

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 603**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 239/88 (2006.01)

C07D 239/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2012** **PCT/EP2012/066741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13030218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2012** **E 12751080 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2751092**

54 Título: **Inhibidores selectivos y reversibles de la proteasa específica de ubiquitina 7**

30 Prioridad:

02.09.2011 EP 11306096

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

21.12.2016

73 Titular/es:

HYBRIGENICS S.A. (100.0%)
3/5, Impasse Reille
75014 Paris, FR

72 Inventor/es:

COLLAND, FRÉDÉRIC y
GOURDEL, MARIE-EDITH

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 594 603 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 selectivos y reversibles de la proteasa específica de ubiquitina 7

5 **[0001]** La presente invención se refiere al descubrimiento de nuevos inhibidores selectivos y reversibles de proteasas específicas de ubiquitina, su procedimiento de preparación y su uso terapéutico.

[0002] Las proteasas específicas de ubiquitina (USP) son cisteína proteasas que pertenecen a la familia de las enzimas desubiquitinantes (DUB).

10

[0003] La desregulación del sistema de ubiquitina-proteasoma se ha relacionado con la patogénesis de muchas enfermedades humanas, incluidos el cáncer (Holler et al. Nat Rev Cancer 2006, 6(10), 776-788), los trastornos neurodegenerativos (Rubinsztein, Nature 2006, 443(7113), 780-786) y las enfermedades virales (Gao & Luo Can J Physiol Pharmacol 2006, 84(1), 5-14). El éxito en el mercado del inhibidor del proteasoma Velcade®
 15 (bortezomib) para el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma de células del manto ha establecido este sistema como un objetivo válido para el tratamiento del cáncer (Adams, Nat Rev Cancer 2004, 4(5), 349-360). Una alternativa prometedora para abordar el proteasoma propiamente dicho sería interferir con la maquinaria de conjugación/desconjugación aguas arriba de la ubiquitina para generar agentes contra el cáncer más específicos y menos tóxicos.

20

[0004] Las enzimas desubiquitinantes pueden invertir la mono- y la poliubiquitinización, puesto que estas escinden específicamente el enlace isopeptídico en el extremo C-terminal de ubiquitina. Las enzimas de las proteasas específicas de la ubiquitina y las hidrolasas del extremo C-terminal de la ubiquitina (UCH) son los miembros mejor caracterizados de la familia DUB (Komander et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009, 10(8), 550-63;
 25 Nijman et al. Cell 2005, 123(5), 773-786). Se cree que las UCH escinden pequeños sustratos proteicos, preferentemente, y que están relacionadas, principalmente, con el tratamiento y el reciclaje de la ubiquitina, pero sus funciones específicas siguen apenas se conocen. Las USP constituyen la mayor subfamilia de DUB, con más de 60 miembros. Eliminan la ubiquitina de sustratos proteicos específicos, evitando así su orientación a la proteasoma o la regulación de su localización subcelular y activación (Daviet & Colland, Biochimie 2008, 90(2), 270-83). Las USP
 30 están surgiendo como posibles objetivos para la interferencia farmacológica con la maquinaria de regulación de la ubiquitina, en función de su actividad de proteasa y en su implicación en varias enfermedades humanas (Colland, Biochem Soc Trans 2010, 38, 137-43).

[0005] USP7 (proteasa específica de la ubiquitina 7) / HAUSP (proteasa específica de la ubiquitina asociada
 35 al herpes) es una proteína de 135 kDa de la familia USP. Se ha demostrado que USP7 interactúa con proteínas virales, como ICP0 (Vmw 110), un gen temprano inmediato del virus del herpes simple que estimula el ciclo lítico viral (Everett et al., J Virol 73, 1999, 417-426), y EBNA1 (antígeno-1 nuclear Epstein-Barr) (Holowaty et al., J Biol Chem 2003, 278, 29987-29994 and 47753-47761). Las proteínas humanas, tales como la p53 y la mayor ligasa E3 de p53, Mdm2, también han sido identificados como asociados y sustratos de USP7 (Cummins et al. Nature 2004,
 40 486, Cummins & Vogelstein, Cell Cycle, 2004, 3, 689-692; Li et al. Mol Cell 2004, 13, 879-886; Li et al. Nature 2002, 416, 648-653). De manera más general, USP7 puede desubiquitinar diferentes objetivos, entre ellos Mdm2 y p53, y la desubiquitinización neta de estos últimos objetivos en última instancia determina los niveles funcionales de p53. De acuerdo con informes recientes, también se ha demostrado que el silenciamiento de USP7 aumenta los niveles de p53 en el estado estacionario incitando la degradación de Mdm2. La unión de USP7 a p53 recientemente ha
 45 demostrado estar regulada por TSPYL5, una proteína potencialmente implicada en la oncogénesis de mama a través de una competición con p53 para la unión a la misma región de USP7 (Epping et al., Nat Cell Biol. 2011, 13(1):102-8). Más recientemente, se ha demostrado que tanto la regulación al alza como a la baja de USP7 inhiben la proliferación celular del cáncer de colon en crecimiento in vitro y el crecimiento de tumores in vivo, resultando en niveles constitutivamente elevados de p53 (Becker et al. Cell Cycle 2008, 7(9), 1205-13).

50

[0006] USP7 también altera el nivel del supresor de tumor p16^{INK4a} través de la estabilización de Bmi1/Mel18 (Maertens et al., Embo J. 2010, 29, 2553-2565). Las proteínas adicionales relacionadas con la integridad/regulación genómica, como ADN metilasa DNMT1 y el adaptador Claspin, también se estabilizan por USP7 (Du et al, Science Signaling 2010, 3(146):ra80; Fastrup et al., J. Cell Biol. 2009, 184(1):13-9). Es importante destacar que la
 55 abundancia de USP7 y DNMT1, una proteína implicada en el mantenimiento de la metilación epigenética necesario para silenciar genes implicados en el desarrollo y el cáncer, se correlaciona en el cáncer de colon humano (Du et al, Science Signaling, 2010, 3(146):ra80). También se ha demostrado que USP7 desubiquitina en las células humanas el conocido gen supresor de tumores PTEN, lo que provoca su exportación nuclear y por lo tanto su inactivación (Song et al., Nature 2008, 455(7214), 813-7). Y lo que es más, se informó de la sobreexpresión de USP7 por primera

vez en el cáncer de próstata y esta sobreexpresión se asocia directamente con la agresividad del tumor (Song et al., Nature 2008, 455(7214), 813-7).

[0007] También se ha demostrado que USP7 desubiquitina FOXO4 en las células humanas, lo que provoca su exportación nuclear y por lo tanto su inactivación; y, en consecuencia, se activa la ruta de señalización oncogénica de PI3K/PKB (van der Horst et al., Nat Cell Biol. 2006, 8,) Por último, USP7 desempeña un papel importante en las respuestas celulares mediadas por p53 a diversos tipos de estrés, tales como daños en el ADN y estrés oxidativo (Marchenko et al., Embo J. 2007 26, 923-934, Meulmeester et al., Mol Cell 2005, 18, 565-576., van der Horst et al., Nat Cell Biol. 2006, 8, 1064-1073).

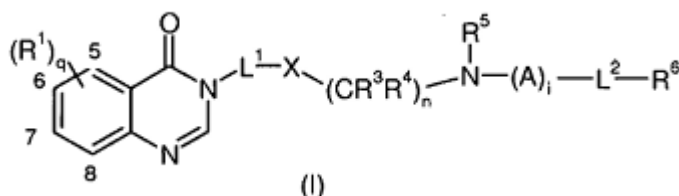
[0008] Se han descrito inhibidores sintéticos de unión de la proteína USP7 que contiene la porción de polipéptido P¹-Gly-P³-Ser, donde P¹ es un resto de ácido glutámico o un aminoácido con una cadena lateral no polar y P³ es un residuo de glicina o un aminoácido con una cadena lateral no polar (WO2006072048).

[0009] Los fenotipos asociados al silenciamiento de USP7 y las conexiones conocidas entre USP7 y las proteínas virales esenciales y las vías oncogénicas, tales como p53/Mdm2 y las vías PI3K/PKB, sugieren marcadamente que la orientación a USP7 con inhibidores de molécula pequeña puede ser beneficiosa en el tratamiento de cánceres y enfermedades virales (Sippl et al., Future Oncology 2011, 7, 619-32). Se informó recientemente de inhibidores contra USP7 (Colland et al. Molecular Cancer Therapeutics 2009, 8, 2286-95 y EP 1 749 822 y PCT/EP2011/050523.2).

[0010] Sin embargo, hasta la fecha, parece que no se ha informado de ningún inhibidor específico y reversible de moléculas pequeñas de USP7.

[0011] También se conocen por el documento WO2005/095360 los compuestos heterocíclicos neurológicamente activos que comprenden dos anillos condensados de 6 miembros con átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 3, un grupo carboxi en la posición 4, y un grupo hidroxilo en la posición 8, con un anillo aromático.

[0012] Se describe un compuesto de fórmula (I):



en la que

■ R¹, cada uno idénticos o diferentes, se seleccionan de entre el grupo que consiste en halógeno, R, OR, NR, CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', NO₂, (C₁-C₆)alquileo-OR, (C₁-C₆)alquileo-NRR', (C₁-C₆)alquileo-CO₂R, (C₁-C₆)alquileo-C(O)NRR', -O-(C₁-C₆)alquileo-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquileo-C(O)NRR', CO₂-(C₁-C₆)alquileo-OR, CO₂-(C₁-C₆)alquileo-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquileo-OR, C(O)NH-(C₁-C₆)alquileo-NRR', OCF₃, SO₂R, SO₃H, SO₂NRR', NH₂SO₂R, R¹⁰C=CR¹¹, (R¹⁰)(R¹¹)C=C(R¹¹)₂, (C₁-C₆)alquileo-C(O)R, NHC(O)R o (C₁-C₆)alquileo interrumpido por al menos un heteroátomo, elegido preferiblemente entre O, N o S, preferiblemente O;

■ L¹ es (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado opcionalmente sustituido por uno o más de =O, CN, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR', o CH₂(C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado,

■ en la que el último (C₁-C₆)alquileo está opcionalmente sustituido por uno o más de halógeno, OR, NRR' o CF₃;

■ X es CR²R⁷, NR², arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo está opcionalmente sustituido por uno o más de C₁-C₆(alquilo) lineal o ramificado, halógeno, OR, NRR, CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR';

■ R² es (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado y está enlazado con R⁵=(C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado para formar con -X-(CR³R⁴)_n-N-, al que están unidos, un heterociclo, preferiblemente un heterociclo con entre 5 y 7 miembros, opcionalmente sustituido por uno o más de OR, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', o =O;

■ R⁵, se elige entre H y (C₁-C₆)alquilo, (C₁-C₆)alquileo lineales o ramificados;

- R³, R⁴, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR' o =O;
 ■ q es 0, 1, 2, 3 o 4
 ■ n es 0, 1, 2 o 3;
 5 ■ R⁷ es OR, H, halógeno, (C₁-C₆)alquilo-OR lineal o ramificado, C(O)OR, C(O)NRR', CN, OR⁹, NRR' o SR;
 ■ i es 0 o 1;
 ■ A se elige de entre el grupo que consiste en:
- 10 - [C₁-C₆(alquilo)]₀₋₁-C(O)- lineal o ramificado;
 - [C₁-C₆(alquilo)]₀₋₁-C(O)NH- lineal o ramificado;
 - [C₁-C₆(alquilo)]₀₋₁SO₂- lineal o ramificado; o
 - [C₁-C₆(alquilo)]₀₋₁SO₂N- lineal o ramificado;
- 15 ■ L² es (C₁-C₆)alquilenio-O lineal o ramificado o un (C₁-C₆)alquilenio lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHOR;
 ■ R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR, CN, CF₃, OR, =O, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R,
 20 (C₂-C₆)alquilenio lineal o ramificado o C(O)NRR';
 ■ R⁹ se selecciona de entre el grupo que consiste en -C(O)R, -C(O)NHR, -C(O)OR, -C(O)CH₂-NRR', -C(O)-CH₂-CH₂-CO₂R, -C(O)-CH₂-SO₃H, -C(O)-(C₅H₄N), -PO₃H₂, o su forma ionizada;
 ■ R¹⁰ independientemente idénticos o diferentes se eligen entre un enlace, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado;
 ■ R¹¹ independientemente idénticos o diferentes se elige entre un átomo de hidrógeno, un (C₁-C₆)alquilo lineal o
 25 ramificado o un arilo, estando el alquilo o arilo opcionalmente sustituidos por OH, NH₂, C(O)OH o C(O)NH₂;
 ■ cada R y R', idénticos o diferentes, se eligen independientemente de H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo, heterociclo aromático o no aromático, -(C₁-C₆)alquilarilo lineal o ramificado o -(C₁-C₆)alquilheterociclo lineal o ramificado, en donde el heterociclo es aromático o no aromático; opcionalmente sustituido o no por OH, CO₂H, C(O)NH₂, NH₂
 30 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros.
- 35 **[0013]** La fórmula (I) se refiere a cualquiera de las siguientes realizaciones o cualquiera de sus combinaciones.
- 40 **[0014]** Preferiblemente, en el compuesto de la fórmula (I), R¹, cada uno idénticos o diferentes, se selecciona de entre el grupo que consiste en (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OR, NRR, CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR'; NO₂; (C₁-C₆)alquilenio-OR, (C₁-C₆)alquilenio-NRR', (C₁-C₆)alquilenio-CO₂R, (C₁-C₆)alquilenio-C(O)NRR', -O-(C₁-C₆)alquilenio-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquilenio-C(O)NRR', CO₂-(C₁-C₆)alquilenio-OR, CO₂-(C₁-C₆)alquilenio-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquilenio-OR, C(O)NH-(C₁-C₆)alquilenio-NRR' o NHC(O)R.
- 45 **[0015]** Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I), L¹ es alquilenio lineal o ramificado (C₁-C₆) opcionalmente sustituido por uno o más de =O, CN, C(O)R, C(O)OR, o C(O)NRR'; o alquilenio lineal o ramificado CH₂(C₁-C₆), donde el último alquilenio (C₁-C₆) está opcionalmente sustituido por uno o más de halógeno, OR, NRR' o CF₃.
- 50 **[0016]** Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I), R² es un alquilenio ramificado (C₁-C₆) lineal o y está vinculado con R⁵ = lineal o ramificado alquilenio (C₁-C₆) alquilenio para formar con -X- (CR³R⁴) n-N-, al que están unidos, un heterociclo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de OR, alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', o =O.
- 55 **[0017]** Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I), R⁷ es OR, OR⁹, halógeno, lineal o ramificado (C₁-C₆) alquilo-OR, C(O)OR, C(O)NRR' o CN. Más preferiblemente R⁷ es OR, OR⁹. Más preferiblemente R⁷ es OH o OR⁹, preferiblemente OH.
- [0018]** R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o

más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R o C(O)NRR'.

[0019] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I), A se elige de entre el grupo que consiste en:

- C(O)-;
- C(O)NH-;
- SO₂-; o
- SO₂N-.

[0020] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I), L² es (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHO.

[0021] Preferiblemente, se debe entender que L₂ no representa O-(C₁-C₆)alquileo.

[0022] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I):

- NR⁵ está unido directamente a al menos uno de los grupos C(O), C(O)N, SO₂ o SO₂N; y/o
- i=0, n es 1, 2 o 3 y el CR³R⁴ enlazado a NR⁵ es C(O); o i=1, A es -C(O)-, C(O)NH, SO₂ o SO₂N; y/o
- i=0, n es 1, 2 o 3 y el CR³R⁴ unido a NR⁵ es C(O); o i=1, A es -C(O)-, C(O)NH, SO₂ o SO₂N, X es CR²R⁷ o NR² y R² y R⁵, idéntico o diferente, son alquileo lineal o ramificado (C₁-C₆) y forman junto con -X-(CR³R⁴)_n-N-, al que están unidos, un heterociclo de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de OR, alquilo lineal o sustituido (C₁-C₆), halógeno, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR' y R³, R⁴, cada uno idéntico o diferente, son elegidos en el grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (C₁-C₆), halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR'; y/o
- i=1 y A es -C(O)-, X es CR²R⁷ o NR² y R² y R⁵, idénticos o diferentes, son alquileo lineal o ramificado (C₁-C₆) y forman junto con -X-(CR³R⁴)_n-N-; a los que están unidos, un heterociclo de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de OR, alquilo lineal o ramificado (C₁-C₆), halógeno, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR' y R³, R⁴, cada uno idénticos o diferentes, se eligen en el grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (C₁-C₆), halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR'; y/o
- R¹, cada uno idénticos o diferentes, se selecciona de entre el grupo que consiste en alquilo lineal o ramificado (C₁-C₆), halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', o NHC(O)R; y/o
- R¹, cada uno idénticos o diferentes, se selecciona de entre el grupo que consiste en (alquilo) lineal o ramificado C₁-C₆, halógeno, OH o alquilo lineal o ramificado -O-(C₁-C₆); y/o
- R¹, cada uno idénticos o diferentes, se selecciona de entre el grupo que consiste en halógeno o alquilo lineal o ramificado -O-(C₁-C₆); y/o
- q es 0, 1 o 2; y/o
- X es CR²R⁷ o NR² y R² y R⁵, idénticos o diferentes, son (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado para formar con -X-(CR³R⁴)_n-N-, al que están unidos, un heterociclo, preferiblemente un heterociclo con entre 5 y 7 miembros, opcionalmente sustituido por uno o más de OR, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, o C(O)NRR'. Preferiblemente, el heterociclo formado por -XR²-(CR³R⁴)_nNR⁵- es un heterociclo no aromático; y/o
- R³, R⁴, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, =O, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR'; y/o
- R³, R⁴, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, -O-(C₁-C₆)alquilo, OH y =O. Preferiblemente, R³, R⁴, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H y OH; y/o
- X es CR²R⁷, o arilo y R⁷ es OR, OR⁹, (C₁-C₆)alquilo-OR lineal o ramificado, halógeno, C(O)OH, NRR', C(O)NH₂ o SR. Preferiblemente, X es CR²R⁷, o arilo y R⁷ es OR, OR⁹, NRR' o SR. Más preferiblemente, R⁷ es OH o OR⁹, preferiblemente OH. R⁹ es como se define anteriormente; y/o
- X es un arilo, preferiblemente fenilo y/o
- L¹ es (alquileo) lineal o ramificado C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más =O o es (alquileo) lineal o ramificado CH₂-C₁-C₆, donde el último alquileo es opcionalmente sustituido por uno o más -OH; y/o
- L² es C₁-C₆(alquileo)-O lineal o ramificado o C₁-C₆ (alquileo) lineal o ramificado opcionalmente

interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O o S y/u opcionalmente sustituido por uno o más de: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHOR;. Más preferiblemente L² es C₁-C₆(alquilenos) lineal o ramificado o -(C₁-C₆(alquilenos))-O- lineal o ramificado; y/o

- 5 — R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo o H, donde el arilo, heteroarilo o cicloalquilo está opcionalmente sustituido por halógeno, O-(C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado; y/o
- R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en fenilo, tiofenilo, ciclopentilo y H, donde el fenilo está opcionalmente sustituido por halógeno, O-(C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado.

