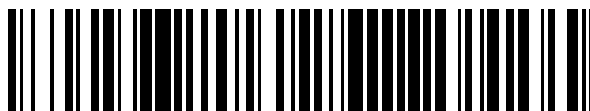


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 277**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/087**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2005** **E 16166492 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 3101026**

54 Título: **Compuestos para la inhibición enzimática de proteosoma**

30 Prioridad:

**06.08.2004 US 599401 P**

**14.09.2004 US 610001 P**

**14.04.2005 US 106879**

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

**28.06.2018**

73 Titular/es:

**ONYX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**One Amgen Center Drive**

**Thousand Oaks, CA 91320-1799 , US**

72 Inventor/es:

**SMYTH, MARK S. y**

**LAIDIG, GUY J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 674 277 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

Compuestos para la inhibición enzimática de proteosoma

5 **Campo técnico**

Esta divulgación se refiere a compuestos y procedimientos para la inhibición enzimática. En particular, la divulgación se refiere a procedimientos terapéuticos basados en la inhibición enzimática.

10 **Antecedentes de la invención**

En eucariotas, la degradación proteica está mediada predominantemente a través de la ruta de ubiquitina, en que las proteínas orientadas para destrucción se ligan al polipéptido de 76 aminoácidos ubiquitina. Una vez orientadas, las proteínas ubiquitinadas sirven entonces como sustratos para el proteasoma de 26S, una proteasa multicatalítica, que escinde proteínas en péptidos cortos mediante la acción de sus tres actividades proteolíticas principales. Aunque tiene una función general en el recambio proteico intracelular, la degradación mediada por proteasoma desempeña también un papel clave en muchos procesos tales como presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, apoptosis, regulación del crecimiento celular, activación de NF- $\kappa$ B, procesamiento antigénico y transducción de señales proinflamatorias.

El proteasoma de 20S es un complejo de proteasa multicatalítica en forma cilíndrica de 700 kDa que comprende 28 subunidades organizadas en cuatro anillos. En levadura y otros eucariotas, 7 subunidades  $\alpha$  diferentes forman los anillos exteriores y 7 subunidades  $\beta$  diferentes comprenden los anillos interiores. Las subunidades  $\alpha$  sirven como sitios de unión para los complejos reguladores de 19S (PA700) y 11S (PA28), así como barrera física para la cámara proteolítica interna formada por los dos anillos de subunidades  $\beta$ . Por tanto, in vivo, se cree que el proteasoma existe como una partícula de 26S ("el proteasoma de 26S"). Los experimentos in vivo han mostrado que la inhibición de la forma de 20S del proteasoma puede correlacionarse fácilmente con la inhibición del proteasoma de 26S. La escisión de las prosequencias aminoterminales de subunidades  $\beta$  durante la formación de partícula expone los residuos de treonina aminoterminales, que sirven como nucleófilos catalíticos. Las subunidades responsables de la actividad catalítica en proteasomas poseen por tanto un residuo nucleofílico aminoterminal, y estas subunidades pertenecen a la familia de las hidrolasas nucleofílicas N-terminales (Ntn) (donde el residuo N-terminal nucleofílico es, por ejemplo, Cys, Ser, Thr y otros restos nucleofílicos). Esta familia incluye, por ejemplo, penicilina G acilasa (PGA), penicilina V acilasa (PVA), glutamina PRPP amidotransferasa (GAT) y glicosilasparaginasa bacteriana. Además de las subunidades  $\beta$  expresadas ubicuamente, los vertebrados superiores poseen también tres subunidades  $\beta$  inducibles por interferón  $\gamma$  (LMP7, LMP2 y MECL1), que reemplazan a sus contrapartidas normales, X, Y y Z respectivamente, alterando por tanto las actividades catalíticas del proteasoma. Mediante el uso de diferentes sustratos peptídicos, se han definido tres actividades proteolíticas principales para el proteasoma de 20S eucariótico: actividad de tipo quimotripsina (CT-L), que escinde después de residuos hidrófobos grandes; actividad de tipo tripsina (T-L), que escinde después de residuos básicos y actividad hidrolizante del péptido peptidilglutamilo (PGPH), que escinde después de residuos ácidos. Se han adscrito también dos actividades adicionales menos caracterizadas al proteasoma: la actividad BrAAP, que escinde después de aminoácidos ramificados; y la actividad SNAAP, que escinde después de aminoácidos neutros pequeños. Las actividades proteolíticas principales del proteasoma parecen ser la contribución de diferentes sitios catalíticos, puesto que los inhibidores, las mutaciones puntuales en subunidades  $\beta$  y el intercambio de subunidades  $\beta$  inductoras de interferón  $\gamma$  alteran estas actividades en diversos grados.

Myung et al. Molecular Cell. Vol. 7, 411-420 describe la síntesis de inhibidores de  $\alpha'\beta'$ -epoxicetona peptídicos selectivos de la actividad hidrolizante del péptido peptidilglutamilo (PGPH). Se sintetizan y prueban diversos compuestos tripeptídicos.

Kim et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 9 (1999), 3335-3340 describe la inhibición de proteasoma por los productos naturales epoxomicina y dihidroeponemicina. Este documento describe también la síntesis de estos compuestos.

El documento WO 2005/105827 describe compuestos de base peptídica para la inhibición enzimática. Los compuestos de base peptídica incluyen al menos tres unidades peptídicas, un epóxido o aziridina y funcionalización N-terminal. Se describe también la síntesis de estos compuestos.

