

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 351**

51 Int. Cl.:

C07D 303/36 (2006.01) **A61K 31/506** (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01) **A61K 31/428** (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01) **A61K 31/501** (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01) **A61K 31/497** (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01) **A61K 31/4375** (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 31/409 (2006.01)
A61K 31/4725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010** **E 10724601 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2411376**

54 Título: **Inhibidores del factor NF-KB**

30 Prioridad:

27.10.2009 US 255096 P
27.03.2009 US 164256 P
30.11.2009 US 265026 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2015

73 Titular/es:

PROFECTUS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
6411 Beckley Street
Baltimore, MD 21224, US

72 Inventor/es:

ZHANG, JIE;
SLISKOVIC, D. ROBERT y
DUCKER, CHARLES E.

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Julio

ES 2 540 351 T3

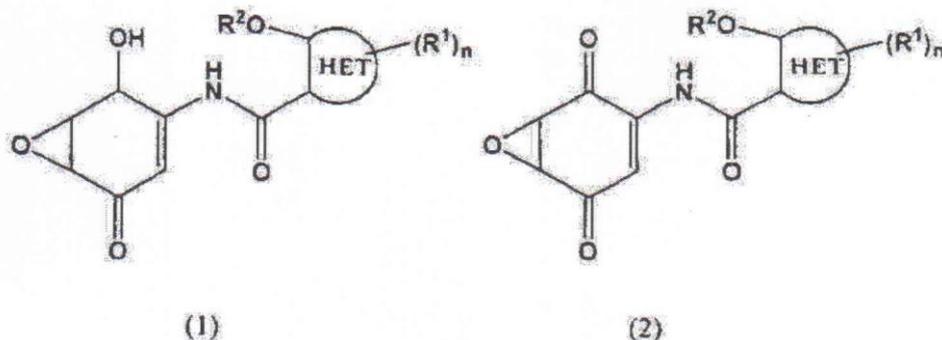
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores del factor NF-KB.

Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos de fórmulas (1) y (2),



5

y a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunes, diabetes y complicaciones diabéticas, infección, enfermedad cardiovascular y lesiones por reperfusión isquémica.

Antecedentes de la invención

10 El factor NF-κB (factor nuclear κ-potenciador de cadena ligera de células B activadas) es uno de los factores de transcripción que consiste en hetero- u homo-dímeros de p65 (RelA), C-Rel, RelB, p50 (NF-κB1, y p52 (NF-κB2) (Dejardin 2006). En la vía clásica o canónica de NF-κB, la estimulación de una diversidad de receptores de membrana celular conduce a fosforilación, ubiquitinación y degradación proteosómica de las IκBs (proteínas inhibidoras), lo que da como resultado la translocación del heterodímero p65/50 que activa transcripción. La vía
15 canónica puede ser bloqueada de manera efectiva mediante inhibición de IκBβ kinasa, proteasoma 26S, o p65 de unión a ADN. La vía alternativa, o no canónica, está regulada mediante proteólisis de la anquirina inhibitoria que contiene proteína NF-κB2/p100 para liberar p52, lo que dimeriza típicamente con RelB. Adicionalmente, existe una vía "híbrida" que activa p52/c-Rel y p52/p65. Las vías no canónicas o "híbridas" no son susceptibles a los inhibidores de IκBβ kinasa o proteasomales. Estas vías se inhiben de manera más efectiva mediante antagonización de RelB o c-Rel de enlace a ADN. Las vías canónica y no canónica están asociadas a diferentes aspectos de enfermedades
20 específicas por activación de grupos distintivos de genes. De ese modo, se considera que la inhibición selectiva de la vía canónica, o bien de la no canónica, o de ambas, bajo diferentes estados de enfermedad, es la alternativa más eficaz para mejorar las condiciones de enfermedad mencionadas.

25 La activación de NF-κB ha estado implicada en una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, SIDA, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, replicación viral, shock séptico, desórdenes neurodegenerativos, ataxia telangiectasia (AT), artritis, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, y otras condiciones inflamatorias, aterosclerosis, enfermedad del corazón, asma, desórdenes catabólicos, diabetes de tipo 1 y 2, envejecimiento, enfermedades de la piel, enfermedades renales, enfermedades intestinales, pancreatitis, enfermedades neuropatológicas, enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, septicemia y apnea del sueño. La activación de NF-κB ha sido implicada en un gran número de enfermedades
30 humanas.

35 Por ejemplo, la activación de NF-κB por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos Gram-negativos puede contribuir al desarrollo de shock séptico debido a que el NF-κB sobre-activa la transcripción de numerosas citoquinas y enzimas de modificación, cuya expresión prolongada puede afectar negativamente a la función de órganos tales como el corazón y el hígado (Arcaroli et al., 2006; Niu et al., 2008).

Adicionalmente, en la enfermedad de Alzheimer crónica, el péptido amiloide β causa la producción de productos intermedios de oxígeno reactivo y activa directamente expresión de gen a través de sitios de NF-κB (Giri et al., 2005).

40 La erosión destructiva de los huesos, u osteolisis, es una complicación importante de condiciones inflamatorias tal como artritis reumatoide (RA), enfermedad periodontal, y osteolisis periprotésica. La RA es una enfermedad autoinmune que afecta aproximadamente a un 1,0% de adultos estadounidenses, con una relación de hembra a varón de 2,5 a 1 (Lawrence et al., 1998). Su característica es una destrucción progresiva de las articulaciones que causa una importante morbilidad. La enfermedad periodontal es altamente predominante y puede afectar hasta un 90% de la población mundial. Se sabe bien que es la causa que conduce a la pérdida de dientes en adultos

(Pihlstrom et al., 2005). A pesar de su relevancia, se sabe poco acerca del mecanismo mediante el que se produce la erosión ósea periodontal, aunque la respuesta del anfitrión a microorganismos patógenos presentes en la boca parece disparar el proceso. La osteolisis periprotésica está causada por resorción ósea crónica en torno a dispositivos de implante exógenos hasta que se pierde la fijación (Harris, 1995), y se considera como el resultado de una respuesta inmune innata a partículas portadoras de residuos, con poca contribución por parte de componentes del sistema inmune adquirido.

Aunque esas condiciones son iniciadas por distintas causas y progresan por vías alternativas, el (los) factor(es) común(es) importante(s) en el proceso patológico de esas enfermedades es (son) la sobreproducción de citoquinas inflamatorias que es impulsada por la activación de la vía del NF- κ B en el tejido inflamado. La erosión ósea vista en esas condiciones está en gran medida localizada en los tejidos inflamados, distintos de las patologías óseas sistémicas, hormonalmente reguladas, tal como la osteoporosis. Estos tejidos inflamados, encontrados en muchas de esas enfermedades, producen también citoquinas proinflamatorias, es decir, TNF- α , IL-1 e IL-6 que, a su vez, están involucradas en actividades de señalización de diferenciación de osteoclastos y de resorción ósea. De ese modo, la osteolisis inflamatoria es el resultado del enganche y activación potenciados de osteoblastos incitados por NF- κ B impulsados por citoquinas proinflamatorias en el tejido inflamado.

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) abarca un número de desórdenes inflamatorios reincidentes crónicos que incluyen el tracto gastrointestinal. Las dos formas más prevalentes de IBD, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, pueden ser distinguidas mediante histopatologías únicas y respuestas inmunes (Atreya et al., 2008; Bouma & Strober, 2003). La eficacia limitada y los efectos adversos potenciales de los tratamientos actuales llevan a los pacientes y los médicos ansiosos de nuevos tratamientos, a gestionar la naturaleza inflamatoria reincidente crónica de esas enfermedades.

Aunque las etiologías exactas que conducen a la enfermedad de Crohn y a la colitis ulcerosa siguen siendo desconocidas, se cree que éstas son generalmente el resultado de una activación inapropiada y permanente del sistema de mucosa inmune frente a la flora luminal normal (Tilg et al., 2008). Como resultado, los macrófagos residentes, las células dendríticas y las células T se activan y empiezan a segregar principalmente citoquinas y quimioquinas dependientes de NF- κ B. La sobreproducción mediada por NF- κ B de mediadores pro-inflamatorios clave, se atribuye a la iniciación y la progresión tanto de IBD humana como de modelos animales de colitis (Neurath et al., 1998; Wirtz & Neurath, 2007). En particular, los macrófagos de pacientes con IBD presentan altos niveles de actividad de enlace de NF- κ B ADN acompañados de una producción incrementada de interleuquina (IL) 1, IL6 y factor de necrosis tumoral (TNF α) (Neurath et al., 1998). Adicionalmente, el NF- κ B juega un papel fundamental en la activación de las citoquinas de la célula T auxiliar 1 (Th1) y de la célula T auxiliar 2 (Th2), siendo ambas necesarias para fomentar y mantener la inflamación (Barnes, 1997). Debido al papel central jugado por el NF- κ B en la IBD, se han realizado grandes esfuerzos por desarrollar tratamientos que objetiven esta vía.

Se ha comprobado que el NF- κ B está expresado constitutivamente en numerosos cánceres derivados de líneas celulares de pecho, ovarios, colon, de páncreas, de tiroides, de próstata, de pulmón, de cabeza y de cuello, de vejiga, y en tumores de la piel (Calzado et al., 2007). Esto se ha visto también en relación con el linfoma de célula B, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma de célula T, la leucemia de célula T adulta, la leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, y leucemia mielogenosa aguda. Aunque el NF- κ B es un mediador clave de inflamación normal, como parte de la respuesta de defensa, la inflamación crónica puede conducir a cáncer, diabetes, y a una serie de otras enfermedades según se ha mencionado con anterioridad. Se han identificado diversos productos de gen pro-inflamatorios que median con un papel crítico en el proceso carcinogénico, angiogénesis, invasión y metástasis de células tumorales. Entre estos productos de gen se encuentran el TNF y miembros de su superfamilia, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, quimioquinas, MMP-9, VEGF, COX-2 y 5-LOX. La expresión de todos estos genes está regulada principalmente por el factor de transcripción NF- κ B, el cual está constitutivamente activo en la mayor parte de los tumores y es inducido por carcinógenos (tal como el humo del cigarrillo), promotores tumorales, proteínas virales carcinogénicas (VIH-tat, KHSV, EBV.LMP1, HTLV-tax, HPV, HCV y HBV), agentes quimioterapéuticos, e irradiación gamma (Aggarwal et al., 2006). Estas observaciones implican que agentes anti-inflamatorios que suprimen NF- κ B podrían tener un potencial tanto en la prevención como en el tratamiento del cáncer.

La hemaglutinina de la proteína del virus de la influenza activa también NF- κ B, y esta activación puede contribuir a la inducción viral de citoquinas y a alguno de los síntomas asociados a la influenza (Flory et al., 2000; Path & Baeuerle, 1995).

Los lípidos oxidizados procedentes de las lipoproteínas de baja densidad, asociados a aterosclerosis, activan el NF- κ B, lo que activa a continuación otros genes tal como citoquinas inflamatorias (Liao et al., 1994). Además, los ratones que son susceptibles a la aterosclerosis, presentan activación de NF- κ B cuando se alimentan con una dieta aterogénica, debido a su susceptibilidad a la formación de lesión aterosclerótica aórtica asociada a la acumulación de productos de peroxidación de lípidos, a la inducción de genes inflamatorios, y a la activación de factores de transcripción de NF- κ B (Liao et al., 1994). Otro importante contribuyente a aterosclerosis es la trombina, la cual estimula la proliferación de células vasculares del músculo liso mediante la activación de NF- κ B (Maruyama et al., 1997). Se ha demostrado que una forma truncada de proteína represora de I κ B (I κ B α) es la causa de la hipersensibilidad a la radiación ionizante y es defectuosa en cuanto a la regulación de síntesis de ADN en células de

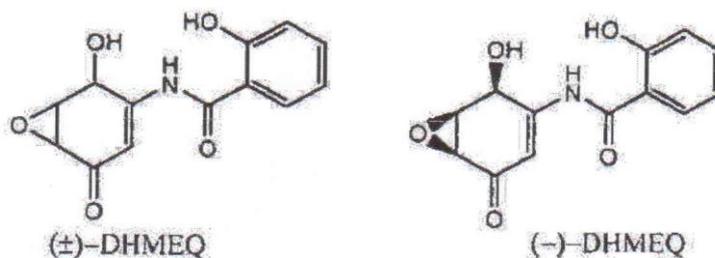
ataxia telangiectasia (AT), las cuales tienen niveles constitutivos de activación de NF- κ B (Jung et al., 1995). Se ha demostrado que esta mutación en la I κ B α a partir de células de AT inactiva la proteína represora causando la activación constitutiva de la vía NF- κ B. A la vista de estos hallazgos, la activación o la expresión anormal de NF- κ B está asociada claramente a una amplia diversidad de condiciones patológicas.

5 La infección y el ciclo de vida del VIH-1 están unidos estrechamente a la vía del NF- κ B en células mononucleares humanas. La infección viral conduce a la activación de NF- κ B que genera la sobre-estimulación y la reducción de células T que es la característica del SIDA (revisado en Argyropoulos & Mouzaki, 2006). Por ejemplo, la expresión de CCR5, un receptor clave para el VIH-1, está regulada por el NF- κ B (liu et al., 1998). El análisis de supresión del promotor de CCR-5 ha demostrado que la pérdida del sitio NF- κ B/AP-1 3'-distal hace caer la transcripción en >95% (Liu et al., 1998). Estos estudios podrían sugerir que la represión constitutiva de NF- κ B podría causar una disminución drástica en el mensaje receptor de CCR-5. Puesto que la cinética de entrada de VIH-1 está influenciada por los niveles expresados de CCR5 sobre la superficie de las células T objetivo (Ketas et al., 2007; Platt et al., 1998; Reeves et al., 2002), el descenso del CCR5 de modulación puede restringir la expresión del pozo de células infectadas que engendra el depósito viral. Se ha informado también que la expresión de CXCR4 está influenciada por el NF- κ B (Helbig et al., 2003), sugiriendo que los inhibidores de NF- κ B pueden ser igualmente eficaces frente a aislados trópicos X4 que aparecen durante la infección de la última etapa. El NF- κ B es necesario para la transcripción del ADN-pro-virus integrado (Baba, 2006; Lordansky et al., 2002; Mukerjee et al., 2006; Palmieri et al., 2004; Rizzi et al., 2004; Sui et al., 2006; Williams et al., 2007). De hecho, la carencia de activación de NF- κ B conduce a la generación de una población de células que albergan el virus latente que es un obstáculo principal para la eliminación del virus en los pacientes infectados (Williams et al., 2006).

El NF- κ B fomenta la expresión de más de 150 genes objetivo en respuesta a estimuladores inflamatorios. Estos genes incluyen interleuquina-1, -2, -6 y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) (estos receptores median apoptosis, y funcionan como reguladores de inflamación), así como genes que codifican inmunoreceptores, moléculas de adhesión de células, y enzimas tales como ciclooxigenasa-II y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Karin, 2006; Tergaonkar, 2006). Éste juega también un papel clave en la progresión de enfermedades asociadas a infecciones virales como CVH y VIH-1.

Los miembros de la familia del NF- κ B incluyen RelA/p65, RelB, c-Rel, p-50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2) (Hayden & Ghosh, 2004; Hayden et al., 2006a; Hayden et al., 2006b). Los miembros de la familia Rel funcionan ya sea como homodímeros o ya sea como heterodímeros con distinta especificidad para elementos de enlace cis localizados dentro de los dominios de promotor de genes regulados con NF- κ B (Boisio et al., 2006; Natoli et al., 2005; Sacconi et al., 2004). El NF- κ B clásico, compuesto por el heterodímero RelA/p65 y el p50, es la forma mejor estudiada de NF- κ B (Burstain & Duckett, 2003; Hayden & Ghosh, 2004; y referencias de la presente memoria). Con anterioridad a la estimulación celular, el NF- κ B clásico reside en el citoplasma como un complejo inactivo enlazado a las proteínas inhibidoras de I κ B. Los inductores de NF- κ B tal como los lipopolisacáridos bacterianos, las citoquinas inflamatorias o la proteína Vpr del VIH, liberan NF- κ B activo del complejo citoplásmico por activación del complejo de I κ B-quinasa (IKK), con fosforilatos I κ Bk (Greten & Karin, 2004; Hacker Karin, 2006; Karin, 1999; Scheidereit, 2006). La fosforilación de I κ B lo marca para una posterior ubiquitinilación y degradación por el proteosoma 26S. Los dímeros de NF- κ B se translocan en el núcleo donde estimulan la transcripción de sus genes objetivo.

El diseño molecular de deshidrometilepoxiquinomicina racémica (DHMEQ) se basó en el antibiótico epoxiquinomicina C aislado a partir de *Amicولاتopsis* (Chaicharoenpong et al., 2002). La DHMEQ fue sintetizada como un racemato a partir de 2,5-dimetoxianilina en cinco etapas. La separación de los enantiómeros sobre una columna quiral produjo ambos enantiómeros (+) y (-). El enantiómero (-) demostró ser más potente en la inhibición del NF- κ B que el enantiómero (+) (Umezawa et al., 2004). La DHMEQ ha demostrado inhibir específicamente la translocación del NF- κ B en el núcleo (Anga et al., 2002). Específicamente, ésta modifica covalentemente un residuo de cisteína específico en p65 y otras proteínas de homología Rel con una relación estequiométrica de 1:1 (Yammamoto et al., 2008). Como inhibidora del NF- κ B, la DHMEQ ha sido probada ampliamente en varios modelos de enfermedades animales y ha demostrado un amplio espectro de eficacia que incluye el tratamiento de tumores sólidos, malignidad hematológica, artritis, isquemia intestinal, y aterosclerosis (Watanabe et al., 2006). Así, la DHMEQ puede ser útil como tratamiento contra el cáncer y la inflamación (Takeuchi et al., 2003).