10

[0023] En un modo de realización, en el compuesto de fórmula (I), X es CR²R⁷ o NR² y R² y R⁵ forman junto con -X-(CR³R⁴)_n- a los que están unidos un heterociclo de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido con uno o más grupos OH. Preferiblemente, en esta realización particular, n es 0, 1 o 2 y/o X es CR²R⁷ en donde R⁷ es OR, OR⁹, (C₁-C₆)alquilo-OR lineal o ramificado, halógeno, C(O)OH, C(O)NH₂, NRR' o SR, y/o L¹ es (CH₂)_k, en donde k es 1 o 2, preferiblemente k es 1, -C(O)-, -CH₂-CH(OH)- o -CH₂-C(O)-. Preferiblemente R⁷ es OR, OR⁹, NRR' o SR. Más preferiblemente, R⁷ es OH o OR⁹, preferiblemente OH. Siendo R⁹ según se definió anteriormente.

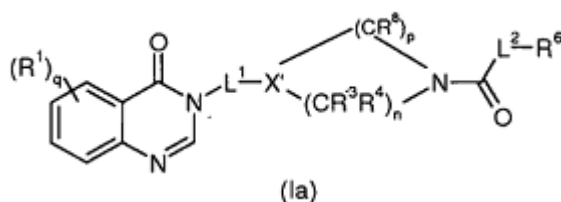
15

[0024] En otra realización, en el compuesto de fórmula (I), X es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo está opcionalmente sustituido por uno o más de C₁-C₆(alquilo) lineal o ramificado, halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR', preferiblemente X es arilo y R⁵ es H o C₁-C₆(alquilo) lineal o ramificado, preferiblemente H. Preferiblemente, en esta realización particular, n es 0 y/o X es arilo y/o L¹ es -CH₂-CH(OH)-.

20

[0025] De acuerdo con una realización particular, los compuestos pueden ser de la siguiente fórmula (Ia)

25



en la que

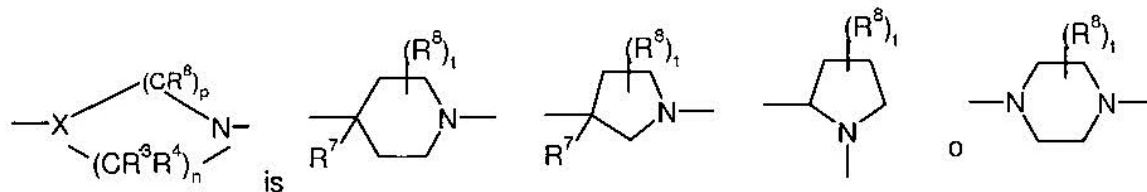
- 30 • R¹, q, L¹, L², R⁶ y R⁷ son según se define en la fórmula (I);
- X' es CR⁷ o N;
- n es 0, 1 ó 2;
- p es 1, 2 o 3;
- R³, R⁴ y R⁸, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR'.

35

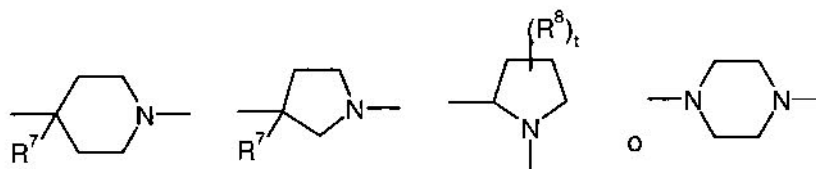
[0026] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ia), R³, R⁴ y R⁸, cada uno idénticos o diferentes, se eligen entre el grupo que consiste en H o OH; y/o p es 1 o 2.

[0027] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ia)

40

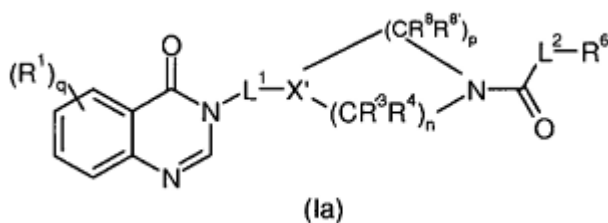


t es 0, 1 o 2, preferiblemente



donde R7 es OR, halógeno, (C₁-C₆)alquilo-OR lineal o ramificado, C(O)OR, C(O)NRR', CN, OR⁹, NRR' o SR, más preferiblemente OR, OR⁹, NRR' o SR, preferiblemente OH o OR⁹, p es 1 o 2 y R⁸ se elige en el grupo que consiste en H o OH.

[0028] De acuerdo con una realización particular, los compuestos pueden ser de la siguiente fórmula (Ia)



10

en la que

■ R¹, q, L¹, L², R⁶ y R⁷ son según se define en la fórmula (I);

■ X' es CR⁷ o N;

■ n es 0, 1 o 2;

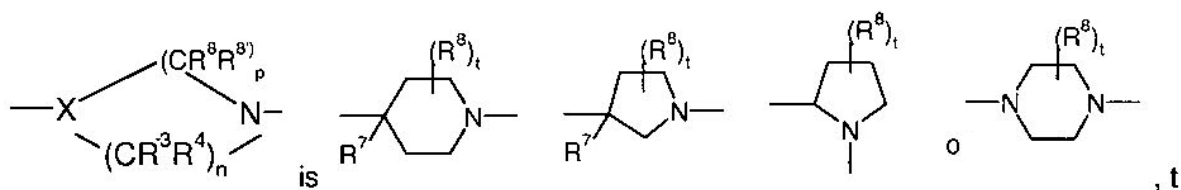
15

■ p es 1, 2 o 3;

■ R³, R⁴, R⁸ y R^{8'}, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR'.

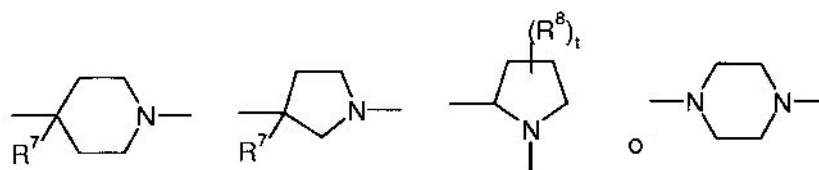
[0029] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ia), R³, R⁴, R⁸ y R^{8'}, cada uno idénticos o diferentes, se eligen entre el grupo que consiste en H o OH; y/o p es 1 o 2.

[0030] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ia)



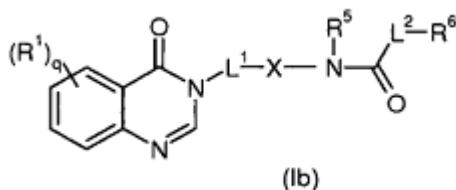
25

es 0, 1 o 2 preferiblemente



donde R^7 es OR, halógeno, (C_1-C_6) alquilo-OR lineal o ramificado, $C(O)OR$, $C(O)NRR'$, CN, OR^9 , NRR' o SR, más preferiblemente OR, OR^9 , NRR' o SR, preferiblemente OH o OR^9 , p es 1 o 2 y R^8 se elige en el grupo que consiste en H o OH.

- 5 **[0031]** De acuerdo con un modo de realización particular, los compuestos pueden ser de la siguiente fórmula (Ib)



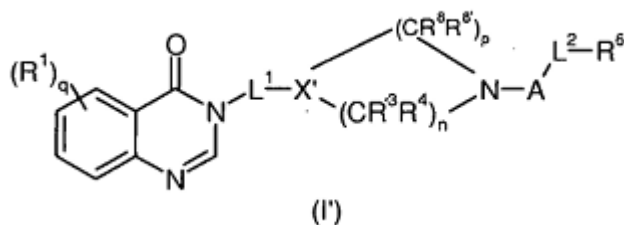
10 en la que

- R^1 , q, L^2 y R^6 son como se definen para compuestos de fórmula (I);
- X es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo, donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo está opcionalmente sustituido con uno o más de C_1-C_6 (alquilo) lineales o ramificados, halógeno, OH, $-O-(C_1-C_6)$ alquilo lineal o ramificado, NRR' , CN, CF_3 , OR, $C(O)R$, $C(O)OR$ o $C(O)NRR'$;
- 15 ■ R^5 es H o (C_1-C_6) alquilo lineal o ramificado;
- L^1 es (C_1-C_6) alquilo lineal o ramificado sustituido por uno o más OH.

[0032] Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ib), X es fenilo.

20 **[0033]** Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ib), R^5 es H.

[0034] La invención se refiere a compuestos de la siguiente fórmula (I')



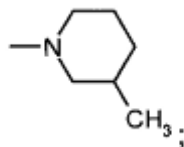
25 en la que

- R^1 , q, L^2 , R, R' y R^6 son como se definen en la fórmula (I);
- A es $-C(O)-$ o $-C(O)NH-$; L^1 es CH_2 ;
- 30 ■ X' es CR^7 ;
- R^7 es OR;
- R^9 es según se define en la fórmula (I);
- n es 1 o 2;
- p es 1, 2 o 3;

35 ■ R^3 , R^4 , R^8 y R^9 , cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C_1-C_6) alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, $-O-(C_1-C_6)$ alquilo, NRR' , CN, CF_3 , OR, $C(O)R$, $C(O)OR$ o $C(O)NRR'$;

o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros, con la excepción de

40 q es 0, L^1 es CH_2 , X' es CR^7 y R^7 es OH, i es 1, A es $C=O$, L^2 es C_2H_4 y R^6 es

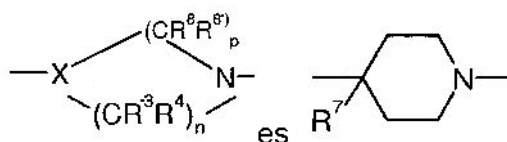


q es 1, R¹ es Cl en la posición 7, L¹ es CH₂, X' es CR⁷ y R⁷ es OH, i es 1, A es C=O, L²R⁶ es CH(CH₂CH₃)₂.

5 **[0035]** Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I'), R³, R⁴, R⁸ y R^{8'}, cada uno idénticos o diferentes, se eligen en el grupo que consiste en H o OH, y/o p es 1 o 2.

[0036] Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I') R⁷ es OR, más preferiblemente OH.

10 **[0037]** Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I') p+n = 4; más preferiblemente p es 2 y n es 2. Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (I')



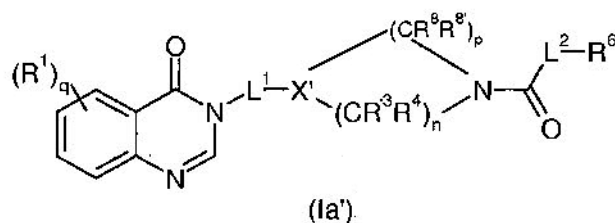
15 **[0038]** Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I') p es 2 y n es 2, R⁷ es OR, por ejemplo OH.

[0039] Preferiblemente, en el de fórmula (I') p es 2 y n es 2, y L¹ es CH₂.

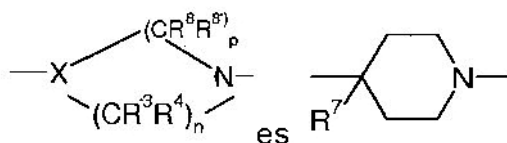
20 **[0040]** Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I') L¹ es CH₂ y R⁷ es OR, por ejemplo OH.

[0041] Preferiblemente, en los compuestos de fórmula (I') p es 2 y n es 2, L¹ es CH₂, R⁷ es OR, por ejemplo OH.

[0042] De acuerdo con un modo de realización particular, en los compuestos de fórmula (I') A es C=O, el compuesto es por lo tanto de la siguiente fórmula (Ia')

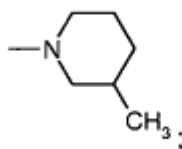


30 en la que R¹, q, L¹, n, p, X', R³, R⁴, R⁸, R^{8'}, L², R⁶ y R⁷ son según se define en la fórmula (I'). Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (Ia')



[0043] De acuerdo con un modo de realización específico, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) como se define anteriormente con la excepción del siguiente compuesto:

- 5 — q es 0, L¹ es CH₂, X-(CR³R⁴)_n-NR⁵ forma una piperidina, X es CR²R⁷ y R⁷ es OH, i es 1, A es C=O, L² es C₂H₄ y R⁶ es



- 10 — q es 1, R¹ es Cl en la posición 7, L¹ es CH₂, X-(CR³R⁴)_n-NR⁵ forma una piperidina, X es CR²R⁷ y R⁷ es OH, i es 1, A es C=O, L²R⁶ es CH(CH₂CH₃)₂.

[0044] De acuerdo con un modo de realización específico, los compuestos de fórmula (I) se eligen entre:

- 15 3-({4-hidroxi-1-[3-(2-metoxifenil)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 7-cloro-3-{{1-(2-etilbutanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{1-[2-(3-fluorofenoxi)acetil]-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-6,7-dimetoxi-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona 4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-
 il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 20 7-cloro-3-{{1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 7-cloro-3-{{4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 25 7-cloro-3-({4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-({4-hidroxi-1-[3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-{{1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-7-cloro-3,4-dihidroquinazolin-4-ona,
 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros
 o tautómeros.

[0045] Tal como se usa aquí anteriormente o en lo sucesivo:

- 35 "Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono en la cadena. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquilo lineal. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, 3-pentilo.

- [0046]** Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalquilo" se refiere un anillo monocíclico no aromático o anillo hidrocarbonado multicíclico de 3 a 10 átomos de carbono formados por la eliminación de un átomo de hidrógeno.
 40 Una designación tal como "C₅-C₇ cicloalquilo" se refiere a un radical cicloalquilo que contiene de 5 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentilo, adamantilo, así como los sistemas formados por su condensación o mediante la condensación con un grupo fenilo.

- [0047]** "Alken" o alqueno significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alqueno preferidos tienen de 2 a 6 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, n-pentenilo.

- 50 **[0048]** "Átomo de halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o átomo de yodo; preferiblemente flúor y átomo de cloro.

[0049] "Ariilo" significa un sistema aromático monocíclico o multicíclico de anillo de hidrocarburo de 6 a 14

átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono, sustituido o no. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo o naftilo.

[0050] Tal como se utiliza aquí, los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a anillos saturados, 5 parcialmente insaturados o insaturados, no aromáticos estables de 3 a 14 miembros, preferiblemente de 5 a 10 miembros, mono, bi o multicíclicos donde al menos un miembro del anillo es un heteroátomo, sustituido o no. Típicamente, los heteroátomos incluyen oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio, y átomos de fósforo. Los heteroátomos preferibles son oxígeno, nitrógeno y azufre.

10 **[0051]** Los heterociclos adecuados también se describen en The Handbook of Chemistry and Physics, 76th Edition, CRC Press, Inc., 1995-1996, p. 2-25 to 2-26. Un ejemplo de heterociclo aromático es tiofenilo.

[0052] Los heterocíclicos no aromático preferidos incluyen pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, oxiranilo, tetrahidrofuranilo, dioxolanilo, tetrahidro-piranilo, dioxanilo, dioxolanilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, piranilo, 15 imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiopiranilo, ditianilo, tiomorfolinilo, dihidro-piranilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidro-piridilo, dihidropiridilo, tetrahydropyridinyl, dihidrotiopiranilo, azepanilo, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo, cada uno sustituido o no.

[0053] Tal como se utiliza aquí, el término "heteroarilo" o heterociclos aromáticos se refiere a un anillo de 5 a 20 14 miembros, preferiblemente de 5 a 10 miembros, hetero aromático mono-, bi- o multicíclico. Los ejemplos incluyen pirrolilo, piridilo, pirazolilo, tienilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, indolilo, quinolinilo, purinilo, imidazolilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, triazolil, tetrazolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, carbazolilo, bencimidazolilo, isoxazolilo, piridilo N-óxido, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

25 **[0054]** "Alquilo", "cicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" se refieren también a los correspondientes "alquilenos", "cicloalquilenos", "arilenos", "heteroarilenos", "heterociclenos" que se forman por la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Alquilo y alquileno se utilizan aquí de forma intercambiable.

30 **[0055]** Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere a un animal, tal como un animal valioso para la reproducción, para la empresa o a efectos de conservación, o preferiblemente un ser humano o un niño humano, que padece, o tiene el potencial de padecer una o más enfermedades y condiciones descritas en el presente documento.

35 **[0056]** En la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz para prevenir, reducir, eliminar, tratar o controlar los síntomas de las enfermedades y condiciones descritas en el presente documento. El término "control" pretende referirse a todos los procesos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención, o parada de la progresión de las enfermedades y condiciones descritas en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación 40 total de todos los síntomas de la enfermedad y condición e incluye el tratamiento profiláctico.

[0057] En la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, 45 respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

[0058] Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica haciendo sales ácidas o básicas del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio 50 cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, por ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, incluyendo mono, di o tri-sales de los mismos; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucorónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico. 55 Otras sales de adición incluyen sales de amonio tales como trometamina, meglumina, epolamine, sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio.

[0059] Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales.

Generalmente, tales sales se pueden preparar por reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 2000.

[0060] También se describe el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I).

[0061] Los compuestos y el procedimiento de la presente invención se pueden preparar en un número de maneras bien conocidas por los expertos en la técnica. Los compuestos se pueden sintetizar, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los procedimientos descritos a continuación, o variaciones de los mismos como pueden apreciar los expertos en la materia. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán fácilmente evidentes y bien conocidas o fácilmente obtenibles a partir de la literatura científica para los expertos en la técnica.