Hay varios ejemplos de moléculas pequeñas que se han usado para inhibir la actividad de proteasoma; sin embargo, estos compuestos generalmente carecen de la especificidad, estabilidad o potencia necesarias para explorar y explotar los papeles del proteasoma a nivel celular y molecular. Por lo tanto, es necesaria la síntesis de un inhibidor

o inhibidores de molécula pequeña con especificidad de sitio aumentada, estabilidad y solubilidad mejoradas y potencia aumentada para permitir la exploración de los papeles del proteasoma a nivel celular y molecular.

### **Resumen de la invención**

5 La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a clases de moléculas conocidas como  $\alpha',\beta'$ -epóxidos peptídicos y  $\alpha',\beta'$ -aziridinas peptídicas. Se entiende que las moléculas originales se unen eficiente, irreversible y selectivamente a hidrolasas nucleofílicas N-terminales (Ntn) y pueden inhibir específicamente actividades particulares de enzimas que tienen múltiples actividades catalíticas.

10 Antes se consideraba que simplemente se deshacía de proteínas desnaturalizadas y mal plegadas, ahora el proteosoma se reconoce como la maquinaria proteolítica constituyente que regula los niveles de diversas proteínas intracelulares mediante su degradación de manera dependiente de señal. Por ello, hay un gran interés en la identificación de reactivos que puedan perturbar específicamente las actividades del proteasoma y otras hidrolasas Ntn y usarse así como sondas para estudiar el papel de estas enzimas en procesos biológicos. En la presente memoria, se describen, sintetizan e investigan compuestos que se orientan a hidrolasas Ntn. Se divulgan y reivindican epóxidos peptídicos y aziridinas peptídicas que pueden inhibir potencial, selectiva e irreversiblemente actividades de proteasoma particulares.

Al contrario que otros inhibidores de base peptídica, no se espera que los epóxidos peptídicos y aziridinas peptídicas descritos en la presente memoria inhiban sustancialmente proteasas no proteasómicas tales como tripsina, quimotripsina, cathepsina B, papaína y calpaína a concentraciones de hasta 50  $\mu$ M. A mayores concentraciones, puede observarse inhibición, pero se esperaría que fuera competitiva y no irreversible, si el inhibidor simplemente compite con el sustrato. Se espera también que los epóxidos peptídicos y aziridinas peptídicas novedosos inhiban la activación de NF- $\kappa$ B y estabilicen los niveles de p53 en el cultivo celular. Además, se esperaría que estos compuestos tuvieran actividad antiinflamatoria. Por tanto, estos compuestos pueden ser sondas moleculares únicas, que tienen la versatilidad de explorar la función de enzimas Ntn en procesos biológicos normales y patológicos.

30 En un aspecto, la divulgación proporciona inhibidores que comprenden un anillo de tres miembros que contiene heteroátomo. Estos inhibidores pueden inhibir la actividad catalítica de enzimas hidrolasas nucleofílicas N-terminales (por ejemplo, el proteasoma de 20S o el proteasoma de 26S) cuando dicho inhibidor está presente a concentraciones menores de aproximadamente 50  $\mu$ M. Respecto al proteasoma de 20S, los inhibidores de hidrolasa particulares inhiben la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma de 20S cuando el inhibidor está presente a concentraciones menores de aproximadamente 5  $\mu$ M, y no inhiben la actividad de tipo tripsina o la actividad PGPH del proteasoma de 20S cuando están presentes a concentraciones menores de aproximadamente 5  $\mu$ M. El inhibidor de hidrolasa puede ser, por ejemplo, una  $\alpha',\beta'$ -epoxicetona o  $\alpha',\beta'$ -aziridincetona peptídica y el péptido puede ser un tetrapéptido. El péptido puede incluir cadenas laterales ramificadas o no ramificadas tales como hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-6</sub>, arilo, aralquilo C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-amida, alquil C<sub>1-6</sub>-amina, ácido carboxílico C<sub>1-6</sub>, éster carboxílico C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-tiol o alquil C<sub>1-6</sub>-tioéter, por ejemplo isobutilo, 1-naftilo, fenilmetilo y 2-feniletilo. El carbono  $\alpha'$  de la  $\alpha',\beta'$ -epoxicetona o  $\alpha',\beta'$ -aziridincetona puede ser un átomo de carbono quiral, tal como un carbono de configuración (R) o  $\beta$ , como estos se definen en la presente memoria.

45 La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas, incluyendo un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente efectiva del inhibidor de hidrolasa, que mejoran los efectos de enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer), enfermedades de consunción muscular, cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, fiebre, atrofia muscular, denervación, lesión nerviosa, ayuno y afecciones inmunorrelacionadas, entre otras.