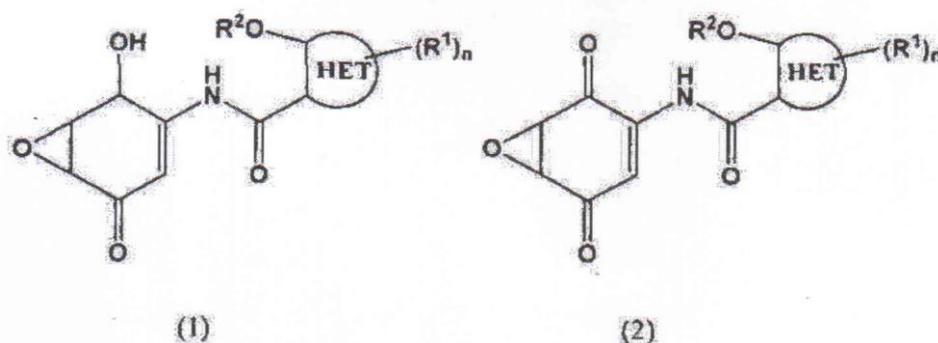
50 En vista del papel que juega dicha activación del NF- κ B en un número de enfermedades distintas, tal como las que se han descrito con anterioridad, existe una necesidad permanente de inhibidores de NF- κ B efectivos de molécula

pequeña.

Se han descubierto varias series de inhibidores de molécula pequeña que inhiben directamente el enlace de componentes del NF- κ B, p65 (RelA), RelB y c-Rel con el ADN. Como resultado, esos compuestos pueden bloquear tanto la vía canónica como la vía no canónica del NF- κ B. La doble inhibición es distinta de los inhibidores de I κ B β quinasa que afectan solamente a la vía canónica. Se ha comprobado la eficacia de los compuestos en varios modelos animales de mieloma múltiple y de artritis reumática y los resultados se describen en la presente memoria.

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos que tienen la estructura de fórmula (1) o de fórmula (2):



o a una sal farmacéuticamente aceptables de las mismas, en donde HET es un carbociclo saturado o insaturado mono- o multi-anillo, en el que uno o más de los átomos de carbono del anillo se ha sustituido por N, S, P u O.

Cada R^1 es independientemente hidrógeno; CF_3 fenil opcionalmente sustituido con ciano, halo, nitro, hidroxil, (C1-C6) alquil, (C1-C6) alquil.OH, (C1-C6) alcoxi, COR^3 , NR^4R^5 o $NHCO(C1-C6)$ alquil; ciano; halo; nitro; hidroxil; (C1-C6) alquil; (C1-C6) alquil-OH; (C1-C6) alcoxi; (C1-C6) tioalcoxi; fenoxi; COR^3 ; NR^4R^5 ; $NHCO(C1-C6)$ alquil; $SO_2(C1-C6)$ alquil; o $SO_2NR^4R^5$.

R^2 es H, R^6 , COR^6 , $CONHR^6$, $COOR^6$, CH_2OCOR^6 , $P(O)(O(C1-C6)$ alquil) $_2$, $P(O)(OCH_2OCO(C1-C6)$ alquil) $_2$, $P(O)(OH)(OCH_2OCO(C1-C6)$ alquil), $P(O)(OH)(C1-C6)$ alquil, una sal orgánica de $P(O)(OH)_2$, $P(O)(O(C1-C6)$ alquil) $_2$, $P(O)(OCH_2OCO(C1-C6)$ alquil) $_2$, $P(O)(OH)(OCH_2OCO(C1-C6)$ alquil, $P(O)(OH)(OC1-C6)$ alquil o $P(O)(OH)(C1-C6)$ alquil) o glicosil (el radical resultante de la retirada de un grupo hidroxil de la forma hemiacética de un carbohidrato), en donde R^6 es C1-C6 alquil, trifluorometil, (C3-C6) cicloalquil, ciclohexilmetil o fenil, en donde el fenil se sustituye con 0 a 4 grupos seleccionados a partir de flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxi y fenilmetil, en donde el fenilmetil se sustituye en el anillo fenil por 0-4 grupos elegidos a partir de flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxi, 2-, 3- o 4-piridinil y 2-, 4- o 5-pirimidinil.

R^3 es independientemente hidroxil, (C1-C6) alcoxi, fenoxi o $-NR^4R^5$.

Cada uno de R^4 y R^5 es independientemente hidrógeno, (C1-C6) hidroxil o (C3-C6) cicloalquil.

$n = 0-3$.

En HET, existe una relación orto entre el grupo OR^2 y la porción amida (es decir, las funcionalidades OR^2 y $C(=O)NH$ están unidas a átomos adyacentes en el anillo HET).

Un aspecto de la presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (1) o fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la presente invención se refiere además a compuestos para su uso en el tratamiento de cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunes, diabetes y complicaciones diabéticas, infección, enfermedad cardiovascular y lesiones por reperfusión isquémica, que comprenden administrar a un mamífero que necesite tal tratamiento, tal como un humano, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto de la presente invención se refiere adicionalmente a compuestos para su uso en la inhibición de expresión de gen y a transducción de señal directa o indirectamente a través de la vía de NF- κ B en un mamífero, tal como un humano, que comprende administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable

del mismo.

Breve descripción de las Figuras

Las Figuras representan realizaciones específicas de la invención que se describe, y se usan por lo tanto con fines ilustrativos solamente. En consecuencia, no se pretende que las Figuras limiten el alcance de la invención.

5 La **Figura 1** muestra la inhibición dependiente de concentración de la expresión de dos genes informadores dependientes de NF- κ B, luciferasa (A) y proteína de fluorescencia verde (GFP) (B) por el compuesto del Ejemplo 1 en células HEK-293.

10 La **Figura 2** muestra el compuesto del Ejemplo 1 que tiene un pequeño efecto citotóxico en hPBMCs. Se trataron células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (hPBMCs) con el ejemplo 1 o con DHMEQ y se evaluó el porcentaje de células viables 24 horas después del tratamiento con el medicamento. El gráfico representa la desviación media \pm estándar de tres experimentos de replicación.

La **Figura 3** muestra los efectos del compuesto del Ejemplo 1 sobre la expresión dependiente de NF- κ B de IL-2R α soluble, una citoquina regulada mediante NF- κ B, en hPBMCs. El gráfico es el valor medio de 2 experimentos independientes.

15 La **Figura 4** muestra la capacidad del compuesto del Ejemplo 1 para inhibir la secreción de citoquinas inflamatorias, IL-6(A) e IL-6(B), en células de carcinoma de pecho de una manera dependiente de la dosis. Específicamente, A y B muestran los efectos del compuesto del Ejemplo 1 sobre secreción de IL-6 y de IL-8 a partir de células MDA-MB-231 estimuladas con 20 ng/ml de TNF- α . Las células fueron tratadas con las concentraciones indicadas del compuesto del Ejemplo 1 durante 2 horas, y después se añadió el TNF- α y continuó la incubación durante 4 horas.

20 La **Figura 5** muestra la capacidad del compuesto del Ejemplo 1 para bloquear translocación de RelA/p65 desde el citoplasma a los núcleos de una manera dependiente de la dosis. Específicamente, el compuesto del Ejemplo 1 causa la acumulación de RelA/p65 activado en el citoplasma de las células. Se trataron células Hek293 con DHMEQ o el compuesto del Ejemplo 1 (según se ha indicado) con TNF α (20 ng/ml) durante 30 minutos. Tras la incubación, las células fueron inmuno-manchadas con anticuerpo anti-p65 (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y los núcleos fueron contra-manchados con Dapi. Se capturaron imágenes usando un microscopio invertido AE31 con iluminación de epifluorescencia (Motic, Xiamen, China) y una cámara ProgRes C3 (JENOPTIK, Jena, Alemania). Las imágenes individuales de p65 y de los núcleos correspondientes fueron fundidas en una figura final. Las células de control tratadas (DMSO solamente) muestran acumulación nuclear de p65 tras estimulación de TNF α . La acumulación nuclear de p65 inducida por TNF α fue bloqueada significativamente mediante el compuesto del Ejemplo 1 en 1 a 12 mM mientras que la DHMEQ necesitó una concentración más alta para conseguir el mismo efecto.

La **Figura 7** muestra que el compuesto del Ejemplo 2 inhibe p65 (RcIA) que enlaza con ADN en la vía canónica de una manera más potente que la DHMEQ y la partenolida.

35 La **Figura 8** muestra que el compuesto del Ejemplo 2 inhibe el RcIB que enlaza con ADN en la vía no canónica (IC₅₀ ~2 μ M), mientras que la DHMEQ y la partenolida no lo hacen (IC₅₀ >20 μ M)..

La **Figura 9** muestra que el compuesto del Ejemplo 2 redujo el crecimiento del tumor RPMI8226 como el Bortezomib (PS-341) en ratones de xenoinjerto. Ni el tratamiento con PS-341 (1 mg/kg iv días 1,4/semana x 4 semanas) ni con el compuesto del Ejemplo 2 (15 mg/kg ip QD x 21) consiguió inhibición significativa estadística de crecimiento del tumor en este estudio en comparación con el tratamiento vehicular (P > 0,10).

40 La **Figura 10** muestra que el compuesto del Ejemplo 2 presentó una eficacia antiinflamatoria como el Etanercept en un modelo de ratón de artritis reumatoide inducida por colágeno (CIA). Tanto el grupo de tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 (15 mg/kg s.c. qd 21-35) como con el Etanercept (50 μ g/ratón ip qd 21-35) consiguieron efectos antiinflamatorios estadísticos significativos (P < 0,05 en comparación con el compuesto vehicular tratado).

45 La **Figura 11** muestra que el compuesto del Ejemplo 2 (a 10 μ M) no interactúa con P450s ni con hERG (inhibición < 50%).

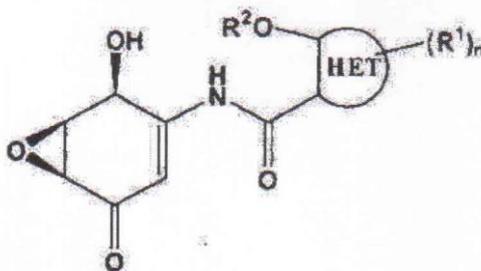
Descripción detallada

Definiciones

50 Los términos usados para describir la presente invención tienen los significados proporcionados a continuación en la presente memoria. Los compuestos y los productos intermedios de la presente invención pueden ser nombrados según cualquiera de los sistemas de nomenclatura IUPAC (Unión Internacional para Química Pura y Aplicada) o CAS (Servicio de Resúmenes de Química).

El contenido de átomos de carbono de las diversas porciones que contienen hidrocarburo en la presente memoria

- pueden ser indicadas mediante un prefijo que designa el número mínimo y máximo de átomos de carbono en esa porción, por ejemplo el prefijo (Ca-Cb) alquil indica una porción alquil de un número entero “a” o “b” de átomos de carbono, ambos inclusive. De ese modo, por ejemplo, (C1-C6) alquil se refiere a un grupo alquil de uno a seis átomos de carbono, ambos inclusive. El término “alquil” indica una cadena recta o ramificada de átomos de carbono con sustituyentes de átomos de hidrógeno únicamente, en donde la cadena de carbono contiene opcionalmente uno o más dobles o triples enlaces, o una combinación de dobles y triples enlaces. Ejemplos de grupos alquil incluyen aunque sin limitación, el metil, etil, propil, isopropil, propenil, propinil, hexadienil y similares.
- 5 El término “alcoxi” se refiere a cadenas rectas o ramificadas, monovalentes, saturadas alifáticas de átomos de carbono en donde uno de los átomos de carbono ha sido sustituido por un átomo de hidrógeno. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen, aunque sin limitación, metoxi, etoxi e isopropoxi.
- 10 El término “cicloalquil” se refiere a una disposición de cadenas alifáticas monocíclicas o bicíclicas, saturadas y opcionalmente insaturadas. Ejemplos de grupos cicloalquil incluyen, aunque sin limitación, ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil y ciclohexenil. Los grupos cicloalquil pueden estar opcionalmente fusionados en hidrocarburos aromáticos tal como benzeno, para formar grupos cicloalquil fusionados, tal como indanil y similares.
- 15 El término “halo” se refiere a cloro, bromo, flúor o yodo.
- El término “sustituido” se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno en una molécula con un átomo o una molécula diferente. El átomo o la molécula que reemplaza al átomo de hidrógeno se indica como “sustituyente”.
- 20 El término “HET” se refiere a un carbociclo saturado o insaturado, mono- o multi-anillo, en el que uno o más de los átomos de carbono del anillo se han sustituido por N, S, P u O. Se pretende que el término “HET” abarque sistemas de anillo completamente saturados o insaturados, así como sistemas de anillo parcialmente insaturados, incluyendo todas las formas isoméricas posibles del heterociclo (por ejemplo, pirrolil comprende 1H-pirrolil y 2H-pirrolil). Ejemplos de dónde el HET es un heterociclo saturado monocíclico (por ejemplo, un anillo de 4, 5 ó 6 miembros) o bicíclico (por ejemplo, un sistema 5/6, 5/5, 6/6) incluyen, aunque sin limitación, tetrahidrofuranyl, pirrolidinil, tetrahidrotienil, dihidrooxazolil, piperidinil, hexahidropirimidinil, dioxanil, morfolinil, ditianil, tiomorfolinil, piperazinil y similares. Ejemplo de dónde el HET es un heterociclo monocíclico, bicíclico o tricíclico parcialmente saturado incluyen, aunque sin limitación, pirrolidinil, imidazolil, pirazolil, 2,3-dihidrobenzofuranil, 1,3-benzodioxalanil, 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinil, indolinil y similares. Ejemplos de dónde el HET es un heterociclo aromático monocíclico, bicíclico o tricíclico incluyen, aunque sin limitación, pirrolil, furanil, tienil, imidazolil, oxazolil, isoxazolil, tiazolil, isotiazolil, pirazolil, 1,2,3-triazolil, 1,2,5-tiadiazolil, 1,2,3-tiadiazolil, 1,2,3-oxadiazolil, 1,2,5-oxadiazolil, piridinil, pirimidinil, pirazinil, piridazinil, triazinil, benzofuranil, isobenzofuranil, benzotienil, isobenzotienil, indolizininil, indolil, isoindolil, benzoxazolil, benzimidazolil, indazolil, benzisoxazolil, benzisotiazolil, benzopirazolil, benzoxadiazolil, benzotiadiazolil, benzotriazolil, quinolinil, isoquinolinil, cinolinil, quinolizininil, ftalazininil, quinoxalinil, quinazolinil, naftiridinil, pteredinil, pirrolopiridinil, tienopiridinil, furanopiridinil, isotiazolopiridinil, tiazolopiridinil, isoxazolopiridinil, oxazolopiridinil, pirazolopiridinil, imidazopiridinil, pirrolopirazinil, tienopirazinil, furanopirazinil, isotiazolopirazinil, tiazolopirazinil, isoxazolopirazinil, oxazolopirazinil, pirazolopirazinil, imidazopirazinil, pirrolopirimidinil, tienopirimidinil, furanopirimidinil, isotiazolopirimidinil, tiazolopirimidinil, isoxazolopirimidinil, oxazolopirimidinil, pirazolopirimidinil, imidazopirimidinil, pirrolopiridazinil, tienopiridazinil, furanopiridazinil, isotiazolopiridazinil, tiazolopiridazinil, isoxazolopiridazinil, oxazolopiridazinil, pirazolopiridazinil, imidazopiridazinil, oxadiazolopiridinil, tiadiaazolopiridinil, triazolopiridinil, oxadiazolopirazinil, tiadiazolopirazinil, triazolopirazinil, oxadiazolopirimidinil, tiadiazolopirimidinil, triazolopirimidinil, oxadiazolopiridazinil, tiadiazolopiridazinil, triazolopiridazinil, isoxazolotriazinil, isotiazolotriazinil, pirazolotriazinil, oxazolotriazinil, tiazolotriazinil, imidazotriazinil, oxadiazolotriazinil, tiadiazolotriazinil, triazolotriazinil, carbazolil y similares.
- 25 30 35 40
- 45 La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un compuesto que: (i) trate o prevenga la enfermedad, condición o desorden particular, (ii) atenúe o elimine uno o más síntomas de la enfermedad, condición o desorden particular, o (iii) evite o retarde el comienzo de uno o más síntomas de la enfermedad o condición particular.
- La frase “farmacéuticamente aceptable” indica que el portador, vehículo, diluyente, excipiente(s) y/o sal que se designa es en general químicamente y/o físicamente compatible con los otros ingredientes que comprende la formulación, y fisiológicamente compatible con el receptor los mismos.
- 50 El término “mamífero” se refiere a un animal individual que es un miembro de la clase taxonómica Mammalia. Ejemplos de mamíferos incluyen, aunque sin limitación, los humanos, perros, gatos, caballos y ganado vacuno. En la presente invención, el mamífero preferido es un humano.
- El compuesto racémico 2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo [4,1,0] hept-3-en-3-il) quinolina-3-carboximida se describe en Ejemplo 2 y se menciona a lo largo de la descripción como el compuesto del Ejemplo 2.
- 55 En un ejemplo de realización, los compuestos de la presente invención tienen la estructura y la estequiometría que se muestran en la fórmula (3).



