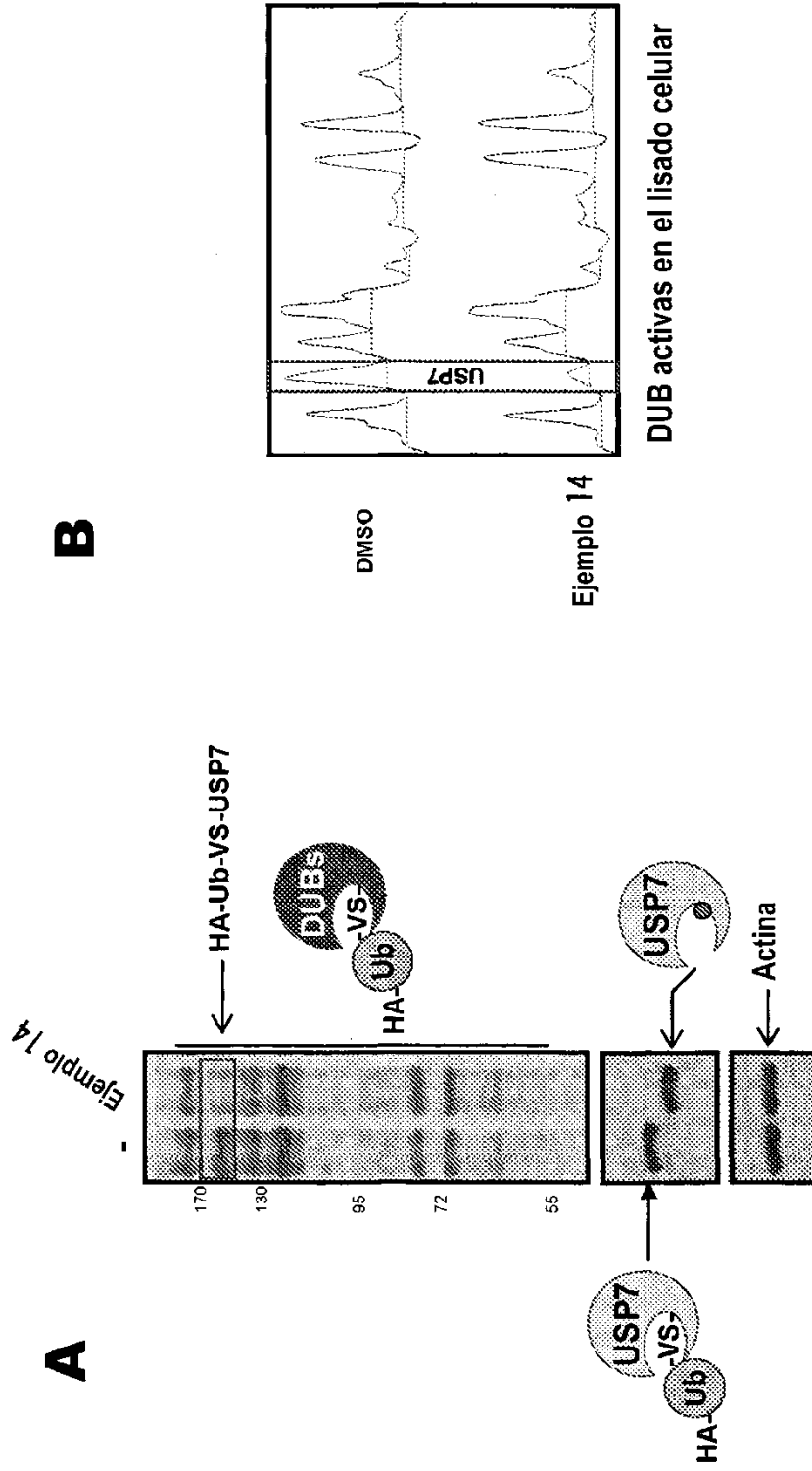