50 La divulgación proporciona composiciones antiinflamatorias.

La divulgación proporciona además procedimientos para lo siguiente: inhibición o reducción de la infección por VIH en un sujeto; afectación del nivel de expresión de genes víricos en un sujeto; alteración de la variedad de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma en un organismo; determinación de si un proceso celular, de desarrollo o fisiológico o un resultado clínico en un organismo está regulado por la actividad proteolítica de una hidrolasa Ntn particular; tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto; reducción de la velocidad de degradación de proteína muscular en una célula; reducción de la velocidad de degradación de proteína intracelular en una célula; reducción de la velocidad de degradación de proteína p53 en una célula; inhibición del crecimiento de cánceres relacionados con p53 en un sujeto; inhibición de la presentación antigénica en una célula; supresión del sistema

- inmunitario de un sujeto; inhibición de la degradación de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  en un organismo; reducción del contenido de NF- $\kappa\text{B}$  en una célula, músculo, órgano o sujeto; afectación de los ciclos celulares eucarióticos dependientes de ciclina; tratamiento de enfermedades proliferativas en un sujeto; afectación de la regulación dependiente de proteasoma de oncoproteínas en una célula; tratamiento del crecimiento canceroso en un sujeto; tratamiento de la apoptosis relacionada con p53 en un sujeto y cribado de proteínas procesadas por hidrolasas nucleofílicas N-terminales en una célula. Cada uno de estos procedimientos implica la administración o puesta en contacto de una cantidad efectiva de una composición que comprende los inhibidores de hidrolasa divulgados en la presente memoria a un sujeto, una célula, un tejido, un órgano o un organismo.
- 10 La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis del compuesto 8 como se define en las reivindicaciones.

### **Descripción detallada de la invención**

- 15 La divulgación implica compuestos útiles como inhibidores enzimáticos. Estos compuestos son generalmente útiles para inhibir enzimas que tienen un grupo nucleofílico en el extremo N. Por ejemplo, las actividades de enzimas o subunidades enzimáticas que tienen aminoácidos N-terminales con nucleófilos en sus cadenas laterales, tales como treonina, serina o cisteína, pueden inhibirse exitosamente por los inhibidores enzimáticos descritos en la presente memoria. Las actividades de enzimas o subunidades enzimáticas que tienen grupos nucleofílicos no aminoacídicos en sus extremos N, tales como, por ejemplo, grupos protectores o carbohidratos, pueden inhibirse exitosamente también por los inhibidores enzimáticos descritos en la presente memoria.

Aún sin ligarse a ninguna teoría operativa particular, se cree que tales nucleófilos N-terminales de Ntn forman aductos covalentes con el grupo funcional epóxido de los inhibidores enzimáticos descritos en la presente memoria.

- 25 Por ejemplo, en la subunidad  $\beta 5/\text{Pre}2$  del proteasoma de 20S, se cree que la treonina N-terminal forma irreversiblemente un aducto de morfolino o piperazino tras reacción con un epóxido o aziridina peptídico tal como aquellos descritos a continuación. Tal formación de aducto implicaría escisión con apertura de anillo del epóxido o aziridina.
- 30 En realizaciones que incluyen tales grupos unidos a carbonos  $\alpha'$ , la estereoquímica del carbono  $\alpha'$  (aquel carbono que forma parte del anillo de epóxido o aziridina) puede ser (R) o (S). La invención está basada, en parte, en la información de estructura-función divulgada en la presente memoria, que sugiere las siguientes relaciones estereoquímicas preferidas. Se señala que un compuesto preferido puede tener una serie de estereocentros que tienen la relación arriba-abajo (o  $\beta$ - $\alpha$ , cuando  $\beta$  como se dibuja en la presente memoria está por encima de plano de la
- 35 la página) o (R)-(S) indicada (es decir, no se requiere que cada estereocentro en el compuesto sea conforme a las preferencias manifestadas). En algunas realizaciones preferidas, la estereoquímica del carbono  $\alpha'$  es (R), es decir, el átomo X es  $\beta$ , o por encima del plano de la molécula.

Con respecto a la estereoquímica, se siguen las reglas de Cahn, Ingold y Prelog para determinar la estereoquímica

- 40 absoluta. Estas reglas se describen, por ejemplo, en Organic Chemistry, Fox y Whitesell; Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA (1994); sección 5-6, pág. 177-178. Los péptidos pueden tener una estructura de cadena principal repetida con cadenas laterales que se extienden desde las unidades de cadena principal. Generalmente, cada unidad de cadena principal tiene una cadena lateral asociada con ella, aunque en algunos casos la cadena lateral es un átomo de hidrógeno. En otras realizaciones, no todas las unidades de cadena principal tienen una
- 45 cadena lateral asociada. Los péptidos útiles en epóxidos peptídicos o aziridinas peptídicas tienen dos o más unidades de cadena principal. En algunas realizaciones útiles para inhibir la actividad de tipo quimotripsina (CT-L) del proteasoma, están presentes entre dos y ocho unidades de cadena principal, y en algunas realizaciones preferidas para la inhibición de CT-L, están presentes entre dos y seis unidades de cadena principal.
- 50 Las cadenas laterales que se extienden desde las unidades de cadena principal pueden incluir cadenas laterales aminoacídicas alifáticas o aromáticas naturales tales como hidrógeno (glicina), metilo (alanina), isopropilo (valina), *sec*-butilo (isoleucina), isobutilo (leucina), fenilmetilo (fenilalanina) y la cadena lateral que constituye el aminoácido prolina. Las cadenas laterales pueden ser también otros grupos alifáticos o aromáticos ramificados o no ramificados tales como etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo y derivados sustituidos con arilo tales como 1-feniletilo, 2-feniletilo, (1-naftil)metilo, (2-naftil)metilo, 1-(1-naftil)etilo, 1-(2-naftil)etilo, 2-(1-naftil)etilo y compuestos similares.
- 55 Los grupos arilo pueden estar sustituidos además con grupos alquilo  $\text{C}_{1-6}$  ramificados o no ramificados, o grupos alquilo sustituidos, o grupos acetilo o arilo adicionales, o grupos arilo sustituidos tales como benzoílo. Los grupos heteroarilo pueden usarse también como sustituyentes de cadena lateral. Los grupos heteroarilo incluyen grupos arilo que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre tales como tienilo, benzotienilo, naftotienilo, tiantrenilo, furilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, indolilo, purinilo o quinolilo.
- 60