(3)

Los compuestos pueden ser resueltos en sus enantiómeros mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen la formación de sales diastereoisoméricas que puedan ser separadas, por ejemplo, mediante cristalización, formación de derivados diastereoisoméricos o complejos que pueden ser separados, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía de gas-líquido, reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico del enantiómero, por ejemplo, esterificación enzimática, o cromatografía de gas-líquido o de líquido en un entorno quiral, por ejemplo, sobre un soporte quiral como por ejemplo sílice con un ligando quiral enlazado o en presencia de un solvente quiral. Se apreciará que cuando el estereoisómero deseado sea convertido en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación de los ejemplos descritos con anterioridad, se necesita una etapa adicional para liberar la forma enantiomérica deseada. Alternativamente, los enantiómeros específicos pueden ser sintetizados usando un material de partida ópticamente activo, mediante síntesis asimétrica usando reactivos ópticamente activos, mediante sustratos, catalizadores o solventes, o convirtiendo un estereoisómero en el otro por transformación asimétrica.

Siempre que los compuestos contengan uno o más centros estereogénicos adicionales, los expertos en la materia podrán apreciar que todos los diastereoisómeros y mezclas diastereoisoméricas de los compuestos ilustrados y discutidos en la presente memoria están dentro del alcance de la presente invención. Estos diastereoisómeros pueden ser aislados mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante cristalización, cromatografía de gas-líquido o de líquido. Alternativamente, los productos intermedios en el transcurso de la síntesis pueden existir como mezclas racémicas y estar sujetos a resolución mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante formación de sales diastereoisoméricas que pueden ser separadas, por ejemplo, por cristalización, formación de derivados o complejos diastereoisoméricos que pueden ser separados, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía de gas-líquido o de líquido; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico del enantiómero, por ejemplo mediante esterificación enzimática; o por cromatografía de gas-líquido o de líquido en un entorno quiral, por ejemplo, sobre un soporte quiral, por ejemplo sílice, con un ligando quiral enlazado o en presencia de un solvente quiral. Se apreciará que cuando el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los ejemplos de procedimientos de separación descritos en lo que antecede, se necesita una etapa adicional para liberar la forma enantiomérica deseada. Alternativamente, los estereoisómeros específicos pueden ser sintetizados usando un material de partida ópticamente activo, por ejemplo, mediante síntesis asimétrica usando reactivos ópticamente activos, sustratos, catalizadores o solventes, o convirtiendo un estereoisómero en el otro mediante transformación asimétrica. Estos métodos están descritos con mayor detalle en textos tales como "Drogas Quirales", Cynthia A. Challener (Editor), Wiley, 2002, o en "Separación de Droga Quiral" de Bingyunh Li y Donald T. Haynia en "Enciclopedia de Procesamiento Químico" de Sunggyu Lee y Lee Lee (Editores), CRC Press, 2005.

Los compuestos de la presente invención, y las sales de los mismos, pueden existir en forma no solvatada así como también solvatada con solventes farmacéuticamente aceptables tal como agua, etanol y similares.

Los compuestos seleccionados de fórmula (1) y de fórmula (2) y sus sales y solvatos pueden existir en más de una forma de cristal. Los polimorfos de los compuestos representados por la fórmula (1) y la fórmula (2) forman parte de esta invención y pueden ser preparados por cristalización de un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2) bajo diferentes condiciones. Algunos ejemplos incluyen usar diferentes solventes o mezclas de solventes para cristalización; cristalización a diferentes temperaturas, y varios modos de enfriamiento, que van desde enfriamiento muy rápido a muy lento durante la cristalización. Los polimorfos pueden ser también obtenidos calentando o fundiendo un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2) seguido de un enfriamiento gradual o rápido. La presencia de polimorfos puede determinarse, por ejemplo, mediante espectroscopia NMR de estado sólido, espectroscopia de IR, calorimetría de exploración diferencial, difracción de rayos X, u otras técnicas de ese tipo.

La invención incluye también compuestos etiquetados isotópicamente, los cuales son idénticos a los descritos mediante las fórmulas (1) y (2), pero por el hecho de que uno o más átomos han sido reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa atómica diferente de la masa atómica o del número de masa

atómica encontrados normalmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden ser incorporados en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y flúor, tal como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I , ^{129}I y ^{18}F , respectivamente. Los compuestos de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos, caen dentro del alcance de la invención. Determinados compuestos de la presente invención etiquetados isotópicamente, por ejemplo aquellos en los que se ha incorporado un isótopo tal como ^2H (deuterio), pueden proporcionar ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media incrementada *in vivo* o unos requisitos de dosificación reducidos, y con ello, pueden ser preferidos en algunas circunstancias. Los compuestos isotópicamente etiquetados de fórmula (1) y (2) de la presente invención, las sales y los solvatos de los mismos, pueden ser preparados en general llevando a cabo procedimientos divulgados en los esquemas y/o en los Ejemplos que siguen, sustituyendo un reactivo isotópicamente etiquetado fácilmente disponible por un reactivo no etiquetado isotópicamente.

Las sales farmacéuticamente aceptables, según se utiliza en la presente memoria en relación con los compuestos de la presente invención, incluyen las sales orgánicas e inorgánicas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. Estas sales pueden ser preparadas *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de un compuesto, o haciendo reaccionar por separado el compuesto con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen, aunque sin limitación, sales de bromhidrato, hidrocloreuro, hidroyoduro, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, trifluoroacetato, oxalato, besilato, camsilato, palmitato, malonato, estearato, laureato, malato, borato, benzoato, lactato, fosfato, hexafluorofosfato, benzeno sulfonato, tosilato, formato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y laurilsulfonato, y similares. Los compuestos de la presente invención pueden también reaccionar para formar sales con cationes amina y metálicos farmacéuticamente aceptables formados a partir de bases orgánicas e inorgánicas. El término "catión metálico farmacéuticamente aceptable" contempla iones metálicos cargados positivamente derivados del sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hierro, zinc y similares. El término "catión amina farmacéuticamente aceptable" contempla los iones cargados positivamente derivados de base de amonio y nitrosas orgánicas suficientemente fuertes como para formar tales cationes. Las bases útiles para la formación de sales de adición no tóxicas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención forman una clase cuyos límites son fácilmente entendidos por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Berge et al., "Sales Farmacéuticas", J. Pharm. Sci. 66: 1-19 (1997)).

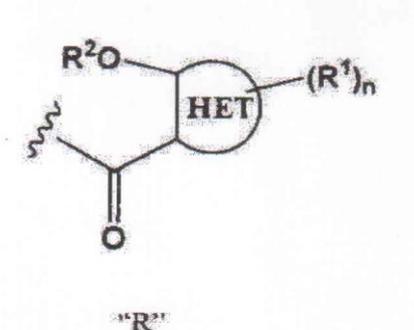
Se han divulgado también profármacos de compuestos de fórmula (I). Un profármaco de un compuesto de fórmula (1) puede estar formado de una manera convencional con un grupo funcional del compuesto, tal como con un grupo amino, hidroxilo o carboxilo. El término "profármaco" se refiere a un compuesto que se transforma *in vivo* para producir un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del compuesto. La transformación puede ocurrir mediante varios mecanismos, tal como mediante hidrólisis en sangre. Una discusión sobre el uso de profármacos ha sido proporcionada por T. Higuchi y W. Stella, "Pro-fármacos como Nuevos Sistemas de Suministro", Vol. 14 de la Serie A.C.S. Symposium, y en "Portadores Bio-reversibles en el Diseño de Fármacos", ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Por ejemplo, si un compuesto de la presente invención contiene un grupo alcohol funcional, se puede formar un profármaco mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo alcohol por un grupo tal como COR^6 para proporcionar un profármaco éster; por CONHR^6 para proporcionar un profármaco carbamato; por COOR^6 para proporcionar un profármaco carbonato; por CH_2OCOR^6 para proporcionar un profármaco alquilcarboniloximetil; por $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ para proporcionar un profármaco fosfato; por $\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{OCO}(\text{C}1-\text{C}6) \text{alquil})_2$ para proporcionar un profármaco fosfato; por $\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{OCH}_2\text{OCO}(\text{C}1-\text{C}6) \text{alquil})$ para proporcionar un profármaco fosfato; por $\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{OC}1-\text{C}6) \text{alquil}$ para proporcionar un profármaco fosfonato, o por $\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{C}1-\text{C}6) \text{alquil}$ para proporcionar un profármaco fosfonato, y las correspondientes sales orgánicas de los profármacos fosfato y fosfonato, o glicosil (el radical resultante de la retirada del grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato), en donde R^6 es C1-C6 alquil, trifluorometil, ciclopropil, ciclohexil, ciclohexilmetil, fenil, fenil sustituido con flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxi, fenilmetil, fenilmetil sustituido con flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxi, 2-, 3- ó 4-piridinil, 2-, 4- ó 5-pirimidinil.

Ha existido un enfoque sobre objetivación de un evento "corriente-abajo" de activación de NF-KB, que impide que el p65, RelB y c-Rel enlacen con secuencias potenciadoras de ADN y activen transcripción. Esta alternativa hizo posible modular ambas vías canónica y no canónica, tanto conjuntamente como por separado con diferentes compuestos. Adicionalmente, los inhibidores de NF-kB "corriente-abajo" pueden evitar los efectos colaterales observados para muchos inhibidores de NF-kB "corriente-arriba". Se ha establecido un paradigma de cribado de fármacos para identificar novedosos y exclusivos inhibidores de NF-kB de la familia Rel. Se han adoptado tres alternativas paralelas para identificar moléculas principales adecuadas: (1) un cribado *in-silico* de 5.000.000 de compuestos usando la estructura de cristal de p65, (2) un cribado amplio de alto rendimiento de una librería diversificada del compuesto usando una criba a base de células, y (3) modificación para mejorar los inhibidores existentes de p65. En comparación con antagonistas de p65 conocidos, por ejemplo, el producto natural parthenolide y la molécula sintética, deshdroximetilepoxiquinomicina (DNMEQ), los compuestos de la invención presentan una mejora significativa en cuanto a potencialidad frente a p65 (RelA) (véase la Figura 7).

A diferencia con DHMEQ o parthenolide, se ha descubierto que los compuestos de la invención inhiben también el RelB (véase la Figura 8) y el c-Rel (Tabla 1). De ese modo, los compuestos son inhibidores duales de las vías

canónica y no canónica, así como inhibidores únicos.

En general, los compuestos de la presente invención se preparan mediante métodos sintéticos generales esbozados en Esquemas de Reacción 1 y 2, donde "R" según se indica en los esquemas es la porción que se muestra a continuación:



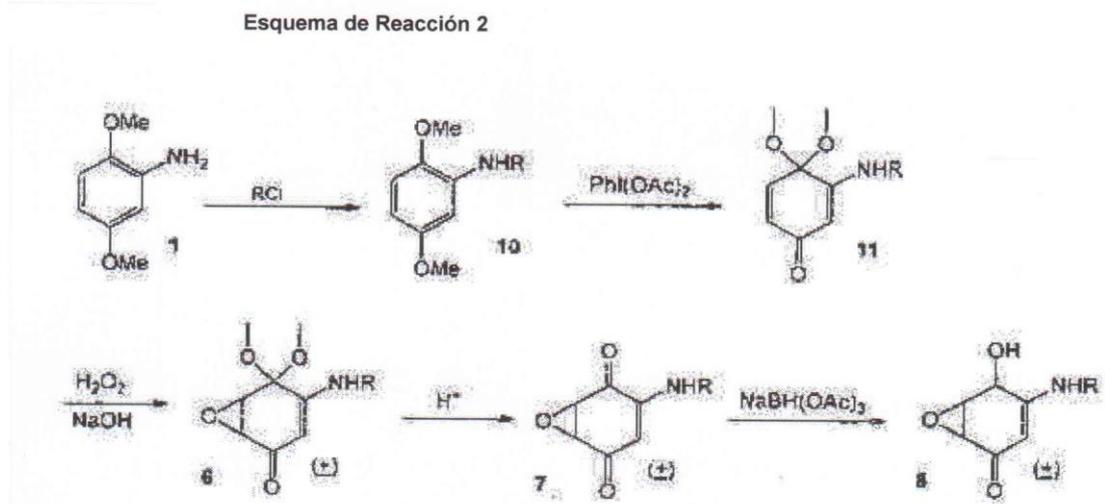
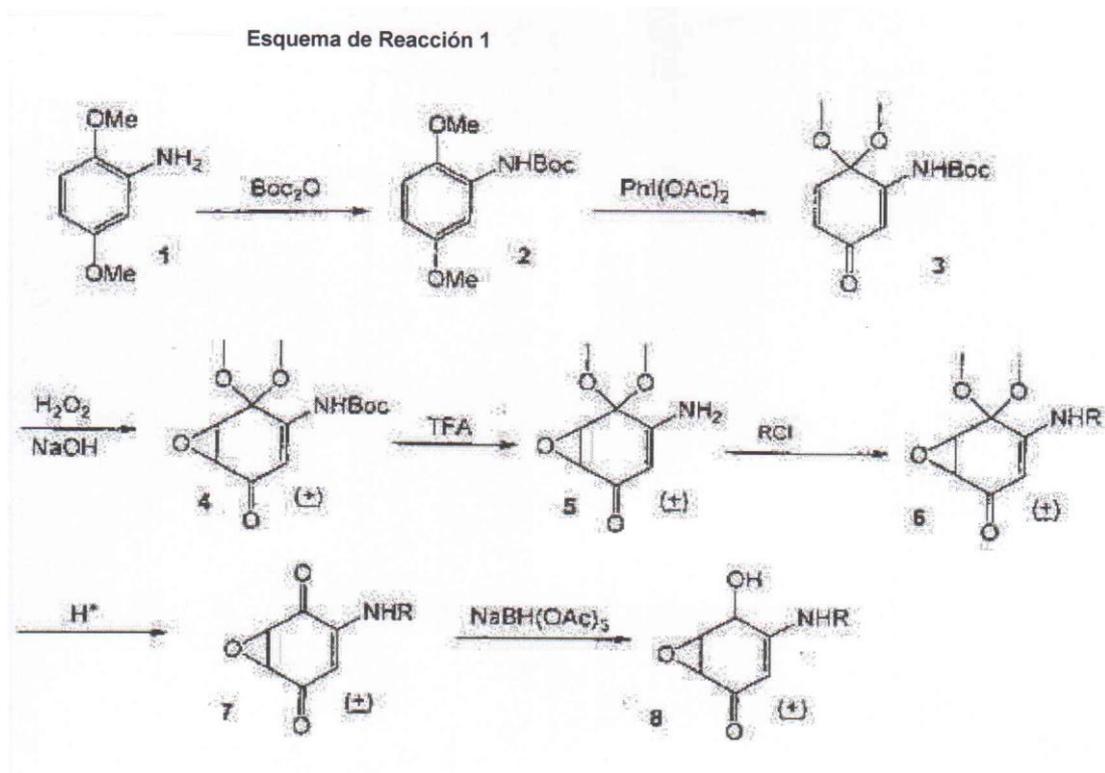
5

y HET es según se describe en la presente memoria.

Haciendo referencia al Esquema de Reacción 1, los compuestos **2-5** pueden ser preparados conforme a procedimientos de la literatura publicada (véase, por ejemplo, Taylor et al., Síntesis 1998, 775). El tratamiento de 2,5-dimetoxianilina **1** con di-ter-butil dicarbonato (Boc_2O) y trietilamina en metanol o tetrahidrofurano a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente, dio el derivado **2** de anilina protegido. La oxidación con bis (acetoxiyodo) benzeno en metanol a 0 °C dio el ketal **3**. La monoepoxidación para producir **4** se consiguió usando peróxido de hidrógeno acuoso al 30% y una base tal como hidróxido de sodio acuoso o carbonato potásico en tetrahidrofurano acuoso a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente. La extracción selectiva del grupo Boc con una mezcla 4/1 de diclorometano/ácido trifluoroacético a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente, dio la amina libre **5**. Alternativamente, esta desprotección puede ser alcanzada usando un complejo de trifluoruro de boro-trietil éter y tamices moleculares activados en un solvente tal como diclorometano a temperatura ambiente. La amina **5** fue acoplada a continuación con un cloruro de ácido tal como *ter*-butóxido de litio (LiO^tBu) en un solvente tal como tetrahidrofurano anhidro a -78 °C para dar el ketal **6**. Los diversos cloruros de ácido (RCI) fueron preparados a partir del ácido carboxílico correspondiente mediante reflujo en cloruro de tionil puro. El ketal **6** fue desprotegido en un medio ácido tal como ácido trifluoroacético en un solvente tal como diclorometano a temperaturas comprendidas en la gama desde 0 °C a temperatura ambiente, para dar dicetona **7**. La reducción regioselectiva de **7** se consiguió mediante tratamiento con un ligero exceso de un agente reductor suave tal como triacetoxiborohidruro de sodio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$) en un solvente tal como metanol a temperatura comprendida en la gama de 0 °C a temperatura ambiente.