[0062] En particular, tales procedimientos se pueden encontrar en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

[0063] Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos y pueden ser aislados en formas ópticamente activas o racémicas. Por lo tanto, se incluyen todas las formas racémicas, diastereoméricas, formas isoméricas quirales de una estructura, a menos que la estereoquímica específica o forma isomérica se indique específicamente. Es bien conocido en la técnica cómo preparar y aislar tales formas ópticamente activas. Por ejemplo, las mezclas de estereoisómeros se pueden separar mediante técnicas estándar, incluyendo resolución de formas racémicas, de fase inversa normal y cromatografía quiral, formación de sal preferencial, recristalización, o mediante síntesis quiral o bien a partir de materiales de partida quirales o mediante síntesis deliberada de centros objetivo quirales.

[0064] Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por una variedad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están comercialmente disponibles, o se sintetizan fácilmente por técnicas bien conocidas por un experto en la materia. Todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, se definen como se ha hecho anteriormente.

[0065] En las reacciones descritas en adelante puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, cuando éstos se deseen en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Los grupos protectores convencionales se pueden usar de acuerdo con la práctica estándar, para ejemplos véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en Protective Groups in Organic Chemistry, 4th ed.(2007), John Wiley & Sons Inc., 1999; J. F. W. McOmie en Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973.

[0066] Algunas reacciones se pueden llevar a cabo en presencia de una base. No hay restricción particular en la naturaleza de la base a utilizar en esta reacción, y cualquier base utilizada convencionalmente en reacciones de este tipo puede ser igualmente utilizada aquí, siempre que no tenga ningún efecto adverso sobre otras partes de la molécula. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen: hidróxido de sodio, carbonato de potasio, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, tales como hidruro de sodio e hidruro de potasio; compuestos de alquil-litio, tales como metil-litio y butil-litio; y alcóxidos de metales alcalinos, tales como metóxido de sodio y etóxido de sodio.

[0067] Por lo general, las reacciones se llevan a cabo en un disolvente adecuado. Pueden utilizarse diversos disolventes, siempre que no tengan ningún efecto adverso sobre la reacción o sobre los reactivos implicados. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen: hidrocarburos, que pueden ser hidrocarburos aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xileno; amidas, tales como dimetilformamida; alcoholes tales como etanol y metanol y éteres, tales como éter dietílico y tetrahidrofurano.

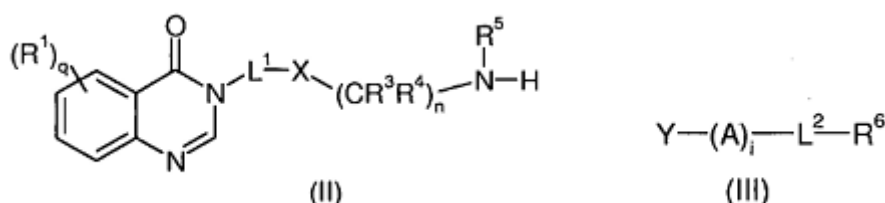
[0068] Las reacciones pueden tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas. En general, se encuentra conveniente llevar a cabo la reacción a una temperatura de 0 °C a 150 °C (más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente a 100 °C). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, sobre todo la temperatura de reacción y la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, siempre que la reacción se efectúe en las condiciones preferidas subrayadas antes, un período de 3 horas a 20 horas será normalmente suficiente.

[0069] El compuesto así preparado se puede recuperar de la mezcla de reacción por medios convencionales.

Por ejemplo, los compuestos se pueden recuperar por destilación del disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario, después de separar por destilación el disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de extracción con un disolvente orgánico inmiscible con agua y eliminación por destilación del disolvente del extracto. Además, el producto puede, si se desea, purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, concretamente, cromatografía de columna o cromatografía en capa fina preparativa.

[0070] También se describe el proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I).

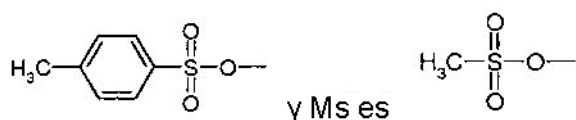
10 **[0071]** De acuerdo con un primer aspecto, un compuesto de fórmula (I) se puede obtener por reacción de un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III) con el fin de formar aminas secundarias o terciarias, carboxamidas, urea, sulfonamidas o tioureas,



15 en la que R^1 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X , A , q , n e i son según se define anteriormente en la fórmula (I), Y es un grupo saliente.

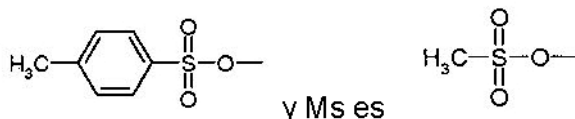
20 **[0072]** El grupo saliente es tal que las funciones reactivas de compuestos (II) y (III) llevan al grupo $-NR^5-(A)_i$ como en la fórmula (I).

[0073] Preferiblemente, el grupo saliente Y se elige entre halógeno, OH, OH activado tal como un grupo de $R-S(O)_2O-$, en el que R es un arilo o un lineal o ramificado C_1-C_6 -(alquilo). Preferiblemente, $R-S(O)_2O-$ es un grupo TS o Ms- con Ts es



[0074] Más específicamente, cuando el grupo que consiste en $-NR^5-(A)_i$ en los compuestos (I) es:

30 ■ Aminas secundarias o terciarias: Y es un grupo saliente elegido entre halógeno, OH, OH activado tal como un grupo de $R-S(O)_2O-$, en el que R es un arilo o un lineal o ramificado C_1-C_6 -(alquilo). Preferiblemente, $R-S(O)_2O-$ es un grupo TS o Ms- con Ts es



35 e $i = 0$. Generalmente, estas reacciones son alquilaciones, reacciones de Mitsunobu y se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica; o

40 ■ Carboxamidas: Y y A forman un cloruro de ácido o un ácido carboxílico. Generalmente, cuando Y es OH, i es 1 y A es $C(O)$, se utilizan condiciones de reacción de acoplamiento peptídico;

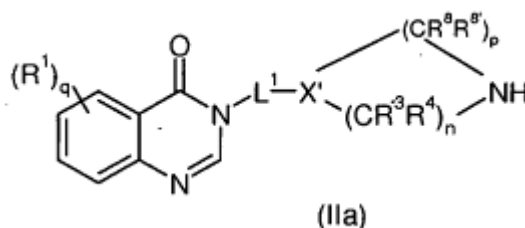
[0075] Generalmente, cuando Y es OH, i es 1 y A es $C(O)$ esta reacción se lleva a cabo en presencia de reactivos de acoplamiento tales como EDCI (1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida cloridrato) y HOBt (N-

hidroxibenzotriazol), con o sin una base (por ejemplo, ET_3N) en un disolvente aprótico como diclorometano o dimetilformamida

o

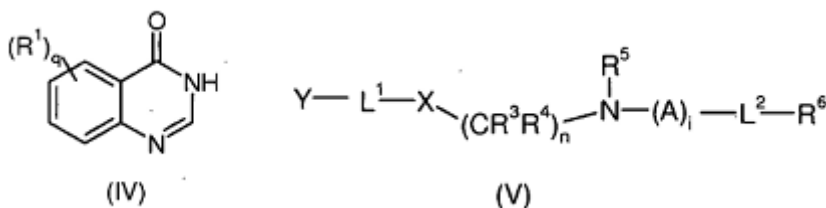
- Ureas: Y y A forman un isocianato; o
- Sulfonamidas: Y y A forman un cloruro de sulfonilo; o
- Tioureas: Y y A forman un tioisocianato.

[0076] Preferiblemente, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIa)



en la que R^1 , q , L^1 , X' , R^8 , $\text{R}^{8'}$, p , R^3 , R^4 y n son según se define por las fórmulas (I') y (Ia').

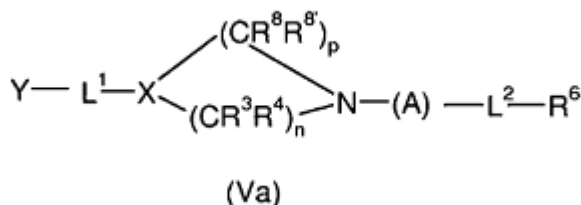
[0077] De acuerdo con un segundo aspecto, un compuesto de fórmula (I) también se puede obtener por reacción de un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V)



en la que R^1 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X , q , n e i son según se define anteriormente e Y es un grupo saliente.

[0078] Preferiblemente, Y se selecciona de entre epoxi, halógeno, OH activado como se definió anteriormente.

[0079] Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (V) es un compuesto de fórmula (Va)



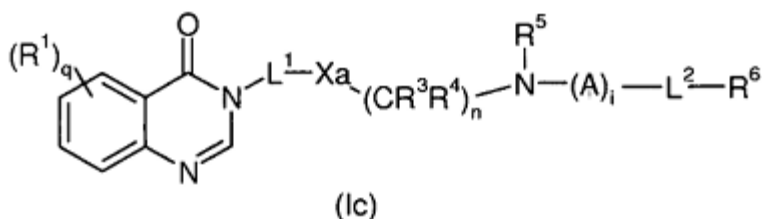
en la que X , R^8 , $\text{R}^{8'}$, p , R^3 , R^4 , n , A , L^2 y R^6 son según se define en las fórmulas (I') y (Ia').

[0080] Esta reacción se lleva a cabo generalmente en presencia de una base, preferiblemente una base inorgánica y en un disolvente, preferiblemente un disolvente polar aprótico.

[0081] Los compuestos de fórmula (III) y (IV) están disponibles comercialmente o pueden ser preparados por la persona experta en la técnica basándose en su conocimiento general de la química orgánica.

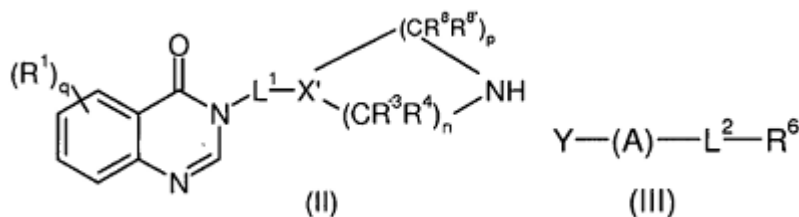
[0082] Los compuestos de fórmula (II) y (V) se obtienen como se describe en el procedimiento general incluido a continuación.

5 **[0083]** De acuerdo con un tercer aspecto, un compuesto de fórmula (I) también se puede obtener por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula (Ic)



10 Donde, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , q , n e i son como se define para la fórmula (I) y X_a es un grupo precursor de X . El compuesto de fórmula (Ic) se puede obtener a partir de compuestos correspondientes de fórmula (IIc) y (IIIc) o (IVc) y (Vc), respectivamente, por analogía con los compuestos de fórmula (I) como se ha dicho anteriormente. La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con la invención que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III)

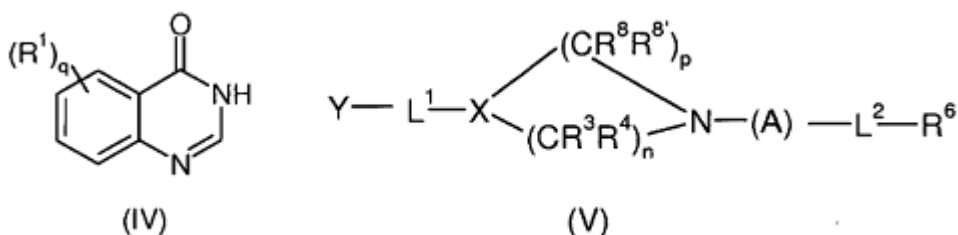
15



en la que R^1 , R^8 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X' , A , q , n son según se define anteriormente, Y es un grupo saliente.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con la invención que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V)

20



donde R^1 , R^8 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X' , q , n son según se define anteriormente e Y es un grupo saliente elegido de entre epoxi, halógeno, OH activado.

25

[0084] El término "precursor" se utiliza aquí para referirse a compuestos que difieren de los compuestos indicados o deseados por la presencia y/o ausencia de grupos o funciones. Tales grupos o funciones pueden ser introducidos, transformados y/u omitidos por reacciones de funcionalización comunes, conocidas por la persona experta.

30

[0085] La reacción de funcionalización puede llevarse a cabo por aplicación o adaptación de procedimientos

conocidos.

[0086] Preferiblemente, el grupo precursor es tal que permite obtener X partiendo de Xa, en una o más etapas, tal como por ejemplo por reducción, amidificación, oxidación, hidrólisis, esterificación.

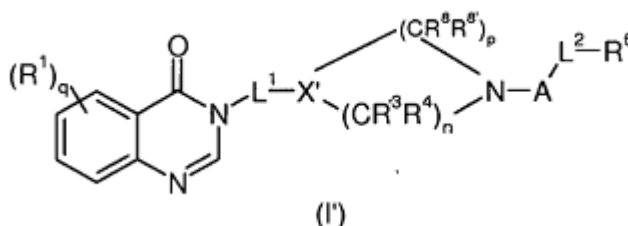
[0087] Las reacciones anteriores pueden ser llevadas a cabo por el experto en la materia mediante la aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrados en los ejemplos de aquí en adelante.

[0088] Además, el proceso de la invención también puede comprender la etapa adicional de aislar el compuesto de fórmula (I), (I'), (Ia), (Ib) o (I'a). Esto puede hacerlo el experto por cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los procedimientos de recuperación descritos anteriormente.

[0089] En general, los productos de partida están disponibles comercialmente, y pueden obtenerse principalmente de Aldrich o Acros u otro proveedor de productos químicos típico o pueden obtenerse por aplicación o adaptación de cualquier procedimiento conocido o aquellos descritos en los ejemplos.

[0090] También se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib) tal como se definen anteriormente, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0091] Los modos de realización preferidos de fórmula (I), (Ia), (Ib) son como se definen anteriormente con respecto a los compuestos y de acuerdo a cualquiera de las características o modos de realización preferidos. La presente invención también se refiere a la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I')



en la que

■ R^1 , cada uno idénticos o diferentes, se seleccionan de entre el grupo que consiste en halógeno, R, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', NO₂ (C₁-C₆)alquilenos-OR, (C₁-C₆)alquilenos-NRR', (C₁-C₆)alquilenos-CO₂R, (C₁-C₆)alquilenos-CONRR', -O-(C₁-C₆)alquilenos-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquilenos-CONRR', CO₂-(C₁-C₆)alquilenos-OR, CO₂-(C₁-C₆)alquilenos-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquilenos-OR, CONH-(C₁-C₆)alquilenos-NRR', OCF₃, SO₂R, SO₃H, SO₂NRR', NHSO₂R, R¹⁰C=CR¹¹, (R¹⁰)(R¹¹)C=C(R¹¹)₂, (C₁-C₆)alquilenos-COR, NHCOR o (C₁-C₆)alquilo interrumpido por al menos un heteroátomo, elegido entre O, N o S;

■ L' es CH₂;

■ q es 0, 1, 2, 3 o 4

■ X' es CR⁷;

■ R⁷ es OR;

■ n es 1 o 2;

■ p es 1, 2 o 3;

■ R³, R⁴, R⁵ y R⁶, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR';

■ A se elige de entre el grupo que consiste en:

-C(O)-;

-C(O)NH-;

■ L² es (C₁-C₆)alquilenos lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHO

■ R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el

arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, OR, =O, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R, (C₂-C₆)alquenileno lineal o ramificado o C(O)NRR';

- 5 ■ cada R y R', idénticos o diferentes, se eligen independientemente de H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo, heterociclo aromático o no aromático, -(C₁-C₆)alquilarilo lineal o ramificado o -(C₁-C₆)alquilheterociclo lineal o ramificado, en donde el heterociclo es aromático o no aromático; opcionalmente sustituido o no por OH, CO₂H, C(O)NH₂, NH₂

■ R¹⁰ se elige independientemente entre un enlace, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado;

- 10 ■ R¹¹ se elige independientemente entre un átomo de hidrógeno, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado o un arilo, estando el alquilo o arilo opcionalmente sustituidos por OH, NH₂, C(O)OH o C(O)NH;

o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros, con un excipiente farmacéutico aceptable.

Los compuestos de fórmula (I') son preferentemente los que se han definido anteriormente.

- 15 Preferiblemente, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con las reivindicaciones 15 a 19. La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas de acuerdo con los compuestos de fórmula (I') o (I'a) como se describe anteriormente.

La presente invención también se refiere al uso in vitro de un compuesto de fórmula (I') como se define anteriormente para la inhibición de una enzima desubiquitinante.

- 20 La invención también se refiere al uso in vitro de un compuesto de fórmula (I') como se define anteriormente para la inhibición de USP7 (proteasa específica de ubiquitina 7) / HAUSP (proteasa específica de ubiquitina asociada al herpes).

- 25 **[0092]** De acuerdo con un objeto adicional, se describe un compuesto de fórmula (I) para inhibir la proteasa de cisteína.

[0093] Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I), (Ia), (Ib) permiten una inhibición selectiva y reversible de la proteasa de cisteína.

- 30 **[0094]** Los compuestos de fórmula (I') o (I'a) como se define anteriormente son ventajosos para inhibir la proteasa de cisteína.

[0095] Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I') o (I'a) como se define anteriormente permiten una inhibición selectiva y reversible de la proteasa de cisteína.

35

[0096] Los compuestos y la composición farmacéutica de la invención son útiles para la inhibición de proteasas de cisteína, en particular, enzimas específicas de desubiquitinación como USP, y más particularmente USP-7 en pacientes que los necesiten.

- 40 **[0097]** Los compuestos y la composición farmacéutica de la invención son particularmente útiles para tratar y/o prevenir el cáncer y la metástasis, más particularmente de próstata y/o el cáncer de colon, enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos inmunológicos, enfermedades óseas y de las articulaciones, trastornos de la osteoporosis, la artritis inflamatoria, enfermedades cardiovasculares, infecciones virales y enfermedades, y/o infectividad y/o latencia viral, infecciones bacterianas y
- 45 enfermedades.

[0098] La composición farmacéutica y el compuesto de la invención se pueden utilizar en pacientes que no tienen placas beta-amiloides que actúan sobre la demencia senil, especialmente, la enfermedad de Alzheimer.

- 50 **[0099]** En particular, dichas infecciones virales y las enfermedades se eligen de infecciones virales del herpes simple 1 o 2, hepatitis A, hepatitis C, infección y enfermedad por coronavirus SARS, el virus de Epstein-Barr, infecciones y enfermedades rinovirales, infecciones y enfermedades adenovirales, poliomielititis.

[0100] Según un aspecto, dichos compuestos inhiben una o más cisteína proteasas virales.

