

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 095**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61K 31/4196** (2006.01)  
**A61K 31/41** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 33/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2007 PCT/IB2007/003209**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2008 WO08053301**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007 E 07848828 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2084163**

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

30 Prioridad:

**30.10.2006 EP 06291686**  
**30.10.2006 US 554056**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.09.2017**

73 Titular/es:

**HYBRIGENICS S.A. (100.0%)**  
**3/5, IMPASSE REILLE**  
**75014 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**GUEDAT, PHILIPPE;**  
**JACQ, XAVIER;**  
**COLLAND, FRÉDÉRIC;**  
**DAVIET, LAURENT;**  
**FORMSTECHER, ETIENNE;**  
**RAIN, JEAN-CHRISTOPHE y**  
**COLOMBO, MATTEO**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 633 095 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 tetracíclicos de cisteína proteasas, las composiciones farmacéuticas de los mismos y sus aplicaciones terapéuticas

5 [0001] La presente invención se refiere a nuevos inhibidores de cisteína proteasas, su procedimiento de preparación y su uso terapéutico.

10 [0002] Las proteasas se pueden clasificar en función de sus especificidades de sustrato o mecanismos de catálisis. Sobre la base del mecanismo de la hidrólisis del péptido, se conocen cinco clases principales de proteasas: serina, cisteína, aspártico, treonina y metalo-proteasas. Las cisteína proteasas comprenden, entre otras, enzimas de desubiquitinación, caspasas, catepsinas, calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas o parasitarias.

15 [0003] Las enzimas de desubiquitinación incluyen proteasas específicas de ubiquitina (USP) y ubiquitina carboxi hidrolasas (UCH). En términos generales, la vía de la ubiquitina regula la degradación de proteínas y participa más particularmente en el cáncer, en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, en la inflamación, en la infectividad viral y la latencia (en particular para, virus-1 de Herpes simplex, virus de Epstein-Barr, coronavirus del SARS), o en enfermedades cardiovasculares (Chem Rev. 1997, 97, p. 133-171; Chem Rev. 2002, 102, p. 4459-4488; J. Biochem 2003, 134, p. 9- 18; J. Virology, 2005, 79 (7),  
20 p. 4550-4.551; Cardiovasc Res 2004, 61, p. 11-21).

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

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

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

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

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

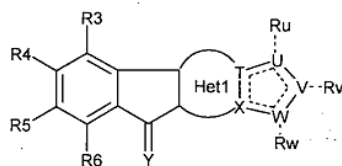
[0009] Las cisteína proteasas parasitarias han sido revisadas en Molecular & Biochemical Parasitology (2002, 120, p. 1-21) y Chem. Rev. (2002, 102, p. 4459-4488), por ejemplo. Vale la pena señalar que los agentes parasitarios responsables de la mayoría de las enfermedades parasitarias más importantes utilizan sus propias cisteína proteasas en algún momento u otro de sus ciclos infectivos, nutritivos o reproductivos; tales enfermedades que incluyen malaria, enfermedad de Chagas, tripanosomiasis africana, leishmaniasis, giardiasis, tricomoniasis, amebiasis, cripto-esporidiasis, toxoplamiasis, esquistosomiasis, fascioliasis, oncocercosis, y otras infecciones por algunos otros gusanos planos o redondos.

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

[0011] Los documentos US 6.514.927, WO01/79209 y WO02/02562 describen compuestos que comprenden 4 ciclos condensados. Sin embargo, no se sugiere su uso como inhibidores de cisteína proteasas.

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

65



(I)

(I)

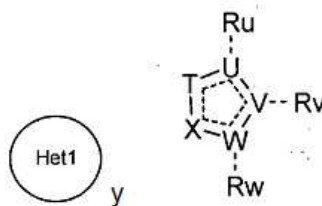
en la que:

---- es un enlace sencillo o un doble enlace, según el caso;

----- es ninguno o un enlace sencillo, según el caso;



es un heterociclo de 5 a 7 miembros, preferiblemente heteroarilo que comprende de 1 a 5 heteroátomos opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, NRCN, C(CN)=C(OH)(OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', heterociclo, arilo, heteroarilo, en el que Alq, arilo, heteroarilo, heterociclo están opcionalmente sustituidos por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo, OAlq; donde



se fusionan entre sí por T y X;

Y es N-OR1, NR'1, CR2R'2;

R1 es H, alquilo, alqueno, alcoxilalquilo, ariloxilalquilo, arilalquilo, alcoxycarbonilalquilo, carboxilalquilo;

R'1 es H, alquilo, arilo o aralquilo;

R2, R'2 son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, alquilo, arilo o aralquilo;

T, U, V, W, X son iguales o diferentes y pueden ser seleccionados entre C, N, O, S.

Ru, Rv, Rw son iguales o diferentes y se pueden seleccionar del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, NRCN, C(CN)=C(OH)(OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', heterociclo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, en el que Alq, Arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo, OAlq.

R3, R4, R5, R6 son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo;

R y R' son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo;

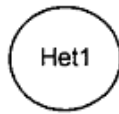
o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros, isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

**[0013]** Preferiblemente, T, U, V, W, X son C o N.

**[0014]** Preferiblemente, Y es N-OR1 o NR'1, más preferiblemente N-OR1, en particular N-OH, N-alquil, N-OAlqueno, N-Oalquil-O-alquilo, N-O-alquil-CO-Oalquilo, N-O-alquil-COOH.

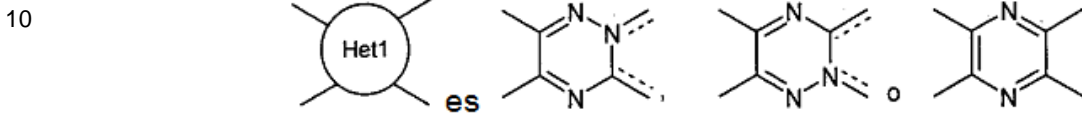
**[0015]** Se entenderá que cuando Y es CR2R2', R2 y/o R2' no pueden formar un anillo condensado con el resto de la estructura de fórmula (I).

**[0016]** Preferiblemente,

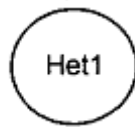


5 contiene 2 ó 3 heteroátomos; más preferiblemente, 2 o 3 N.

[0017] Lo más preferiblemente,



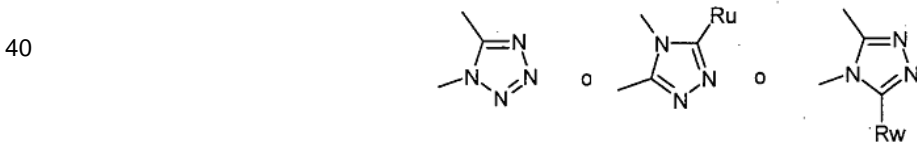
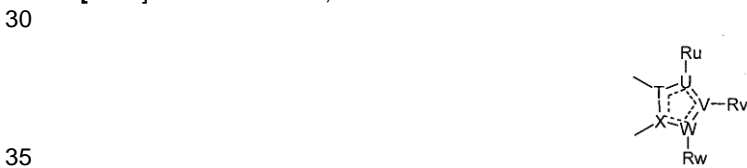
15 [0018] Preferiblemente,



25 es no sustituido.

[0019] Preferiblemente, Ru, Rv, Rw se seleccionan de entre H, arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, cicloalquilo.

[0020] Preferiblemente,



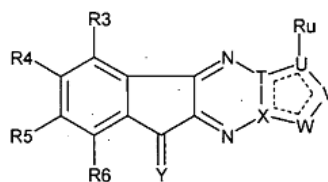
45 donde Rw es H.

[0021] Preferiblemente, R3, R4, R5, R6 son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, Hal, Alq, OAlq, OCF<sub>3</sub>.

50 [0022] Preferiblemente, R y R' son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, Alq.

[0023] Preferiblemente, Rv, Rw son H o están ausentes.

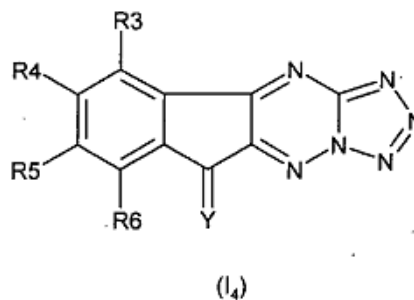
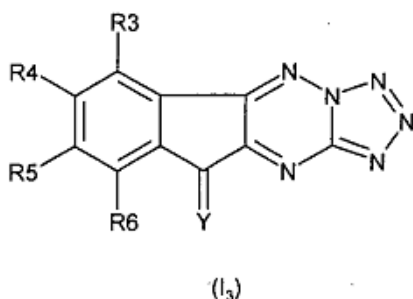
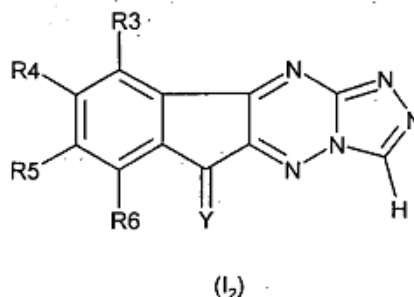
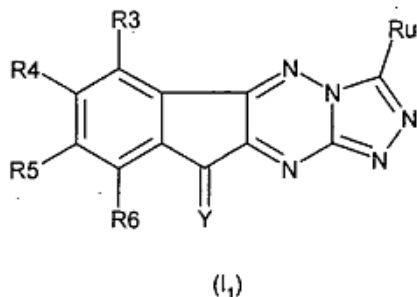
55 [0024] Los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos de fórmula (Ia):



(Ia)

65

[0025] Los compuestos más preferidos son en particular los de las fórmulas (I<sub>1</sub>) a (I<sub>4</sub>):



[0026] Los compuestos preferidos de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

- 30 O-metil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 1-metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 1-butil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 35 O-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 Oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(2-metoxi-etil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(3-fenoxi-propil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 40 O-metil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-etil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 45 O-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-bencil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-bencil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 [1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-iliden]-fenil-amina  
 éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acético  
 50 sal de litio del (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acetato,  
 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de  
 estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros,  
 isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

[0027] Los compuestos más preferidos se seleccionan de manera destacada del grupo que consiste en:

- 55 O-metil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 60 Oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(2-metoxi-etil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(3-fenoxi-propil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 65 O-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminooxi)acético  
sal de litio del (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminooxi)acetato,  
o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de  
5 estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros,  
isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

**[0028]** Tal como se usa en el presente documento anteriormente o en lo sucesivo:  
Alq representa alquilo, alqueno o alquino.

10 **[0029]** "Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos  
de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a 12 átomos de carbono en la  
cadena. "Ramificado" significa que uno o más grupos de alquilo inferior, tales como metilo, etilo o propilo, están  
unidos a una cadena de alquilo lineal. Los grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-  
15 butilo, t-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, octilo, nonilo, decilo.