Una ruta sintética alternativa ha sido representada en el Esquema de Reacción 2. El tratamiento de 2,5-dimetoxianilina **1** con un cloruro de ácido (RCI) y una base tal como piridina en un solvente tal como tetrahidrofurano anhidro a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente, dio **10**. La oxidación con bis (acetoxiyodo) benzeno en metanol al 0 °C dio el ketal **11**. La monoetoxidación para producir **6**, se consiguió usando peróxido de hidrógeno acuoso al 30% y una base tal como hidróxido de sodio acuoso a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente. El ketal **6** fue desprotegido en un medio ácido tal como ácido trifluoroacético en un solvente tal como diclorometano a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente, para dar dicetona **7**. La reducción regioselectiva de **7** para proporcionar **8**, se logró mediante tratamiento con un ligero exceso de un agente reductor suave tal como triacetoxiborohidruro de sodio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$) en un solvente tal como metanol a temperaturas comprendidas en la gama de 0 °C a temperatura ambiente.

Se ha descubierto que los productos intermedios de dicetona de fórmula general (7), según se ha representado en el Esquema de Reacción (2), presentaron también una actividad significativa como inhibidores de NF- κ B. De ese modo, las dicetonas de fórmula general (2) según se describen en la presente memoria, se consideran parte de la invención.



Una composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica preferida de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas formadas por combinación de los compuestos de esta invención y portadores, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se administran después fácilmente según una diversidad de formas de dosificación tal como tabletas, polvos, pastillas, jarabes, soluciones inyectables y similares. Estas composiciones farmacéuticas pueden contener, si se desea, ingredientes adicionales tal como aromas, ligantes, excipientes y similares.

De ese modo, a los efectos de administración oral, se pueden emplear tabletas que contengan varios excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y/o fosfato de calcio, junto con varios desintegrantes tales como almidón, ácido alginico y/o ciertos silicatos complejos, junto con agentes ligantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y/o acacia. Adicionalmente, agentes de lubricación tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco son con frecuencia útiles a efectos de fabricación de tabletas. Las composiciones sólidas de tipo similar pueden ser empleadas como filtros en cápsulas duras rellenas de gelatina. Los materiales preferidos para todo esto incluyen lactosa o azúcar de la leche y polietileno glicoles de alto peso molecular. Cuando se desean

suspensiones acuosas de elixires para administración oral, el agente farmacéutico activo de los mismos puede ser combinado con varios agentes edulcorantes y aromatizantes, materia o tintes colorantes, y si se desea, agentes de emulsificación o suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propileno glicol, glicerina, y/o combinaciones de los mismos.

- 5 Para administración parenteral, se pueden emplear los compuestos o composiciones de la presente invención en aceite de sésamo o de cacahuete, propileno glicol acuoso, o en soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas podrían estar tamponadas adecuadamente si fuera necesario, y los diluyentes líquidos deben hacerse primero isotónicos con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles empleados son todos fácilmente disponibles mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia.

- 10 En un ejemplo de realización, la preparación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria, estando la preparación subdividida en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, por ejemplo tabletas, cápsulas y polvos envasados, en viles o ampollas. La forma de dosificación unitaria puede ser también una cápsula o tableta en sí misma, o puede ser un número apropiado de cualquiera de esas formas de envasado.

- 15 Los métodos de preparación de diversas composiciones farmacéuticas con una determinada cantidad de ingrediente activo son conocidos por los expertos en la materia. Para ver ejemplos de métodos de preparación de composiciones farmacéuticas, véase Remington: Ciencia y Práctica de Farmacia, Lippincot, Williams & Wilkins, 21^a ed. (2005), la cual se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

20 En una realización de la invención, los compuestos de la invención pueden ser combinados también con al menos un agente terapéutico adicional.

Ejemplos

- 25 **Ejemplo 1: Preparación de (+)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-il) nicotinamida (8a)**

A.. Preparación de ter-butil 2,5 dimetoxifenilcarbamato (2)

- 30 A una solución de 2,5-dimetoxianilina 1 (50 g, 326 mmol) en MeOH (1 l) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno inerte, se añadió trietilamina (55 ml, 397 mmol), seguido de la adición gota a gota de Boc₂O (78 g, 359 mmol) en metanol (150 ml). La reacción fue agitada durante toda la noche. Tras juzgar incompleta mediante cromatografía de capa fina, se añadió Boc₂O (22g, 69 mmol) y trietilamina (55 ml, 397 mmol) adicionales, y la solución se agitó durante 3 días. Se extrajo el metanol y el residuo se disolvió en etil acetato, el cual fue enjuagado con ácido clorhídrico diluido (2x) y salmuera antes de su secado sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración, y evaporación del solvente para proporcionar 50 g (61%) de ter-butil-2,5-dimetoxifenilcarbamato (2) a modo de un aceite marrón. El ¹H NMR fue acorde con lo descrito en la literatura (Síntesis 1998, 775).

- 35 B. Preparación de ter-butil 6,6-dimetoxi-3-oxociclohexa-1,4-dienilcarbamato (3)

- 40 Una solución de metanol (700 ml) del compuesto 2 (29 g, 115 mmol) fue enfriada en un baño de hielo antes de la adición de bis (acetoxiyodo) benzeno (62 g, 194 mmol) en seis porciones durante un período de 30 minutos. La solución fue agitada en el baño de hielo durante 2 horas y a continuación llevada a temperatura ambiente y agitada durante 1 noche. La mezcla de reacción fue diluida con etil acetato (1,5 l) y enjuagada con agua, ácido clorhídrico diluido y salmuera. La solución acuosa fue extraída después una vez con etil acetato y los productos orgánicos combinados con anterioridad al secado sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración, y evaporación de solvente. El líquido resultante fue purificado sobre gel de sílice usando un gradiente de etil acetato (0 a 2%) en heptano; proporcionando 6,9 g (21%) (3) a modo de sólido amarillo-naranja. El material era suficientemente puro (aproximadamente 95%) según ¹H NMR, lo que fue acorde con lo publicado en la literatura (Síntesis 1998, 775).

- 45 C. Preparación de ter-butil 2,2-dimetoxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-ilcarbamato (4)

- 50 Compuesto 3 (3,4 g, 12,7 mol) en tetrahidrofurano (93 ml) fue enfriado en un baño de hielo. A la solución en agitación, se añadió en forma de gota a gota peróxido de hidrógeno (30% ac., 22 ml) e hidróxido de sodio acuoso (1M, 61 ml) en tándem usando 2 embudos de adición separados y utilizando un adaptador Claisen. La mezcla de reacción fue agitada durante 30 minutos en el baño de hielo y después durante 5 horas a temperatura ambiente. El frasco fue enfriado en un baño de hielo y el peróxido fue inactivado cuidadosamente con dióxido de manganeso. Tras la filtración de la mezcla sobre un lecho pequeño de gel de sílice seguido de enjuagado, el sulfato de magnesio fue filtrado y evaporado. El aceite resultante fue tratado con pentano para precipitar un sólido blanquecino que produjo tras la evaporación del solvente 2 g (56%) de compuesto (4). El ¹H NMR del producto fue acorde con lo publicado en la literatura (Síntesis 1998, 775).

D. Preparación de 4-amino-5,5-dimetoxi-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-2-ona (5)

Una solución del compuesto 4 (300 mg, 1,1 mmol) en diclorometano anhidro (6 ml) fue agitada en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno inerte. A esta solución se añadió ácido trifluoroacético (1,5 ml) gota a gota y la solución fue llevada a temperatura ambiente, agitando 3 horas. Tras considerarla completa mediante cromatografía de capa fina, se evaporaron los solventes y el residuo fue disuelto en etil acetato. Se añadió cuidadosamente bicarbonato de sodio sólido (2 g) y la solución fue agitada durante 10 minutos. La sal fue filtrada y enjuagada con etil acetato con anterioridad a la evaporación del solvente. El compuesto crudo fue purificado sobre gel de sílice usando un gradiente de etil acetato (0 a 100%) en heptano. El producto fue eluido en etil acetato al 100% proporcionando 178 mg (91%) de compuesto (5). El ^1H NMR del producto fue acorde con lo publicado en la literatura (Síntesis 1998, 775).

10 E. Preparación de N-(2,2-dimetoxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-il)-2-hidroxinicotinamida (6a)

Una mezcla de ácido 2-hidroxinicotínico (112 mg, 0,81 mmol) y cloruro de tionilo (650 mg, 8,9 mmol) fue calentada a reflujo durante 30 minutos. Tras enfriamiento a temperatura ambiente, el exceso de cloruro de tionilo fue extraído bajo vacío y el cloruro de ácido resultante fue almacenado bajo una atmósfera de nitrógeno inerte. Separadamente, un frasco que contenía la amina 5 (100 mg, 0,54 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (4 ml) fue enfriado a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de nitrógeno inerte con anterioridad a la adición gota a gota de ter-butóxido de litio (en 1M tetrahidrofurano, 54 $^\circ$ ml, 0,54 mmol). Esta solución fue agitada durante 30 minutos antes de la adición gota a gota del cloruro de 2-hidroxinicotinoil crudo (en 1 ml de tetrahidrofurano). La mezcla de reacción fue agitada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos y a continuación calentada a temperatura ambiente y agitada durante una hora. La cromatografía de líquido-espectro de masa (LC-MS) indicó tanto productos deseados como sobre-acilados. La mezcla de reacción fue diluida a continuación con etil acetato, enjuagada con cloruro de amonio saturado, seguido de salmuera, y la solución acuosa fue extraída de nuevo con etil acetato, seguido de un lavado en salmuera. Los productos orgánicos combinados fueron secados sobre sulfato de magnesio anhidro con anterioridad a la filtración y la evaporación del solvente, proporcionando 169 mg de material crudo. La cromatografía con gel de sílice usando un gradiente de etil acetato (50 a 100%) en heptano proporcionó 56 mg de una mezcla de producto y material de partida, 56 mg de una mezcla de producto deseado y producto sobre-acilado, y 31 mg de producto sobre-acilado primario (rendimiento en crudo: 99%). La mezcla de 56 mg de material deseado/sobre-acilado fue disuelta en metanol (1,4 ml) y agua (200 ml) con anterioridad a la adición de carbonato potásico (9 mg, ~ 1 equivalente). La reacción fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente con anterioridad a considerarla completa cromatografía decapa fina. La solución fue diluida con etil acetato y lavada con salmuera con anterioridad al secado sobre sulfato de magnesio anhidro, filtración y evaporación del solvente para proporcionar 50 mg del compuesto 6a. La estructura del producto fue confirmada mediante ^1H NMR, NMR (CDCl_3): 8,12,10 (br.s, 1H), 10,60 (br.s, 1H), 8,62 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,40 (s, 3H) ppm.

30 F. Preparación de N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-il)-2-hidroxinicotinamida (7a)

A una solución de 6a (50 mg, 16 mmol) en diclorometano anhidro (2 ml) se añadió lentamente ácido trifluoroacético (0,5 ml) a temperatura ambiente. Tras agitación durante toda la noche, la LC-MS indicó que permanecía un 27% de material de partida. Se añadió ácido trifluoroacético adicional (0,5 ml) y la mezcla de reacción fue agitada durante 24 horas adicionales, en cuyo momento se consideró completa. La solución fue enfriada en un baño de hielo y diluida con diclorometano (10 ml) con anterioridad a la adición lenta de solución de bicarbonato de sodio saturada hasta que la mezcla en agitación fue alcalina. La mezcla fue particionada a continuación y los solventes orgánicos fueron extraídos y enjuagados con salmuera. La capa acuosa fue extraída dos veces con etil acetato y la capa orgánica fue lavada con salmuera. Todos los productos orgánicos fueron agrupados y secados sobre sulfato de magnesio anhidro con anterioridad a la filtración y la evaporación del solvente, dando 7a como un sólido ligeramente amarillo (30 mg, 71%). La LC-MS indicó una pureza del 80%, y el material fue usado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

40 G. Preparación de (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-il) nicotinamida (8a)

A una solución de compuesto 7a (30 mg, 0,092 mmol, 80% de pureza) en metanol (4 ml) enfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de nitrógeno inerte, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (30 mg, 0,142 mmol) en una porción. La solución fue agitada a esta temperatura durante 15 minutos con anterioridad a llevarla a temperatura ambiente. Tras agitar durante 45 minutos adicionales, se consideró la reacción completa mediante TLC. El metanol fue evaporado hasta aproximadamente 2 ml de volumen y el frasco fue enfriado en un baño de hielo durante 10 minutos. El precipitado fue filtrado y enjuagado con metanol (2 x 3 ml). Tras el secado bajo alto vacío, se aislaron 10 mg (rendimiento del 42%) de compuesto 8a a modo de un sólido amarillo pálido. La pureza fue del 95% mediante HPLC (columna Restek Pinnacle II, C18, 5 μ , 250 x 4,6 mm; fase móvil: 5 minutos al 5% de acetonitrilo en agua, a continuación 5 a 100% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos; tasa de flujo: 1,5 ml/minuto; detector: 316 nm (VWD)). La estructura del producto fue confirmada mediante ^1H NMR. NMR (DMSO-d_6): δ 12,70 (br.s, 1H), 12,50 (br.s, 1H), 8,35 (m, 1H), 7,85 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,55 (m, 2H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

55 **Ejemplo 2: (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0] hept-3-en-3-il) quinolina-3-carboxamida (8b)**

Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 2-hidroxiquinolina-3 carboxílico en vez de ácido 2-

hidroxinicotínico en la etapa E, se preparó 2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)quinolina-3-carboxamida.

A. Preparación de N-(2,2-dimetoxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-hidroxiquinolina-3-carboxamida (6b)

5 En un frasco de fondo redondeado seco cargado con ácido 2-hidroxiquinolina-3-carboxílico (528 mg, 2,8 mmol) se
añadió cloruro de tionilo (4 ml, 57 mmol). La mezcla fue calentada a continuación a reflujo durante 20 minutos con
anterioridad a la evaporación rotatoria del cloruro de tionilo. En un frasco separado, se disolvió amina 5 (430 mg,
2,3 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (17 ml) y se enfrió a -78 °C bajo una atmósfera de nitrógeno inerte. A la
10 solución de amina enfriada se añadió lentamente ter-butóxido de litio (en 1 M hidrofurano, 3 ml, 3 mmol) seguido de
agitación durante 15 minutos. El cloruro de ácido fue suspendido a continuación en tetrahidrofurano (12 ml) y añadido
directamente a la solución de amina enfriada. La mezcla de reacción fue agitada durante toda la noche, durante
cuyo tiempo llegó a temperatura ambiente. La reacción fue diluida a continuación con etil acetato, lavada con
15 salmuera, secada sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrada y concentrada para proporcionar 550 mg de material
crudo que contenía un 10% de producto O-aroiado (según se determinó mediante LC-MS). El sólido fue agitado en
8/1 metanol/agua (9 ml) que contenía 25 mg de carbonato potásico, durante una hora, después de lo cual fue diluido
con etil acetato y lavado con solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera. El etil acetato fue secado sobre
sulfato de magnesio anhidro, filtrado y concentrado para dar un sólido que contenía una pequeña cantidad del éster.
El producto fue purificado a continuación sobre un pequeño tapón de sílice, eluyendo con 95/5 de diclorometano/etil
acetato para dar 530 mg de un sólido amarillo pálido (rendimiento del 64%). La estructura del producto fue
20 confirmada mediante ¹H NMR (CDCl₃): δ 12,30 (br.s, 1H), 10,60 (br.s, 1H), 9,00 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,65 (m, 1H),
7,40 (m, 2H), 5,60 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,40 (s, 3H) ppm.

B. Preparación de N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-hidroxiquinolina-3-carboxamida (7b)

A un frasco que contenía N-(2,2-dimetoxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-hidroxiquinolina-3-carboxamida
(65 mg, 0,18 mmol), se añadió ácido trifluoroacético (15 ml) en una porción. La solución fue agitada durante 3 horas,
después de lo cual se consideró que la reacción estaba completa con LC-MS. El ácido trifluoroacético fue extraído *in*
25 *vacuo* y el producto secado con una corriente de nitrógeno para proporcionar 57 mg (100%) del producto del
enunciado que contenía aproximadamente un 15% de un subproducto que se sugirió que era el producto hidrolizado
(en ambas posiciones de amida y epóxido: M⁺ 204). El sólido fue usado en la siguiente etapa sin caracterización ni
purificación adicional.

C. Preparación de (+)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)quinolina-3-carboxamida (8b)

30 El producto obtenido en lo que antecede fue disuelto en una mezcla 2/1 de tetrahidrofurano/metanol (36 ml) y
enfriado a 0 °C. A continuación se añadió triacetoxiborohidruro de sodio en una porción y la reacción fue conducida a
temperatura ambiente. Tras agitación durante 30 minutos, la reacción quedó completa según se estimó mediante
LC-MS. Los solventes fueron evaporados a continuación y se añadió metanol (5 ml). La mezcla fue sonicada
35 brevemente y enfriada en un baño de hielo durante 15 minutos. El sólido fue filtrado a continuación y enjuagado
con metanol (2 x 2 ml), recogido y secado bajo alto vacío para proporcionar 18 mg (78%) del producto. La pureza fue
del 94% según HPLC (columna Restek Pinnacle II, C18, 5µ, 150 x 4,6 mm; fase móvil: 5 minutos a un 5% de
acetonitrilo en agua (0,1% TFA), después 5 a 100% acetonitrilo en agua (0,1% ácido trifluoroacético) durante 20
minutos; tasa de flujo: 1,5 ml/minuto; detector: 316 nm (VWD)). Se confirmó la estructura del producto mediante ¹H
40 NMR, NMR (DMSO-d₆): δ 12,70 (br.s, 1H), 12,50 (br.s, 1H), 9,00 (m, 1H), 8,00 (m, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,40 (m, 1H),
7,30 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,65 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 3: (+)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida. ¹H NMR. NMR
(DMSO-d₆): δ 11,20 (br.s, 1H), 10,70 (br.s, 1H), 8,20 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,50 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H),
4,90 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,45 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 4: (+)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) nicotinamida. ¹H NMR. NMR
(DMSO-d₆): δ 12,90 (br.s, 1H), 8,50 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,45 (m, 2H), 4,75 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H)
45 ppm.