Pueden introducirse residuos polares o cargados en los epóxidos peptídicos o aziridinas peptídicas. Por ejemplo, pueden introducirse aminoácidos de origen natural tales como que los contienen hidroxilo (Thr, Tyr, Ser) o contienen azufre (Met, Cys), así como aminoácidos no esenciales, por ejemplo, taurina, carnitina, citrulina, cistina, ornitina y norleucina. Pueden incluirse también sustituyentes de cadena lateral de origen no natural con restos cargados o polares tales como, por ejemplo, cadenas alquilo  $C_{1-6}$  o grupos arilo  $C_{6-12}$  con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi de cadena corta, sulfuro, tio, carboxilo, éster, fosfo, amido o amino, o tales sustituyentes sustituidos con uno o más átomos de halógeno. En algunas realizaciones preferidas, hay al menos un grupo arilo presente en una cadena lateral del resto peptídico.

10

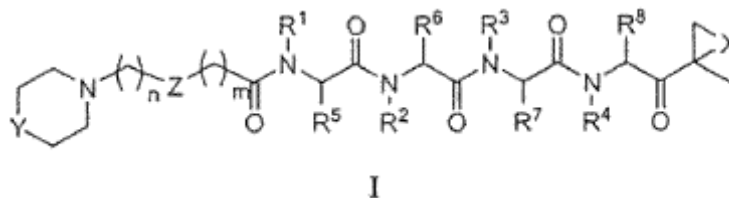
Las unidades de cadena principal pueden ser unidades de amida  $[-NH-CHR-C(=O)-]$ , en que R es la cadena lateral. Tal denominación no excluye el aminoácido de origen natural prolina, u otros aminoácidos secundarios cíclicos de origen no natural, que se reconocerán por los especialistas en la materia.

- 15 La unidad de cadena principal puede ser de otro modo unidades de amida N-alquilada (por ejemplo, N-metilo y similares), análogos olefinicos (en que uno o más enlaces amida se reemplazan por enlaces olefinicos), análogos de tetrazol (en que un anillo de tetrazol impone una configuración cis a la cadena principal), o combinaciones de tales enlaces de cadena principal. Como alternativa, el carbono  $\alpha$  aminoacídico se modifica por sustitución con  $\alpha$ -alquilo, por ejemplo, ácido aminoisobutírico. La cadena lateral puede estar modificada localmente, por ejemplo, por modificación deshidro  $\Delta E$  o  $\Delta Z$ , en que está presente un doble enlace entre los átomos  $\alpha$  y  $\beta$  de la cadena lateral, o por ejemplo por modificación ciclopropilo  $\Delta E$  o  $\Delta Z$ , en que está presente un grupo ciclopropilo entre los átomos  $\alpha$  y  $\beta$  de la cadena lateral. En aún otras realizaciones que emplean grupos aminoacídicos. Pueden usarse D-aminoácidos.

- 25 Se describen además ciclación de cadena lateral con cadena principal, formación de enlace disulfuro, formación de lactama, enlace azoico y otras modificaciones discutidas en "Peptides and Mimics, Design of Conformationally Constrained" de Hruby y Boteju, en "Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference", ed. Robert A. Meyers, VCH Publishers (1995), pág. 658-664.

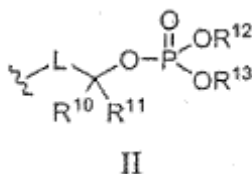
Los compuestos divulgados tienen una estructura de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

30



donde

- 35 L está ausente o se selecciona de entre  $-CO_2$  o  $-C(=S)O$ ;  
 X es O, NH, o N-alquilo, preferiblemente O;  
 Y es NH, N-alquilo, O o  $C(R^9)_2$ , preferiblemente N-alquilo, O, o  $C(R^9)_2$ ;  
 Z es O o  $C(R^9)_2$ , preferiblemente  $C(R^9)_2$ ;  
 $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y un grupo de fórmula II, preferiblemente  $R^1$ ,  
 40  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, más preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno;



- cada  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ ,  
 45 alcoxialquilo  $C_{1-6}$ , arilo y aralquilo  $C_{1-6}$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de entre alquilo, amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter, preferiblemente  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo

C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub> y aralquilo C<sub>1-6</sub> y cada R<sup>9</sup> es hidrógeno, más preferiblemente R<sup>6</sup> y R<sup>8</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente aralquilo C<sub>1-6</sub> y cada R<sup>9</sup> es H;

R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>, o R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros;

- 5 R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, un catión metálico, alquilo C<sub>1-6</sub> y aralquilo C<sub>1-6</sub>, o R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> representan conjuntamente alquilo C<sub>1-6</sub>, formando así un anillo;

m es un entero de 0 a 2; y

n es un entero de 0 a 2, preferiblemente 0 o 1.

- 10 En ciertas divulgaciones, X es O y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son todos iguales, preferiblemente R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son todos hidrógeno. En ciertas de tales divulgaciones, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan independientemente de entre alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub> y aralquilo C<sub>1-6</sub>, más preferiblemente R<sup>6</sup> y R<sup>8</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-6</sub> y R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente aralquilo C<sub>1-6</sub>.