**[0030]** "Alqueno" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que  
puede ser lineal o ramificado que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alqueno preferidos  
tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 átomos de  
carbono en la cadena. Los grupos alqueno de ejemplo incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metilbut-  
20 2-enilo, n-pentenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo.

**[0031]** "Alquino" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede  
ser lineal o ramificado que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquino preferidos tienen  
de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los  
25 grupos alquino de ejemplo incluyen etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo,  
octinilo y decinilo.

**[0032]** "Alcoxialquilo" significa un grupo alquil-O-alquilo en el que los grupos alquilo son independientemente como  
se definen en este documento. Un ejemplo de alcoxialquilo es metoxietilo.

30 **[0033]** "Alcoxicarbonilalquilo" significa un grupo alquil-O-CO-alquilo en el que los grupos alquilo son  
independientemente como se definen en este documento. Los grupos alcoxicarbonilalquilo de ejemplo incluyen  
grupos metoxi- y etoxi-carbonil-metilo y carbonil etilo.

35 **[0034]** "Átomo de halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo; preferiblemente un átomo de flúor y  
cloro.

**[0035]** "Ariilo" significa un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o multicíclico de 6 a 14 átomos de  
40 carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono. Los grupos ariilo de ejemplo incluyen fenilo o naftilo.

**[0036]** "Ariilalquilo" significa un grupo aril-alquilo en el que los grupos arilo y alquilo son como se definen en el  
presente documento. Un ejemplo de grupos ariilalquilo es bencilo.

45 **[0037]** "Ariloxialquilo" significa un grupo aril-O-alquilo- en el que los grupos alquilo y arilo son como se definen en el  
presente documento. Un grupo ariloxialquilo de ejemplo es fenoxipropilo.

**[0038]** Como se usa en el presente documento, los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a un anillo  
monocíclico, bicíclico o multicíclico no aromático estable, saturado, parcialmente insaturado o insaturado, de 3 a 14,  
preferiblemente de 5 a 10 miembros, en el que al menos un miembro del anillo es un heteroátomo. Típicamente, los  
50 heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio, y átomos de fósforo. Los  
heteroátomos preferibles son oxígeno, nitrógeno y azufre.

**[0039]** Los heterociclos adecuados se describen también en The Handbook of Chemistry and Physics, 76a edición,  
55 CRC Press, Inc., 1995-1996, p. 2-25 a 2-26, la descripción de la cual se incorpora aquí por referencia.

**[0040]** El heterocíclico no aromático preferido incluye, pero no se limita a, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo,  
oxiranilo, tetrahidrofurano, dioxolanilo, tetrahidro-pirano, dioxanilo, dioxolanilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo,  
piranilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiopirano, ditanilo, tiomorfolinilo, dihidropirano,  
tetrahidropirano, dihidropirano, tetrahidro-piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridinilo, dihidrotiopirano, azepanilo,  
60 así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

**[0041]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" o heterociclos aromáticos se refiere a  
un anillo monocíclico, bicíclico, multicíclico hetero aromático que tiene de 5 a 14 miembros, preferiblemente de 5 a  
10 miembros. Los ejemplos incluyen pirrolilo, piridilo, pirazolilo, tienilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, indolilo,  
75 quinolinilo, purinilo, imidazolilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo,  
triazolilo, tetrazolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, carbazolilo, bencimidazolilo, isoxazolilo,

piridilo N-óxido, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

**[0042]** "Carboxialquilo" significa un grupo HOOC-alquilo- en el que el grupo alquilo es como se define en el presente documento. Los grupos preferidos incluyen carboximetilo y carboxietilo.

**[0043]** "Alquilo", "cicloalquilo", "alquenilo", "alquinilo", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" y similares se refieren también a los correspondientes "alquileno", "cicloalquileno", "alquenileno", "alquinileno", "arileno", "heteroarileno", "heterociclono" y similares que se forman por la eliminación de dos átomos de hidrógeno.

**[0044]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un animal, tal como un animal valioso para fines de cría, compañía o conservación, o, preferiblemente, es un ser humano o un niño humano, que está afectado con, o tiene el potencial de ser afectado con una o más enfermedades y afecciones descritas en este documento.

**[0045]** Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz en la prevención, reducción, eliminación, tratamiento o control de los síntomas de las enfermedades y afecciones descritas en este 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 afecciones descritas en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad y afección, y se pretende que incluya el tratamiento profiláctico.

**[0046]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

**[0047]** 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 formando sales ácidas o básicas del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, de 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 y similares; 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 y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio, tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales de metales, tales como sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio.

**[0048]** Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar 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, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, la descripción de la cual se incorpora aquí por referencia.

**[0049]** Los compuestos de la fórmula general (I) que tienen isómeros geométricos, regioisómeros y estereoisómeros también son una parte de la invención.

**[0050]** De acuerdo con un objeto adicional, la presente invención también se refiere al proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I).

**[0051]** Los compuestos y procedimientos 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, tal como se entiende por el experto 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.

**[0052]** En particular, dichos procedimientos se pueden encontrar en RC Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

**[0053]** Se entenderá 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 pretenden cubrir todas las formas quirales, racémicas, diastereoméricas, formas isoméricas 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, mezclas de estereoisómeros se

pueden separar mediante técnicas estándar, incluyendo, pero no limitadas a, separación de formas racémicas, de cromatografía de fase inversa, normal y quiral, formación de sales preferenciales, recristalización, y similares, o mediante síntesis quiral a partir de materiales de partida quirales o mediante síntesis deliberada de centros quirales diana.

5 [0054] Además, el proceso de la invención puede dar lugar a varios regioisómeros que están todos abarcados por la presente invención. Los regioisómeros se aíslan generalmente mediante cromatografía.

10 [0055] Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante 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 anteriormente.

15 [0056] En las reacciones descritas de aquí en adelante, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, cuando éstos se desean 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 TW Greene y PGM Wuts en Protective Groups in Organic Chemistry, 3ª ed, John Wiley and Sons., 1999; JFW McOmie en Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973.

20 [0057] Algunas reacciones pueden llevarse 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 usada en el presente documento, siempre que no tenga ningún efecto adverso sobre otras partes de la molécula. 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.

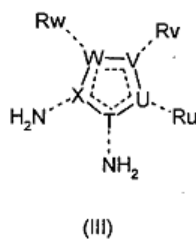
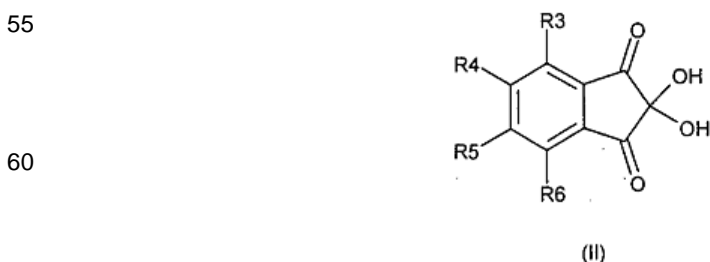
30 [0058] Por lo general, las reacciones se llevan a cabo en un disolvente adecuado. Se puede utilizar una variedad de disolventes, siempre que no tengan ningún efecto adverso sobre la reacción o sobre los reactivos implicados. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen: hidrocarburos, que pueden ser 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.

35 [0059] 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, de manra destacada la temperatura de reacción y la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, siempre que la reacción se efectúe en las condiciones preferidas indicadas anteriormente, un periodo de tiempo de 3 horas a 20 horas será normalmente suficiente.

40 [0060] El compuesto así preparado puede recuperarse 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 la extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y eliminación por destilación del disolvente del extracto. Además, el producto, si se desea, puede purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, en particular, cromatografía en columna o cromatografía en capa fina preparativa.

50 [0061] El proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I) de la invención es un objeto adicional de la presente invención.

[0062] De acuerdo con un primer aspecto, los compuestos de la invención de fórmula (I) se pueden obtener haciendo reaccionar los compuestos correspondientes de fórmula (II) y (III):



65 en las que R3, R4, R5, R6, T, U, V, W, X, Ru, Rv, Rw se definen como en la fórmula (I).

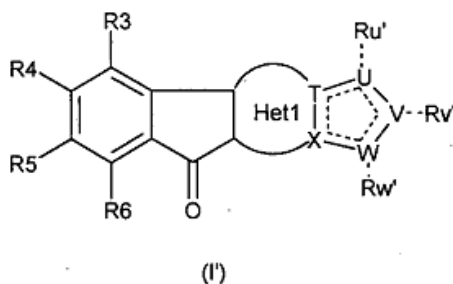


[0063] Generalmente, la reacción se lleva a cabo en un disolvente prótico orgánico, tal como un alcohol (preferiblemente etanol), en presencia de un ácido, tal como ácido acético.

5 [0064] Como alternativa y/o acumulativamente, los compuestos de fórmula (I) se pueden obtener a partir de los compuestos de fórmula (I') correspondientes:

10

15



20

en la que R3, R4, R5, R6, Het1, T, U, V, W, X, Ru, Rv, Rw se definen como en la fórmula (I), en la que cada uno de Ru', Rv', Rw' es similar a Ru, Rv, Rw o es un grupo precursor de los correspondientes Ru, Rv, Rw, mediante una o más etapas que permiten que un grupo precursor se transforme en el grupo Ru, Rv o Rw deseado.

25

[0065] Según la presente invención, la expresión "grupo precursor" de un grupo funcional se refiere a cualquier grupo que puede, mediante una o más reacciones, conducir a la función deseada, por medio de uno o más reactivos adecuados. Las reacciones incluyen desprotección, así como las reacciones habituales de adición, sustitución o de funcionalización.

30

[0066] Los compuestos de fórmula (I') se pueden obtener a partir de compuestos correspondientes de fórmula (II) y (III) como se discutió anteriormente.

35

[0067] Los compuestos de fórmula (I) pueden ser especialmente obtenidos a partir de compuestos de fórmula (I') descritos en EP 05292612.8.

40

[0068] Las reacciones anteriores pueden llevarse a cabo por el experto en la materia mediante la aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrados en los ejemplos de aquí en adelante.

[0069] Además, el proceso de la invención puede también comprender la etapa adicional de aislar el compuesto de fórmula (I). Esto se puede hacer por el experto mediante cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los procedimientos de recuperación descritos anteriormente.

45

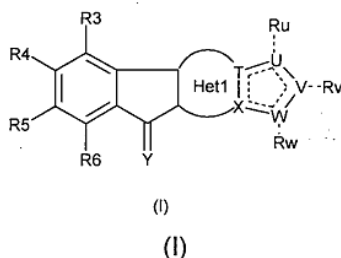
[0070] Los productos de partida (II) y (III) están disponibles comercialmente o pueden obtenerse por aplicación o adaptación de cualquier procedimiento conocido o aquellos descritos en los ejemplos.