55

[0101] Las cisteína proteasas bacterianas pueden ser elegidas entre streptopaína, clostripaína, cisteína proteasa estafilocócica, gingipaína.

[0102] La presente invención también se refiere a las combinaciones que comprenden un compuesto de

fórmula (I') o (I'a) como se define anteriormente con uno o más agentes activos elegidos de entre agentes contra el cáncer, agentes neurológicos, agentes trombolíticos, agentes antioxidantes, anti-infeccioso, agentes anti-hipertensivos, agentes diuréticos, agentes trombolíticos, agentes inmunosupresores, agentes cardiovasculares, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes antibacterianos.

5

[0103] Se describen también los procedimientos correspondientes de tratamiento que comprenden la administración de un compuesto de la invención junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable a un paciente que los necesiten.

10 **[0104]** Según la invención, los términos "paciente" o "paciente que lo necesite", están destinados a un animal o un ser humano afectado o susceptible de ser afectado por un estado patológico que implique una proteasa de cisteína activa en su patogénesis. Preferiblemente, el paciente es humano.

15 **[0105]** La identificación de los sujetos que necesiten tratamiento para las enfermedades y condiciones descritas aquí entra dentro de la capacidad y conocimiento de un experto en la técnica. Un veterinario o un médico experto en la técnica pueden identificar fácilmente, mediante el uso de pruebas clínicas, examen físico e historial médico/familiar o ensayos biológicos y de diagnóstico, a los sujetos que necesiten tal tratamiento.

20 **[0106]** "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto/medicamento de acuerdo con la presente invención eficaz en la prevención o el tratamiento de una condición patológica que requiere la inhibición de una cisteína proteasa activa involucrada en su patogénesis.

25 **[0107]** Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada fácilmente por el médico encargado, como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz, una serie de factores son considerados por el médico encargado, entre ellos: la especie del sujeto; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica en cuestión; el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del sujeto concreto; el compuesto particular administrado; el modo de administración; la característica de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis elegido; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

30 **[0108]** La cantidad de un compuesto de fórmula (I), (I'), (Ia), (Ib) o (I'a), que se requiere para lograr el efecto biológico deseado, variará dependiendo de un número de factores, incluyendo las características químicas (por ejemplo hidrofobicidad) de los compuestos empleados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la que el paciente pertenece, el estado de enfermedad del paciente, la vía de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la ruta elegida, todos los factores que dictan las cantidades de dosis requeridas, el suministro y el régimen que ha de administrarse.

35 **[0109]** "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro tipo cuando se administran a un animal o un ser humano, según corresponda.

40 **[0110]** Como se usa en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier portador, diluyentes, adyuvantes, o vehículos, tales como agentes conservantes o agentes antioxidantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos de suspensión, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos

50 suplementarios en las composiciones como combinaciones terapéuticas adecuadas.

[0111] En el contexto de la invención, los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en este documento, significan invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a los que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

55

[0112] En términos generales, los compuestos de esta invención se pueden proporcionar en una solución tampón fisiológica acuosa que contiene de 0,1 a 10% w/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicos son de 1 g/kg y 0,1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal por día o una dosis equivalente en un niño humano. La dosificación

preferida de fármaco a administrar es probable que dependa de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto elegido, la formulación del compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular, u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la ruta de entrega escogida, y la velocidad (bolo o infusión continua) y el horario de las administraciones (número de repeticiones en un período de tiempo dado).

[0113] Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados en formas de dosis unitarias, donde la expresión "dosis unitaria" significa una dosis única que puede ser administrada a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria físicamente y químicamente estable que comprende bien el compuesto activo propiamente dicho, o como una composición farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en lo sucesivo. Como tal, los intervalos de dosis diaria total típicos son de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de guía general, las dosis unitarias para seres humanos varían de 1 mg a 3.000 mg por día. Preferiblemente, el intervalo de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrados de una a seis veces al día, y aún más preferiblemente de 10 mg a 500 mg, una vez al día. Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas por mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones de dosis unitarias pueden prepararse para su uso por administración oral, particularmente en forma de comprimidos, cápsulas simples o cápsulas de gelatina blanda; o por vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, por vía tópica en ungüentos, cremas, lociones, geles o aerosoles, o por medio de parches transdérmicos.

[0114] Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

[0115] Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que se formula un compuesto de la presente invención para administración oral o parenteral.

[0116] Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, pastillas pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o un diluyente tal como almidón o lactosa; un disgregante tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden ser en forma de una cápsula dura o de cápsula blanda, que generalmente están hechas de mezclas de gelatina opcionalmente mezclada con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros materiales distintos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, revestimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otras formas de dosificación oral como jarabes o elixires pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes, y saborizantes. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de rápida disolución, de liberación modificada o de liberación sostenida, y donde tales formulaciones de liberación sostenida son preferiblemente bi-modales. Las tabletas preferidas contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio, o talco en cualquier combinación.

[0117] Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones, y emulsiones. Las composiciones líquidas también pueden incluir aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes y agentes colorantes. Los disolventes no acuosos incluyen alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. En particular el polímero de lactida biocompatible y biodegradable, el copolímero de lactida/glicólido, o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de etileno-vinilo acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas.

[0118] Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol, o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado por vía intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen,

por ejemplo, tabletas o pastillas y pueden incluir también una base aromatizada, tal como sacarosa o acacia, y otros excipientes tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para la administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria, con un portador de base sólida, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica en la piel toman preferiblemente la forma de ungüento, crema, loción, pasta, gel, spray, aerosol, o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipofílicas o soluciones acuosas tamponadas, disueltas y/o dispersadas en un polímero o un adhesivo.

10 **[0119]** La invención se ilustra adicionalmente mediante la descripción en los siguientes ejemplos y figuras para la inhibición selectiva de la actividad desubiquitinizante USP7 sobre un panel de DUB activos en condiciones fisiológicas.

15 La figura 1 muestra un gel HAUbVS competitivo por ejemplo 2 y el ejemplo 5 (12.5-25-50-100-200 μ M) usando el proteoma HEK293.

La figura 2 muestra geles HAUbVS competitivos comparando la actividad del ejemplo 2 y el ejemplo 5 contra USP7 y enzimas desubiquitinizantes adicionales (USP8, USP5, USP10, CYLD, UCH-L3) mediante el proteoma HEK293.

20 La figura 3 muestra experimentos dependientes del tiempo con USP7 y el ejemplo 2.

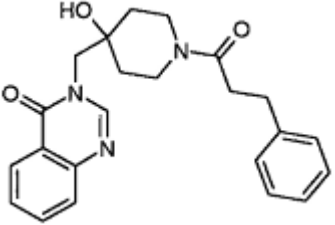
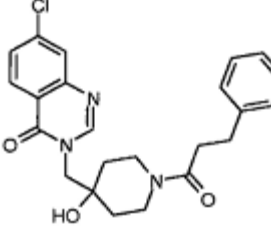
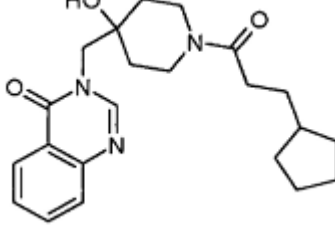
La figura 4 muestra los resultados de reversibilidad obtenidos tras unos experimentos de filtración en gel con USP7 en presencia del ejemplo 2 y el ejemplo 3.

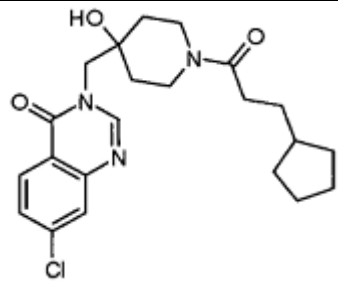
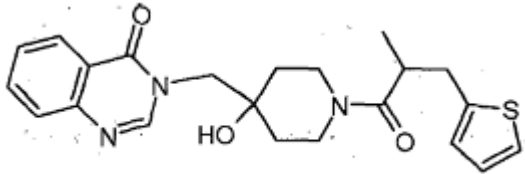
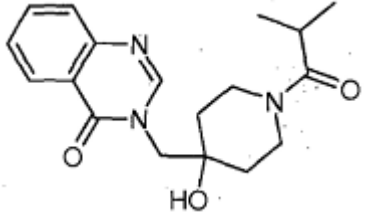
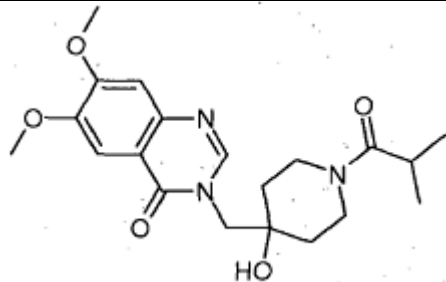
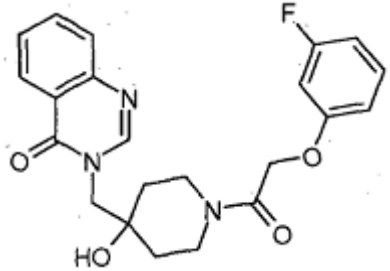
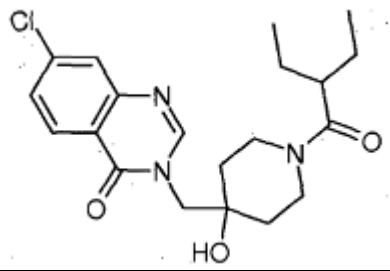
La figura 5 muestra los resultados de reversibilidad obtenidos tras la dilución rápida y amplia de USP7 en presencia del ejemplo 2 y el ejemplo 3.

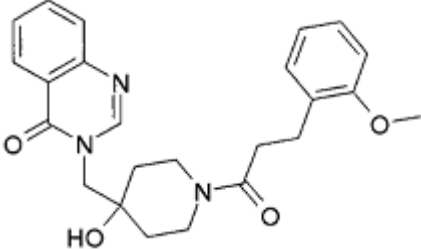
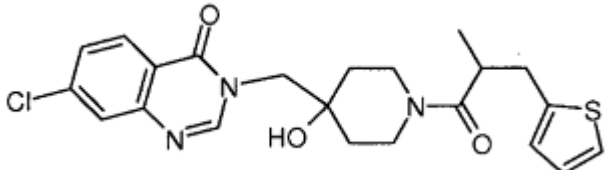
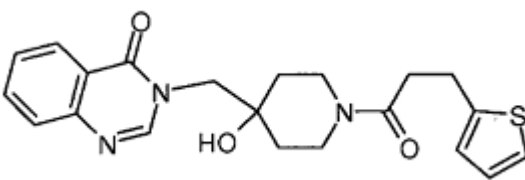
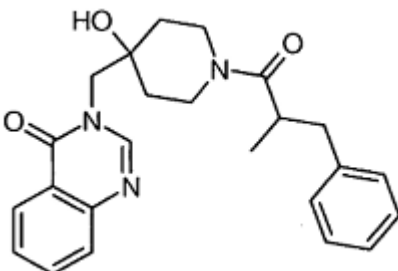
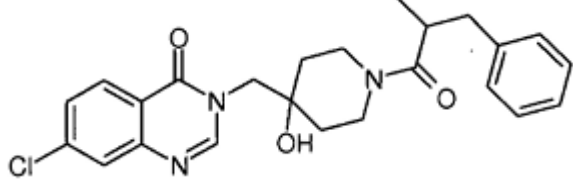
25 La figura 6 representa la caracterización de complejos que implican USP7 y los ejemplos 1 y 2, tal y como se evaluaron por ESI-MS en condiciones nativas.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

30 **[0120]** Los compuestos representativos de la invención se resumen en la siguiente tabla:

Fórmula	Ejemplo
	1
	2
	3

	4
	5
	6
	7
	8
	9

	10
	11
	12
	13
	14

[0121] Los compuestos representativos de la invención se pueden sintetizar de acuerdo con los siguientes procedimientos.

5 **Procedimientos analíticos generales**

[0122] Los espectros de RMN se registraron a 300 o 400 MHz para ^1H y a 75 o 100 MHz para ^{13}C en un espectrómetro Bruker o Varian con CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$ (dimetilsulfóxido) como disolvente. Los desplazamientos químicos se dan en ppm, referidos al TMS (trimetilsilil) interno o a la señal de disolvente deuterado.

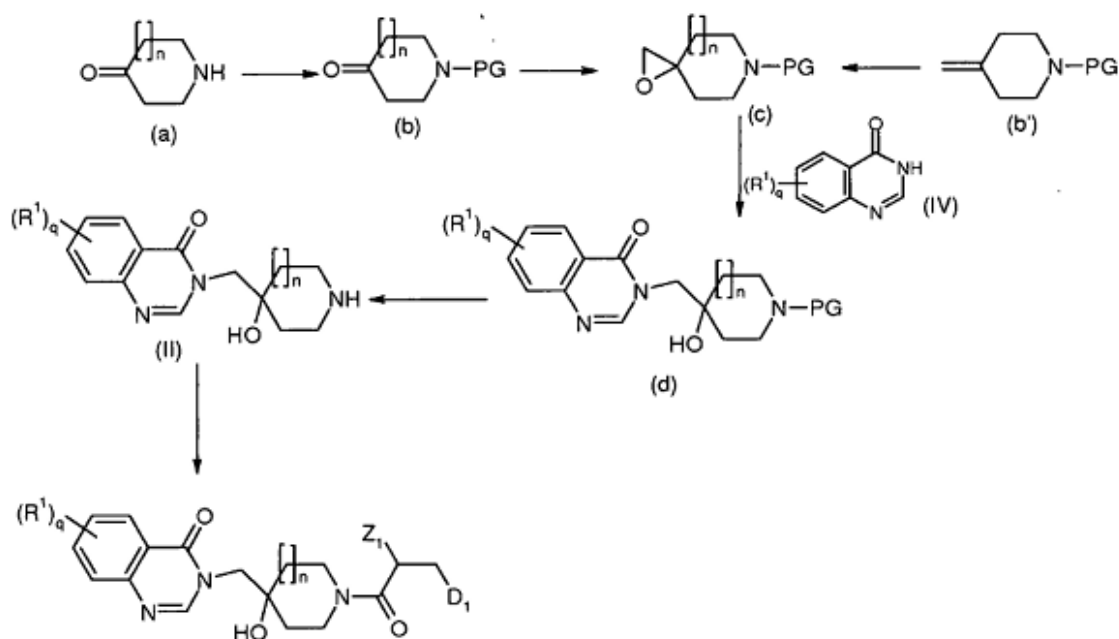
10

[0123] Se utilizó el análisis LC-MS para analizar y purificar los compuestos de interés. Se realizaron análisis LC-MS utilizando un Micromass Waters, Bruker Esquire 3000 (ESI-IT) o espectrómetros de masas Agilent Iontrap XCT-Plus y Waters Alliance 2790 o sistemas LC Agilent Serie 1100 con detección de UV y/o DAD. Columnas: Waters Xterra MS C18, 30 x 2,1 mm (3,5 micras), Atlantis T3 C18, 3 micras, 50 mm x 2,1 mm o Inertsil C8, 250 mm, 4,6 mm, 5µm. Velocidades de flujo: 0,8-1,2 ml/min, Gradientes a) agua 10% de MeOH (metanol), formiato de amonio 10 mM, a 100% de MeOH o b) 95% de agua-acetonitrilo, 0,1% HCOOH al 95% de acetonitrilo). Detección UV: 190-400 nm. Todos los compuestos fueron de > 95% de pureza.

15

Procedimiento representativo 1:*Preparación de los Ejemplos 1-14*

5 [0124]

**Esquema de Reacción 1**

10

[0125] se obtienen compuestos de fórmula (c) o bien a partir del compuesto (b) mediante una reacción de Corey-Chaykovsky como se describe en J. Amer. Chem. Soc. 1965, 87, 1353-1364 y WO2005054249_o bien mediante epoxidación del doble enlace de derivados de (b'). Los compuestos (b) están comercialmente disponibles o pueden obtenerse a partir del compuesto (a) después de las reacciones de protección bien conocidos en la técnica.

15 El grupo protector (PG) es por ejemplo bencilo (Bn), benzoilo (Bz), ter-butiloxicarbonilo (BOC) o carbobenciloxi (Cbz).

[0126] La apertura del anillo de oxirano (c) con quinazolinona (IV) se lleva a cabo en presencia de una base como NaH, KF, K₂CO₃, Cs₂CO₃ cuando se calienta entre 50 y 100 °C en dimetilformamida, acetona

20

[0127] La desprotección del nitrógeno de la piperidina realizada de acuerdo con procedimientos conocidos da el compuesto (II).

[0128] La reacción de acoplamiento de péptidos se realizó de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica entre el compuesto (II) y los derivados de ácido HO-C(O)-CH₂(Z₁)-CH₂-D (compuesto III). Para algunas condiciones de ejemplos se prefirieron el EDCI (1-etil-3-[3-(dimetilamino) propil] carbodiimida), HOBt (N-hidroxibenzotriazol) y Et₃N en diclorometano (CHCl₂). La formación de enlaces amida también es posible cuando se hace reaccionar con el derivado de cloruro de ácido.

25

[0129] Los compuestos (IV) están disponibles comercialmente o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos de la bibliografía

[0130] Los siguientes compuestos se obtienen mediante la aplicación del procedimiento representativo 1:

35

- q es 0, n es 1, Z₁ es H y D₁ es fenilo (ejemplo 1, se describe en la parte experimental)
- q es 1, n es 1, R₁ es Cl, Z₁ es H y D₁ es fenilo (ejemplo 2)

- q es 0, n es 1, Z1 es H y D1 es ciclopentilo (ejemplo 3)
- q es 1, n es 1, R1 es Cl, Z1 es H y D1 es ciclopentilo (ejemplo 4)
- q es 0, n es 1, Z1 es CH3 y D1 es tiofenilo (ejemplo 5)
- q es 0, n es 1, Z1 es CH3 y D1 es H2 (ejemplo 6)
- 5 – q es 2, R1 es OMe, n es 1, Z1 es CH3 y D1 es H2 (ejemplo 7)
- ☐ q es 1, R1 es Cl, n es 1, Z1 es CH2CH3 y D1 es CH3 (ejemplo 9)
- ☐ q es 0, n es 1, Z1 es H, D1 es 2-Ome-fenilo (ejemplo 10)
- ☐ q es 1, R1 es Cl, n es 1, Z1 es CH3, D1 es tiofenilo (ejemplo 11)
- ☐ q es 0, n es 1, Z1 es H, D1 es tiofenilo (ejemplo 12)
- 10 – ☐ q es 0, n es 1, Z1 es CH3, D1 es fenilo (ejemplo 13)
- ☐ q es 1, R1 es Cl, n es 1, Z1 es CH3 y D1 es fenilo (ejemplo 14)

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

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Ejemplo 1: 3-[[4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

20

Etapas 1: Preparación de terc-butil-1-oxa-6-azaespiro[2,5]octano-6-carboxilato

[0132] A una solución agitada de 1-Boc-4-piperidona (6,1 g, 1 eq 30,6mmol,) en tetrahidrofurano (200 ml) se añadió yoduro de trimetilsulfoxonio (6,8 g, 30,6mmol, 1 eq) y terc-butoxido potásico (4,0 g, 30,6mmol, 1 eq). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 h y se concentró a vacío. El producto bruto se disolvió en AcOEt (100 ml), y se lavó con agua (100 ml). Las capas se separaron, y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre NaSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. El sólido se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 9/1) para dar el compuesto terc-butil-1-oxa-6-azaespiro[2,5]octano-6-carboxilato (3,3 g, 52%) como un sólido blanco.