Ejemplo 5: ácido (+)-6-cloro-4-hidroxi-quinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 13,1 (br.s, 1H), 12,50 (br.s, 1H), 8,90 (m, 1H), 8,20 (m, 1H), 7,80 (m, 1H),
7,75 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 6: ácido (+)-4-hidroxi-8-trifluorometil-quinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 12,30 (br.s, 1H), 8,75 (m, 1H), 8,60 (m, 1H), 8,25 (m, 1H),
7,70 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 7: (+)-5-cloro-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)nicotinamida. ¹H NMR.
NMR (DMSO-d₆): δ 13,10 (br.s, 1H), 12,65 (br.s, 1H), 8,25 (m, 1H), 8,20 (m, 1H), 8,05 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,55 (m,
55 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 8: ácido (+)-4-hidroxi-2-fenilpirimidínico-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-

3-il) amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 13,70 (br.s, 1H), 12,00 (br.s, 1H), 8,75 (m, 1H), 5,20 (m, 2H), 7,50 (m, 3H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 9: ácido (±)-3-hidroxi-quinoloxalina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 13,00 (br.s, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 10: (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-metil-nicotinamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 12,60 (br.s, 1H), 12,20 (s, 1H), 8,25 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 6,40 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 2,35 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 11: ácido (±)-4-hidroxi-2-piperidin-1-il-pirimidina-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): 8,50 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 6,50 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,80 (m, 4H), 3,40 (m, 1H), 1,6 (m, 6H) ppm.

Ejemplo 12: (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida, mesilato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,60 (br.s, 1H), 8,30 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,50 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 5,00 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,20 (m, 1H), 2,20 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 13: (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida trifluoroacetato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,10 (br.s, 1H), 10,60 (br.s), 8,30 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,50 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 14: (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida tosilato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,60 (br.s, 1H), 8,20 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 6,80 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 2,2 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 15: ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,90 (br.s, 1H), 10,80 (br.s, 1H), 7,90 (m, 3H), 7,60 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 16: (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,70 (br.s, 1H), 8,40 (m, 1H), 8,35 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 17: ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida mesilato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,90 (br.s, 1H), 10,80 (br.s, 1H), 7,90 (m, 3H), 7,60 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 2,30 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 18: ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida trifluoroacetato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,90 (br.s, 1H), 10,80 (br.s, 1H), 7,90 (m, 3H), 7,60 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,50 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 19: ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida tosilato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,90 (br.s, 1H), 10,80 (br.s, 1H), 7,90 (m, 3H), 7,60 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,1 (m, 2H), 6,80 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 2,2 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 20: ácido (±)-3-metoxi-piridina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ: 10,60 (br.s, 1H), 8,30 (m, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 5,70 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,90 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 21: (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida trifluoroacetato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,70 (br.s, 1H), 8,40 (m, 1H), 8,35 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 22: ácido (±)-3-metoxi-piridina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida trifluoroacetato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,40 (br.s, 1H), 8,30 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 6,50 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 23: (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-trifluorometil-nicotinamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,80 (br.s, 1H), 5,50 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 24: ácido (±)-4-hidroxi-2-metil-pirimidina-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 13,40 (br.s, 1H), 11,80 (br.s, 1H), 8,60 (s, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 25: ácido (±)-2-metoxi-quinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)

amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,80 (br.s, 1H), 9,00 (m, 1H), 8,10 (m, 1H), 7,80 (m, 2H), 7,50 (m, 1H), 6,90 (m, 2H), 4,90 (m, 1H), 4,20 (s, 3H), 3,90 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 26: ácido (±)-3-metoxi-pirazina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,30 (br.s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 6,70 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,00 (s 3H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 27: ácido (±)-1-cloro-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 12,30 (br.s, 1H), 10,30 (br.s, 1H), 8,40 (m, 2H), 8,10 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 28: (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-hidroxi-quinolina-3-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 12,60 (br.s, 1H), 10,30 (br.s., 1H), 9,00 (m, 1H), 8,00 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,30 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,90 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 29: (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolina-7-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,10 (br.s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 4,35 (s, 3H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 30: (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,60 (br.s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,30 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,10 (s, 3H), 3,95 (m, 1H) ppm,

Ejemplo 31: (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-3-metoxiquinolina-2-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 10,60 (br.s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,00 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 6,80 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 32: (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolina-7-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,20 (br.s, 1H), 9,00 (s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,10 (m, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 4,40 (s, 3H), 4,20 (m, 1H), 4,00 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 33: (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolina-7-carboxamida trifluoroacetato. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,20 (br.s, 1H), 9,00 (s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,10 (m, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 4,90 (s, 3H), 3,90 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 34: (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-3-hidroxiisonicotinamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 8,30 (s, 1H), 8,00 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 4,20 (s, 1H), 4,00 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 35: (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxiquinolina-3-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 11,00 (br.s, 1H), 9,00 (s, 1H), 7,90 (m, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,50 (m, 1H), 4,40 (s, 3H), 4,00 (s, 1H), 3,90 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 36: (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-metoxiquinolina-3-carboxamida. ¹H NMR. NMR (DMSO-d₆): δ 12,50 (br.s, 1H), 8,90 (m, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,40 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,60 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 3,80 (m, 4H), 3,40 (m, 1H) ppm.

Ejemplo 37: (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]oxazol-5-carboxamida. Empleando el método del Ejemplo 1, pero usando ácido 6-hidroxibenzol[d]oxazol-5-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]oxazol-5-carboxamida.

Ejemplo 38: (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]tiazol-5-carboxamida. Empleando el método el Ejemplo 1, pero usando ácido 6-hidroxibenzo[d]tiazol-6-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]tiazol-5-carboxamida.

Ejemplo 39: (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piperidina-2-carboxamida. Empleando el método del Ejemplo 1, pero usando ácido 3-hidroxipiperidina-2-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piperidina-3-carboxamida.

Ejemplo 40: (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirazina-2-carboxamida. Empleando el método del Ejemplo 1, pero usando ácido 3-hidroxipirazina-2-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirazina-2-carboxamida.

Ejemplo 41: (±)-5-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirimidina-4-carboxamida. Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 5-hidroxipirimidina-4-carboxílico en vez de ácido 2-

hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-5-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirimidina-4-carboxamida.

Ejemplo 42: (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1,8-naftiridina-3-carboxamida.

5 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 2-hidroxi-1,8-naftiridina-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1,8-naftiridina-3-carboxamida.

Ejemplo 43: (\pm)-7-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirido[2,3-d] pirimidina-6-

10 **carboxamida.** Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 7-hidroxi-pirido[2,3-d] pirimidina-6-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-7-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirido[2,3-d] pirimidina-6-carboxamida.

Ejemplo 44: (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piridazina-3-carboxamida.

Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 4-hidroxi-piridazina-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piridazina-3-carboxamida.

Ejemplo 45: (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-pirazol-3-carboxamida.

15 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 4-hidroxi-1H-pirazol-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-pirazol-3-carboxamida.

Ejemplo 46: 4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) furan-3-carboxamida.

20 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 4-hidrofuran-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar 4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) furan-3-carboxamida.

Ejemplo 47: (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) tiofeno-3-carboxamida.

25 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 4-hidroxitiofeno-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) tiofeno-3-carboxamida.

Ejemplo 48: (\pm)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isotiazol-4-carboxamida.

Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 3-hidroxitiazol-4-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar 3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isotiazol-4-carboxamida.

Ejemplo 49: (\pm)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isoxazol-4-carboxamida.

30 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 3-hidroxiisoxazol-4-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isoxazol-4-carboxamida.

Ejemplo 50: (\pm)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-indol-5-carboxamida.

35 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 6-hidroxi-1H-indol-5-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-indol-5-carboxamida.

Ejemplo 51: (\pm)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-

40 **carboxamida.** Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 6-hidroxi-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida.

Ejemplo 52: (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) morfolina-3-carboxamida.

45 Empleando el método del Ejemplo 1 pero usando ácido 2-hidroximorfolina-3-carboxílico en vez de ácido 2-hidroxinicotínico en la etapa E, se puede preparar (\pm)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) morfolina-3-carboxamida.

Inhibición de NF- κ B en las células mediante el compuesto del Ejemplo 1. Se usaron dos ensayos de célula

informadora para determinar la capacidad del compuesto del Ejemplo 1 para inhibir transcripción activada por NF- κ B.

El primer ensayo fue un ensayo basado en células 293 con un plásmido informador de pNF- κ B-luc establemente

50 con un informador pTRHI-NF- κ B-dscGFP establemente integrado que contenía 4 elementos promotores de NF- κ B.

Las células fueron tratadas con 0, 0,2, 1, 10, 20 y 40 μ M del compuesto del Ejemplo 1 durante 2 horas, y después

fueron inducidas con 20 ng/ml de TNF- α durante 18 horas. A continuación de la inducción se cuantificó la

luminiscencia o fluorescencia usando un lector de placa Beckman-Coulter 2300. Las Figuras 1A y 1B muestran la

55 curva de respuesta a la dosis a partir de los datos de luminiscencia y fluorescencia, respectivamente. Se observó

que el compuesto del Ejemplo 1 inhibía la expresión del gen de luciferasa de una manera dependiente de la dosis

con una IC₅₀ media (Concentración inhibitoria del 50%) de 16,2 \pm 1,1 μ M. El compuesto del Ejemplo 1 inhibió también

la expresión del gen de proteína fluorescente Verde de una manera dependiente de la dosis con una IC_{50} media de $6,2 \pm 0,5 \mu M$. Estos valores representan el valor medio generado a partir de tres experimentos independientes \pm el error estándar. Como control, se compararon células tratadas y no tratadas con DMSO al 0,5%, para verificar que el portador del Ejemplo 1 no tuvo ningún efecto sobre la expresión de la luciferasa ni en la lectura del ensayo. Existió un ligero descenso en el resultado del ensayo en la población tratada con DMSO aunque no fue estadísticamente significativa. Como resultado de los controles, la disminución de la actividad en las muestras de fármaco tratadas se comparó con la muestra de control de DMSO.

Perfil de citotoxicidad del compuesto del Ejemplo 1. Se determinó la citotoxicidad del compuesto del Ejemplo 1 respecto a células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMCs). Véase la Figura 2. Al igual que con el ensayo de actividad, las hPBMCs fueron tratadas con 0, 0,2, 1, 20, 20 7 y 40 μM del compuesto del Ejemplo 1 durante 2 horas, y a continuación inducidas con 20 ng/ml de TNF- α durante 48 horas. El número de células viables fue determinado usando el ensayo de viabilidad de célula luminiscente CellTiter-Glo (Promega (cat#G7573)). Un experimento representativo ha sido mostrado en la Figura 2. Según muestra el gráfico, existió poca toxicidad detectable en esas células con el compuesto del Ejemplo 1 hasta los 40 μM comprobados. Por el contrario, la DHMEQ presentó inhibición del crecimiento celular mayor del 60% a 40 μM . Las células tratadas con 0,5% de DMSO no mostraron efectos citotóxicos detectables en comparación con hPBMCs no tratadas. Se asignó el índice de selectividad de citotoxicidad (la relación de citotoxicidad CC_{50} respecto a IC_{50} inhibitoria) al compuesto del Ejemplo 1. En base a los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición y toxicidad descritos en lo que antecede, el compuesto del Ejemplo 1 presentó selectividad (es decir, mayor actividad y menor citotoxicidad) en comparación con la DHMEQ.

La IL-2R α soluble está transcripcionalmente regulada por NF-kB. La Figura 3 demuestra que los niveles de suero de sIL-2R α pueden verse influenciados por las células tratadas del Ejemplo 1. Las PBMC humanas fueron tratadas con 0, 0,2, 1, 10, 20 y 40 μM del compuesto del Ejemplo 1 simultáneamente con activación de PHA-P. Las células fueron cultivadas durante tres días adicionales y se cosechó el medio a efectos de evaluación del marcador. La Figura 3 muestra que la IL-2R α fue inducida significativamente mediante activación de PHA-P. Además, el gráfico demuestra claramente que la sIL-2R α se vio afectado por la adición del compuesto del Ejemplo 1 de una manera dependiente de la dosis, produciendo con 10 μM del compuesto del Ejemplo 1 un efecto estadísticamente significativo.

Inhibición de Secreción de IL-6 e IL-8 por el compuesto del Ejemplo 1. Durante unos pocos años anteriores, extensos estudios sobre el cáncer de mama han conducido al reconocimiento de que la sobreexpresión de HER2, del receptor de estrógeno (ER), y la mutación de genes incluyendo el p53, el BRCA1 y el BRCA2, juegan un importante papel en el desarrollo y progresión del cáncer de mama mediante inducción de múltiples reguladores angiogénicos, proapoptóticos, incluyendo el factor nuclear kB. NF-kB se activa constitutivamente con frecuencia en carcinomas de pecho, carcinomas de vejiga, carcinomas de próstata, y melanomas. Numerosos estudios han demostrado que la activación constitutiva de NF-kB contribuye a la progresión de crecimiento independiente de la hormona de líneas celulares del cáncer de mama.

La vía de señalización de NF-kB se activa constitutivamente en células MDA-MB-231, las cuales se ha demostrado que segregan IL-6 e IL-8 constitutivamente, mientras que la adición de TNF- α acelera más esta secreción (véanse las Figuras 4A y 4B). Se observó que el compuesto del Ejemplo 1 inhibía la secreción constitutiva de IL-6 e IL-8 a partir de MDA-MB-231 de una manera dependiente de la dosis. Incluso cuando las células fueron estimuladas con TNF- α (20 ng/ml), 20 μM del compuesto del Ejemplo 1 inhibieron por completo la secreción de IL-6 e IL-8 de esas células (Figuras 4A y 4B).

Los macrófagos juegan un importante papel en reacciones inmunes, en alergia y en inflamación. El exceso de activación de macrófago puede potencia también tumores sólidos, diabetes mellitus, y desórdenes neuronales tales como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. Por lo tanto, la inhibición del exceso de actividades macrófagas debería ser útil como quimioterapia para esas enfermedades. Para estudios de cultivo de células, la línea celular de ratón RAW264.7 se utiliza con frecuencia como modelo de macrófagos. En respuesta a microbios y a sus productos tales como el lipopolisacárido (LPS), los macrófagos segregan varias citoquinas inflamatorias incluyendo la interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α mediante la activación del factor nuclear NF-kB, así como expresan sintasa NO inducible (iNOS) dependiente de NF-kB y ciclooxigenasa-2 (COX-2). El NF-kB se activa mediante señales extracelulares principalmente mediante varios receptores de tipo Toll en macrófagos. La detección y respuesta a infección microbianas por parte del sistema inmune dependen de una familia patrón de receptores de reconocimiento denominados receptores de tipo Toll (TLRs). Estos receptores han sido conservados evolutivamente para reconocer patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), incluyendo las bacterias Gram-positivo y -negativo, virus de ADN y ARN, hongos y protozoos, y muestran una considerable especificidad objetivo. El TLR4 es crucial para las respuestas efectivas de la célula anfitrión al LPS de las bacterias Gram-negativo.

La estimulación de LPS induce la expresión de COX-2, la enzima responsable de la prostaglandina E2. El tratamiento previo con el compuesto del Ejemplo 1 dio como resultado una fuerte inhibición de la expresión en 6 a 12 horas. Este descenso en la expresión de COX-2 inducida por LPS fue dependiente de la dosis tal y como se muestra mediante el descenso en la síntesis corriente abajo de PGE₂ según se muestra en la Figura 5A.

La citoquina inflamatoria IL-6 fue inhibida de una manera dependiente de la dosis por el compuesto del Ejemplo 1 según se muestra en la Figura 5B. Esta inhibición es acorde con la inhibición de IL-6 en la línea celular de carcinoma de pecho MDA-MB-231.

5 Inmunomanchado de RelA/p65. El compuesto del Ejemplo 1 provoca la acumulación de RelA/p65 activado en el citoplasma de las células. Células Hek293 fueron tratadas con DHMEQ o el compuesto del Ejemplo 1 (según se ha indicado) con $TNF\alpha$ (20 ng/ml) durante 30 minutos. Tras la incubación, las células fueron inmunomanchadas con anticuerpo anti-p65 (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y los núcleos fueron contra-teñidos con Dapi. Se capturaron imágenes usando un microscopio invertido AE31 con iluminador de epifluorescencia (Motic, Xiamen, China) y una cámara ProgRes C3 (JENOPTIK, Jena, Alemania). Las imágenes individuales del p65 y los núcleos correspondientes, se fundieron en una figura final. Las células tratadas de control (DMSO solamente) presentaron acumulación nuclear de p65 tras la estimulación de $TNF\alpha$. La acumulación nuclear de p65 inducida por $TNF\alpha$ fue bloqueada significativamente por el compuesto del Ejemplo 1 a razón de 1 a 12 μM , mientras que la DHMEQ necesitó una concentración más alta para conseguir el mismo efecto. Véase la Figura 6.