[0071] La síntesis también puede llevarse a cabo en un recipiente como una reacción multicomponente.

50

[0072] De acuerdo con un objeto adicional, la presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) tal como se define a continuación:

55

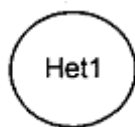


60

en la que:  
 ---- es un enlace sencillo o un doble enlace, según el caso;  
 - - - - es ninguno o un enlace sencillo, según el caso;

65

5

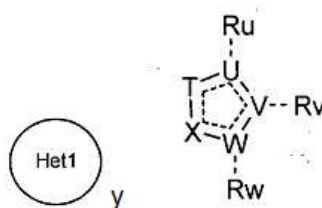


10

es un heterociclo de 5 a 7 miembros, preferiblemente heteroarilo que comprende de 1 a 5 heteroátomos opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, NRCN, C(CN)=C(OH)(OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', heterociclo, arilo, heteroarilo, en el que Alq, arilo, heteroarilo, heterociclo están opcionalmente sustituidos por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo, OAlq; en el que

15

20



25

se fusionan entre sí por T y X;

Y es N-OR<sub>1</sub>, NR'<sub>1</sub>, CR<sub>2</sub>R'<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> es H, alquilo, alqueno, alcoxilalquilo, ariloxilalquilo, arilalquilo, alcoxycarbonilalquilo, carboxialquilo;

R'<sub>1</sub> es H, alquilo, arilo o aralquilo;

R<sub>2</sub>, R'<sub>2</sub> son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, alquilo, arilo o aralquilo;

T, U, V, W, X son iguales o diferentes y pueden ser seleccionados entre C, N, O, S.

30

Ru, Rv, Rw son iguales o diferentes y se pueden seleccionar del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH, NRCN, C(CN)=C(OH)(OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', heterociclo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, en el que Alq, Arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo, OAlq.

35

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OAlq, Alq, Hal, NRR', CN, OH, OCF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo;

R y R' son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, Alq, en el que Alq está opcionalmente sustituido por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo;

40

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros, isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

[0073] Preferiblemente, T, U, V, W, X son C o N.

45

[0074] Otras realizaciones preferidas de fórmula (I) son como se definen anteriormente en relación con los compuestos de la invención.

[0075] Los compuestos preferidos para el uso terapéutico de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

50

O-metil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 1-metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 1-butil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

55

O-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

Oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-(2-metoxi-etil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-(3-fenoxi-propil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

60

O-metil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-etil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

O-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

65

O-bencil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta [ b ] fluoren-9-ona

O-bencil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona

[1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-iliden]-fenil-amina  
 éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acético  
 sal de litio del (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acetato,  
 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de  
 5 estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros,  
 isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

**[0076]** Los compuestos más preferidos para el uso terapéutico de acuerdo con la invención se seleccionan de  
 manera destacada del grupo que consiste en:

10 O-metil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 Oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 15 O-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(2-metoxi-etil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-(3-fenoxi-propil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 O-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 20 O-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona  
 éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acético  
 sal de litio del (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acetato,  
 o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimórficas de  
 25 estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros,  
 isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

**[0077]** De acuerdo con un objeto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I),  
 tal como se define anteriormente en relación con la composición farmacéutica, para la preparación de un  
 medicamento para inhibir la cisteína proteasa.

30 **[0078]** Los compuestos de la invención son útiles para la inhibición de cisteína proteasas, en particular enzimas de  
 desubiquitinación (tales como USP y UCH), caspasas, catepsinas (en particular, la catepsina B, D, K, S y similares),  
 calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas o parasitarias en pacientes en necesidad de los mismos.

35 **[0079]** Los compuestos de la invención son particularmente útiles para tratar y/o prevenir el cáncer y la metástasis,  
 más particularmente cáncer de próstata y/o de colon, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad  
 de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, sordera, trastornos asociados con el envejecimiento, trastornos  
 inflamatorios, artritis, osteoporosis, hepatitis, insuficiencia hepática, isquemia e insuficiencia cardíaca, accidente  
 40 cardiovascular, aterosclerosis, insuficiencia renal, diabetes, cataratas; infecciones virales agudas o latentes por  
 virus-1 de herpes simplex, virus de Epstein-Barr, coronavirus del SARS, rinovirus, virus de la poliomielitis, virus de  
 hepatitis A, virus de la hepatitis C, adenovirus, y similares; infecciones bacterianas o fúngicas por agentes patógenos  
 que pertenecen a los géneros *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Aspergillus sp.*, y  
 similares; infecciones por protozoos por especies miembros de los géneros *Trypanosoma sp.*, *Plasmodium sp.*,  
 45 *Leishmania sp.*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba sp.*, *Giardia sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Cryptosporidium sp.*, y  
 similares; infecciones por gusanos planos o redondos por especies miembros de los géneros *Fasciola sp.*,  
*Schistosoma sp.*, *Onchocerca sp.*, *Ascaris sp.*, *Taenia sp.*, *Caenorhabditis sp.*, *Toxocara sp.*, *Haemonchus sp.*,  
*Ancylostoma sp.*, *Trichuris sp.*, *Trichinella sp.*, *Strongyloides sp.*, *Brugia sp.*, y similares; así como trastornos  
 inmunológicos, inmunorreguladores o de presentación de antígenos.

50 **[0080]** La presente invención también se refiere a 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 en la necesidad de los mismos.

55 **[0081]** La identificación de los sujetos que están en necesidad de tratamiento de enfermedades y afecciones  
 descritas en el presente documento está 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, los sujetos que están en necesidad  
 de dicho tratamiento.

60 **[0082]** Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por el médico tratante, como 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 efectiva, una serie de factores son considerados por  
 el médico tratante, incluyendo, pero no limitado a: la especie del sujeto; su tamaño, edad, y salud general; la  
 enfermedad específica implicada; el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del sujeto  
 65 individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; la característica de biodisponibilidad de  
 la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras

circunstancias relevantes.

**[0083]** La cantidad de un compuesto de fórmula (I), que se requiere para conseguir 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 pertenece el paciente, 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, la liberación y el régimen a administrar.

**[0084]** "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administra a un animal, o un ser humano, según sea apropiado.

**[0085]** Como se usa en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier vehículo, diluyentes, adyuvantes, o portador, tales como agentes conservantes o agentes antioxidantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción y similares. 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 principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos complementarios en las composiciones como combinaciones terapéuticas adecuadas.

**[0086]** En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

**[0087]** "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 afección patológica que requiere la inhibición de una cisteína proteasa activa implicada en su patogénesis.

**[0088]** Según la invención, el término "paciente" o "paciente en necesidad del mismo", está destinado a un animal o un ser humano afectado o susceptible de ser afectado con un estado patológico que implica una cisteína proteasa activa en su patogénesis. Preferiblemente, el paciente es humano.

**[0089]** En términos generales, los compuestos de esta invención pueden proporcionarse en una solución tampón fisiológica acuosa que contiene de 0,1 a 10% p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicos son de 1 µg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día o una dosis equivalente en un niño humano. La dosificación preferida de fármaco a administrar probablemente depende 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 seleccionado, la formulación del compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular, o de otro tipo), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la ruta de liberación escogida, y la velocidad (bolo o infusión continua) y la programación de las administraciones (número de repeticiones en un período de tiempo determinado).

**[0090]** Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados en formas de dosis unitarias, en donde el término "dosis unitaria" significa una dosis única que es capaz de ser administrada a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el propio compuesto activo o como una composición farmacéuticamente aceptable, tal como se describe más adelante. Por tanto, los intervalos de dosis diaria totales típicos varían 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 3000 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 unitaria 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 mediante parches transdérmicos.

**[0091]** 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, 20a ed.; Gennaro, AR, Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

**[0092]** Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que se formula un compuesto de la presente invención para administración oral o parenteral.

5 [0093] Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, trociscos y similares pueden  
contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un  
aglutinante, tal como celulosa microcristalina, o goma de tragacanto; un diluyente, tal como almidón o lactosa; un  
disgregante, tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un deslizante,  
tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante,  
tal como menta o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de una cápsula dura o una cápsula  
blanda, que generalmente están formadas de mezclas de gelatina opcionalmente mezcladas con plastificantes, así  
como una cápsula de almidón. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros materiales que  
10 modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca, o agentes  
entéricos. Otras formas de dosificación oral, jarabe o elixir, pueden contener agentes edulcorantes, conservantes,  
tintes, colorantes, y saborizantes. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y  
formulaciones de disolución rápida, de liberación modificada o de liberación sostenida, y donde tales formulaciones  
de liberación sostenida son preferiblemente bi-modales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de  
maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio, o talco en cualquier  
15 combinación.

[0094] Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones  
estériles acuosas o no acuosas. Las composiciones líquidas también pueden incluir aglutinantes, tampones,  
conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes y agentes colorantes, y similares. Los disolventes no  
20 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, biodegradable, copolímero de  
lactida/glicólido, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden ser excipientes útiles para controlar la  
liberación de los compuestos activos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y nutrientes,  
25 reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Otros sistemas de suministro  
parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de copolímero de etileno-  
acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas.

[0095] Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios, tales  
30 como polvo seco, aerosol, o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril  
éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel  
para aplicarse por vía intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, pastillas de  
chupar 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  
35 como supositorios de dosis unitaria, con un vehículo de base sólida, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un  
salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica a la piel toman preferiblemente la forma de un ungüento, crema,  
loción, pasta, gel, pulverización, aerosol, o aceite. Los vehículos 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 lipófilas o tamponadas, soluciones acuosas,  
40 disueltas y/o dispersadas en un polímero o un adhesivo.

[0096] La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por la descripción en los siguientes  
ejemplos.