30

Etapas 2: Preparación de terc-butil-4-hidroxi-4-[(4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-3-il) metil] piperidina-1-carboxilato

[0133] A una solución de 4-hidroxiquinazolina (1,65 g, 11,3 mmol, 1,1 eq) en DMF (20 ml) se añadió compuesto de la etapa 1 (2,35 g, 1 eq) y carbonato de cesio (10,34 g, 3 eq). La mezcla se calentó a 80 ° C durante la noche. La mezcla se lavó con una solución saturada de NH₄Cl, la capa acuosa se extrajo con AcOEt. El extracto orgánico se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 3/7) para dar el ter-butil-4-hidroxi-4-[(4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-3-il)metil]piperidina-1-carboxilato (1,6 g, 40%) como un aceite incoloro.

40

MS (ES+, m/z): 360.2 [M+H]⁺, 719.6 [2M+H]⁺

Etapas 3: Preparación de sal de trifluoroacetato de 3-[(4-hidroxi-piperidin-4-il)metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0134] El compuesto de la Etapa 2 (1,0 g, 2,8 mmol) se disolvió en TFA (ácido trifluoroacético) (80 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se concentró al vacío. La sal de trifluoroacetato en bruto de 3-[(4-hidroxi-piperidin-4-il)metil] -3,4-dihidroquinazolin-4-ona se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

45

MS (ES+, m/z): 260.1 [M+H]⁺

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,53 (m ancho, 1 H), 8,25 (s, 1 H), 8,27 (m ancho, 1 H), 8,17 (dd, 1 H), 7,85 (dd, 1 H), 7,70 (dd, 1 H), 7,57 (dd, 1 H), 4,07 (s, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,02 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,50 (m, 2H)

50

Etapas 4: 3-[[4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0135] A una solución de la sal de TFA de la etapa 3 (0,8 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió sucesivamente DIEA (N,N diisopropiletilamina) (0,4 ml, 2,4 mmol, 3 eq), ácido hidrocínámico (150 mg, 0,96 mmol, 1,2 eq), EDCI (306 mg, 1,6 mmol, 2 eq) y HOBt (216 mg, 1,6 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10

55

después acetato de etilo/MeOH 9/1) para dar el Ejemplo 1 (256 mg, 82%) como un sólido blanco .

MS (ES+, m/z): 392.2 [M+H]⁺

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,25 (s, 1 H), 8,17 (dd, 1 H), 7,84 (dd, 1 H), 7,69 (dd, 1 H), 7,55 (dd, 1 H), 7,21 (m, 5H), 4,96 (s, 1 H), 4,04 (m, 3H), 3,64 (m, 1 H), 3,21 (m, 1 H), 2,93 (m, 1 H), 2,80 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 1,41 (m, 4H)

5

Ejemplo 5: 3-({4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0136] A una solución de la sal de TFA de la etapa 3 del Ejemplo 1 (0,42 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadieron sucesivamente DIEA (0,37 ml, 2,12 mmol, 5 eq), 2-metil-3-(2-tienil)ácido propanoico (71 mg, 0,42 mmol, 1 eq, Organometálicos, 2002, 21, 2842), EDCI (161 mg, 0,84 mmol, 2 eq) y HOBt (114 mg, 0,84 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10 después acetato de etilo/MeOH 9/1). Una segunda purificación por cromatografía en columna se realizó usando las mismas condiciones para dar, después de evaporación del disolvente y secado bajo alto vacío el Ejemplo 5 (117 mg, 68%) como un sólido blanco.

MS (ES+, m/z): 412.2 [M+H]⁺

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,24 (s, 1 H), 8,17 (m, 1 H), 7,84 (m, 1 H), 7,70 (m, 1 H), 7,56 (m, 1 H), 7,27 (m, 1 H), 6,88 (m, 1 H), 6,82 (s, 1 H), 4,96 (s, 1 H), 4,06 (m, 1 H), 3,90 (m, 2H), 3,68 (m, 1 H), 3,20 (m, 5H), 1,34 (m, 4H), 1,02 (m, 3H).

20

Ejemplo 11 : 7-cloro-3-({4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

Etapas 1: Preparación de terc-butil 4-[(7-cloro-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-3-il)metil]-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato

25

[0137] A una solución de 7-cloro-3,4-dihidroquinazolin-4-ona (0,40 g, 2,2 mmol, 1 eq) en DMF (5 ml) se añadió compuesto de la etapa 1 del Ejemplo 1 (0,47 g, 1 eq) y cesio carbonato (2,17 g, 3 eq). La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante la noche, y después se dejó alcanzar la temperatura ambiente. La mezcla se lavó con una solución saturada de NH₄Cl, y después se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre NaSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 3/7). Se realizó una segunda purificación por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 6/4 a 0/10) para dar el ter-butil-4-[(7-cloro-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-3-il)metil]-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato (0,6 g, 68%) como un aceite incoloro.

30

Etapas 2: Preparación de sal de trifluoroacetato de 7-cloro-3 - [(4-hidroxipiperidin-4-il)metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0138] El compuesto de la etapa anterior 1 (0,6 g, 1,5 mmol) se disolvió en TFA (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se concentró al vacío. La sal de trifluoroacetato bruta de 7-cloro-3-[(4-hidroxipiperidin-4-il)metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

40

Etapas 3: 7-cloro-3-({4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0139] A una solución de la sal de TFA de la etapa anterior 2 (0,51 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (18 ml) se añadió sucesivamente DIEA (0,45 ml, 2,5 mmol, 5 eq), 2-metil-3-(2-tienil) ácido propanoico (86 mg, 0,51 mmol, 1 eq, Organometálicos, 2002, 21, 2842), EDCI (196 mg, 1,02 mmol, 2 eq) y HOBt (138 mg, 1,02 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10 después acetato de etilo/MeOH 9/1). Una segunda purificación por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice se realizó para eliminar los reactivos residuales. El producto se solubilizó en EtOH/H₂O 1/1 y la solución se secó por congelación para dar el Ejemplo 11 (85 mg, 40% en dos etapas) como un merengue blanco.

45

MS (ES+, m/z): 446.2 [M+H]⁺

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,27 (m, 1 H), 8,17 (m, 1 H), 7,77 (m, 1 H), 7,59 (m, 1 H), 7,25 (m, 1 H), 6,90 (m, 1 H), 6,82 (m, 1 H), 4,96 (s, 1 H), 4,09 (m, 3H), 3,68 (m, 1 H), 3,20 (m, 5H), 1,50 (m, 4H), 1,03 (m, 3H)

50

Ejemplo 12: 3-({4-hidroxi-1-[3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0140] A una solución de la sal de TFA de la etapa 3 del Ejemplo 1 (0,42 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml) se

añadieron sucesivamente DIEA (0,37 ml, 2,1 mmol, 5 eq), 3- (tiofen-2-il) propanoico (80 mg, 0,51 mmol, 1,2 eq), EDCI (161 mg, 0,84 mmol, 2 eq) y HOBt (114 mg, 0,84 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días y después se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10 después acetato de etilo/MeOH 9/1). El producto se solubilizó en EtOH/H₂O y la solución se secó por congelación para dar el Ejemplo 12 (125 mg, 75%) como un merengue blanco.

MS (ES⁺, m/z): 398.2 [M+H]⁺
 1 H NMR (DMSO-d₆) δ: 8.24 (s, 1 H), 8.16 (dd, J = 8 Hz, 1 H), 7.84 (dd, J=8Hz, J=8Hz, 1 H), 7.68 (d, J=8Hz, 1 H), 7.55 (dd, J=8Hz, J=8Hz, 1 H), 7.27 (m, 1 H), 6.90 (m, 3H), 4.98 (s, 1 H), 4.09 (m, 1 H), 3.99 (m, 2H), 3.64 (m, 1 H), 3.23 (m, 1 H), 3.00 (m, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 1.45 (m, 4H).

Ejemplo 13: 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquina zolin-4-ona

[0141] A una solución de la sal de TFA de la etapa 3 del Ejemplo 1 (2,37 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (30 ml) se añadió sucesivamente DIEA (1,24 ml, 7,11 mmol, 7EQ), 2-metil-3-ácido fenilpropanoico (466mg, 2,84 mmol, 1,2 eq), EDCI (909mg, 4,74mmol, 2 eq) y HOBt (640 mg, 4,74mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía de columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10 después acetato de etilo/MeOH 9/1) para dar el Ejemplo 13 (640 mg, 66% en dos etapas) como un sólido blanco.

MS (ES⁺, m/z): 406.3 [M+H]⁺
 1 H NMR (DMSO-d₆) δ: 8.20 (m, 2H), 7.84 (m, 1 H), 7.68 (m, 1 H), 7.56 (m, 1 H), 7.20 (m, 5H), 4.90 (m, 1 H), 3.85 (m, 4H), 3.11 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.52 (m, 1 H), 1.48 (m, 4H), 1.00 (m, 3H).

Ejemplo 14: 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-7-cloro-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

[0142] A una solución de la sal de TFA de la etapa 2 del Ejemplo 11 (0,34 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadieron sucesivamente DIEA (0,18 ml, 1,02 mmol, 3 eq), 2-metil-3-ácido fenilpropanoico (67 mg, 0,41 mmol, 1,2 eq), EDCI (130 mg, 0,68 mmol, 2 eq) y HOBt (104 mg, 0,68 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía de columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo de 2/8 a 0/10 después acetato de etilo/MeOH 9/1) para dar el Ejemplo 14 (56mg, 37% en dos etapas) como un sólido blanco.

MS (ES⁺, m/z): 440.3 [M+H]⁺
 1 H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,29 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7,20 (t, J = 8 Hz, 1 H), 7,79 (s ancho, 1 H), 7,64-7,61 (m, 1 H), 7,32-7,26 (m, 2H), 7,22 hasta 7,16 (m, 3H), 4,94 (d, J = 6 Hz, 1 H), 4,15-3,79 (m, 3H), 3,68 (t, J = 14 Hz, 1 H), 3,24 a 3,9 (m, 2H), 2,89-2,82 (m, 2H), 1,59-1,21 (m, 4H), 1,03 (d, J = 6 Hz, 3H), 0,78-0,75 (m, 1 H)

Cisteína proteasas representativos

Producción y purificación de proteínas USP7

[0143] El ADNc que codifica USP7 se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de ARNm de placenta. El ADNc que codifica USP7 se subclonó por PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). USP7 humano de tipo salvaje de longitud completa y su mutante catalítica (cisteína 223 sustituida por alanina, C223A) se produjeron como fusiones N-terminal marcadas con His en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Invitrogen), utilizando el sistema Bac-to-Bac Baculovirus de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. pFastBac-HT-B-USP7 se utilizó para transformar células DH10Bac (Invitrogen), y la selección azul/blanco se llevó a cabo en placas de agar X-gal/IPTG. Se preparó ADN bácmido mediante un procedimiento de lisis alcalina. La integridad de las minipreparaciones bácmido y su orientación se comprobó por PCR, utilizando cebadores genéricos y específicos. Se cultivaron células de insecto Sf9 en medio InsectXpress (Cambrex) a 27 °C y se transfectaron con el bácmido correspondiente, utilizando GeneShuttle 40 (Q-Biogen). Los virus se recuperaron en el sobrenadante 72 h después de la transfección. Los virus se amplificaron mediante la infección de células de insecto (Sf9 o células High Five; Invitrogen) en un medio de 50 ml InsectXpress en un matraz de cultivo de 150 cm² de células con 500 µl del sobrenadante de las células Sf9 transfectadas. Después de la segunda ronda de amplificación, las células infectadas se recuperaron por lisis rápida SDS, se hirvieron durante 5 min a 100 °C, se sonicaron brevemente y se centrifugaron durante 20 min a 14.000 g. Los niveles de expresión en células Sf9 infectadas fueron comparados con los de las células no infectadas. Las proteínas de fusión se dejaron unirse a perlas TALON (BD Biosciences, TALON resina de afinidad de metal) durante 30 min a 4 °C con agitación suave. Las perlas se lavaron exhaustivamente (tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, 0,5% de Triton X-100 y 10% de glicerol) y las proteínas unidas se eluyeron en tampón de lavado suplementado con imidazol

250 mM (Sigma). Las fracciones eluidas se resolvieron en geles NuPAGE al 4-12% (Novex, Invitrogen). Se dializaron las fracciones que contenían altas concentraciones de proteínas purificadas (pureza > 95%) (mM Tris HCl 20 pH 7.6, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y 10% de glicerol) se dividió en alícuotas y se congeló en nitrógeno líquido antes del almacenamiento en -80 °C.

5

Ensayo de actividad de USP7

[0144] USP7 se diluyó en tampón USP (50 mM Tris HCl, EDTA 0,5 mM (ácido etilendiaminotetraacético); DTT 5 mM; 0,01% de Triton X-100; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7.6). Las soluciones de compuestos (10 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

10

[0145] Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (pequeños volúmenes de microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP7 fue de 300 nM de Ub-AMC (Chem. Biol., 2003, 10, p. 837-846) (Boston Biochem). Las concentraciones de la enzima (USP7) en ensayos de especificidad fueron de 100 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente □ Pherastar (BMG). λ □ Emisión 380 nm; λ excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

15

20

25

Ensayo de actividad USP5

[0146] USP5 se diluyó en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; 0,01% de Triton X-100; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7.6). Las soluciones de compuestos (100 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

30

[0147] Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (volumen pequeño microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP5 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). Las concentraciones de la enzima (USP5) en ensayos de especificidad fueron de 300 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se pre-incubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ Emisión 380 nm; λ Excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

35

40

Clonación y purificación de USP8

[0148] El ADNc que codifica USP8 se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de ARNm de placenta. El ADNc que codifica USP8 se subclonó por PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). Un ADNc que codifica una USP8 mutada se generó por PCR mutagénica. La proteína correspondiente codifica una cisteína para sustitución de alanina en el residuo 786. Las secuencias se determinaron por secuenciación de todo el marco de lectura abierto. Se generaron los bácmidos que codifican USP8 siguiendo la transposición DH10Bac. Los bácmidos correspondientes se transfectaron en células de insecto (Sf9). Los virus se recuperan del sobrenadante del cultivo y se amplificaron dos veces. Las células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) se infectaron durante 72 horas. Se recogió el total de lisados de células y se lisó en tampón de lisis (Tris HCl pH 7.6 50 mM; 0,75% de NP40; NaCl 500 mM; 10% de glicerol; DTT 1 mM; imidazol 10 mM; cóctel de inhibidor de la proteasa; AEBSF 20 µg.ml⁻¹; aprotinina 10 µg.ml⁻¹). Las proteínas se purificaron por afinidad en resinas de afinidad metálica (resina de afinidad Talon metal; BD Biosciences). Los materiales unidos se lavaron extensamente en tampón de lavado (mM fosfato de sodio pH 5 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; 0,5% de Triton X-100; 10% de glicerol) y se eluyó de la resina en tampón de lavado conteniendo imidazol 250 mM. Las proteínas se dializaron en

50

55

tampón de diálisis (Tris HCl pH 7.6 20 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; 10% de glicerol). Se analizaron las purificaciones de proteínas en 4-12% NuPAGE (Invitrogen).

Ensayo de actividad USP8

5

[0149] USP8 se diluyó en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; 0,01% de Triton X-100; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 8.8). Las soluciones de compuestos (100 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

- 10 **[0150]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (volumen pequeño microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para USP8 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (USP8) en ensayos de especificidad fue de 1,36 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se pre-incubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión de 380 nm: λ = 460 nm de excitación. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Ensayo de actividad de UCH-L1

- 25 **[0151]** UCH-L1 se diluyó en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; 5 mM DTT (ditiotretitol); 0,01% de Triton X-100; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7.6). Las soluciones de compuestos (100 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

- [0152]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (volumen pequeño microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para la UCH-L1 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (UCH-L1) en ensayos de especificidad fue de 2,5 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión 380 nm: λ de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Ensayo de actividad de UCH-L3

- 45 **[0153]** UCH-L3 se diluyó en tampón USP (Tris HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; 0,01% de Triton X-100; albúmina de suero bovino 0,05 mg.ml⁻¹ pH 7.6). Las soluciones de compuestos (100 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

- [0154]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (volumen pequeño microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para la UCH-L3 fue de 300 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). La concentración de la enzima (UCH-L3) en ensayos de especificidad fue de 13 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión 380 nm: λ de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Ensayo 3 actividad de la caspasa

[0155] La caspasa 3 se diluyó en tampón de caspasa 3 (100 mM Hepes pH 7.5; 10% de sacarosa; 0,1% CHAPS). Las soluciones de compuestos (100 mM) fueron almacenadas a -20 °C en DMSO. Los compuestos se analizaron a diferentes concentraciones: de 200 µM a 91 nM.

[0156] Las reacciones se realizaron como duplicados en placas negras de 384 pocillos (volumen pequeño microplacas; Greiner, 10 µl de volumen de reacción final). La concentración del sustrato para el ensayo de especificidad de la caspasa 3 fue de 250 nM (Ac-DEVD-AMC; Promega). La concentración de la enzima (caspasa 3) en ensayos de especificidad fue de 1,6 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales en concentración de sustrato fijo. Los compuestos se preincubaron con enzimas durante 30 minutos a 25 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato a las placas que contenían las enzimas (+/- compuestos) diluidas en tampón de ensayo. Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido acético (100 mM final). Las lecturas se realizaron en un lector fluorescente Pherastar (BMG). λ de emisión 380 nm: λ de excitación = 460 nm. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

Métodos de viabilidad y proliferación celular Ensayo de proliferación y viabilidad de células HCT116

[0157] Se obtuvieron células de cáncer de colon HCT116 de la ATCC (American Type Culture Collection), y se mantuvieron en medio 5A de Mc Coy que contiene 10% de FBS, glutamina 3 mM y 1% de penicilina/estreptomycin. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂.