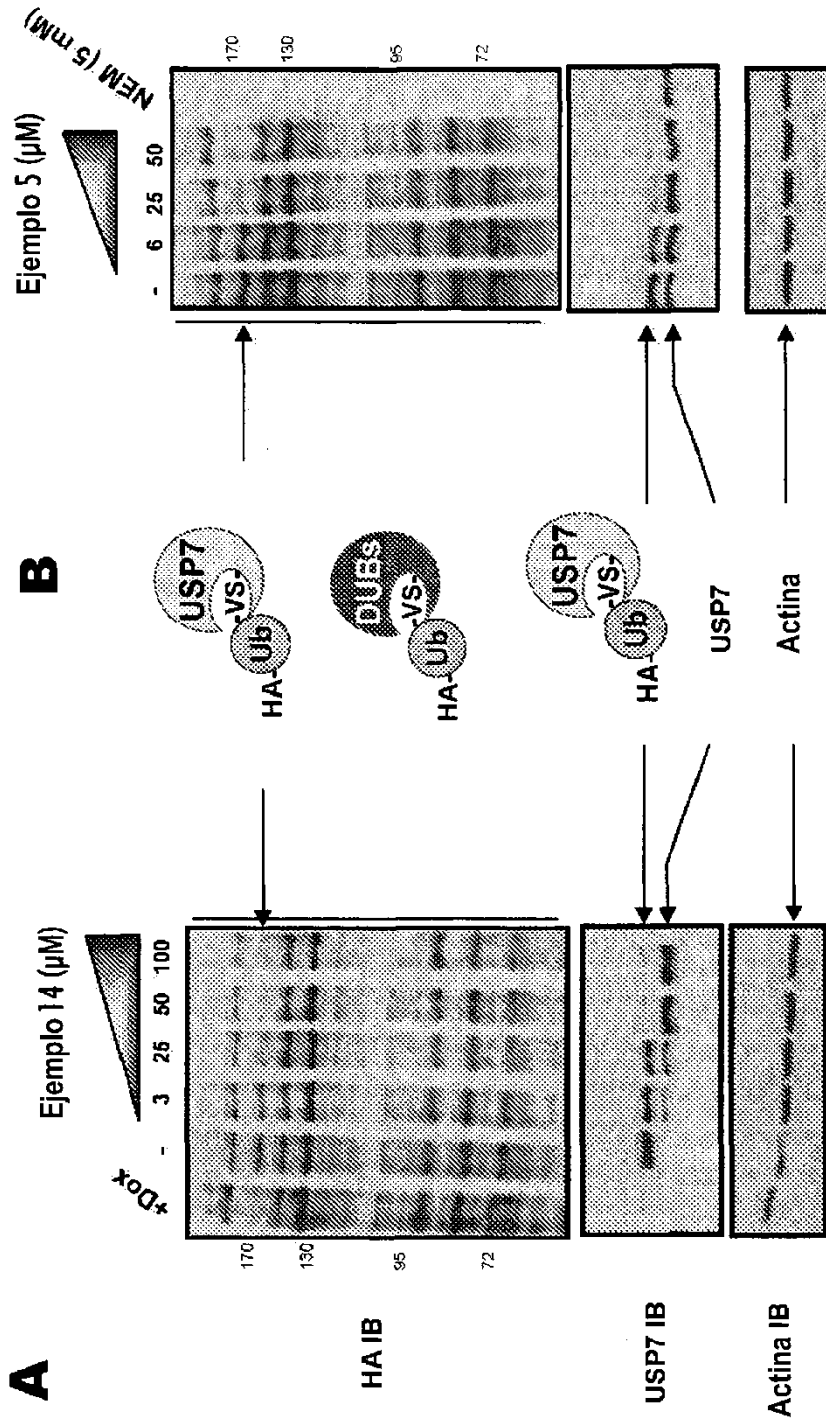


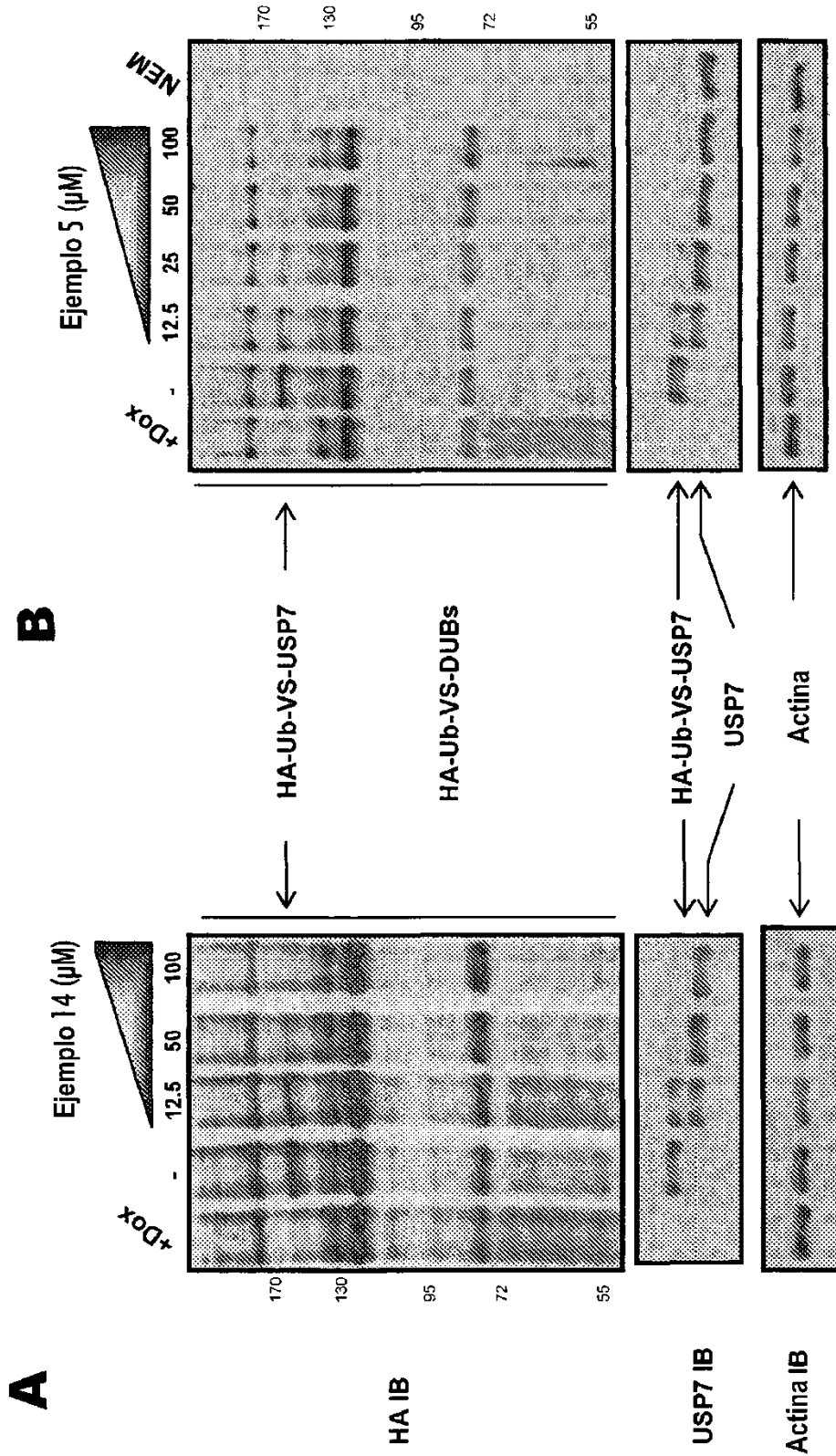
FIG.2



**FIG.3**



**FIG.4**



**FIG.5**