45 [0097] Los compuestos representativos de la invención se resumen en la siguiente tabla:

50

55

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

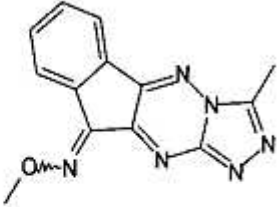
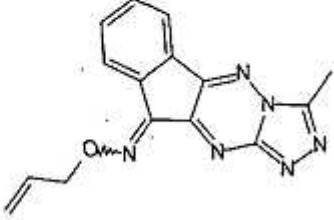
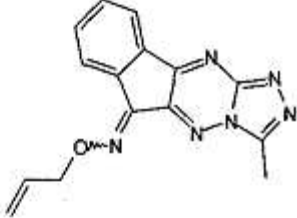
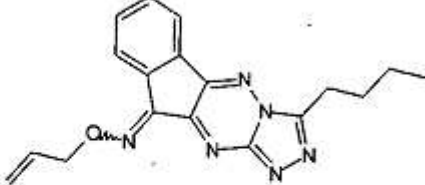
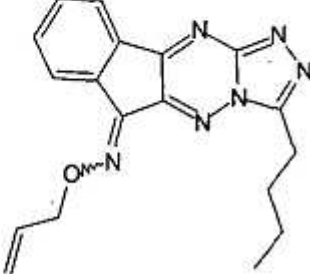
45

50

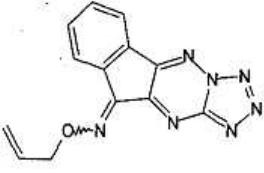
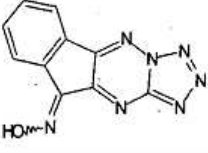
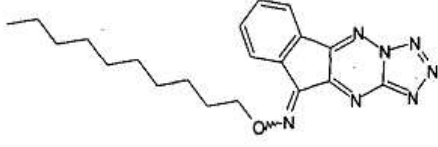
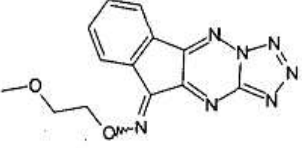
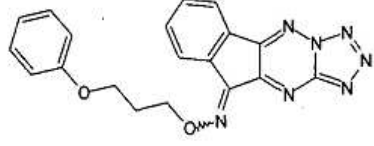
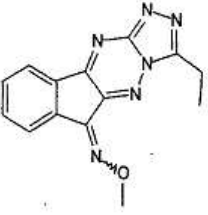
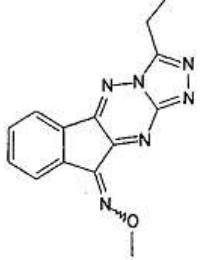
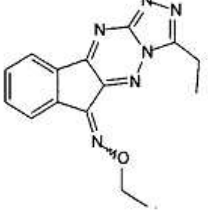
55

60

65

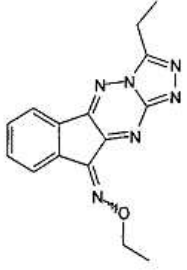
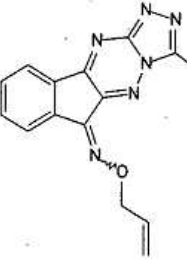
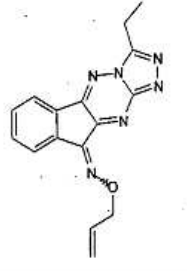
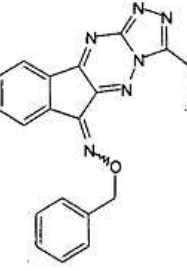
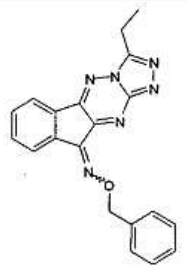
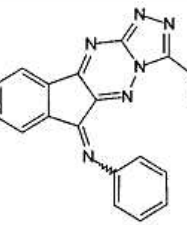
QUÍMICA	Procedimiento de preparación
	Ejemplo 5a/E
	Ejemplo 5b/E
	Ejemplo 5c/E
	Ejemplo 5d/E
	Ejemplo 5e/E

(continuación)

QUÍMICA	Procedimiento de preparación
<p>5</p>  <p>10</p>	<p>Ejemplo 6</p>
<p>15</p>  <p>20</p>	<p>Ejemplo 7</p>
<p>25</p>  <p>30</p>	<p>Ejemplo 8a/F</p>
<p>35</p>  <p>40</p>	<p>Ejemplo 8b/F</p>
<p>45</p>  <p>50</p>	<p>Ejemplo 8c/F</p>
<p>55</p>  <p>60</p>	<p>Ejemplo 10a/K</p>
<p>65</p> 	<p>Ejemplo 10b/K</p>
	<p>Ejemplo 10c/K</p>

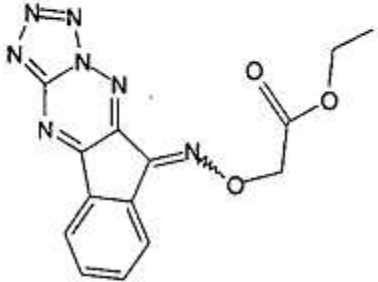
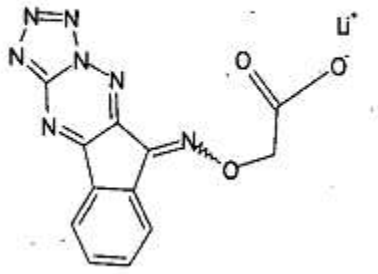
(continuación)

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

QUÍMICA	Procedimiento de preparación
	Ejemplo 10d/K
	Ejemplo 10e/K
	Ejemplo 10f/K
	Ejemplo 10g/K
	Ejemplo 10h/K
	Ejemplo 11



(continuación)

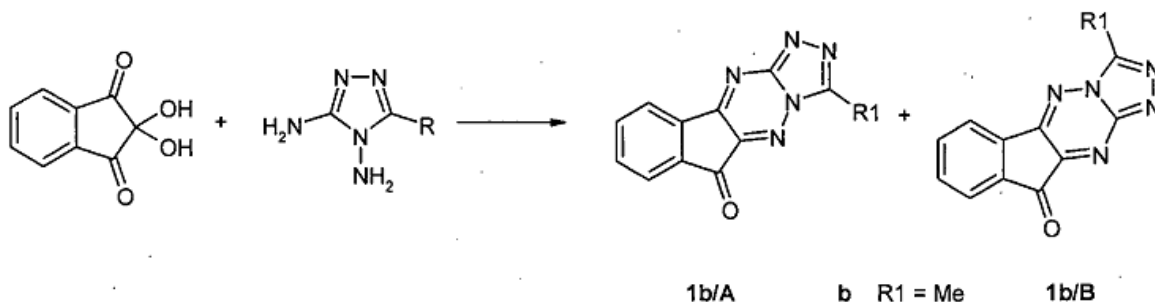
QUÍMICA	Procedimiento de preparación
	Ejemplo 12
	Ejemplo 13

PARTE EXPERIMENTAL

[0098] Los compuestos representativos de la invención se pueden sintetizar de acuerdo con los siguientes procedimientos:

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

[0099]



[0100] Se calentó a reflujo una mezcla de (1,2,4)-triazol-3,4-diamina sustituido en R1 (8,8 mmol) y la ninhidrina (1,57 g, 8,8 mmol) en EtOH (10 ml) y AcOH (1,5 ml) durante 2-16 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con solución saturada de  $K_2CO_3$  y solución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y los disolventes se eliminaron por evaporación bajo presión reducida. El crudo se purificó de la siguiente manera: cromatografía flash en gel de sílice (tolueno/MeOH 95:5 a 8:2 o  $CH_2Cl_2$ /EtOAc 9:1 a 1:1) para la purificación de la mezcla regioisomérica, a continuación cromatografía flash de alúmina neutra (grado II) ( $CH_2Cl_2$ /EtOAc 7:3 a  $CH_2Cl_2$ /MeOH 1:1 + 5% HCOOH o AcOH) para la separación de los regioisómeros.

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

[0101] Preparado de acuerdo con el procedimiento general A con un rendimiento del 13% como un sólido de color amarillo.

[0102] RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>): δ 8,23 (d, 1 H), 8,02 (m, 2H), 7,89 (ddd, 1 H), 2,72 (s, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O: 237,22; encontrado: 238,2 (MH<sup>+</sup>).

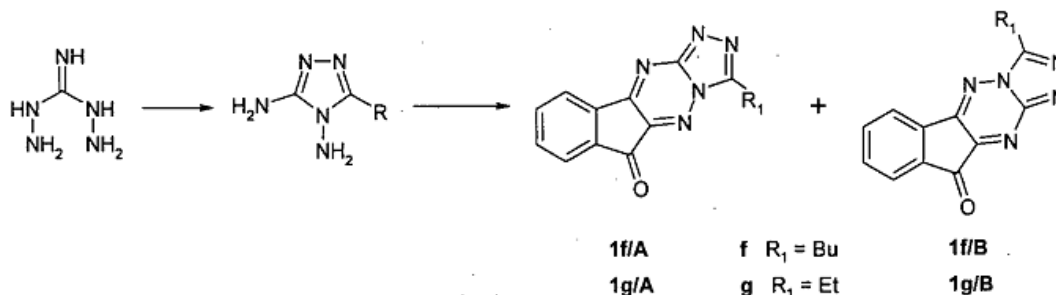
3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta [b]fluoren-9-ona (1b/B)

[0103] Preparado de acuerdo con el procedimiento general A con un rendimiento del 30% como un sólido de color amarillo.

[0104] RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>): δ 8,16 (d, 1H), 8,05-7,95 (m, 2H), 7,85 (ddd, 1H), 2,77 (s, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O: 237,22; encontrado: 238,2 (MH<sup>+</sup>).

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

[0105]



[0106] La preparación de diaminotriazoles sigue el procedimiento descrito en Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther. 1986, 21, 235.

[0107] Se agitó una mezcla de clorhidrato de diaminoguanidina (1 g, 8 mmol) en un exceso (10 g) del ácido carboxílico apropiado y se calentó a 120-130°C durante 12-24 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió HCl al 37% (10 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 2-3 horas y después se concentró a sequedad a vacío. El crudo obtenido se lavó con Et<sub>2</sub>O (X3) y se utilizó sin ninguna purificación adicional.

[0108] Para la condensación entre el diaminotriazol crudo y ninhidrina, ver el procedimiento general A.

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

[0109] Preparado de acuerdo con el procedimiento general B con un rendimiento del 6% como un sólido de color amarillo.

[0110] RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>): δ 8,23 (d, 1 H), 8,02 (m, 2H), 7,89 (ddd, 1 H), 3,10 (dd, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,42 (m, 2H), 0,94 (t, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>5</sub>O<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N: 279,30; encontrado: 280,2 (MH<sup>+</sup>).

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

[0111] Preparado de acuerdo con el procedimiento general B con un rendimiento de 10% como un sólido de color amarillo.

[0112] RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>): δ 8,16 (d, 1H), 7,99 (m, 2H), 7,85 (dd, 1 H), 3,16 (dd, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 0,96 (t, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>5</sub>O<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N: 279,30; encontrado: 280,3 (MH<sup>+</sup>).

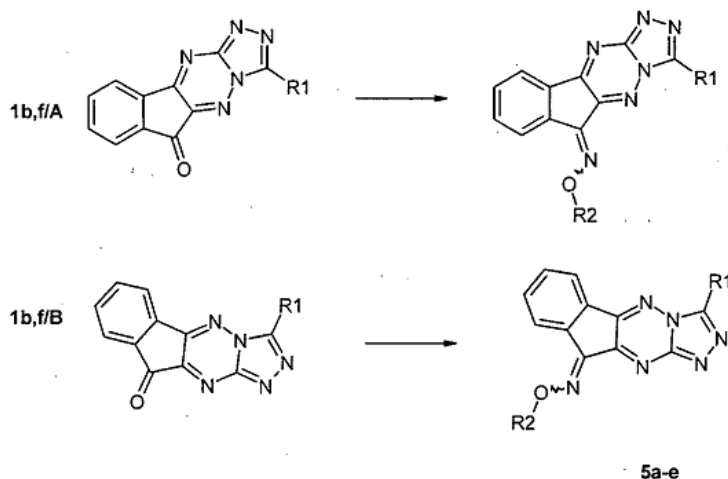
1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (1g/A)

[0113] Preparado de acuerdo con el procedimiento general B con un rendimiento del 48% como un sólido de color amarillo.