[0158] La viabilidad celular se ensayó utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (Cell CellTiter 96® Ensayo de proliferación celular acuoso no radioactivo, Promega) según las instrucciones del fabricante. MTS (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetra-zolium) es un tetrazolio derivado de MTT reducido en las células metabólicamente activas en un formazán soluble, de células permeante. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas.

[0159] 10³ de células HCT116 se sembraron por pocillo. 24 horas más tarde, se cambió el medio y las células fueron tratadas por triplicado con las concentraciones de cada compuesto de 100µM a 50 nM. Los compuestos se diluyeron en 100% de DMSO, cuya concentración final sobre las células se mantuvo a 0,5%.

[0160] Las células se incubaron con los compuestos durante 72 horas, y su viabilidad se ensayó a continuación por la adición de MTS durante 2 horas. La absorbancia a 492 nm se midió directamente de las placas de cultivo de 96 pocillos. Se calcularon las concentraciones de GI50 (Inhibición del Crecimiento 50) para cada compuesto usando un ajuste pendiente variable sigmoidal (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

Procedimientos para la evaluación de la selectividad de compuestos de un panel de enzimas activas desubiquitinantes en lisados celulares

[0161] El derivado sulfona de vinilo modificado por C-terminal de la ubiquitina, UbVS, fue claramente útil para una visualización directa de DUB activos en las células. Esta herramienta, que se une covalentemente al sitio activo de cisteína de enzimas desubiquitinantes, se aplicó con éxito para descubrir y caracterizar proteasas nuevas de ubiquitina/similares a la ubiquitina y para perfilar enzimas desubiquitinantes activas en las células normales, infectadas por el virus, y malignas (Borodovsky et al. , Chem Biol 2002, 9, 1149-1159, Hemelaar et al., Mol Biol Cell 2004, 24, 84-95, Ovaa et al., Proc Natl Acad Sci USA 2004 101, 2253-2258).

[0162] La sonda HA-Ub-VS (hemaglutinina tag-ubiquitina-vinilsulfona) se utilizó en este estudio para visualizar directamente la actividad de todas las enzimas desubiquitinantes de proteomas nativas. Esta herramienta se utiliza para evaluar la actividad/especificidad de nuestros compuestos de moléculas pequeñas en USP7 relativos a todas las enzimas desubiquitinantes activas en condiciones fisiológicas.

[0163] Se cosecharon y se lisaron células HEK293 en hielo con un tampón no desnaturizante que contiene

Tris pH 7.4, 50 mM células HEK293; NaCl, 150 mM; MgCl₂, 5 mM; EDTA, 0,5 mM; TDT, 2 mM; ATP (trifosfato de adenosina), 2 mM; NP40 (fenoxipoliethoxietanol nonil), 0,5% y glicerol, 10%. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 1 hora y se clarificaron. Las proteínas se cuantificaron por el procedimiento de Bradford (ensayo de proteínas Bio-Rad). Se trataron 50 µg de proteínas de lisados de células nativas con los compuestos de los ejemplos 5 1 y 2 (de 12,5 mM a 200 mM) o con un inhibidor de DUB no específico como control durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de marcaje ubiquitina se inició por la adición de HA-Ub-VS (8 µg / ml) en tampón de etiquetado (Tris pH 7.6, 50 mM; MgCl₂, 5 mM; EDTA, 0,5 mM; DTT, 2 mM; ATP, 2 mM; sacarosa, 250 mM) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Estos se resolvieron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondearon con anticuerpos 10 contra USP7, HA, UCH-L3, CYLD, USP8, USP5, USP10 y Stat3. Se utilizaron anticuerpos de peroxidasa de rábano conjugados con HRP anti-ratón (Jackson Laboratories, 115-035-003) o conjugados con HRP anti-conejo (Cell Signaling, 7074) como anticuerpos secundarios. Las señales se detectaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL;Amersham) según las instrucciones del fabricante del reactivo.

15 RESULTADOS

1. El uso de Ub52 como USP7 y de sustrato USP8 para la evaluación de moduladores de la USP para la composición de acuerdo con la invención, los ensayos in vitro sobre USP7 y USP8 se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento siguiente

20 *Preparación de proteínas de fusión de ubiquitina-ribosomal*

[0164] Un ADNc que codifica la proteína de fusión entre ubiquitina y la proteína ribosomal L40 (ub52 o UBA52 o ubiquitina-L40) fue amplificado a partir de ARN humano usando una biblioteca de placenta humana 25 patentada. El ADNc se subclonó en un vector de expresión bacteriano (pGEX-2T, GE Healthcare), incluyendo una etiqueta adicional bandera en el extremo carboxilo de la proteína codificada. Los siguientes cebadores se usaron para la subclonación en el marco con la etiqueta de GST la ubiquitina-L40 en pGEX-2T: 5'-cgtggatccatgcagatctttgtgaagaccctc-3' (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N.º: 1) y 5'-gccaattctttatcgatcgtctttagtcttggaccttcttgggacg-3' (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N.º: 2) en BamHI y EcoRI 30 sitios de restricción.

[0165] Para la producción y purificación de proteínas recombinantes, el plásmido pGEX-2TUb52-flag se transformó en E. coli BL21 (Stratagene), que se cultiva en medio LB suplementado con 100 mg/ml ampicilina (LB 35 AMPI) a 37 °C durante la noche y después se diluyó 1/100 en LB AMPI. Las células se incubaron a 37 °C hasta una A600 = 0,6 a 0,8 se alcanzó. Después de la inducción con 0,1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), el cultivo se incubó a 30 °C durante 180 min.

[0166] Los sedimentos bacterianos se lisaron en NETN (Tris HCl pH 8.0; EDTA 1 mM; NP40 0,5%; inhibidor de la proteasa cóctel, PMSF 1 mM) y se sonicó brevemente. El material insoluble se eliminó por centrifugación 30 min a 14.000x g. Las proteínas GST-Ub52 de bandera se purificaron de acuerdo con Everett RD et al., EMBO J. (1997) 16, 1519-1530. Brevemente, la fracción soluble se incubó en perlas de glutatión pre-equilibradas en tampón NETN + 0,5% de leche durante 120 minutos a 4 °C. Se recuperó el flujo transversal. Las perlas se lavaron extensamente: el último lavado se realizó en Tris HCl pH 7.6 20 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 12 mM. Las eluciones se 45 realizaron con 20 mM de glutatión reducida en 50 mM Tris HCl pH 8.0, NaCl 120 mM. Todas las fracciones se resolvieron en un NuPAGE 4-12% después del tratamiento 0,1 M DTT y la desnaturalización y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Las eluciones se dializaron durante la noche a 4 °C en Tris HCl pH 7.6 20 mM; NaCl 50 mM; DTT 0,5 mM.

Ensayo de la proteína de fusión (GST-Ub52-Flag) utilizando un procedimiento de medición homogéneo de 50 fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF®)

[0167] El uso de GST-Ub52-Flag se basa en la medición resuelta en el tiempo de la fluorescencia emitida por transferencia en un medio homogéneo.

55 [0168] Los reactivos usados fueron los siguientes:

- Anticuerpo-europio Anti-Flag conjugado criptato conocido como anti-Flag-K (CIS bio international), solución a 0,2 M en 0,8 M de KF, 0,1% de albúmina sérica bovina, Tris-HCl 25 mM pH 7.6.
- Anticuerpo anti-GST-XL665 conjugado (CIS bio international), solución a 2,6 M en 0,8 M de KF, 0,1% de

albúmina sérica bovina, Tris-HCl 25 mM pH 7.6.

– Solución GST-Ub52-Flag en 14,75 M y MBP_Ub52 a 37,7 M preparadas a partir de la solución madre descrita anteriormente en Tris HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 0,5 mM, albúmina de suero bovino 0,05%, DTT 5 mM.

- 5 **[0169]** El ensayo se lleva a cabo en placas de ensayo de pocillos múltiples. Las placas se analizaron en un fluorímetro PHERAstar (BMG) después de una incubación durante la noche a 4 °C (excitación 337 nm, emisión de 620 y 665 nm).

Ensayo de la actividad de las enzimas del tipo desubiquitinante con la proteína de fusión ubiquitina-ribosomal

- 10 **[0170]** Los reactivos usados fueron los siguientes:

– Solución de USP7 a 200 pM y USP8 a 400 pM en 50 mM Tris HCl pH 7.6, albúmina de suero bovino 0,05%, DTT 5 mM.

- 15 – Anti-Flag-K (CIS bio international), solución a 0,2 M en 0,8 M de KF, 0,1% de albúmina sérica bovina, Tris-HCl 25 mM pH 7.6.

– Anticuerpo anti-GST-XL665 conjugado (CIS bio international), solución a 2,6 M en 0,8 M de KF, 0,1% de albúmina sérica bovina, Tris-HCl 25 mM pH 7.6.

- 20 – Solución GST-Ub52-flag en 14,75 M y MBP_Ub52 a 37,7 M se preparan mediante diluciones de la solución madre descritas anteriormente en Tris HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 0,5 mM, albúmina de suero bovino 0,05%, DTT 5 mM.

- 25 **[0171]** La reacción enzimática se lleva a cabo mediante la mezcla de solución de GST-Ub52-flag con 5 µl de solución de USP7 (200 pM final) o 5 µl de USP8 (400 pM final). Esta mezcla se incuba durante una hora a temperatura ambiente en una placa de ensayo de pocillos múltiples. Se añade una mezcla de 10 µl de 5 µl de solución de anti-Flag-K (0,2 mM) más 5 µl de anticuerpo anti-GST-XL665 (2,6 M) a cada pocillo de la placa de ensayo de pocillos múltiples. La placa se lee después de una incubación durante la noche a 4 °C en un fluorímetro PHERAstar (BMG).

- 30 **[0172]** La disminución en la señal se correlaciona con el aumento de la actividad de la enzima es decir, la escisión del sustrato GST-Ub52-flag. Por consiguiente, el formato utilizado es totalmente adecuado para un procedimiento de ensayo de una enzima del tipo desubiquitinante tal como proteasa específica de ubiquitina, pero también para la determinación de un modulador de la actividad de esta enzima.

Determinación de un modulador de la actividad de la enzima del tipo desubiquitinante

- 35 **[0173]** Se llevan a cabo los mismos procedimientos mencionados anteriormente para el ensayo de la actividad de las enzimas del tipo desubiquitinante, pero las diversas mezclas de reacción se incubaron con la concentración de enzima idéntica, en presencia o ausencia de los compuestos 1 a 14. Los datos (valores medios +/- desviación estándar) se analizaron como porcentaje de control (sin compuesto) y se representan como porcentaje
40 frente al Log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable) y se determinó IC₅₀ (M) y se presentó todo en la siguiente tabla.

Ejemplo	LCMS: m/z [M+H] ⁺	USP7	USP8
1	392,09	74	>200
2	426,08	77	>200
3	384,14	175	>200
4	418,12	173	>200
5	412,20	36	>200
6	330,00	>200	>200
7	390,10	174	>200
8	412,09	224	>200
9	391,98	214	>200
10	422,15	>200	>200
11	446,20	33	>200
12	398,20	42	>200
13	406,30	12	>200
14	440,30	29	>200

2. Inhibición selectiva de la actividad desubiquitinante de USP7 usando sustrato UbAMC

[0174] Los resultados se resumen en la siguiente tabla (μM):

Ejemplo	USP7	USP8	USP5	Uch-L1	Uch-L3	Caspasa 3
1	69	>200	>200	>200	>200	>200
2	33	>200	>200	>200	>200	>200
3	100	>200	>200	>200	>200	>200
4	54	>200	>200	>200	>200	>200
5	37	>200	>200	>200	>200	>200
6	156	>200	>200	>200	>200	>200
7	90	>200	>200	>200	>200	>200
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	155	>200	>200	>200	>200	>200
10	261	>200	>200	>200	>200	>200
11	40	>200	>200	>200	>200	>200
12	70	>200	>200	>200	>200	>200
13	15	>200	>200	>200	>200	>200
14	24	>200	>200	>200	>200	>200
. nd: no determinado debido a la autofluorescencia a 460 nm						

5

3. Inhibición de la proliferación/viabilidad celular

[0175] Los resultados se resumen en la siguiente tabla (μM):

Ejemplo	Viabilidad celular (MTS): HCT116 GI50 Día 3
1	>500
2	67
3	93
4	19
5	113
6	ND
7	>500
8	ND
9	ND
10	ND
11	25
12	253
13	103
14	28

10

4. Inhibición selectiva de la actividad desubiquitinante USP7 sobre un panel de DUB activas en condiciones fisiológicas:

[0176] Para confirmar la especificidad observada in vitro de enzimas recombinantes, se realizaron ensayos de competición utilizando la sonda basada en la actividad HAUbVS (ABP) que se une covalentemente al sitio activo de cisteína de enzimas desubiquitinantes (Borodovsky et al., Chem Biol 2002, 9, 1149- 1159, Hemelaar et al., Mol Cell Biol 2004, 24, 84-95, Ovaa et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2004 101, 2253-2258). En comparación con las enzimas recombinantes, este ensayo tiene la ventaja de evaluar el efecto del inhibidor frente a numerosas enzimas desubiquitinantes en paralelo directamente en proteomas nativos a través de análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-HA. En este ensayo, el inhibidor se añade al lisado total de células y la inhibición se determina mediante el etiquetado de las enzimas desubiquitinantes activas residuales con HAUbVS. Este etiquetado seguido de la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-HA permitió la identificación de todas las enzimas activas desubiquitinantes de lisados de células HEK293 (Figura 1, carril 2). Este etiquetado, específico para la forma activa de DUBs, se inhibe mediante un inhibidor DUB no específico de forma no selectiva (Figura 1, carril 14). Cuando las células HEK293 lisadas se trataron con HAUbVS en ausencia y en presencia de diferentes dosis de los ejemplos 2 y 5, no se observó ningún cambio en el patrón de inmunotransferencia con la excepción de una banda que casi se eliminó por completo en el tamaño correspondiente a HA-Ub-VS-USP7 (Figura 1). Este efecto sobre la actividad de USP7 se confirmó con un anticuerpo anti-USP7 como se indica mediante el cambio de movilidad observado entre las

muestras tratadas y no tratadas (Figura 2).

[0177] Seguidamente, evaluamos el efecto de los inhibidores de USP7 sobre la eficiencia de etiquetado de HAUbVS mediante el control de varias enzimas desubiquitinantes de forma individual. Con este fin, la eficiencia de etiquetado de HAUbVS en USP7, USP8, USP5, USP10, CYLD y UCH-L3 de lisados de células HEK293 se comprobó primero utilizando anticuerpos específicos. Este etiquetado se confirmó con todos los DUB ensayados, como se indica por el cambio de movilidad observado entre las muestras tratadas y no tratadas de HAUbVS, aunque con diferentes tasas de eficiencia (Figura 2, carriles 1 y 2). La inhibición potencial de estos DUB se evaluó en presencia de los ejemplos 2 y 5, así como del inhibidor de la DUB no específica como control. Como era de esperar, se encontró que el inhibidor de la DUB no específica inhibió todas las DUB analizadas (Figura 2, carril 14). Curiosamente, se encontró que los ejemplos 2 y 5 bloqueaban eficientemente el etiquetado de USP7 pero no de USP8, USP5, USP10, CYLD o UCH-L3, mostrando su especificidad USP7 sobre un panel de DUB activas en condiciones fisiológicas (Figura 2). Estos datos tomados indican en conjunto que los ejemplos 2 y 5 apuntan directamente al USP7 en proteomas nativos en condiciones fisiológicas y de una manera dependiente de la dosis sin ningún tipo de reacción cruzada con todas las enzimas desubiquitinantes probados.

5. Los compuestos USP7 específicos son inhibidores reversibles

[0178] Para comprender mejor el mecanismo de inhibición de USP7 mediante nuestros compuestos USP7 específicos, se llevaron a cabo varios experimentos. Primero caracterizamos el mecanismo inhibitor del ejemplo 2 pre-incubando el ejemplo 2 (100 μ M) con USP7 (100 pM) a diferentes puntos de tiempo (30min, 1h, 2h, 4h, 6h). La actividad desubiquitinante se evaluó a continuación con el sustrato Ub-AMC, como se describe anteriormente, y se comparó con la de las muestras tratadas con DMSO. Curiosamente, se encontró que la inhibición USP7 del ejemplo 2 (~75%) era independiente de la sincronización de pre-incubación (Figura 3). Estos datos muestran claramente que el ejemplo 2 no es un inhibidor de USP7 dependiente del tiempo.

[0179] La reversibilidad de la inhibición se determinó a continuación midiendo la recuperación de la actividad enzimática después de la filtración en gel. Incubamos USP7 (100 pM) durante 4h a temperatura ambiente en presencia de los ejemplos 2 y 3 (100 μ M) o un compuesto de control utilizado como inhibidor de USP7 irreversible (25 μ M). Pasamos un poco de cada muestra a través de un sistema de filtración en gel G50 (Sephadex, superfino G50, Sigma Aldrich). La actividad desubiquitinante de los eluidos G50 se evaluó con el sustrato Ub-AMC, como se describe anteriormente, y se comparó con la de las muestras no sometidas a filtración G50. Las reacciones se controlaron mediante el PHERAstar (BMG Labtech). En ausencia de la filtración, la actividad de USP7 se inhibía mediante los ejemplos 2 y 3 y mediante un inhibidor de control utilizado como compuesto irreversible (Figura 4A, - G50). Usando muestras que contienen solo estos compuestos, se confirmó que todos los compuestos filtrados a través de una columna G50, se retuvieron por completo en la columna (Figura 4B). La filtración de las muestras que contienen USP7 y los ejemplos 2 y 3 a través de una columna G50 llevó a la restauración total de la actividad USP7, mientras que la inhibición USP7 por el compuesto de control irreversible no podría ser revertida mediante filtración (Figura 4A, + G50). Dado que se espera que un complejo irreversible permanezca inhibido después del lavado, nuestros resultados demostraron que los ejemplos 2 y 3 son inhibidores reversibles de USP7.