- 15 En ciertas divulgaciones preferidas, X es O, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son todos hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>8</sup> son ambos isobutilo, R<sup>5</sup> es feniletilo y R<sup>7</sup> es fenilmetilo.

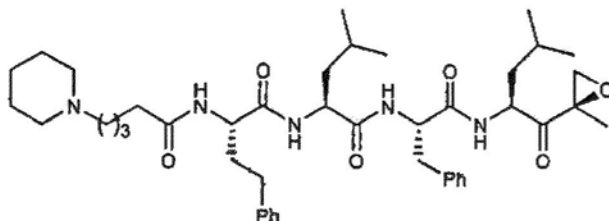
En ciertas divulgaciones, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-6</sub>, arilo y aralquilo C<sub>1-6</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con

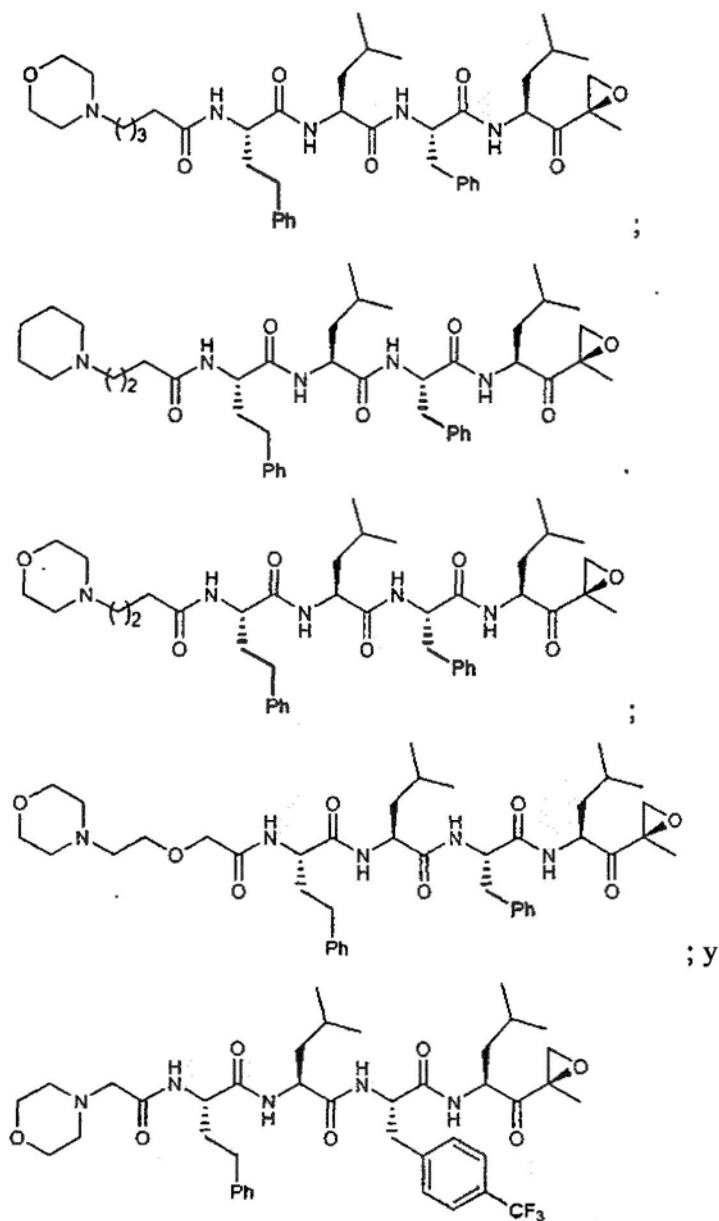
- 20 un grupo seleccionado de entre alquilo, amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter. En ciertas divulgaciones, al menos uno de R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> es aralquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con alquilo, más preferiblemente sustituido con perhalogenoalquilo. En ciertas de tales divulgaciones, R<sup>7</sup> es aralquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con trifluorometilo.

- 25 En ciertas divulgaciones, Y se selecciona de entre N-alquilo, O y CH<sub>2</sub>. En ciertas de tales divulgaciones, Z es CH<sub>2</sub> y m y n son ambos 0. En ciertas de tales divulgaciones alternativas, Z es CH<sub>2</sub>, m es 0 y n es 2 o 3. En todavía otra de tales divulgaciones alternativas, Z es O, m es 1 y n es 2.

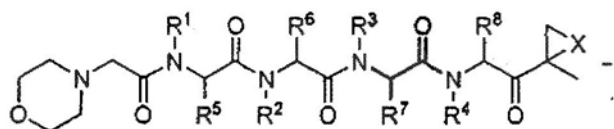
En ciertas divulgaciones, se selecciona un compuesto de fórmula I de entre

30





Los compuestos divulgados tienen una estructura de fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,



III

5

donde X es O, NH o N-alquilo, preferiblemente O;

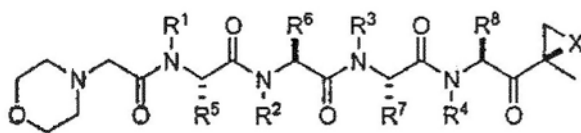
$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y un grupo de fórmula II, preferiblemente  $R^1$ ,  
 10  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, más preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno; y

$R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ , alcoxialquilo  $C_{1-6}$ , arilo y aralquilo  $C_{1-6}$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de entre amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter, preferiblemente  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$  y  $R^5$  y  $R^7$  son independientemente aralquilo  $C_{1-6}$ .