[0114] RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,21 (d, 1H), 8,00 (d, 1H), 7,90 (ddd, 1H), 7,77 (ddd, 1 H), 3,21 (q, 2H), 1,49 (t, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O: 251,25; encontrado: 252,1 (MH<sup>+</sup>).

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

[0115] Preparado de acuerdo con el procedimiento general B con un rendimiento del 32% como un sólido de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,12 (d, 1H), 8,02 (d, 1H), 7,88 (ddd, 1H), 7,75 (ddd, 1H), 3,25 (q, 2H), 1,53 (t, 3H). ESI+MS: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O: 251,25; encontrado: 252,1 (MH<sup>+</sup>).

Procedimiento general E: síntesis de derivados de O-alkiloxima de pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:**[0116]**

- a R1 = Me, R2 = Me - regioisómero B  
 b R1 = Me, R2 = alilo - regioisómero B  
 c R1 = Me, R2 = alilo - regioisómero A  
 d R1 = Bu, R2 = alilo - regioisómero B  
 e R1 = Bu, R2 = alilo - regioisómero A

**[0117]** Se calentó a 60°C una suspensión de 1 (1 mmol), clorhidrato de O-alkil-hidroxilamina (3 mmol) y tamices moleculares en piridina (10 ml) durante 2-12h. El residuo insoluble se filtró, el disolvente se evaporó y se purificó el producto en bruto por cromatografía flash en gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona 85:15 o tolueno/MeOH 9:1 o éter de petróleo/EtOAc 1:1).

*O-metil-oxima de 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (5a)*

**[0118]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general E a partir de 1b/B en un rendimiento del 55% como un sólido amarillo como mezcla E/Z 2:1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,43 (m, 1H), 8,16 (m, 1H), 7,81 (m, 2H), 4,34 (s, 3H), 2,75 (s, 3H), 8,05 (m, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,72 (m, 2H), 4,30 (s, 3H), 2,75 (s, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N: 266,26; encontrado: 267,1 (MH<sup>+</sup>).

*O-alil-oxima de 3-Metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (5b)*

**[0119]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general E a partir de 1b/B en un rendimiento del 65% como un sólido amarillo como mezcla E/Z 1:1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,02 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,75-7,56 (m, 2H), 6,26-6,8 (m, 1H), 5,50 (dd, 1H), 5,35 (d, 1H), 5,05 (d, 2H), 2,86 (s, 3H), 8,49 (m, 1H), 8,13 (m, 1H), 7,77-7,56 (m, 2H), 6,26 a 6,8 (m, 1H), 5,50 (dd, 1H), 5,39 (d, 1H), 5,12 (d, 2H), 2,86 (s, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N: 292,30; encontrado: 293,1 (MH<sup>+</sup>).

*O-alil-oxima de 1-Metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (5c)*

**[0120]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general E a partir de 1b/A con un rendimiento del 76% como un sólido amarillo como mezcla E/Z 7:3. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,16 (m, 1H), 7,95 (m, 1H), 7,77-7,60 (m, 2H), 6,26-6,8 (m, 1H), 5,54 (ddt, 1H), 5,37 (ddt, 1H), 5,04 (ddd, 2H), 2,84 (s, 3H), 8,49 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,77-7,60 (m, 2H), 6,26-6,8 (m, 1H), 5,49 (ddt, 1H), 5,40 (ddt, 1H), 5,09 (ddd, 2H), 2,88 (s, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N: 292,30; encontrado: 293,1 (MH<sup>+</sup>).

*O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (5d)*

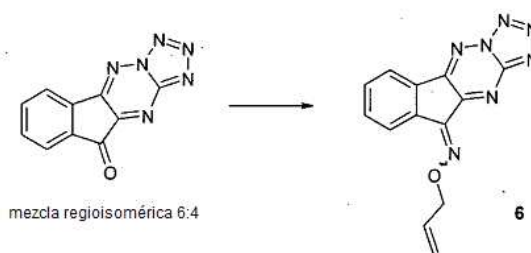
**[0121]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general E a partir de 1f/B con un rendimiento del 93% como un sólido amarillo como mezcla E/Z 6:4. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,42 (m, 1H), 8,06 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 6,19-6,00 (m, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,31 (m, 1H), 5,03 (ddd, 2H), 3,17 (dd, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 0,93 (t, 3H), 7,96 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 6,19-6,00 (m, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,97 (ddd, 2H), 3,17 (dd, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 0,93 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N: 334,38; encontrado: 335,1 (MH<sup>+</sup>).

*O*-alil-oxima de 1-Butil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (5e)

**[0122]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general E a partir de 1f/A con un rendimiento del 95% como un sólido amarillo como mezcla E/Z 1:1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,45 (m, 1 H), 8,22 (m, 1 H), 7,69 (m, 2H), 6,22-6,2 (m, 1 H), 5,45 (m, 1 H), 5,35 (m, 1 H), 5,05 (ddd, 2H), 3,21 (dd, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,95 (t, 3H), 8,12 (m, 1 H), 7,91 (m, 1H), 7,62 (m, 2H), 6,22-6,2 (m, 1 H), 5,49 (m, 1 H), 5,32 (m, 1 H), 4,99 (ddd, 2H), 3,18 (dd, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,95 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N: 334,38; encontrado: 335,2 (MH<sup>+</sup>).

Síntesis de *O*-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (6):

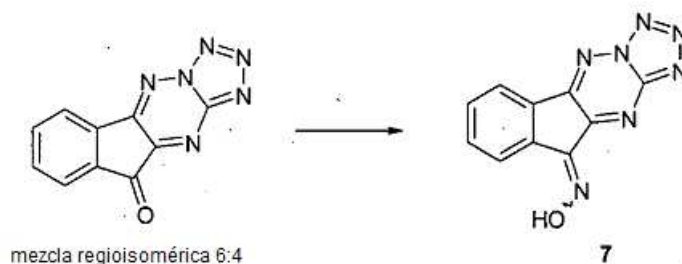
**[0123]**



**[0124]** El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento general E a partir de una mezcla regioisomérica 6:4 de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (preparada a partir de la ninhidrina y tetrazol-1,5-diamina) con un rendimiento del 89% como un sólido amarillo como mezcla E/Z y mezcla regioisomérica. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,47 (m, 1 H), 8,22 (m, 1 H), 7,84-7,58 (m, 2H), 6,23-6,3 (m, 1 H), 5,46 (m, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,13 (ddd, 2H), 8,19 (m, 1H), 7,98 (m, 1 H), 7,84-7,58 (m, 2H), 6,23-6,3 (m, 1 H), 5,46 (m, 1 H), 5,34 (m, 1 H), 5,06 (m, 2H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>7</sub>O: 279,26; encontrado: 280,2 (MH<sup>+</sup>).

Síntesis de oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (7):

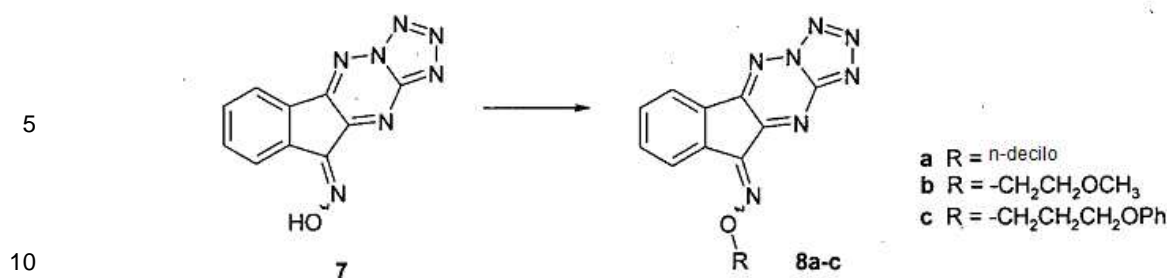
**[0125]**



**[0126]** El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento general E a partir de una mezcla regioisomérica 6:4 de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (preparada a partir de la ninhidrina y tetrazol-1,5-diamina) con un rendimiento del 44% como un sólido amarillo como una mezcla E/Z y regioisomérica. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 13,87 (bs, 1 H), 8,59 (m, 1H), 8,14 (m, 1H), 7,78-7,52 (m, 2H), 13,69 (bs, 1H), 8,05 (d, 1 H), 7,91 (d, 1 H), 7,78-7,52 (m, 2H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>N<sub>7</sub>O: 239,20; encontrado: 240,1 (MH<sup>+</sup>).

Procedimiento general F: Síntesis de *O*-alquinoxima de hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona:

**[0127]**



15 **[0128]** Se agitó a temperatura ambiente una mezcla de 7 (48 mg, 0,20 mmol), bromuro de alquilo (0,6 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (55 mg, 0,4 mmol) en DMF (2 ml) durante 16 h, a continuación el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en la mezcla variable con MeOH o éter de petróleo).

*O*-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (8a)

20 **[0129]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general F con un rendimiento del 53% como un sólido de color amarillo-verde como una mezcla E/Z y regioisomérica. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,39 (m, 1H), 8,24 y 8,15 (m, 1H), 7,78-7,63 (m, 2H), 4,61-4,47 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,47-1,06 (m, 14H), 0,75 (m, 3H). ESI\*MS: calculado para C<sub>7</sub>O<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N: 379,47; encontrado: 380,2 (MH<sup>+</sup>).

25 *O*-(2-metoxi-etil) oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (8b)

30 **[0130]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general F con un rendimiento del 29% como un sólido de color marrón claro como una mezcla E/Z y regioisomérica. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,49 (m, 1 H), 8,27 (m, 1 H), 7,83-7,66 (m, 2H), 4,73 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,40 (s, 3H). 8,49 (m, 1 H), 8,19 (m, 1 H), 7,83-7,66 (m, 2H), 4,73 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,41 (s, 3H). ESI\*MS: calculado para C<sub>11</sub>N<sub>13</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>: 297,28; encontrado: 298,0 (MH<sup>+</sup>).