[0180] Para confirmar estos hallazgos, se midió la recuperación de la actividad enzimática después de una dilución rápida y amplia del complejo enzima-compuesto. Incubamos USP7 a una concentración de 100 veces (10 nM) sobre la concentración requerida para el ensayo de actividad, con una concentración de inhibidor equivalente a 10 veces la IC_{50} (Figura 5A). Después de un tiempo de equilibrio razonable (1 h), esta mezcla se diluye 100 veces en un tampón de reacción que contiene UbAMC (300 nM) para iniciar la reacción (Figura 5A). La dilución de las muestras que contienen USP7 y los ejemplos 2 y 3 dieron lugar a la restauración casi total de la actividad USP7, mientras que la inhibición USP7 por el compuesto de control irreversible no podría ser revertida por dilución (Figura 5B). La disociación de los ejemplos 2 y 3 de USP7 que conduce a una restauración aproximadamente mayor al 90% de la actividad enzimática después de una dilución rápida y amplia demostró claramente que los ejemplos 2 y 3 eran inhibidores reversibles rápidos.

[0181] Para caracterizar los complejos que implican USP7 y los ejemplos 1, 2, 3 y 5, se evaluó la unión directa por ESI-MS en condiciones nativas (7 mM de acetato de amonio pH 7,5), como se describe anteriormente (Vivat Hannah et al., Future Med Chem. 2010 2(1):35-50). En primer lugar comprobamos la interacción mediante la incubación de la proteína en presencia de equivalentes 3-5-10 molares de los ejemplos 1, 2, 3 y 5. Todos estos compuestos formaron complejos con USP7 a diversos niveles y mostraron estequiometría de unión 1:1 para USP7 cuando se ensayaron a excesos equivalentes 3 o 5 molar, como se ilustra con los ejemplos 1 y 2 en la Figura 6. No se observó diferencia de masa de compuestos en presencia o ausencia de USP7. Con el fin de disociar complejos

no covalentes débiles, los complejos USP7/inhibidor se diluyeron en 50/50/1 H₂O / CH₃CN / HCOOH y se analizaron bajo condiciones instrumentales energéticas (V_c = 120 V, P_i = 4 mbar). En estas condiciones, no se observó unión entre USP7 y los ejemplos 1, 2, 3 y 5 sugiriendo que USP7 y los ejemplos 1, 2, 3 y 5 formaban complejos no covalentes.

5 **[0182]** Todos estos datos indican claramente que estos inhibidores USP7 específicos se unen al USP7 de una manera reversible.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0183]

<110> HYBRIGENICS SA

15 <120> NUEVOS INHIBIDORES SELECTIVOS Y REVERSIBLES DE LA PROTEASA ESPECÍFICA DE UBIQUITINA 7, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS CONVENCIONALES Y SUS APLICACIONES TERAPÉUTICAS

<130> BET12P1796

20 <150> EP 11306096.6

<151> 02/09/2011

<160> 2

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

35 <400> 1

cgtggatcca tgcagatctt tgtgaagacc ctc

33

<210> 2

<211> 53

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

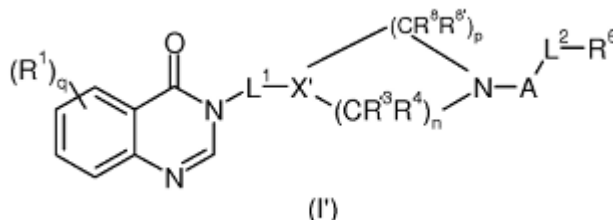
45

<400> 2

gcgaattctt tatcgatcatc gtctttgtag tctttgacct tcttctggg acg 53

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I'):



5

en la que

- R¹, cada uno idénticos o diferentes, se seleccionan de entre el grupo que consiste en halógeno, R, OR, NRR, CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', NO₂, (C₁-C₆)alquilenos-OR, (C₁-C₆)alquilenos-NRR', (C₁-C₆)alquilenos-CO₂R, (C₁-C₆)alquilenos-CONRR', -O-(C₁-C₆)alquilenos-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquilenos-CONRR', CO₂-(C₁-C₆)alquilenos-OR, CO₂-(C₁-C₆)alquilenos-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquilenos-OR, CONH-(C₁-C₆)alquilenos-NRR', OCF₃, SO₂R, SO₃H, SO₂NRR', NH₂SO₂R, R¹⁰C≡CR¹¹, (R¹⁰)(R¹¹)C=C(R¹¹)₂, (C₁-C₆)alquilenos-COR, NHCOR, o (C₁-C₆)alquilo interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S;
- L¹ es CH₂;
- q es 0, 1, 2, 3 o 4
- X' es CR⁷;
- R⁷ es OR;
- n es 1 o 2;
- p es 1, 2 o 3;
- R³, R⁴, R⁸ y R⁸', cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR';
- A se elige de entre el grupo que consiste en:
 - 25 - -C(O)-;
 - -C(O)NH-;
 - L² es (C₁-C₆)alquilenos lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHOR;
 - R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR, CN, CF₃, OR, =O, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R, (C₂-C₆)alquilenos lineal o ramificado o C(O)NRR';
 - cada R y R', idénticos o diferentes, se eligen independientemente de H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo, heterociclo aromático o no aromático, -(C₁-C₆)alquilarilo lineal o ramificado o -(C₁-C₆)alquilheterociclo lineal o ramificado, en donde el heterociclo es aromático o no aromático; opcionalmente sustituido o no por OH, CO₂H, C(O)NH₂, NH₂
 - R¹⁰ se elige independientemente entre un enlace, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado;
 - R¹¹ se elige independientemente entre un átomo de hidrógeno, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado o un arilo, estando el alquilo o arilo opcionalmente sustituidos por OH, NH₂, C(O)OH o C(O)NH;

donde "arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono;

45 donde "cicloalquilo" se refiere a un anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono;

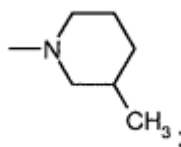
donde "heteroarilo" se refiere a 5-14 anillos hetero, mono-, bi- o multicíclicos aromáticos;

donde "heterociclo" se refiere a anillos mono-, bi- o multicíclicos de 3 a 14 miembros, estables no aromáticos saturados, parcialmente insaturados o insaturados.

50 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros,

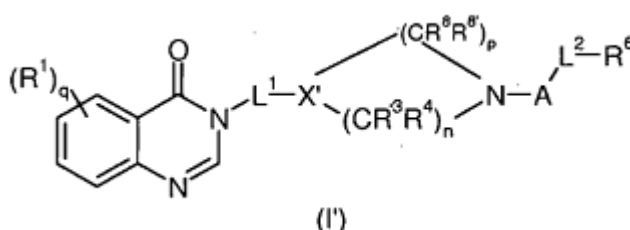
con la excepción de

- q es 0, L¹ es CH₂, X' es CR⁷ y R⁷ es OH, i es 1, A es C=O, L² es C₂H₄ y R⁶ es



5 - q es 1, R¹ es Cl en la posición 7, L¹ es CH₂, X' es CR⁷ y R⁷ es OH, i es 1, A es C=O, L²R⁶ es CH(CH₂CH₃)₂.

2. Un compuesto de fórmula (I'):



10

en la que

- R¹, cada uno idénticos o diferentes, se selecciona de entre el grupo que consiste en halógeno, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR', NO₂, (C₁-C₆)alquilenio-OR, (C₁-C₆)alquilenio-NRR',
- 15 (C₁-C₆)alquilenio-CO₂R, (C₁-C₆)alquilenio-CONRR', -O-(C₁-C₆)alquilenio-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquilenio-CONRR', CO₂-(C₁-C₆)alquilenio-OR, CO₂-(C₁-C₆)alquilenio-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquilenio-OR, CONH-(C₁-C₆)alquilenio-NRR' o NHCOR;
- L¹ es CH₂;
- q es 0, 1, 2, 3 o 4
- 20 ▪ X' es CR⁷;
- R⁷ es OR;
- n es 1 o 2;
- p es 1, 2 o 3;
- R³, R⁴, R⁸ y R⁸, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal
- 25 o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR';
- A se elige de entre el grupo que consiste en:

- -C(O)-;
- -C(O)NH-;

30

- L² es (C₁-C₆)alquilenio lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, N o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHOR;
- R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el arilo,
- 35 heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R o C(O)NRR';
- cada R y R', idénticos o diferentes, se eligen independientemente de H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, arilo, heterociclo aromático o no aromático -(C₁-C₆)alquilheterociclo lineal o ramificado, en donde el heterociclo es aromático o no aromático;

40

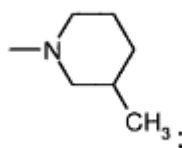
donde "arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono;

donde "cicloalquilo" se refiere a un anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono;

donde "heteroarilo" se refiere a 5-14 anillos hetero, mono-, bi- o multicíclicos aromáticos;
donde "heterociclo" se refiere a anillos mono-, bi- o multicíclicos de 3 a 14 miembros, estables no aromáticos saturados, parcialmente insaturados o insaturados.

o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros,
con la excepción de

- q es 0, L¹ es CH₂, X' es CR⁷ y R⁷ es OH, A es C=O, L² es C₂H₄ y R⁶ es



10

- q es 1, R¹ es Cl en la posición 7, L¹ es CH₂, X' es CR⁷ y R⁷ es OH, A es C=O, L²R⁶ es CH(CH₂CH₃)₂.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde A es C=O.

15

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, donde R⁷ es OH.

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R¹, idéntico o diferente, se selecciona de entre el grupo formado por (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OR, NRR', CN, CF₃, C(O)R, C(O)OR, C(O)NRR' o NHC(O)R.

20

6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R¹, idéntico o diferente, se selecciona de entre el grupo formado por (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH o -O-(C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado.

25

7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R³, R⁴, R⁸, R⁸, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, -O-(C₁-C₆)alquilo, OH.

8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que L² es C₁-C₆(alquileno) lineal o ramificado o -[C₁-C₆(alquileno)]-O- lineal o ramificado.

30

9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R⁶ se elige del grupo formado por arilo, heteroarilo, cicloalquilo o H, donde el arilo, heteroarilo o cicloalquilo está opcionalmente sustituido por halógeno, O-(C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado.

35

10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde p+n = 4.

11. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde p es 2 y n es 2.

40

12. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, elegido en el grupo formado por:

3-({4-hidroxi-1-[3-(2-metoxifenil)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-({1-[2-(3-fluorofenoxi)acetil]-4-hidroxipiperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

45

3-({4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil)-6,7-dimetoxi-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-({4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

4-hidroxi-1-([2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

7-cloro-3-([1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-([1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

50

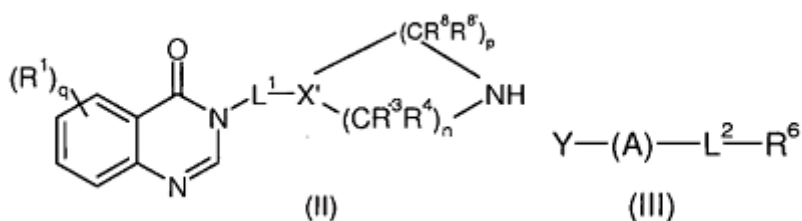
7-cloro-3-({4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-({4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

7-cloro-3-({4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-((4-hidroxi-1-[3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il)metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-7-cloro-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o
 5 tautómeros.

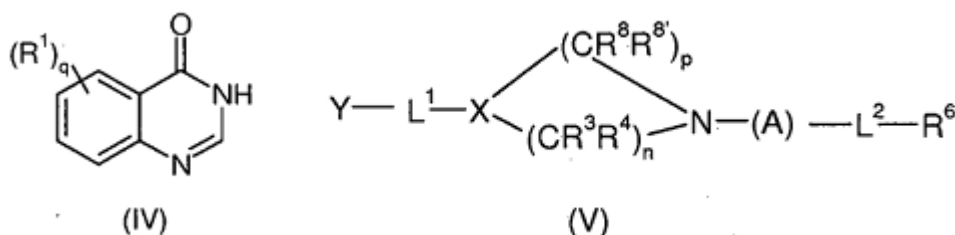
13. Un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III)



10

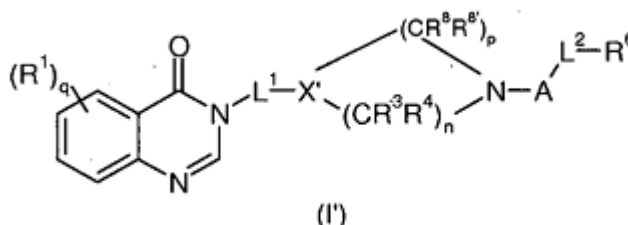
en la que R^1 , R^8 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X' , A , q , n son según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, Y es un grupo saliente.

15 14. Un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V)



20 en la que R^1 , R^8 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 , X' , q , n son según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 e Y es un grupo saliente seleccionado de entre epoxi, halógeno, OH activado.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I')



25

en la que

• R^1 , cada uno idénticos o diferentes, se seleccionan de entre el grupo que consiste en halógeno, R, OR, NRR, CN, CF_3 , $C(O)R$, $C(O)OR$, $C(O)NRR'$, NO_2 , (C_1-C_6) alquilen-OR, (C_1-C_6) alquilen-NRR', (C_1-C_6) alquilen-CO₂R, (C_1-C_6) alquilen-CONRR', -O-(C₁-C₆)alquilen-CO₂R, -O-(C₁-C₆)alquilen-CONRR', CO₂-(C₁-C₆)alquilen-OR, CO₂-(C₁-
 30 C₆)alquilen-CONRR',

C₆)alquileo-NRR', C(O)NH-(C₁-C₆)alquileo-OR, CONH-(C₁-C₆)alquileo-NRR', OCF₃, SO₂R, SO₃H, SO₂NRR', NHSO₂R, R¹⁰C≡CR¹¹, (R¹⁰)(R¹¹)C=C(R¹¹)₂, (C₁-C₆)alquileo-COR, NHCOR, o (C₁-C₆)alquilo interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, N o S;

▪ L¹ es CH₂;

5 ▪ q es 0, 1, 2, 3 o 4

▪ X' es CR⁷;

▪ R⁷ es OR;

▪ n es 1 o 2;

▪ p es 1, 2 o 3;

10 ▪ R³, R⁴, R⁸ y R⁸, cada uno idénticos o diferentes, se eligen de entre el grupo que consiste en H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, OH, -O-(C₁-C₆)alquilo, NRR', CN, CF₃, OR, C(O)R, C(O)OR o C(O)NRR';

▪ A se elige de entre el grupo que consiste en:

--C(O);

15 --C(O)NH-;

▪ L² es (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/u opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHR

20 ▪ R⁶ se selecciona de entre el grupo que consiste en arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo, H, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclo es mono o policíclico y está opcionalmente sustituido por uno o más de (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, halógeno, NRR, CN, CF₃, OR, =O, C(O)R, C(O)OR, NHC(O)R, OC(O)R, (C₂-C₆)alquileo lineal o ramificado o C(O)NRR';

25 ▪ cada R y R', idénticos o diferentes, se eligen independientemente de H, (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo, heterociclo aromático o no aromático, -(C₁-C₆)alquilarilo lineal o ramificado o -(C₁-C₆)alquilheterociclo lineal o ramificado, en donde el heterociclo es aromático o no aromático; opcionalmente sustituido o no por OH, CO₂H, C(O)NH₂, NH₂

▪ R¹⁰ se elige independientemente entre un enlace, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado;

30 ▪ R¹¹ se elige independientemente entre un átomo de hidrógeno, un (C₁-C₆)alquilo lineal o ramificado o un arilo, estando el alquilo o arilo opcionalmente sustituidos por OH, NH₂, C(O)OH o C(O)NH;

donde "arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono;

35 donde "cicloalquilo" se refiere a un anillo de hidrocarburo multicíclico o monocíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono;

donde "heteroarilo" se refiere a 5-14 anillos hetero, mono-, bi- o multicíclicos aromáticos;

donde "heterociclo" se refiere a anillos mono-, bi- o multicíclicos de 3 a 14 miembros, estables no aromáticos saturados, parcialmente insaturados o insaturados.

40 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o tautómeros,

con un excipiente farmacéutico aceptable.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 en la que L² es (C₁-C₆)alquileo-O lineal o ramificado o (C₁-C₆)alquileo lineal o ramificado opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo elegido entre O, NR o S y/o opcionalmente sustituido por: R, OR, NRR', (C₁-C₆)alquilo-OR, (C₁-C₆)alquilo-NRR', OC(O)R, NHC(O)R, NHC(O)NRR', CN, C(=NH)NHR

17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15 o 16, en la que R¹, R⁸, R³, R⁴, R⁵, R⁶, L¹, L², X, q, n son según se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

50 18. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 15 a 17 donde el compuesto de fórmula (I') se elige en el grupo formado por:

3-({4-hidroxi-1-[3-(2-metoxifenil)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

55 7-cloro-3-{{1-(2-etilbutanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-{{1-[2-(3-fluorofenoxi)acetil]-4-hidroxipiperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-{{4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-6,7-dimetoxi-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

3-{{4-hidroxi-1-(2-metilpropanoil)piperidin-4-il}metil}-3,4-dihidroquinazolin-4-ona 4-hidroxi-1-([2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il}metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona

- 7-cloro-3-[[1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-[[1-(3-ciclopentilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 7-cloro-3-[[4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-[[4-hidroxi-1-(3-fenilpropanoil)piperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 5 7-cloro-3-((4-hidroxi-1-[2-metil-3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il)metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-((4-hidroxi-1-[3-(tiofen-2-il)propanoil]piperidin-4-il)metil)-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-hidroxipiperidin-4-il]metil]-3,4-dihidroquinazolin-4-ona 3-[[1-(2-benzilpropanoil)-4-
 hidroxipiperidin-4-il]metil]-7-cloro-3,4-dihidroquinazolin-4-ona
 o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros, enantiómeros o
 10 tautómeros.
19. Uso in vitro de un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para la inhibición de una enzima desubiquitinante.
- 15 20. El uso in vitro para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 para la inhibición de USP7 (proteasa específica de ubiquitina 7)/HAUSP (proteasa específica de ubiquitina asociada a herpesvirus).
21. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para su uso para tratar y/o prevenir el cáncer y la metástasis, enfermedades neurodegenerativas, elegido de la enfermedad de Alzheimer y la
 20 enfermedad de Parkinson, trastornos inmunológicos, diabetes, enfermedades óseas y de las articulaciones, osteoporosis, trastornos inflamatorios de la artritis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades e infecciones virales y/o infectividad y/o latencia viral, infecciones bacterianas y enfermedades.
22. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dichas enfermedades e
 25 infecciones virales se eligen entre las infecciones virales del herpes simple 1 o 2, hepatitis A, hepatitis C, enfermedad e infección por coronavirus SARS, virus de Epstein-Barr, enfermedades e infecciones rinovirales, enfermedades e infecciones adenovirales, poliomielitis.
23. Una combinación formada por un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las
 30 reivindicaciones 15 a 18, con uno o más agentes activos elegidos entre agentes anticancerígenos, agentes neurológicos, agentes trombolíticos, agentes antioxidantes, agentes anti-diabetes, anti-infecciosos, agentes antihipertensivos, agentes diuréticos, agentes trombolíticos, agentes inmunosupresores, agentes cardiovasculares, agentes inmunomoduladores, agentes anti-inflamatorios, agentes antivirales, agentes anti-bacterianos.