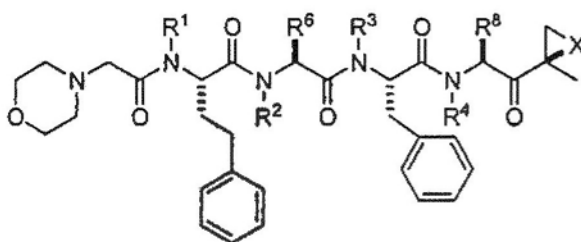
En ciertas divulgaciones, X es O y  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno. En ciertas de tales divulgaciones,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$  y  $R^5$  y  $R^7$  son independientemente aralquilo  $C_{1-6}$ .

En ciertas divulgaciones preferidas, X es O,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno,  $R^6$  y  $R^8$  son ambos isobutilo,  $R^5$  es feniletilo y  $R^7$  es fenilmetilo.

Un compuesto de fórmula III tiene la siguiente estereoquímica:



Más precisamente definido, el compuesto tiene una estructura de fórmula IV o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,



IV

donde

X es O, NH o N-alquilo, preferiblemente O;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y un grupo de fórmula II, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, más preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno; y

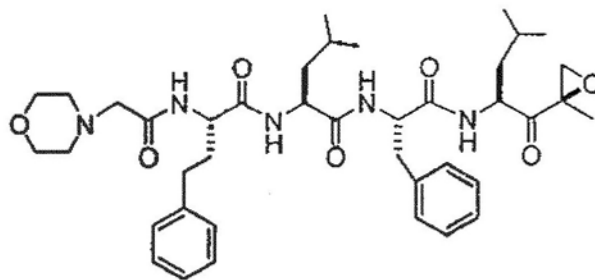
$R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ , alcoxialquilo  $C_{1-6}$ , arilo y aralquilo  $C_{1-6}$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de entre amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter, preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ .

X es O y  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno. En una divulgación adicional,  $R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ .

En una divulgación adicional, X es O,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno, y  $R^6$  y  $R^8$  son ambos isobutilo.

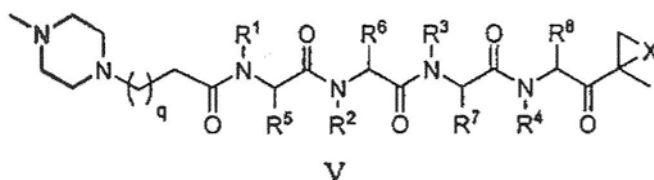
Un compuesto de fórmula III tiene la siguiente estructura:





En una divulgación adicional, los compuestos tienen una estructura de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma

5

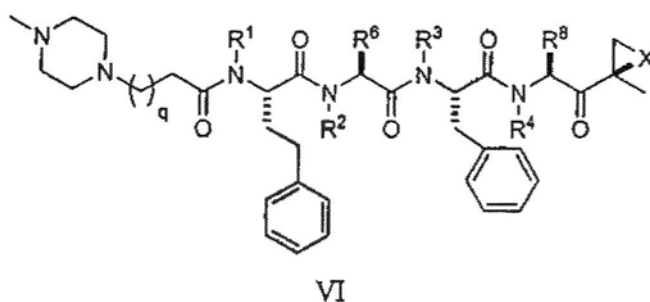


donde

- 10 X es O, NH o N-alquilo, preferiblemente O;  
 $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y un grupo de fórmula II, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, más preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno;  
 $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-6</sub>, arilo y aralquilo C<sub>1-6</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de entre  
15 amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter, preferiblemente  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub> y aralquilo C<sub>1-6</sub>, más preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo C<sub>1-6</sub> y  $R^5$  y  $R^7$  son independientemente aralquilo C<sub>1-6</sub>; y  
q es un entero de 0 a 3.

20

El compuesto divulgado tiene una estructura de fórmula VI o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,



25 donde

- X es O, NH o N-alquilo, preferiblemente O;  
 $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y un grupo de fórmula II, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, más preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno;  
30  $R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-6</sub>, arilo y aralquilo C<sub>1-6</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de entre amida, amina, ácido carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster carboxílico, tiol y tioéter,

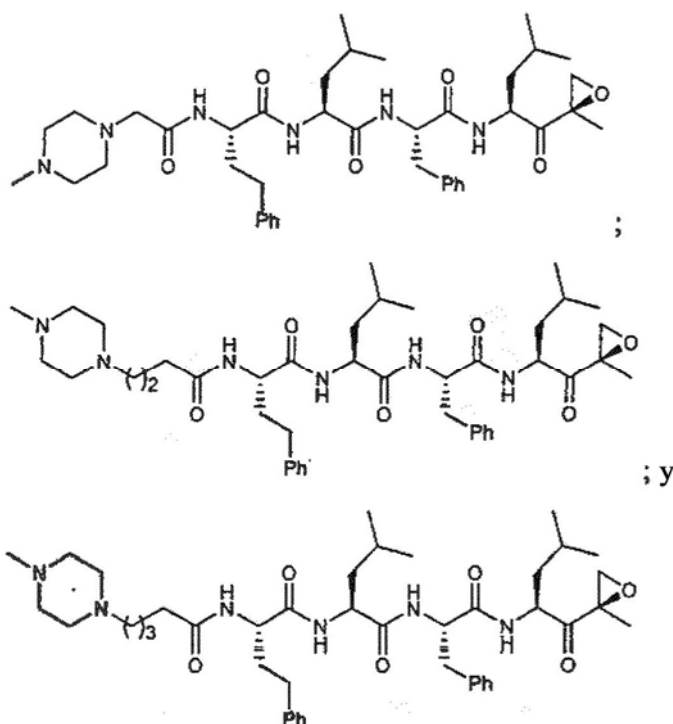
preferiblemente  $R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente,  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ ; y  $q$  es un entero de 0 a 3.