35 *O*-(3-fenoxi-propil) oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (8c)

40 **[0131]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general F con un rendimiento del 42% como un sólido amarillo como una mezcla E/Z y regioisomérica. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de isómeros): δ 8,41 (m, 1H), 8,15 (m, 1H), 7,76-7,58 (m, 2H), 7,18 (m, 2H), 6,83 (m, 3H), 4,87-4,70 (m, 2H), 4,18-4,7 (m, 2H), 2,42-2,27 (m, 2H), 8,26 (m, 1H), 7,89 (d, 1H), 7,76-7,58 (m, 2H), 7,18 (m, 2H), 6,83 (m, 3H), 4,87-4,70 (m, 2H), 4,18- 4,07 (m, 2H), 2,42-2,27 (m, 2H). ESI\*MS: calculado para C<sub>15</sub>N<sub>13</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>: 373,38; encontrado: 374,1 (MH<sup>+</sup>).

Procedimiento general K: síntesis de derivados de O-alkiloxima de pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona de etilo:

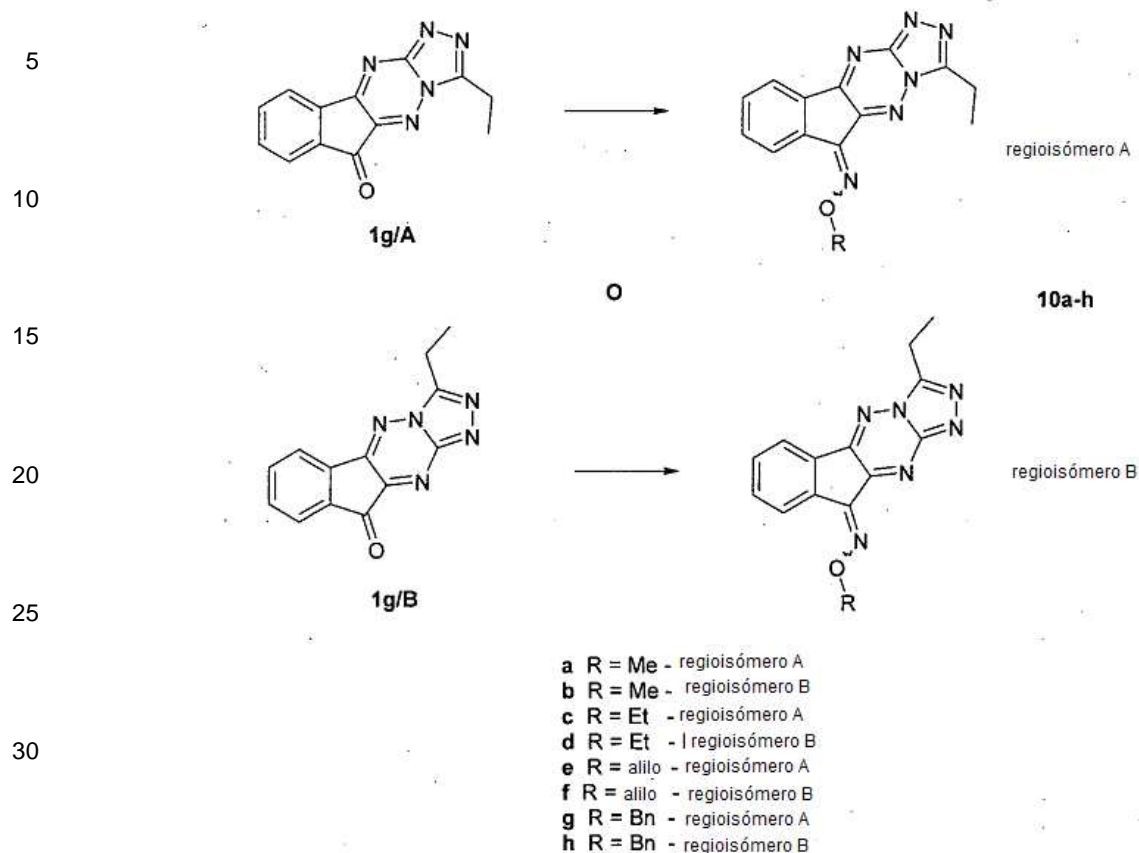
45 **[0132]**

50

55

60

65



**[0133]** Se calentaron una suspensión de **1 g/A** o **1 g/B** (1 mmol), clorhidrato de O-alkil-hidroxilamina (2 mmol) y tamices moleculares en piridina (10 ml) a 60°C durante 23 h. El residuo insoluble se filtró, el disolvente se evaporó y se purificó el crudo por cromatografía flash en gel de sílice.

*O*-metil-oxima de 1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (**10a**)

**[0134]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:17:3) a partir de **1 g/A** en un rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo como mezcla E/Z 7:3. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,47 (m, 1H), 8,27 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,66 (m, 1H), 4,41 (s, 3H), 3,28 (q, 2H), 1,55 (t, 3H) y 8,17 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 4,37 (s, 3H), 3,25 (q, 2H), 1,55 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N: 280,29; encontrado: 281,1 (MH<sup>+</sup>).

*O*-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (**10b**)

**[0135]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:17:3) a partir de **1 g/B** en un rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo como mezcla E/Z 7:3. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,50 (m, 1 H), 8,17 (m, 1 H), 7,63 (m, 2H), 4,45 (s, 3H), 3,30 (q, 2H), 1,57 (t, 3H) y 8,07 (d, 1H), 7,98 (d, 1 H), 7,68 (ddd, 1 H), 7,64 (ddd, 1 H), 4,41 (s, 3H), 3,29 (q, 2H), 1,59 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N: 280,29; encontrado: 281,1 (MH<sup>+</sup>).

*O*-etil-oxima de 1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (**10c**)

**[0136]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 70:25:5) a partir de **1 g/A** en un rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo como mezcla E/Z 6:4. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,17 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,65 (ddd, 1H), 4,60 (q, 2H), 3,26 (q, 2H), 1,55 (t, 3H), 1,55 (t, 3H) y 8,47 (m, 1H), 8,27 (m, 1H); 7,72 (m, 1H), 7,63 (ddd, 1H), 4,66 (q, 2H), 3,30 (q, 2H), 1,54 (t, 3H), 1,51 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N: 294,32; encontrado: 295,1 (MH<sup>+</sup>).

*O*-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (**10d**)

**[0137]** Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 70: 25:5) a partir de **1**

**g/B** en un rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo como mezcla E/Z 1:1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,49 (m, 1H), 8,13 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,62 (m, 1H), 4,69 (q, 2H), 3,27 (q, 2H), 1,58-1,48 (m, 6H), y 8,03 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,62 (m, 1H), 4,62 (q, 2H), 3,27 (q, 2H), 1,58-1,48 (m, 6H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N: 294,32; encontrado: 295,1 (MH<sup>+</sup>).

5

*O*-alil-oxima de 1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (10e)

[0138] Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:16:4) a partir de **1 g/A** en un rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo como mezcla E/Z 6:4. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,17 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,65 (m, 2H), 6,26-6,7 (m, 1H), 5,54 (m, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,04 (ddd, 2H), 3,26 (m, 2H), 1,54 (m, 3H) y 8,49 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,73 (m, 2H), 6,26-6,7 (m, 1H), 5,49 (m, 1H), 5,40 (m, 1H), 5,09 (ddd, 2H), 3,26 (m, 2H), 1,54 (m, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N: 306,33; encontrado: 307,1 (MH<sup>+</sup>).

10

*O*-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (10f)

15

[0139] Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:17:3) a partir de **1 g/B** en 96% de rendimiento como un sólido amarillo como una mezcla E/Z 65:35. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,50 (m, 1H), 8,14 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 6,26-6,9 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,39 (m, 1H), 5,12 (ddd, 2H), 3,27 (q, 2H), 1,55 (t, 3H) y 8,04 (m, 1H), 7,95 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,61 (m, 1H), 6,26-6,9 (m, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,36 (m, 1H), 5,106 (ddd, 2H), 3,27 (q, 2H), 1,56 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N: 306,33; encontrado: 307,2 (MH<sup>+</sup>).

20

*O*-bencil-oxima de 1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (10 g)

[0140] Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:17:3) a partir de **1 g/A** en 86% de rendimiento como un sólido amarillo como una mezcla E/Z 65:35. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,16 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,41 (m, 3H), 5,58 (s, 2H), 3,21 (q, 2H), 1,49 (t, 3H) y 8,43 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,41 (m, 3H), 5,62 (s, 2H), 3,29 (q, 2H), 1,56 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N: 356,39; encontrado: 357,1 (MH<sup>+</sup>).

25

30

*O*-bencil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona (10h)

[0141] Preparado de acuerdo con el procedimiento general K (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:17:3) a partir de **1 g/B** en 99% de rendimiento como un sólido amarillo como mezcla E/Z 6:4. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,44 (m, 1H), 8,13 (m, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,46-7,29 (m, 3H), 5,64 (s, 2H), 3,62 (q, 2H), 1,55 (t, 3H) y 8,01 (m, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,41 (m, 3H), 5,59 (s, 2H), 3,29 (q, 2H), 1,56 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>6</sub>O<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N: 356,39; encontrado: 357,1 (MH<sup>+</sup>).

35

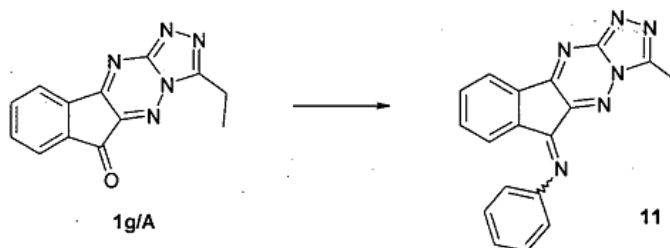
40

Síntesis de [1-Etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-iliden]-fenil-amina (11):

40

[0142]

45



50

[0143] Se añadió a una suspensión de **1 g/A** (200 mg, 0,79 mmol) y tamices moleculares en tolueno (4 ml), anilina (72 µl, 0,79 mmol). La mezcla se agitó a 130°C durante 4 h, a continuación el disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía flash (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH 80:18:2), proporcionando **11** (231 mg, 90%) como un sólido naranja en una proporción diastereoisomérica de 1:1.

55

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,28 (d, 1H), 7,70 (ddd, 1H), 7,56-7,26 (m, 6H), 6,91 (d, 1H), 3,34 (q, 2H), 1,58 (t, 3H) y 8,22 (m, 2H), 7,81 (m, 2H), 7,47 (m, 1H), 7,07 (m, 4H), 2,80 (q, 2H), 1,21 (t, 3H). ESI<sup>+</sup>MS: calculado para C<sub>14</sub>N<sub>19</sub>H<sub>6</sub>: 326,36; encontrado: 327,2 (MH<sup>+</sup>).