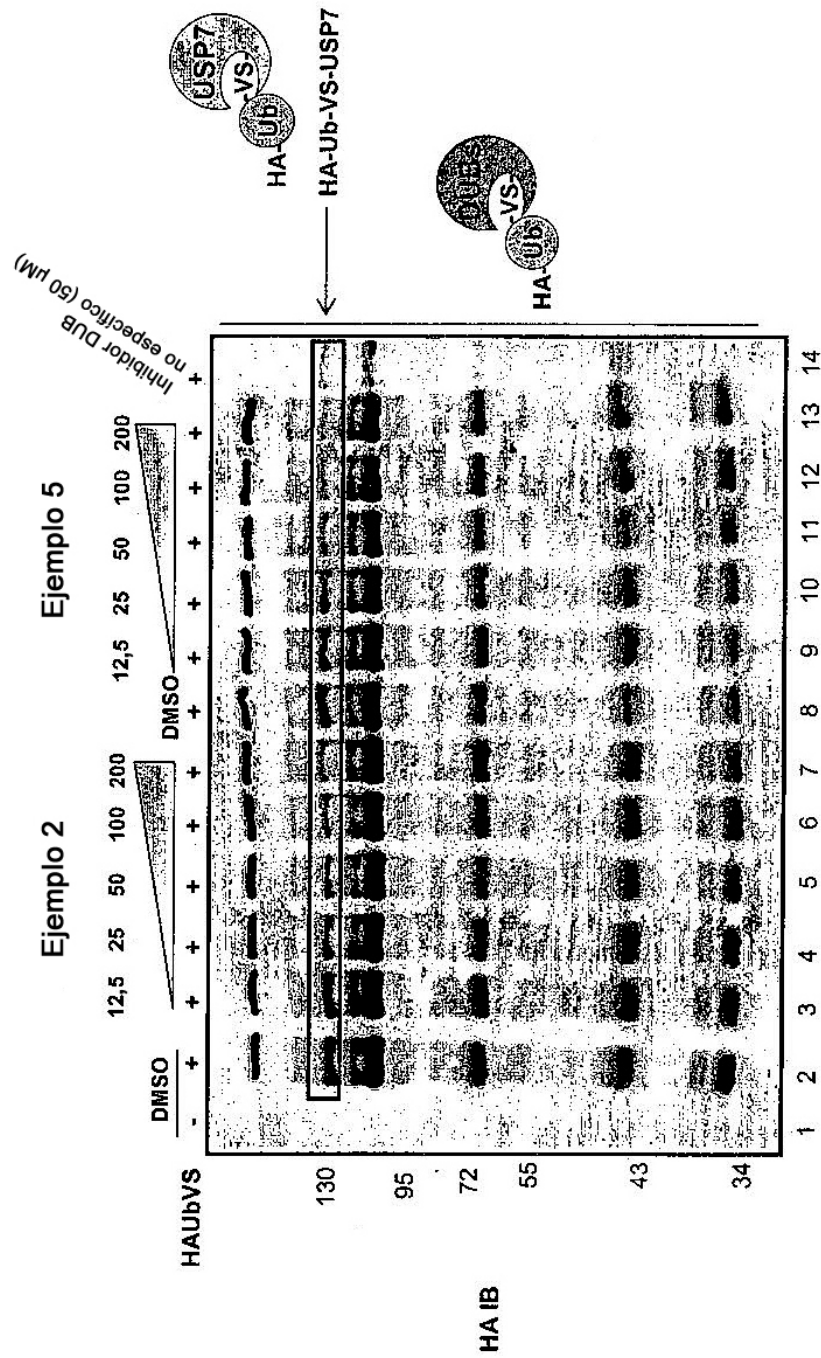


Figura 1

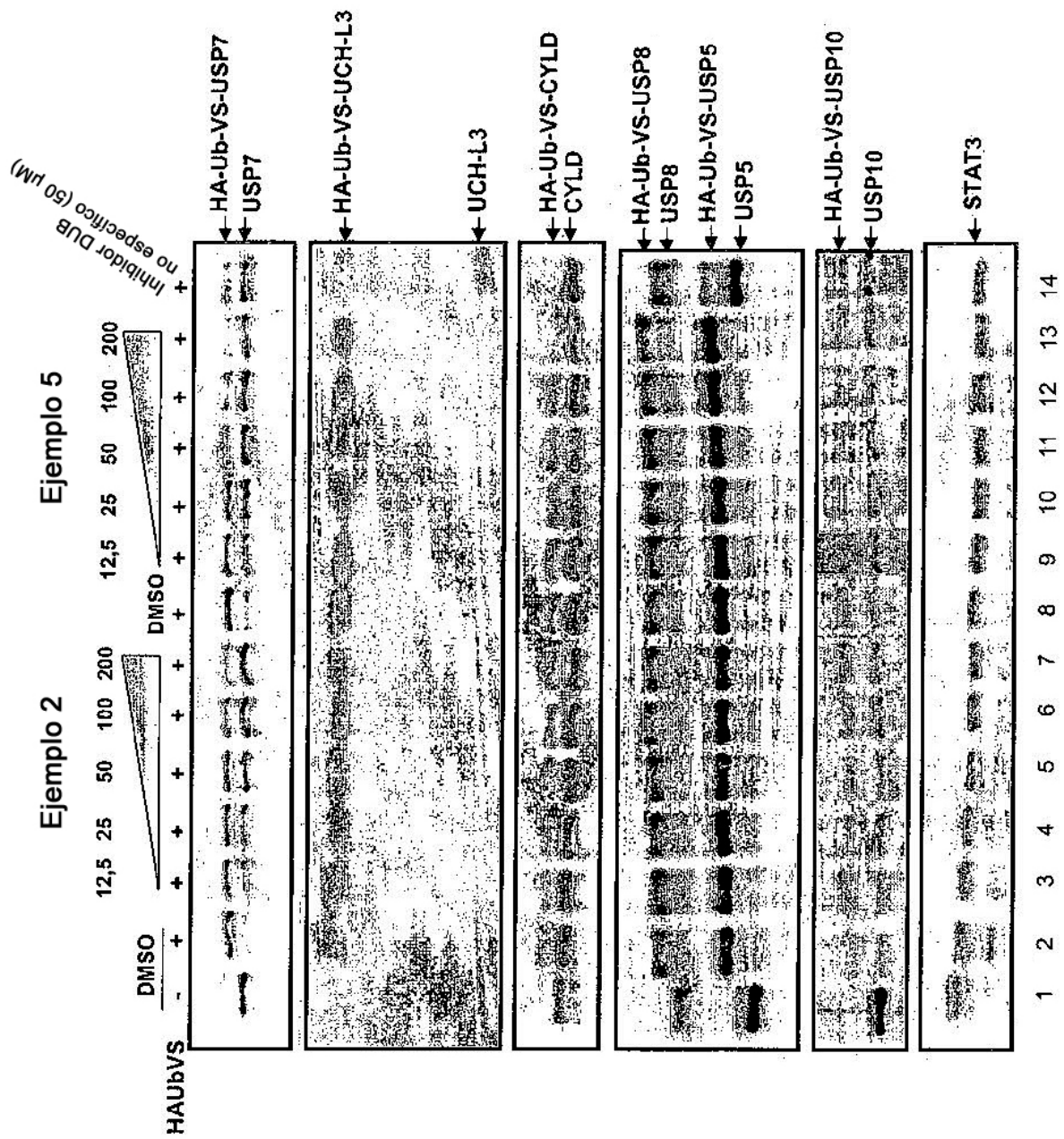


Figura 2

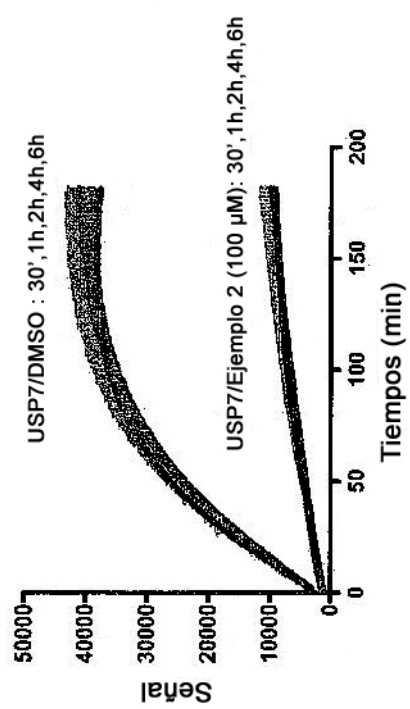


Figura 3

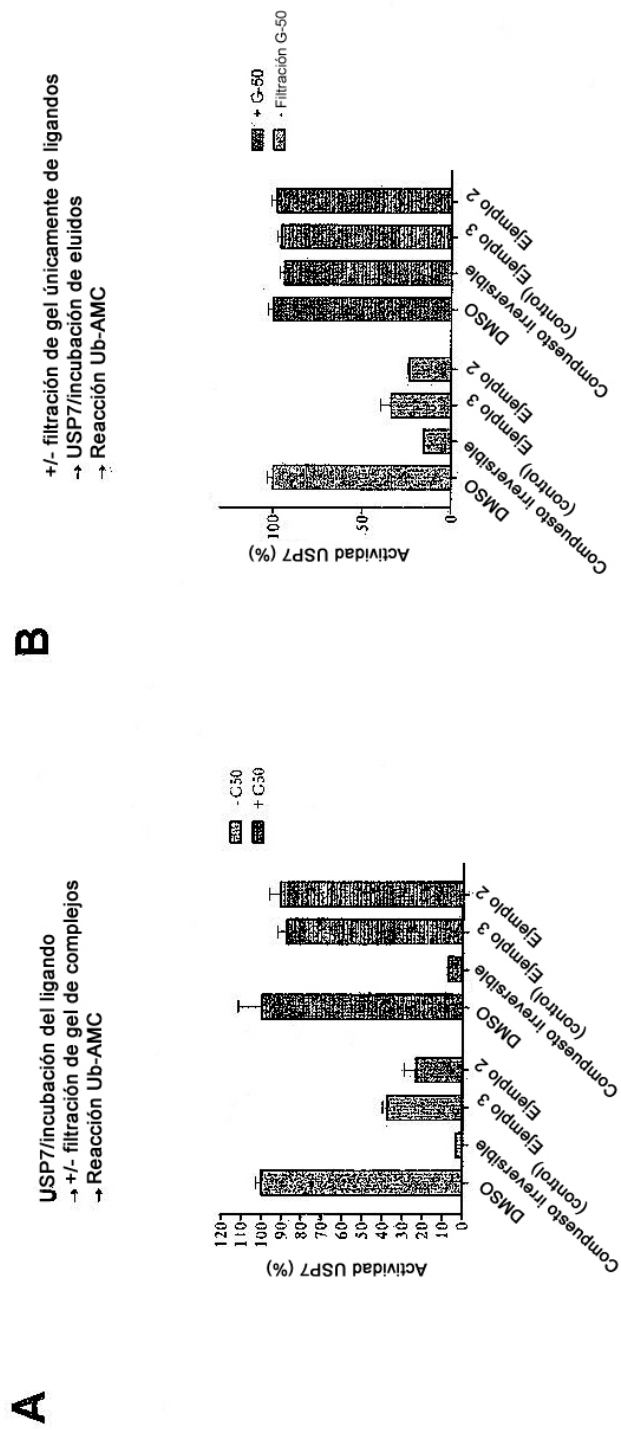
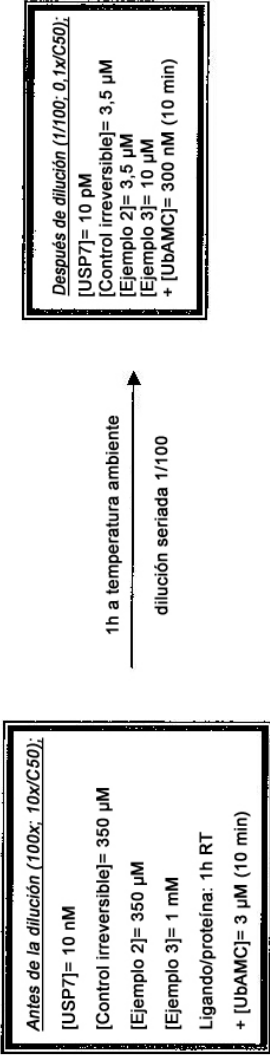


Figura 4

A



B

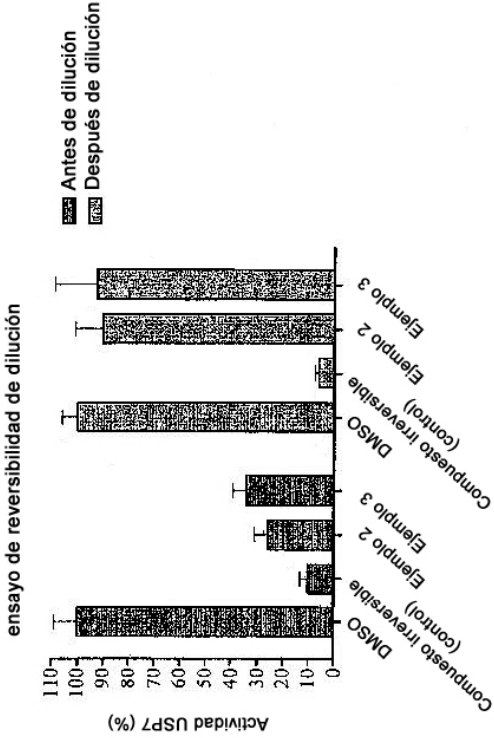


Figura 5

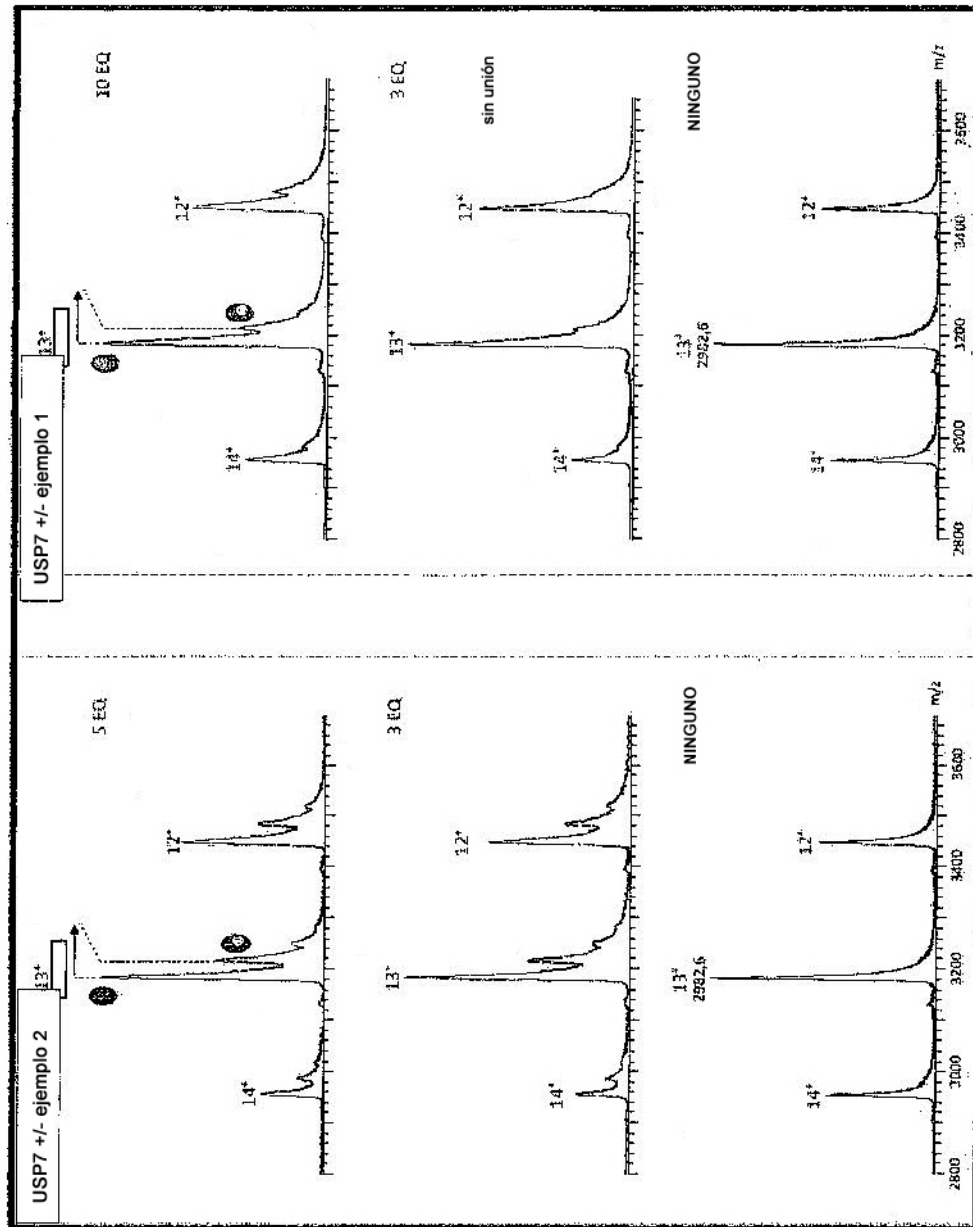


Figura 6