- 5 X es O y  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales, preferiblemente  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno.  $R^6$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de entre alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y aralquilo  $C_{1-6}$ , más preferiblemente,  $R^6$  y  $R^8$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ .

En cierta divulgación preferida, X es O,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos hidrógeno, y  $R^6$  y  $R^8$  son ambos isobutilo.

10

Un compuesto de fórmula VI se selecciona de entre



- 15 Un aspecto de la divulgación se refiere a un dispositivo médico que incluye la composición divulgada en la presente memoria que incluye un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI. La composición se incorpora a un dispositivo médico. En ciertas realizaciones, el dispositivo médico es un gel que comprende una matriz polimérica o matriz cerámica y un inhibidor. Dicho polímero puede ser de origen natural o sintético. Dicho gel sirve como depósito de fármaco, adhesivo, sutura, barrera o sellante.

20

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un dispositivo médico que comprende un sustrato que tiene una superficie sobre la que se dispone un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI. El inhibidor se dispone directamente sobre un dispositivo médico.

- 25 En otra divulgación, se dispone un recubrimiento, comprendiendo el recubrimiento una matriz polimérica o matriz cerámica con un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI dispersado o disuelto en la misma.

- En una realización, el dispositivo médico es una endoprótesis coronaria, vascular, periférica o biliar. Más particularmente, la endoprótesis es una endoprótesis extensible. Cuando se recubre con una matriz que contiene un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI, la matriz es flexible para acomodar los estados comprimido y extendido de tal endoprótesis extensible. En otra realización, la endoprótesis tiene al menos una porción que es insertable o implantable en el cuerpo de un paciente, donde la porción tiene una superficie que está adaptada para exposición a tejido del cuerpo y donde al menos una parte de la superficie está recubierta con un

30

inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI, o un recubrimiento que comprende una matriz que tiene un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI está dispersado o disuelto en la misma. Se divulga un ejemplo de una endoprótesis adecuada en la patente de EE.UU. n° 4.733.665.

- 5 En otra realización, el dispositivo médico es un instrumental quirúrgico tal como un implante vascular, dispositivo intraluminal, sellante quirúrgico o soporte vascular. Más particularmente, el dispositivo médico es un catéter, un puerto de acceso vascular implantable, un catéter venoso central, un catéter arterial, un injerto vascular, una bomba de balón intraaórtica, una sutura, una bomba auxiliar ventricular, una barrera de elución de fármaco, un adhesivo, una funda vascular, un soporte extra/perivascular, un filtro de sangre o un filtro adaptado para despliegue en un vaso
- 10 sanguíneo, recubierto con un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI directamente o mediante una matriz que contiene un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI.

- En ciertas realizaciones, el dispositivo médico intraluminal se recubre con un inhibidor que tiene la estructura de una
- 15 cualquiera de las fórmulas I o III-VI o un recubrimiento que comprende una matriz biológicamente tolerada y un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI dispersado en el polímero, teniendo dicho dispositivo una superficie interior y una superficie exterior, y teniendo el recubrimiento aplicado a al menos una parte de la superficie interior, la superficie exterior o ambas.

- 20 En ciertas realizaciones, el dispositivo médico puede ser útil para prevenir la reestenosis después de angioplastia. El dispositivo médico puede ser también útil para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones al proporcionar la administración localizada de un inhibidor que tiene la estructura de una cualquiera de las fórmulas I o III-VI. Tales enfermedades y afecciones incluyen reestenosis, inflamación, artritis reumatoide, lesión de tejido debida a inflamación, enfermedades hiperproliferativas, psoriasis grave o artrítica, enfermedades de consunción muscular,
- 25 enfermedades infecciosas crónicas, respuesta inmunitaria anormal, afecciones que implican placas vulnerables, lesiones relacionadas con afecciones isquémicas e infección y proliferación víricas. Los ejemplos de enfermedades y afecciones que son sujeto de tratamiento que incluye los dispositivos médicos recubiertos con fármaco de la presente invención incluyen aterosclerosis, síndrome coronario agudo, enfermedad de Alzheimer, cáncer, fiebre, atrofia muscular (atrofia), denervación, oclusiones vasculares, apoplejía, infección por VIH, lesión nerviosa,
- 30 insuficiencia renal asociada a acidosis e insuficiencia hepática. Véase, p.ej., Goldberg, patente de Estados Unidos n° 5.340.736.