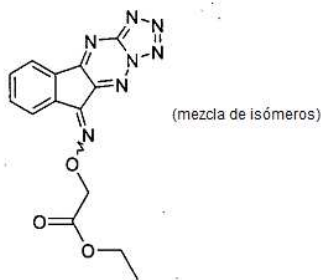
60

Éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminoxi)-acético y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (12)

[0144]

65

5

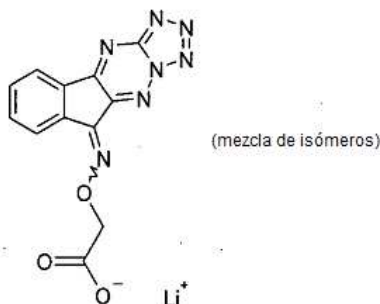


10

15 **[0145]** Se agitó una mezcla de la oxima de **7** (560 mg, 2,34 mmol) y carbonato de cesio (1,54 g, 4,68 mmol) en DMF (12 ml) durante 5 min. Se añadió bromoacetato de etilo (1,2 g, 7,02 mmol) gota a gota, y al final de la adición, la mezcla muy coloreada se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó, y el producto bruto se disolvió en diclorometano. Después de la filtración sobre una almohadilla de sílice, evaporación, recristalización con ciclohexano/acetato de etilo y la trituración con ciclohexano, se obtuvieron 717 mg (94%) del compuesto **12** como un polvo verde. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) (mezcla de isómeros): δ (ppm) = 1,28 (m, 3H); 4,21 (m, 2H); 5,28 (m, 2H); 7,70-8,60 (m, 4H). LC-MS (ES): m/z = 651 (2M+H<sup>+</sup>), 326 (M+H<sup>+</sup>).

20

*Sal de litio de (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminoxil)acetato y/o su correspondiente tetrazol regioisomérico (13)*

25 **[0146]**

30

35

40 **[0147]** Se agitó una solución de éster **12** (700 mg; 2,15 mmol) y LiOH (451 mg, 10,75 mmol) en 12 ml de metanol durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla muy coloreada se enfrió hasta -20°C, y después de 1 h, el precipitado formado se filtró y se lavó con metanol frío para dejar 380 mg (59%) del compuesto **13** como un sólido verde.

40

45 **[0148]** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) (mezcla de isómeros): δ (ppm) = 4,8 (s, 2H); 7,40-8,40 (m, 4H). LC-MS (ES): m/z = 296 (MH<sup>+</sup>).

45

#### Cisteína proteasas representativas

#### Ensayo de actividad USP5

50 **[0149]** USP5 se diluyó en tampón de 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 pH 7,6). Se almacenaron las soluciones madre de los compuestos (100 mM) a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 μM; 33,3 μM; 11,1 μM; 3,7 μM; 1,23 μM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nM.

55 **[0150]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 μl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para USP5 fue de 400 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 a una concentración de sustrato fija. 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 promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideal (pendiente

65



variable).

#### Clonación y purificación de USP7

5 **[0151]** El ADNc que codifica USP7 se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de ARNm de placenta. Se subclonó ADNc de USP7 mediante PCR en un vector de expresión de baculovirus (pFastBac-HT; Invitrogen). Un ADNc que codifica una USP7 mutada se generó por PCR mutagénica. La proteína correspondiente codifica una sustitución de cisteína por alanina en el residuo 223. Las secuencias se determinaron por secuenciación de todo el marco de lectura abierto. Se generaron bácmidos que codifican USP7 siguiendo la transposición de DH10Bac. Los bácmidos correspondientes se transfectaron en células de insecto (Sf9). Se recuperaron los virus del sobrenadante del cultivo y se amplificaron dos veces. Las células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) se infectaron durante 72 horas. Los lisados celulares totales se recogieron y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,6; 0,75% de NP40; NaCl 500 mM; 10% de glicerol; DTT 1 mM; imidazol 10 mM; cóctel de inhibidores de proteasa; AEBSF 20 µg/ml; aprotinina 10 µg/ml). Las proteínas se purificaron por afinidad en resinas de afinidad de metales (resina de afinidad Talon Metal; BD Biosciences). Los materiales unidos se lavaron ampliamente en tampón de lavado (fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; 0,5% de Triton X-100; 10% de glicerol) y se eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía imidazol 250 mM. Las proteínas se dializaron en tampón de diálisis (Tris HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; 10% de glicerol). Las purificaciones de proteínas se analizaron en NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

#### Ensayo de actividad de USP7

25 **[0152]** USP7 se diluyó en tampón de 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 pH 7,6). Las soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nm.

30 **[0153]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para USP7 fue de 400 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 152 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a una concentración de sustrato fija. 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 promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal (pendiente variable).

#### Clonación y purificación de USP8

45 **[0154]** El ADNc que codifica USP8 se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de ARNm de placenta. Se subclonó ADNc de USP8 mediante 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 sustitución de cisteína por alanina en el residuo 786. Las secuencias se determinaron por secuenciación de todo el marco de lectura abierto. Se generaron bácmidos que codifican USP7 siguiendo la transposición de DH10Bac. Los bácmidos correspondientes se transfectaron en células de insecto (Sf9). Se recuperaron los virus del sobrenadante del cultivo y se amplificaron dos veces. Las células de insecto (Sf9 o High Five; Invitrogen) se infectaron durante 72 horas. Los lisados celulares totales se recogieron y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,6; 0,75% de NP40; NaCl 500 mM; 10% de glicerol; DTT 1 mM; imidazol 10 mM; cóctel de inhibidores de proteasa; AEBSF 20 µg/ml; aprotinina 10 µg/ml). Las proteínas se purificaron por afinidad en resinas de afinidad de metales (resina de afinidad Talon Metal; BD Biosciences). Los materiales unidos se lavaron ampliamente en tampón de lavado (fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; 0,5% de Triton X-100; 10% de glicerol) y se eluyeron de la resina en tampón de lavado que contenía imidazol 250 mM. Las proteínas se dializaron en tampón de diálisis (Tris HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; 10% de glicerol). Las purificaciones de proteínas se analizaron en NuPAGE al 4-12% (Invitrogen).

#### Ensayo de actividad de USP8

60 **[0155]** USP8 se diluyó en tampón de 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 pH 8,8). Las soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nm.

65

**[0156]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para USP8 fue de 400 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). Las concentraciones de la enzima (USP8) en ensayos de especificidad fueron de 630 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a una concentración de sustrato fija. 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 promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

#### Ensayo de actividad de UCH-L3

**[0157]** Uch-L3 se diluyó en tampón de 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 pH 7,6). Las soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nm.

**[0158]** Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para Uch-L3 fue de 400 nM de Ub-AMC (Boston Biochem). Las concentraciones de la enzima (Uch-L3) en ensayos de especificidad fueron de 13 pM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a una concentración de sustrato fija. 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 promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

#### Ensayo de actividad de caspasa 3

**[0159]** La caspasa 3 se diluyó en tampón de caspasa 3 (Hepes 100 mM pH 7,5; 10% de sacarosa; 0,1% de CHAPS). Las soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nm. Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para el ensayo de especificidad de caspasa 3 fue de 500 nM (Ac-DEVD-AMC; Promega). La concentración de la enzima (caspasa 3) en ensayos de especificidad fue de 3,2 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a una concentración de sustrato fija. 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 promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

#### Ensayo de actividad de Catepsina B

**[0160]** La catepsina B se diluyó en tampón de catepsina B (Tris HCl 20 mM pH 6,8; EDTA 1 mM; DTT 1 mM). Las soluciones madre de los compuestos (100 mM) se almacenaron a -20°C en DMSO. Los compuestos se ensayaron a las siguientes concentraciones finales: 100 µM; 33,3 µM; 11,1 µM; 3,7 µM; 1,23 µM; 412 nM; 137 nM; 45,7 nM; 15,2 nM; 5 nm. Las reacciones se realizaron como duplicados en placas de 96 pocillos Black LJL (microplacas HE; Molecular Devices; 20 µl de volumen de reacción final). La concentración de sustrato para el ensayo de especificidad de catepsina B fue de 36 µM (z-RR-AMC; Calbiochem). La concentración de la enzima (catepsina B) en ensayos de especificidad fueron de 3,6 nM. Las concentraciones se determinaron con el fin de realizar ensayos de especificidad bajo velocidades iniciales a una concentración de sustrato fija. 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

promedio +/- desviación estándar) se analizaron como % del control (sin compuesto) y se representaron como porcentaje frente al log de la concentración del compuesto utilizando GraphPad (Prism). Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideal (pendiente variable).

5 Procedimientos de viabilidad y la proliferación celular

Ensayo de viabilidad y proliferación de células HCT116

10 [0161] Se obtuvieron células de cáncer de colon HCT116 de ATCC (American Type Culture Collection), y se mantuvieron en medio 5A de Mc Coy que contenía 10% de FBS, glutamina 3 mM y 1% de penicilina/estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>.

15 [0162] La viabilidad celular se ensayó utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) según las instrucciones del fabricante. MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un tetrazolio derivado de MTT que se reduce en células metabólicamente activas en un formazán soluble permeante de células. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas.

20 [0163] Se sembraron 10<sup>3</sup> células de HCT116 por pocillo. 24 horas más tarde, se cambió el medio y las células se trataron por triplicado con las concentraciones siguientes de cada compuesto: 10 µM – 3,33 µM – 1,11 µM - 370 nM – 123 nM - 41nM - 14 nM y 5 nM. Los compuestos se diluyeron en DMSO al 100%, cuya concentración final sobre las células se mantuvo al 0,5%.

25 [0164] Las células se incubaron con los compuestos durante 72 horas, y a continuación se ensayó su viabilidad mediante 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 GI50 (Inhibición del Crecimiento 50) para cada compuesto utilizando un ajuste de pendiente variable sigmoideal (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes.

30 Ensayo de viabilidad y proliferación de células PC-3

[0165] Se obtuvieron células de cáncer de próstata PC-3 de ATCC y se mantuvieron en medio F-12K que contenía 7% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>.

35 [0166] La viabilidad celular se ensayó utilizando la técnica MTS en placas de cultivo de 96 pocillos (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) según las instrucciones del fabricante. MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un tetrazolio derivado de MTT que se reduce en células metabólicamente activas en un formazán soluble permeante de células. La cantidad de formazán, detectada por su absorbancia a 492 nm es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas.

40 [0167] Se sembraron 2 x 10<sup>3</sup> células de PC3 por pocillo. 24 horas más tarde, se cambió el medio y las células se trataron por triplicado con las concentraciones siguientes de cada compuesto: 10 µM – 3,33 µM – 1,11 µM - 370 nM – 123 nM - 41nM - 14 nM y 5 nM. Los compuestos se diluyeron en DMSO al 100%, cuya concentración final sobre las células se mantuvo al 0,5%.

50 [0168] Las células se incubaron con los compuestos durante 72 horas, y a continuación se ensayó su viabilidad mediante 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 GI50 (Inhibición del Crecimiento 50) para cada compuesto utilizando un ajuste de pendiente variable sigmoideal (Prism 4.0, Graphpad Softwares). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes.