15 Enlace ELISA de ADN de la Familia TransAM NF-kB: La actividad de enlace de subunidades de heterodímero o de homodímero de NF-kB a partir de extractos nucleares activados o de proteínas recombinantes purificadas de NF-kB expuestas a los compuestos del fármaco, fue evaluada usando el enlace ELISA de la Familia TransAM NF-kB (Motivo Activo). 3-5 μg de extractos nucleares procedentes de células Hela o Raji activadas de $TNF\alpha$ (Motivo Activo) o 20 ng de proteínas recombinantes purificadas (p65 y p50 del Motivo Activo, p52 de Santa Cruz), fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con 20 μl de compuestos del fármaco diluidos en solución tampón Complete Lysis sin DTT. Las muestras tratadas fueron transferidas a continuación a 30 μl de solución tampón Compete Binding (con DTT) en micro-pocillos de placa recubiertos previamente con el oligonucleótido de consenso de NF-kB. Los controles incluían pocillos de enlace no específico (NSB) que contenían solución tampón de lisis sin ningún extracto no proteína recombinante (para el fondo), extracto nuclear o proteína recombinante tratada con DMSO solamente (para enlace máximo), y pocillos que contenían extracto/proteína más 20 pmoles libres de oligonucleótido de NF-kB de tipo natural como competidor o 20 pmoles de oligonucleótido de NF-kB mutante libre como control para demostrar especificidad. La placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente el agitación suave y después lavada 3 veces con 200 μl de 1x Tampón de Lavado. Las subunidades p65, p50, p52, RelB o c-REI de NF-kB unidas a la placa fueron detectadas con 100 μl del anticuerpo primario (diluido a 1:1000 en 1x Tampón de Anticuerpo) específico para esa subunidad. La placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y después lavada 3 veces con 200 μl de 1x Tampón de Lavado. A continuación, se añadieron 100 μl de un anticuerpo anti-conejo conjugado de cabra HPR (diluido a 1:1000 en 1x Tampón de Anticuerpo) a cada pocillo. La placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y después lavada 4 veces con 200 μl de 1x Tampón de Lavado. Se añadieron 100 μl de Solución de Desarrollo a temperatura ambiente a cada pocillo. Se permitió que la reacción se desarrollara durante 2-10 minutos hasta que se desarrolló un medio de color azul oscuro (dependiendo de la actividad de la subunidad en el lote de extracto o del lote de proteína recombinante usado), y a continuación se detuvo la reacción con 100 μl de Solución de Interrupción produciendo un color amarillo. Se registró la absorbancia usando un Detector Multimodo DTX 880 de Becton-Dickinson a 450 nm con una longitud de onda de referencia sustraída a 620 nm. Las Figuras 7 y 8 ilustran el efecto del Ejemplo 2, la DHMEQ y la partenolide sobre la inhibición de RelA y RelB respecto a sitios NF-kB.

40 Adicionalmente a los compuestos de los Ejemplos 1 y 2, la Tabla 1 detalla otros compuestos por sus actividades para inhibir: 1) expresión de luciferasa activada por NF-kB y GFP en células HEK293, 2) liberación de IL-6 y PGE3 a partir de células RAW264, y 3) enlace de RelA, RelB, c-Rel, p50 y p52 respecto a sitios NF-kB.

Tabla 1. Actividades farmacológicas de compuestos en la inhibición de expresión de genes informador activado por NF-κB, suspensión de liberación de citoquina e inhibición de enlaces de proteína Rel respecto a sitios NF-κB (N/D: no determinado)

Comp. de Ej. #	293/NFκB-luc EC50 (uM)	NF-κB/293/ GFP EC50 (uM)	RAW 264.7 liberación de IL-6 EC50 (uM)	RAW 264.7 liberación de PGE2 EC50 (uM)	enlace de p65 IC50 (uM)	enlace de p50 IC50 (uM) o % de inhibic. a 5 uM	enlace de p52 IC50 (uM) o % de inhibic. a 5 uM	enlace de c-Rel IC50 (uM) o % de inhibic. a 5 uM	enlace de RelB IC50 (uM) o % de inhibic. a 5 uM
1	6,2	6,2	6,5	6,9	2,2	26	13	4,6	7,4
2	4,1	0,21	0,24	1,8	1,4	2,1	6	2,1	2
5	>38	>38	0,43	6,2	230	>481	>481	12%	0%
6	18	3,4	0,90	6,2	3,3	0%	7%	27%	13%
7	15	3,2	0,73	6,8	3,6	19%	16%	63%	32%
8	37	10	2,2	26,2	N/D	16%	17%	46%	21%
9	14	20	7,4	23,6	7,2	11%	22%	44%	22%
10	19	4,5	<0,24	1,1	2,8	6%	11%	54%	27%
3	15	3,4	1,4	N/D	12,4	>636	301	15%	0%
11	15	5,8	7,7	N/D	4,6	4%	9%	40%	18%
4	>51	40	>51	N/D	5	118	365	23%	21%
12	22	N/D	2,5	N/D	34,4	0%	14%	7%	6%
13	9,2	N/D	1,4	N/D	10,6	0%	0%	15%	10%
14	23	N/D	3,3	N/D	35,5	0%	6%	1%	9%
15	11	4,9	1	N/D	488	0%	0%	6%	0%
16	7,1	1,2	0,64	N/D	0,88	20	3,7	0,8	1,7
20	9,6	7,7	1,4	N/D	5,8	1%	18%	40%	29%
21	5,8	N/D	0,38	N/D	0,55	22	22	1,1	1,5
22	>34	N/D	>34	N/D	13,2	N/D	N/D	N/D	N/D
23	>40	>40	24,8	N/D	6,4	N/D	N/D	N/D	N/D
24	>48	>48	27,1	N/D	2,3	N/D	N/D	N/D	N/D
25	4,1	0,84	0,13	N/D	1,1	1,2	4,7	0,49	0,65
26	16	11	1,6	N/D	4,7	246	84	14	12
27	9,7	6,7	0,71	N/D	30	N/D	N/D	N/D	N/D
28	2,7	4,2	0,19	N/D	3	20	9,6	4,5	3,0
29	0,46	2,2	0,16	N/D	4,5	129	59	11	12
30	2,7	4,3	0,76	N/D	36	>608	>608	N/D	N/D
31	3,9	5,6	1,0	N/D	38	28	21	N/D	N/D
32	3,4	3,0	0,24	N/D	30	>514	>514	N/D	N/D
33	0,53	2,0	0,26	N/D	4,8	>378	>378	N/D	N/D
34	>51	39	42	N/D	12	90	96	N/D	N/D
35	2,1	5,3	0,44	N/D	50	148	81	N/D	N/D

En una serie de experimentos *in vitro*, los inhibidores de NF- κ B de la invención impidieron liberaciones de citoquina y el crecimiento de un amplio espectro de líneas de células del cáncer. Estos compuestos no inhibieron actividades del citocromo P450 ni bloquearon el canal hERG. Se han evaluado varios compuestos en cuanto a estudios de eficacia en modelos de enfermedades de roedores. En primer lugar pretendíamos obtener la eficacia *in vivo* de los compuestos en mieloma múltiple que tenga una alta incidencia de activación constitutiva de ambas vías canónica y no canónica. En un modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple RPMI8226 humano, el compuesto del Ejemplo 2 alcanzó el mismo nivel de reducción de tumor que el PS-341 (bortezomib, Velcade™), el cual está indicado como terapia de primera línea para esta indicación (véase la Figura 9). Adicionalmente, el compuesto del Ejemplo 2 fue mejor tolerado que el PS-341. Sin embargo, los análisis estadísticos revelaron que ninguno de los tratamientos con PS-341 ni con el Ejemplo 2 consiguieron una inhibición estadística significativa de crecimiento del tumor ($P > 0,05$).

La inhibición de poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) o regulación a la baja de p65 (RelA) puede potenciar la citotoxicidad inducida por irradiación (IR) en líneas de células de cáncer. En este estudio, se evaluó un nuevo inhibidor de p65 (RelA) de molécula pequeña como agente de radio-sensibilización en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de tipo salvaje o PARP-1^{-/-} o p65^{-/-} MEFs. Se encontró que los MEFs de p65 eran ≥ 2 veces más sensibles los MEFs de p65^{-/-} a IR en ensayos de supervivencia clonogénicos, demostrando con ello que la activación de NF- κ B confiere radio-resistencia. La incubación del compuesto del Ejemplo 2 (1,4 μ M, una dosis no citotóxica) radio-sensibilizó MEFs de p65^{-/-} (valores LD₅₀ de 1,5 Gy para IR + el compuesto del Ejemplo 2 en comparación con 2,3 Gy (sólo IR)). El compuesto del Ejemplo 2 no tuvo ningún efecto sobre la radio-sensibilización de MEFs de p65, lo que indica que el efecto farmacológico del compuesto del Ejemplo 2 está mediado por p65. Se observaron efectos de radio-sensibilización similares usando técnicas de interferencia de ARN para regular a la baja el nivel de expresión de p65 (mediante $>95\%$) en MEFs de p65^{+/+} pero no en MEFs de p65^{-/-}. El compuesto del Ejemplo 2 fue probado a continuación en MEFs de PARP-1^{+/+} o PARP-1^{-/-}. Esto demostró que o bien el tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 (1,4 μ M) o bien la regulación a la baja de siARN incrementó las radio-sensibilidades de los MEFs de PARP-1^{+/+} pero no de PARP-1^{-/-} a la IR, sugiriendo que el PARP-1 está corriente arriba en la activación de la vía del NF- κ B. La inhibición del NF- κ B por parte del compuesto del Ejemplo 2 o de siRN de p65 en MEFs, pudo ser también confirmada. La expresión de luciferasa dependiente de NF- κ B se incrementó en 2,5 veces tras IR de 10 Gy en MEFs de p65. El tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 o con siARN de p65 redujo la transcripción de gen de luciferasa significativamente. De forma similar, la IR incrementó las actividades de enlace de ADN de NF- κ B del extracto nuclear de los MEFs de p65 en 2 veces, lo que se redujo significativamente ya sea por incubación del compuesto del Ejemplo 2 o ya sea por tratamiento de siARN de p65 en esas células. Se demostró que este inhibidor de p65 puede potenciar la radioactividad *in vitro* tal y como se mostró previamente que los inhibidores de PARP-1 pueden hacerlo. Se necesitaron otros estudios *in vivo* para explorar completamente la utilidad potencial del compuesto del Ejemplo 2 como agente de radio-sensibilización.

El objetivo de otro estudio fue evaluar, en ensayos de enlace de enzima y de radioligando, la actividad del compuesto del Ejemplo 2. Los métodos empleados en el estudio fueron adaptados a partir de la literatura específica para maximizar la fiabilidad y la reproducibilidad. Los estándares de referencia se ejecutaron como parte integral de cada ensayo para asegurar la validez de los resultados obtenidos. Cuando estuvieron presentes, se determinaron los valores de IC₅₀ mediante análisis de regresión no lineal, de mínimos cuadrados, usando MathIQs (ID Business Solutions Ltd., UK). Cuando estuvieron presentes constantes de inhibición (K%), los valores K_{1/4} fueron calculados usando la ecuación de Cheng y Prusoff (Cheng 1973) usando la IC₅₀ observada del compuesto probado, la concentración de radioligando empleada en el ensayo, y los valores históricos para el K¹ del ligando (obtenidos experimentalmente). Cuando estuvo presente, el coeficiente de Hill (n_{1/2}), que define la pendiente de la curva de enlace competitiva, fue calculado usando MathIQa. Los coeficientes Hill distintos de 1,0 pueden sugerir que el desplazamiento del enlace no sigue las leyes de acción de masas con un único sitio de enlace. Cuando estuvieron presentes datos de IC₅₀, K_{1/4} y de n_{1/2} sin Error Estándar del Medio (SEM), los datos son insuficientes para que sean cuantitativos. Las respuestas individuales, si se necesitan, están presentes en el anexo de esta memoria. Los resultados se muestran en la Figura 11 sin valores de IC₅₀ y/o K_{1/4} estimados, puesto que no hubo inhibición por encima del 50%.

El cribado por interferencia de ARN identificó que el p53 y las mutaciones ras eran letales sintéticos con las vías canónica y no canónica de NF- κ B (Barbie 2009; Meylan 200). Se sintetizaron inhibidores que antagonizan enlaces de RelA (p65), ReOB y c-Rel respecto a los sitios de NF- κ B y de ese modo inhiben ambas vías canónica y no canónica. Un ejemplo de compuesto de ese tipo, el compuesto del Ejemplo 2, fue evaluado como radiosensibilizador en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) p65, y como agente de radiosensibilización y quimioterapéutico en la línea de células de cáncer de pecho mutante KRAS (G13D) y deficiente de p53, MDA-MB-231. Se encontró que los MEFs de p65^{-/-} fueron 2 veces más sensibles que los MEFs de p65^{+/+} respecto a irradiación (IR) en ensayos de supervivencia clonogénica, demostrando de ese modo que la activación de NF- κ B confirió radio-resistencia. La incubación con el compuesto del Ejemplo 2 a una concentración no citotóxica, de 1,4 μ M, radiosensibilizó MEFs de p65^{+/+} (valor LD₅₀ de 1,5 Gy para IR + el compuesto del Ejemplo 2 en comparación con 2,3 Gy para IR solamente). El compuesto del Ejemplo 2 no tuvo efecto sobre la radio-sensibilización de MEFs de p65^{-/-}, lo que indicó que el efecto de radiosensibilización del compuesto del Ejemplo 2 estuvo mediado por p65. Se observaron efectos de radiosensibilización similares usando la técnica de interferencia de ARN para regular a la baja el nivel de expresión de p65 en $> 95\%$ en MEFs de p65^{+/+} pero no en MEFs de p65^{-/-}. La inhibición del NF- κ B por el compuesto del Ejemplo 2 o por siARN de p65 en MEFs, fue también confirmada. La expresión de luciferasa dependiente de NF- κ B

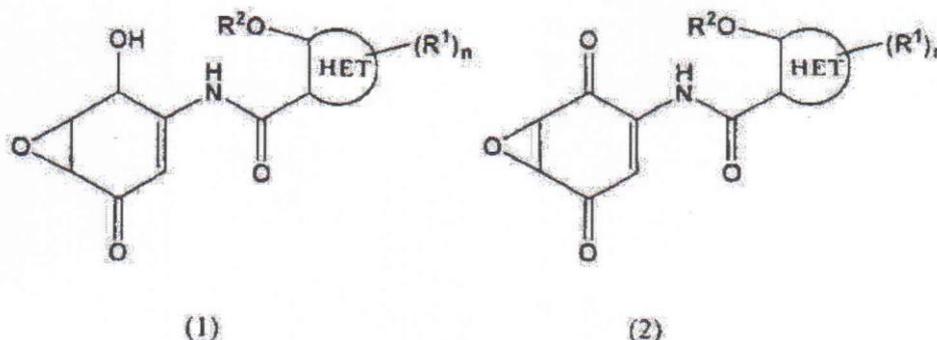
se incremento en 2,5 veces tras IR de 10 Gy en MEFs de p65^{+/-}. El tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 o siARN de p65, redujo significativamente la expresión de luciferasa. De forma similar, la IR incrementó las actividades de enlace de ADN de NF-κB de extracto nuclear de MEFs de p65^{+/-} en 2 veces, lo que se redujo significativamente ya sea mediante incubación del compuesto del Ejemplo 2 o ya sea mediante tratamiento de siARN de p65 en esas células.

El compuesto del Ejemplo 2 fue estudiado también en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con activación constitutiva de NF-κB. En primer lugar, se probó el compuesto del Ejemplo 2 como agente único en el crecimiento de células de cáncer de mama. Se observó el efecto citotóxico significativo del compuesto del Ejemplo 2 con un valor de LD₅₀ de 0,4 μM para las células MDA-MB-231. A continuación se probó el efecto sinérgico del compuesto del Ejemplo 2 con irradiación en esas células. Se observó que la incubación con 0,2 μM del compuesto del Ejemplo 2 potencia significativamente el efecto en 1,5 veces (valor de LD₅₀ de 1,66 Gy IR para IR + el compuesto del Ejemplo 2 en comparación con 2,55 Gy para IR solamente). Estos estudios descritos demuestran que un inhibidor Rel de NF-κB puede potenciar la radioactividad mediante el bloqueo de la vía canónica. También puede matar selectivamente células tumorales con p53 y mutaciones KRAS, probablemente mediante bloqueo de ambas vías canónica y no canónica. Un reciente estudio de asociación amplia de genoma de artritis reumatoide ha identificado el lugar *REL*, codificando c-Rel con un factor de riesgo nuevo definido para la enfermedad (Gregersen 2009). c-Rel es un miembro de la familia de factores de transcripción de NF-κB que median ambas vías canónica y no canónica de NF-κB. Ratonos con una supresión genética de c-Rel que son resistentes a la artritis inducida por colágeno. Se han sintetizado inhibidores de bajo peso molecular que bloquean el enlace c-Rel, RelA y RelB en los sitios de NF-κB. Las actividades antiinflamatorias del compuesto del Ejemplo 2, un inhibidor dual de ambas vías canónica y no canónica de NF-κB, se probó en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno. El efecto del compuesto del Ejemplo 2 con etanercept, el bloqueante de TNF α , se comparó en un modelo de ratón de artritis reumatoide. Los ratones DBA macho desarrollaron artritis por inyección de colágeno DII bovino en las colas en el día 1 y en el día 21. Grupos de animales (n = 10) fueron tratados con: 1) operación simulada, 2) vehículo (DMSO), 3) etanercept (50 μg/ratón, p.i. diaria d21 – d35), 4) compuesto del Ejemplo 2 (15 mg/kg, c.s. diariamente d21 – d35), 5) el compuesto del Ejemplo 2 (15 mg/kg, p.i. diariamente d21 – d35), 6) el compuesto del Ejemplo 2 (50 mg/kg, p.i. diariamente d21 – d35). El tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 redujo significativamente el eritema y la hinchazón de la pata trasera del ratón, comparable al tratamiento con etanercept, según se evaluó mediante la puntuación del índice de artritis (Figura 10). Tanto etanercept como el compuesto del Ejemplo 2 redujeron el edema de la pata (P < 0,01 frente a grupo de vehículo). No se observó ninguna diferencia significativa de pérdida de peso en los ratones en todos los grupos experimentales. La evaluación histórica de las articulaciones en el día 35 reveló una reducción significativa de la inflamación en los ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 2 o con etanercept. Una medición de las actividades de mieloperoxidasa mostró una reducción concomitante de la enzima específica de lisozoma de granulocito debida al tratamiento con el compuesto del Ejemplo 2 o con etanercept. Como conclusión, hemos demostrado que un inhibidor Rel de NF-κB puede proteger los ratones frente al desarrollo de actividades inflamatorias. Las actividades antiinflamatorias del compuesto del Ejemplo 2 son comparables a las de etanercept en el modelo de artritis reumatoide del ratón. La eficacia del compuesto del Ejemplo 2 se logra a dosis bien toleradas por los ratones.