RESULTADOS

55 1. Inhibición de la actividad de cisteína proteasas

[0169]

USP5	
Nº experimento	USP5
5a	1,8 µM
5b	1,15 µM
5d	1,42 µM
6	0,175 µM
7	0,264 µM

## ES 2 633 095 T3

8a	54 $\mu$ M
8b	0,226 $\mu$ M
8c	0,470 $\mu$ M
10f	1,2 $\mu$ M
12	0,131 $\mu$ M
13	0,215 $\mu$ M

<b>USP7</b>	
N° experimento	USP7
5a	4 $\mu$ M
5b	3,14 $\mu$ M
5d	5,35 $\mu$ M
6	0,305 $\mu$ M
7	0,657 $\mu$ M
8b	0,470 $\mu$ M
8c	1,78 $\mu$ M
10b	4,84 $\mu$ M
10d	3, 11 $\mu$ M
10f	3,25 $\mu$ M
10h	7,28 $\mu$ M
12	0,307 $\mu$ M
13	0,415 $\mu$ M

<b>USP8</b>	
N° experimento	USP8
5a	0,58 $\mu$ M
5b	0,355 $\mu$ M
5c	47,7 $\mu$ M
5d	0,565 $\mu$ M
5e	35 $\mu$ M
6	0,064 $\mu$ M
7	0,143 $\mu$ M
8a	27,8 $\mu$ M
8b	0,121 $\mu$ M
8c	0,225 $\mu$ M
10b	0,528 $\mu$ M
10d	0,381 $\mu$ M
10f	0,342 $\mu$ M
10h	0,807 $\mu$ M
12	0,037 $\mu$ M
13	0,071 $\mu$ M

<b>UCH-L3</b>	
N° Experimento	Uch-L3
5a	0,41 $\mu$ M
5b	0,272 $\mu$ M
5c	51 $\mu$ M
5d	0,250 $\mu$ M
5e	89 $\mu$ M
6	0,032 $\mu$ M
7	0,057 $\mu$ M
8a	2,0 $\mu$ M
8b	0,048 $\mu$ M
8c	0,121 $\mu$ M
10f	0,235 $\mu$ M
12	0,044 $\mu$ M
13	0,077 $\mu$ M

[0170]

Nº Experimento	catepB
5a	2,6 µM
5d	6,7 µM
6	0,300 µM
7	0,890 µM
8a	15,8 µM
8b	2,1 µM
8c	3,8 µM
12	0,694 µM
13	0,979 µM

2. Inhibición de la viabilidad y la proliferación celular

5

[0171]

**HCT116**

Nº Experimento	HCT116 GI50 D3
5a	1,402 µM
5b	1,64 µM
5d	1,01 µM
6	0,096 µM
7	0,363 µM
8a	0,398 µM
8b	0,273 µM
8c	0,265 µM
10b	3,36 µM
10d	3,93 µM
10f	2,1 µM
10h	1,91 µM
12	0,412 µM
13	0,832 µM

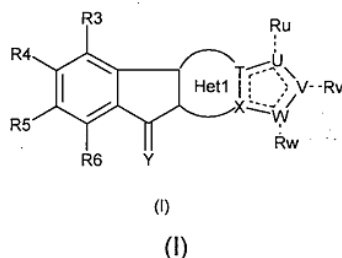
10

**PC3**

Nº Experimento	HCT116 GI50 D3
5a	6,15µM
5b	6,69 µM
5d	2,79 µM
6	0,180 µM
7	0,466 µM
8a	0,391 µM
8b	0,457 µM
8c	0,502 µM
10f	8,4 µM
12	0,548 µM
13	1,97 µM

REIVINDICACIONES

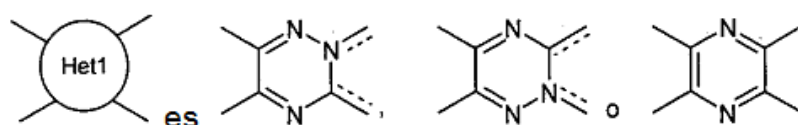
1. Compuesto de fórmula (I):



15 en la que:

---- es un enlace sencillo o un doble enlace, según el caso;

---- es ninguno o un enlace sencillo, según el caso;



30 U, V, W son iguales o diferentes y se pueden seleccionar entre C, N, O, S,

Y es N-OR1, NR'1;

R1 es H, alquilo, alqueno, alcoxilquilo, ariloxialquilo, arilalquilo, alcoxicarbonilalquilo, carboxialquilo;

R'1 es H, alquilo, arilo o aralquilo;

R2, R'2 son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, alquilo, arilo o aralquilo;

35 Rv, Rw son iguales o diferentes y se pueden seleccionar del grupo que consiste en H, CN, =O, Hal, Alq, OAlq, OH,

NRCN, C(CN)=C(OH)(OAlq), SR, NRR', C(O)NRR', heterociclo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, en el que Alq, Arilo,

heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo están opcionalmente sustituidos por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo,

OAlq; Ru se selecciona entre H, Alq, NRR', OAlq;

R3, R4, R5, R6 son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en

H, OAlq, Alq, Hal, OCF<sub>3</sub>;

40 R y R' son cada uno iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, Alq, en

el que Alq está opcionalmente sustituido por Hal, NRR', CN, OH, CF<sub>3</sub>, arilo, heteroarilo;

o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos,

diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros, isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

45 2. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, en el que U, V W son independientemente C o N.

3. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos uno de Rv, Rw

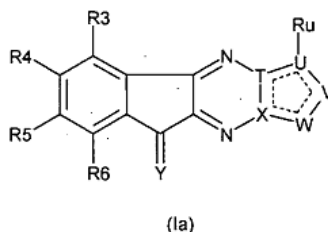
se selecciona entre H, arilo, Alq, NRR', Hal, -AlqArilo, -AlqOH, -AlqOAlq, cicloalquilo, Ru se selecciona entre H, Alq,

NRR', OAlq.

50 4. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Rv, Rw son independiente H o están

ausentes.

55 5. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que son de fórmula (Ia):

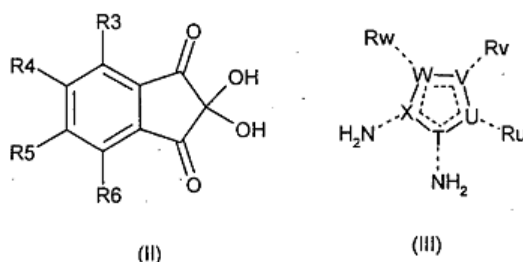


65 en el que R3, R4, R5, R6, Y, T, U, V, W, X, Ru son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

6. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, selecciona del grupo que consiste en:

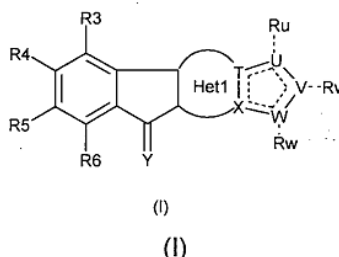
- O-metil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 3-metil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 1-metil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- 5 - O-alil-oxima de 3-butil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 1-butil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- Oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-decil-oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- 10 - O-(2-metoxi-etil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-(3-fenoxi-propil)oxima de 1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-metil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-metil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- 15 - O-etil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-etil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-alil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-bencil-oxima de 1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- O-bencil-oxima de 3-etil-1,2,3a,4,10-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ona
- 20 - [1-etil-2,3,4,10,10a-pentaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-iliden]-fenil-amina
- éster etílico del ácido (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acético
- sal de litio del (1,2,3,3a,4,10-hexaaza-ciclopenta[b]fluoren-9-ilidenaminox)acetato,
- o sus sales, hidratos, o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o sus isómeros ópticos, racematos,
- diastereómeros o enantiómeros, o sus regioisómeros, isómeros geométricos (E y Z) o mezclas de los mismos.

7. Procedimiento de preparación de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa de hacer reaccionar los compuestos correspondientes de fórmula (II) y (III):



en los que R3, R4, R5, R6, T, U, V, W, X, Ru, Rv, Rw son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, llevándose a cabo la reacción en un disolvente prótico orgánico en presencia de un ácido.

8. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I)



en el que R3, R4, R5, R6, T, U, V, W, X, Het1, Ru, Rv, y Rw son como se definen en las reivindicaciones 1 a 5.

9. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 8, para inhibir una o más cisteína proteasas, para el tratamiento y/o prevención del cáncer y metástasis, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y/o infectividad y/o latencia viral, en particular para virus-1 de herpes simplex, virus de Epstein-Barr o coronavirus del SARS, trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente daño en las células nerviosas causadas por un accidente cardiovascular, daño hepático e insuficiencia hepática resultante de una lesión hepática infecciosa, isquémica o química, aguda o crónica, daño renal e insuficiencia renal resultante de una lesión renal infecciosa, isquémica o química, aguda o crónica, daño cardíaco e insuficiencia cardíaca resultante de una lesión cardíaca infecciosa, isquémica o química, aguda o crónica, diabetes resultante de una lesión autoinmunitaria, química,

oxidativa o metabólica, aguda o crónica, en las células beta para insulina de los islotes pancreáticos, cáncer y metástasis, enfermedades cardiovasculares, trastornos inmunológicos, enfermedades de los huesos y las articulaciones, osteoporosis y artritis, trastornos del envejecimiento, diabetes de aparición tardía y cataratas, infecciones y enfermedades virales, que incluyen infección y enfermedad por hepatitis A, hepatitis C, coronavirus de SARS, infecciones y enfermedades rinovirales, infecciones y enfermedades adenovirales, poliomielitis, infecciones y enfermedades bacterianas, que incluyen infecciones y enfermedades por estreptococos, infecciones y enfermedades causadas por la bacteria del género *Clostridium sp.*, infecciones y enfermedades por estafilococos, gingivitis y enfermedades periodontales, infecciones y enfermedades fúngicas, infecciones y enfermedades por parasitarias por protozoos, infecciones y enfermedades parasitarias por gusanos planos, infecciones y enfermedades parasitarias por gusanos redondos.

10. Compuesto, según la reivindicación 9, en el que las cisteína proteasas pertenecen a uno o más grupos de enzimas de desubiquitinación, caspasas, catepsinas, calpaínas, así como cisteína proteasas virales, bacterianas, fúngicas o parasitarias.

11. Combinación que comprende un compuesto, según la reivindicación 8, con una o más terapias seleccionadas entre terapias contra el cáncer, terapias neurológicas, terapias trombolíticas, terapias antioxidantes, terapias contra infecciones, terapias contra la hipertensión, terapias diuréticas, terapias trombolíticas, terapias inmunosupresoras, terapias cardiovasculares, terapias inmunomoduladoras, terapias contra la inflamación, terapias antivirales, terapias contra bacterias, terapias antifúngicas, terapias contra protozoos, terapias antiparasitarias.