Los inhibidores de NF-κB de la invención están siendo probados como agentes antiinflamatorios en modelos animales de colitis a efectos un radiosensibilizador para tratamiento de irradiación de tumores sólidos, como agentes quimioterapéuticos tanto por sí solos como en combinación con varios fármacos para cáncer aprobados. Ambos inhibidores duales para las vías canónica y no canónica e inhibidores únicos para la vía canónica, están siendo caracterizados.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2):



o una sal farmacéutica del mismo,

5 en el que:

HET es un carbociclo saturado o insaturado, mono- o multi-anillo, en el que uno o más átomos de carbono del anillo se reemplaza(n) por N, S, P u O;

10 cada **R¹** es independientemente hidrogeno; CF₃; fenil opcionalmente sustituido con ciano; halo; nitro; hidroxil; (C₁-C₆) alquil; (C₁-C₆) alquil-OH; (C₁-C₆) alcoxi; COR³; NR⁴R⁵ o NHCO(C₁-C₆) alquil; ciano; halo; nitrohidroxil; (C₁-C₆) alquil; (C₁-C₆) alquil-OH; (C₁-C₆) alcoxi; (C₁-C₆) tioalcoxi; fenoxi; COR³; NR⁴R⁵; NHCO (C₁-C₆) alquil; SO₂(C₁-C₆) alquil; o SO₂NR⁴R⁵;

15 **R²** es H, R⁶, COR⁶, CONHR⁶, CH₂OCOR⁶, P(O)(OH)₂, P(O)(O(C₁-C₆) alquil)₂, P(O)(OCH₂OCO(C₁-C₆) alquil)₂, P(O)(OH)(OCH₂OCO(C₁-C₆) alquil), P(O)(OH)(O(C₁-C₆) alquil), P(O)(OH)(C₁-C₆) alquil, glicosil o una sal inorgánica de P(O)(OH)₂, P(O)(O(C₁-C₆) alquil), P(O)(OCH₂OCO(C₁-C₆) alquil)₂, P(O)(OH)(OCH₂OCO(C₁-C₆) alquil), P(O)(OH)(OC₁-C₆) alquil, o P(O)(OH)(C₁-C₆) alquil;

20 **R⁶** es C₁-C₆ alquil, trifluorometil, (C₃-C₆) cicloalquil, ciclohexilmetil o fenil, en el que el fenil está sustituido con 0 a 4 grupos seleccionados a partir del grupo consistente en flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C₁-C₄) alquil, (C₁-C₄) alcoxi y fenilmetil, en el que el fenilmetil se sustituye en el anillo fenil con 0-4 grupos seleccionados en el grupo consistente en flúor, cloro, bromo, hidroxil, trifluorometil, (C₁-C₄) alquil, (C₁-C₄) alcoxi, 2-piridinil, 3-piridinil, 4-piridinil, 2-pirimidinil, 4-pirimidinil y 5-pirimidinil,

R³ es independientemente hidroxil, (C₁-C₆) alcoxi, fenoxi o -NR⁴R⁵;

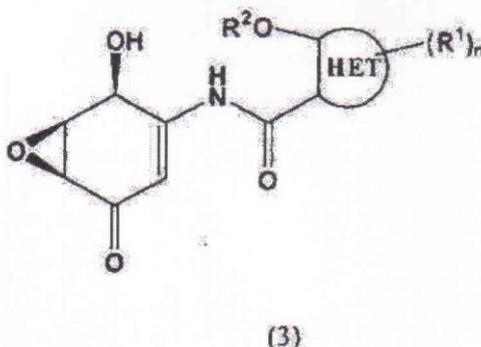
cada uno de **R⁴** y **R⁵** son independientemente hidrógeno, (C₁-C₆) alquil o (C₃-C₆)cicloalquil, y **n** es 0-3,

en el que sobre HET, existe una relación orto entre el grupo OR² y la porción amida.

25 2.- El compuesto según la reivindicación 1, en el que R² es H.

3.- El compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que HET es piridil y n es 0.

4.- El compuesto según la reivindicación 1, que tiene la estructura de fórmula (3):



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5.- El compuesto según la reivindicación 4, en el que R² es H.

6.- El compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéutica del mismo que se selecciona en el grupo consistente en:

- 5 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) nicotinamida;
 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) quinolina-3-carboxamida;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida;
 (±)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) nicotinamida;
 ácido (±)-6-cloro-4-hidroxi-quinolina-3-carboxílico-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-amida;
- 10 ácido (±)-4-hidroxi-8-trifluorometil-quinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 (±)-5-cloro-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) nicotinamida;
 ácido (±)-4-hidroxi-2-fenilpirimidina-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 ácido (±)-3-hidroxi-quinoloxalina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
- 15 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-metil-nicotinamida;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida, mesilato;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida trifluoroacetato;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) picolinamida tosilato;
 ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
- 20 (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida;
 ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida mesilato;
 ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida trifluoroacetato;
 ácido (±)-3-hidroxi-quinolina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida tosilato;
- 25 ácido (±)-3-metoxi-piridina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida trifluoroacetato;
 ácido (±)-3-metoxi-piridina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida trifluoroacetato;
- 30 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-trifluorometil-nicotinamida;
 ácido (±)-4-hidroxi-2-metil-pirimidina-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 ácido (±)-2-metoxi-quinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 ácido (±)-3-metoxi-pirazina-2-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 ácido (±)-1-cloro-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
- 35 (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-hidroxi-quinolina-3-carboxamida;
 (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolona-7-carboxamida;
 (±)-N-(2,5-Dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxi-nicotinamida;
 (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-3-metoxiquinolona-2-carboxamida;
 (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolona-7-carboxamida;
- 40 (±)-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-8-metoxiquinolona-7-carboxamida trifluoroacetato;
 (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-3-hidroxiisonicotinamida;
 (±)-N-(2,5-dioxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-2-metoxiquinolona-3-carboxamida;
 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-6-metoxiquinolona-3-carboxamida;

- (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]oxazol-5-carboxamida;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piperidina-2-carboxamida;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirazina-2-carboxamida;
 (±)-5-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirimidina-4-carboxamida;
 5 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1,8-naftiridina-3-carboxamida;
 (±)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) piridazina-3-carboxamida;
 (±)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-pirazol-3-carboxamida;
 4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) furan-3-carboxamida;
 (±)-4-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) tiofeno-3-carboxamida;
 10 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isotiazol-4-carboxamida;
 (±)-3-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) isoxazol-4-carboxamida;
 (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-indol-5-carboxamida;
 (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida; y,
 (±)-2-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) morfolina-3-carboxamida.
- 15 7.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con un diluyente o portador farmacéuticamente efectivo.
- 8.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (3) según la reivindicación 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con un diluyente o portador farmacéuticamente efectivo.
- 20 9.- Un compuesto de fórmula (1) o de fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un mamífero asociada a inhibición de activación de NF-κB, comprendiendo dicho medicamento una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (1) o fórmula (2) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 10.- Un compuesto según la reivindicación 9, en el que la enfermedad se selecciona en el grupo consistente en cáncer, inflamación, enfermedades auto-inmunes, diabetes, complicaciones diabéticas, infección, enfermedad cardiovascular y lesiones de reperfusión por isquemia.
- 30 11.- Un compuesto de fórmula (3) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un mamífero asociada a inhibición de activación de NF-κB, comprendiendo dicho medicamento una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (3) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 12.- Un compuesto según la reivindicación 11, en el que la enfermedad se selecciona en el grupo consistente en cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunes, diabetes, complicaciones diabéticas, infección, enfermedad cardiovascular y lesiones de reperfusión por isquemia.
- 13.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la enfermedad es cáncer.
- 35 14.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la enfermedad es diabetes.
- 15.- Un compuesto seleccionado en el grupo:
- ácido (±)-4-hidroxi-2-piperidina-1-il-pirimidina-5-carboxílico (2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) amida;
 (±)-6-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) benzo[d]tiazol-5-carboxamida;
 40 (±)-7-hidroxi-N-(2-hidroxi-5-oxo-7-oxa-biciclo[4.1.0]hept-3-en-3-il) pirimidina-6-carboxamida;
- y sales farmacéuticas del mismo.

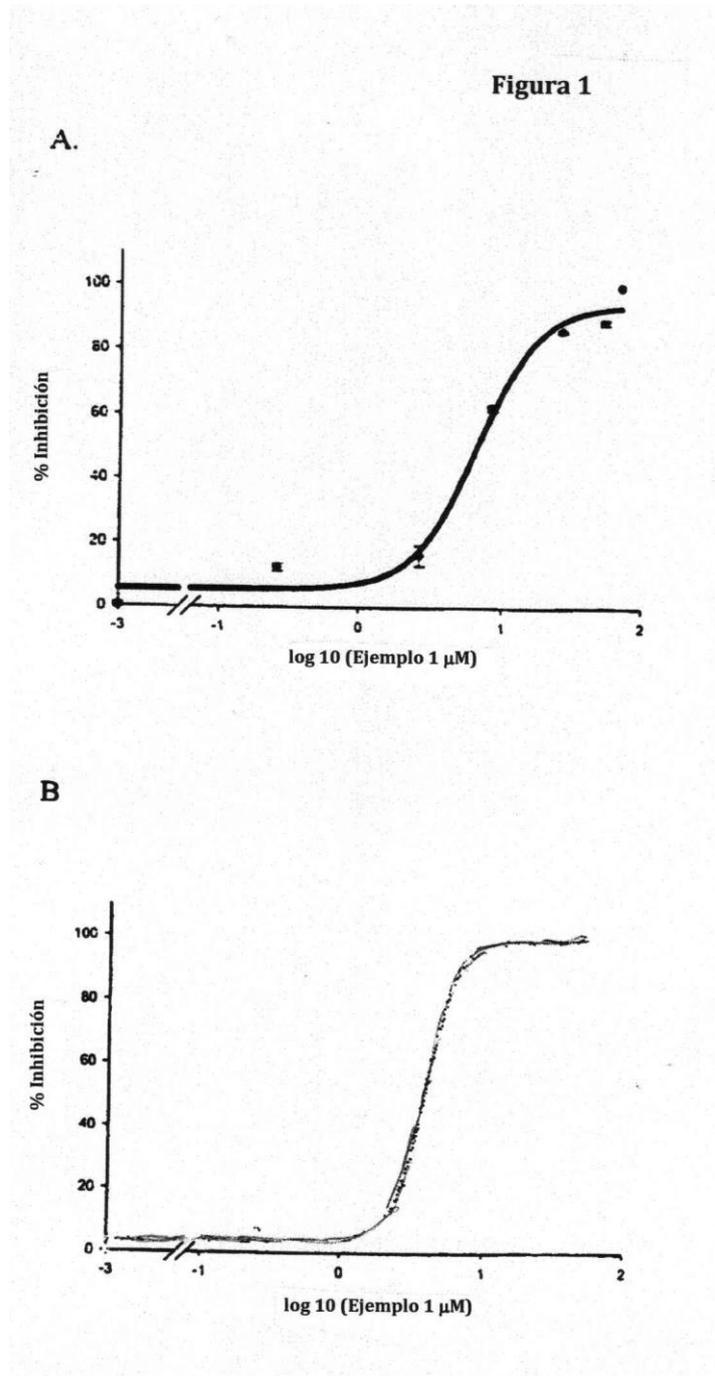


Figura 2

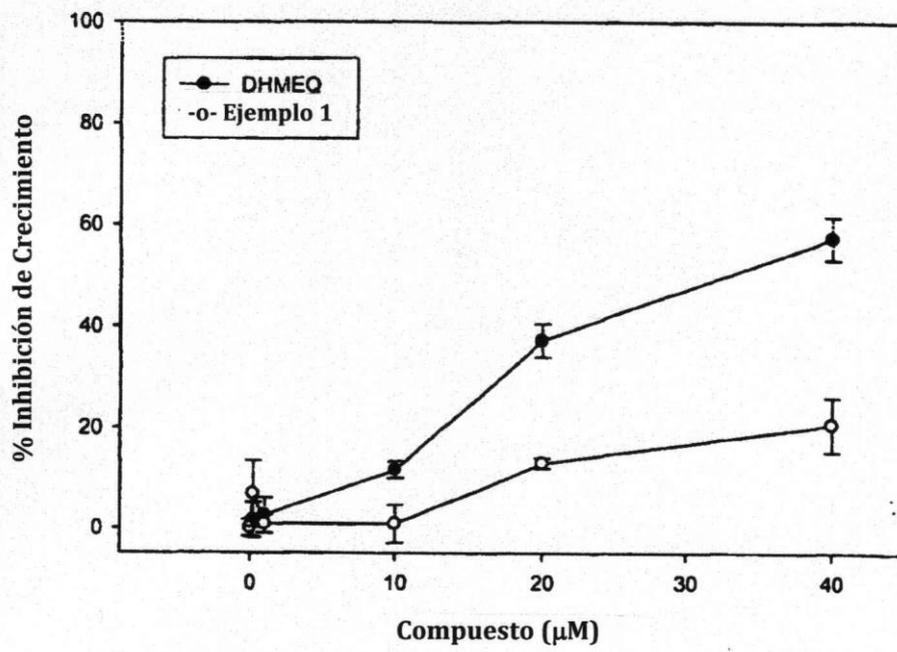


Figura 3

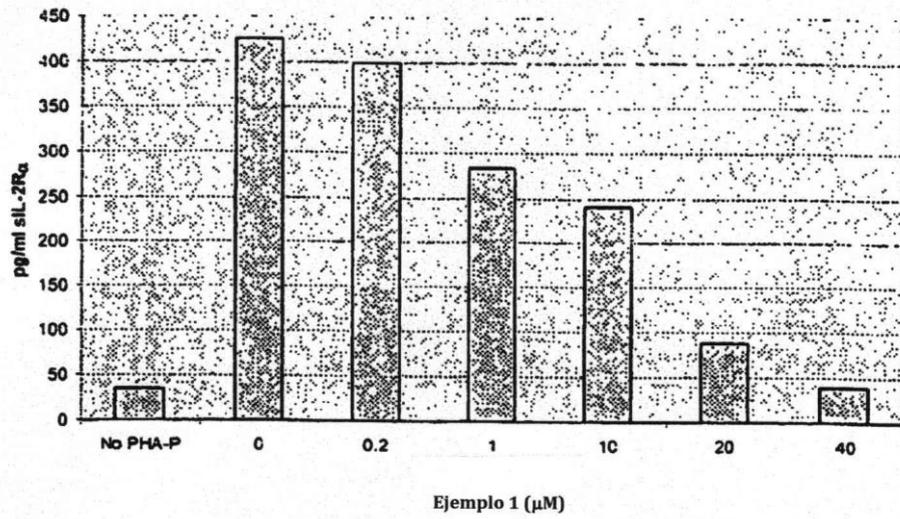
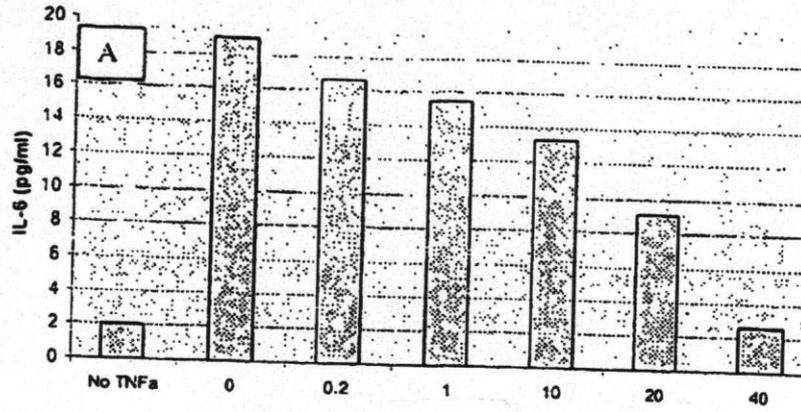
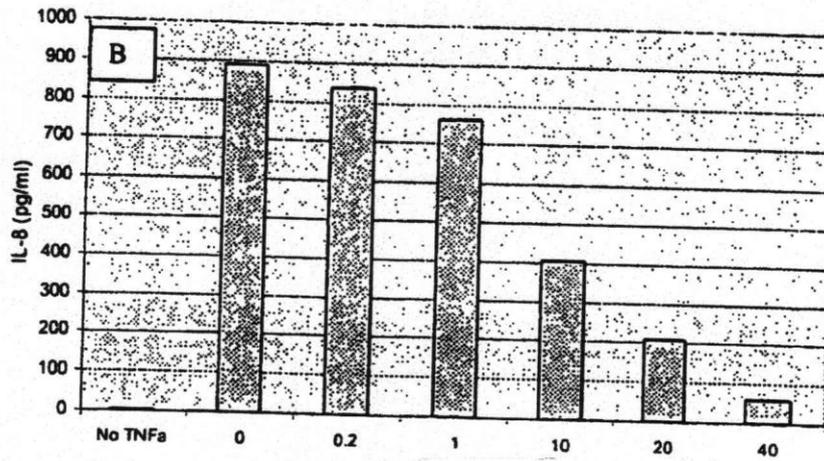


Figura 4



Ejemplo 1 (µM)



Ejemplo 1 (µM)

Figura 5

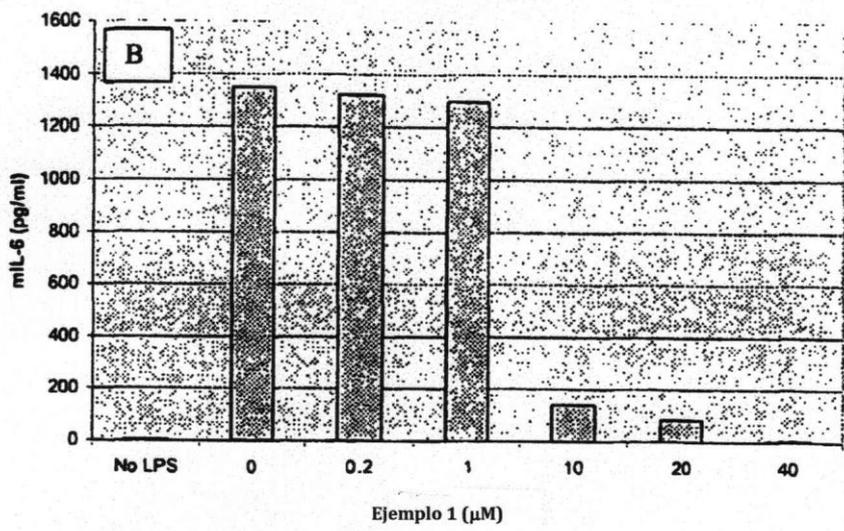
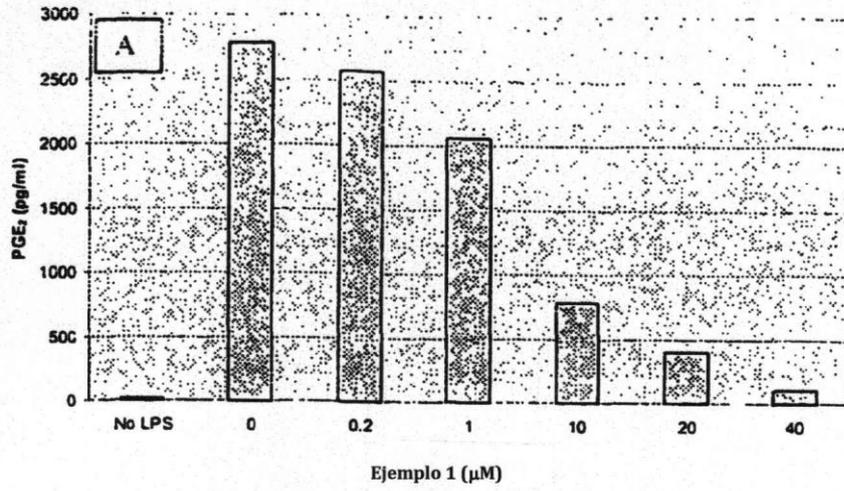


Figura 6

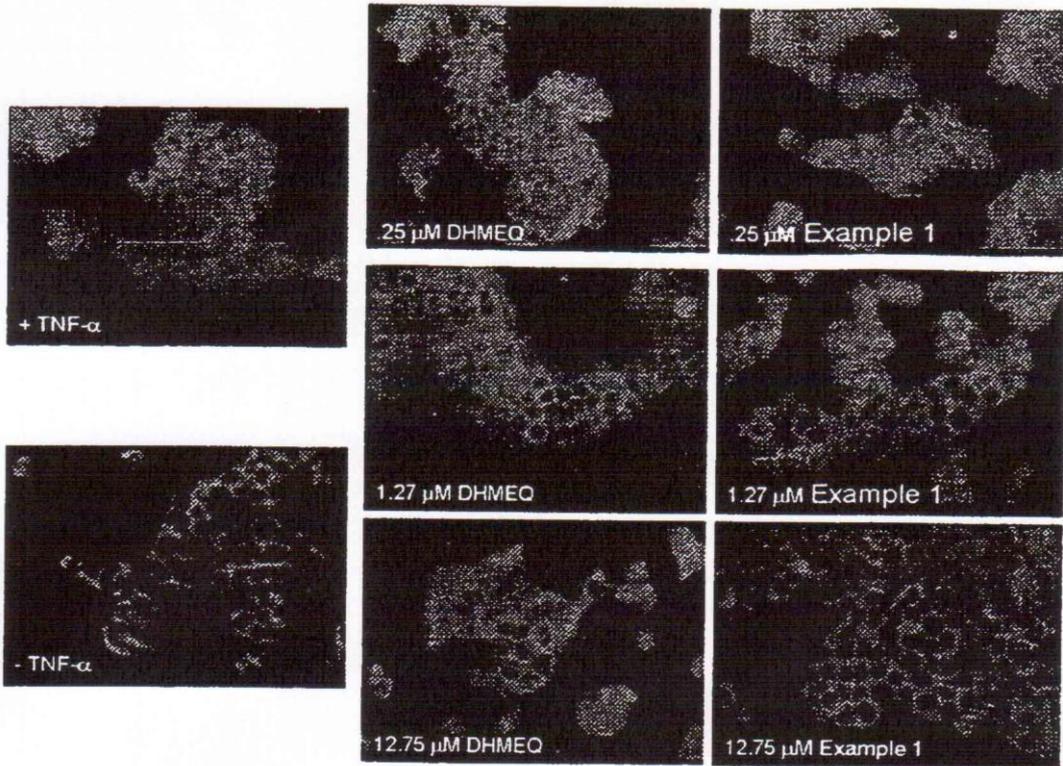


Figura 7

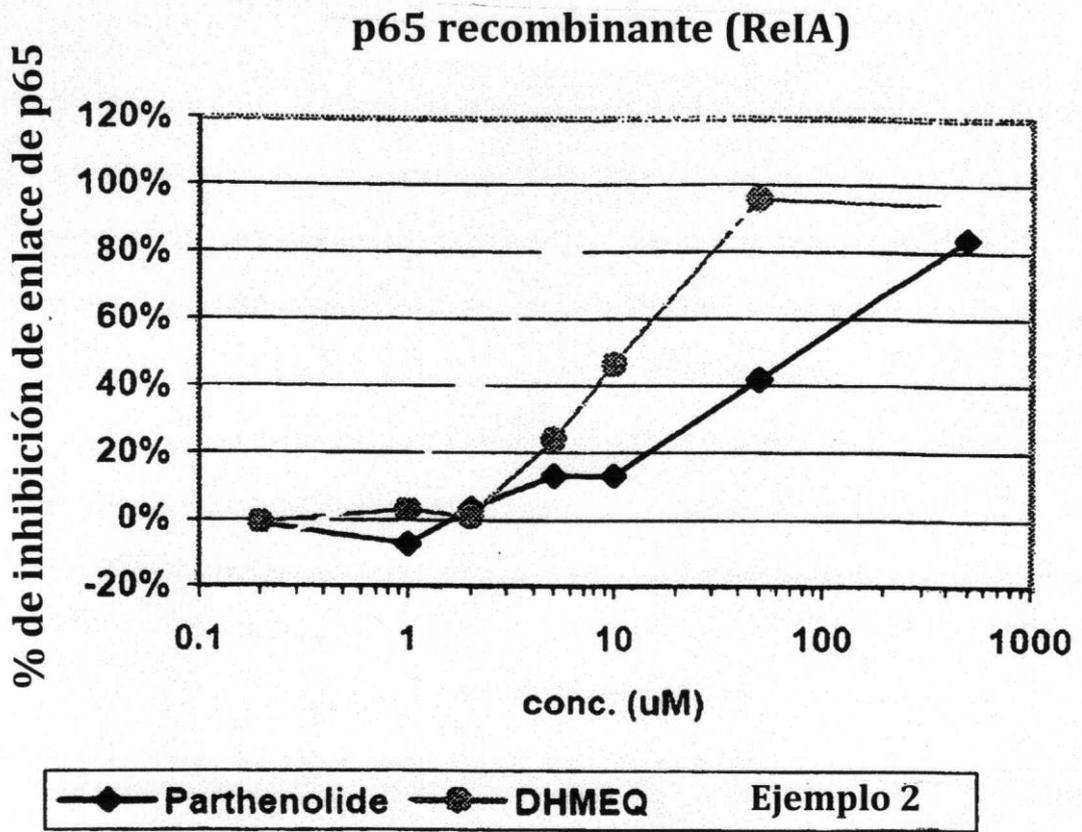


Figura 8

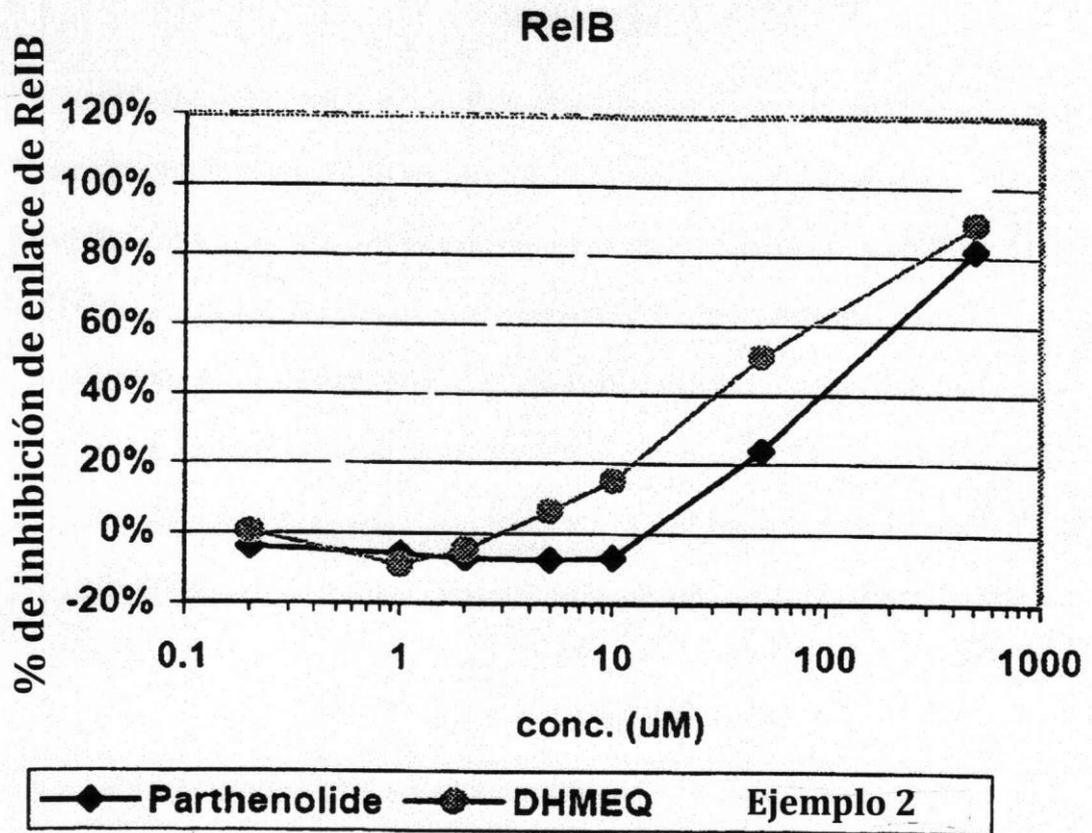


Figura 9

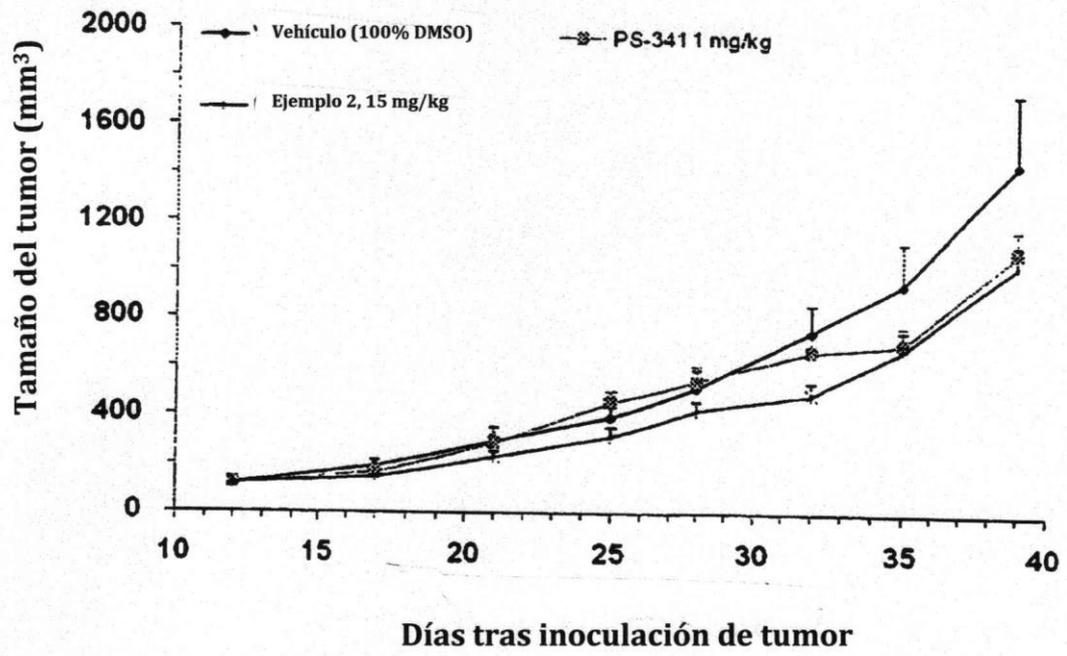


Figura 10

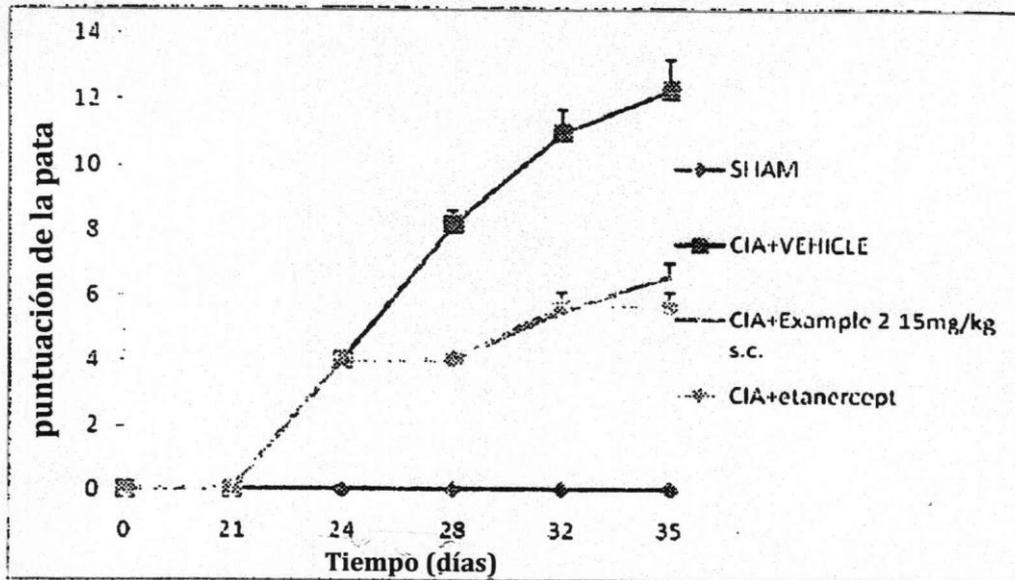


Figura 11

compuesto	objetivo	especie	n	concentración	% inhibición
Ejemplo 2	CYP450, 1A2	humana	2	10 uM	15
Ejemplo 2	CYP450, 2C19	humana	2	10 uM	9
Ejemplo 2	CYP450, 2C9	humana	2	10 uM	6
Ejemplo 2	CYP450, 2D6	humana	2	10 uM	12
Ejemplo 2	CYP450, 3A4	humana	2	10 uM	-5
Ejemplo 2	hERG canal K	humana	2	10 uM	0