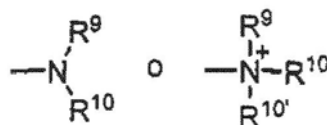
- El término "alquilo C<sub>x-y</sub>" hace referencia a grupos hidrocarburos saturados sustituidos o no sustituidos, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal y grupos alquilo de cadena ramificada que contienen de x a y carbonos en la cadena,
- 35 incluyendo grupos halogenoalquilo tales como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc. Alquilo C<sub>0</sub> indica un hidrógeno en que el grupo está en posición terminal, un enlace si es interno. Los términos "alquenilo C<sub>2-y</sub>" y "alquinilo C<sub>2-y</sub>" hacen referencia a grupos alifáticos insaturados sustituidos o no sustituidos análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un doble o tripe enlace, respectivamente.

- 40 El término "alcoxi" hace referencia a un grupo alquilo que tiene un oxígeno enlazado con el mismo. Los grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, terc-butoxi y similares. Un "éter" es dos hidrocarburos ligados covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que vuelve ese alquilo un éter es o parece un alcoxi.

- 45 El término "alcoxialquilo C<sub>1-6</sub>" hace referencia a un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con un grupo alcoxi, formando así un éter.

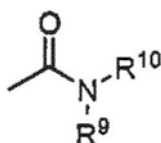
- El término "aralquilo C<sub>1-6</sub>", como se usa en la presente memoria, hace referencia a un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido
- 50 con un grupo arilo.

Los términos "amina" y "amino" son reconocidos en la materia y hacen referencia tanto a aminas no sustituidas como sustituidas y sales de las mismas, p.ej. un resto que puede representarse por las fórmulas generales:



donde  $R^9$ ,  $R^{10}$  y  $R^{10'}$  representan cada uno independientemente un hidrógeno, alquilo, alquenilo,  $-(CH_2)_m-R^8$ , o  $R^9$  y  $R^{10}$  tomados conjuntamente con el átomo de N al que están enlazados completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura de anillo;  $R^8$  representa un arilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o policiclilo; y m es

- 5 cero o un entero de 1 a 8. En realizaciones preferidas, solo uno de  $R^9$  o  $R^{10}$  puede ser un carbonilo, p.ej.  $R^9$ ,  $R^{10}$  y el nitrógeno no forman conjuntamente una imida. En realizaciones incluso más preferidas,  $R^9$  y  $R^{10}$  (y opcionalmente  $R^{10'}$ ) representan independientemente cada uno un hidrógeno, alquilo, alquenilo o  $-(CH_2)_m-R^8$ . En ciertas realizaciones, el grupo amino es básico, lo que significa que la forma protonada tiene un  $pK_a \geq 7,00$ .
- 10 Los términos “amida” y “amido” están reconocidos en la materia como carbonilo sustituido con amino e incluyen un resto que puede representarse por la fórmula general:



- 15 donde  $R^9$ ,  $R^{10}$  son como se definen anteriormente. Realizaciones preferidas de la amida no incluirán imidas, que pueden ser inestables.

El término “arilo”, como se usa en la presente memoria, incluye grupos aromáticos monocíclicos sustituidos o no sustituidos de 5, 6 y 7 miembros en que cada átomo del anillo es de carbono. El término “arilo” incluye también

- 20 sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, donde al menos uno de los anillos es aromático, p.ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos arilo incluyen benceno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina y similares.
- 25 Los términos “carbociclo” y “carbociclilo”, como se usan en la presente memoria, hacen referencia a un anillo no aromático sustituido o no sustituido en que cada átomo del anillo es de carbono. Los términos “carbociclo” y “carbociclilo” incluyen también sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, donde al menos uno de los anillos es carbocíclico, p.ej. los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos.

- 30 El término “carbonilo” está reconocido en la materia e incluye restos tales como pueden representarse por la fórmula general:



- 35 donde X es un enlace o representa oxígeno o azufre, y  $R^{11}$  representa hidrógeno, alquilo, alquenilo,  $-(CH_2)_m-R^8$  o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  $R^{11'}$  representa hidrógeno, alquilo, alquenilo o  $-(CH_2)_m-R^8$ , donde m y  $R^8$  son como se definen anteriormente. Cuando X es oxígeno y  $R^{11}$  o  $R^{11'}$  no es hidrógeno, la fórmula representa un “éster”. Cuando X es un oxígeno y  $R^{11}$  es un hidrógeno, la fórmula representa un “ácido carboxílico”.

- 40 Como se usa en la presente memoria, “enzima” puede ser cualquier molécula parcial o totalmente proteica que lleva a cabo una reacción química de manera catalítica. Tales enzimas pueden ser enzimas nativas, enzimas de fusión, proenzimas, apoenzimas, enzimas desnaturalizadas, enzimas farnesiladas, enzimas ubiquitinadas, enzimas aciladas grasas, enzimas gerangeraniladas, enzimas ligadas a GPI, enzimas ligadas a lípido, enzimas preniladas, enzimas
- 45 mutantes de origen natural o generadas artificialmente, enzimas con modificaciones de cadena lateral o cadena principal, enzimas que tienen secuencias líder y enzimas complejadas con material no proteico, tal como proteoglicanos y proteoliposomas. Las enzimas pueden elaborarse por cualquier medio, incluyendo expresión natural, expresión promovida, clonación, diversas síntesis peptídicas basadas en solución y basadas en sólido y procedimientos similares conocidos por los especialistas en la materia.

El término “heteroaralquilo C<sub>1-6</sub>”, como se usa en la presente memoria, hace referencia a un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con un grupo heteroarilo.

- 5 El término “heteroarilo” incluye estructuras de anillo aromático sustituidas o no sustituidas de 5 a 7 miembros, más preferiblemente anillos de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. El término “heteroarilo” incluye también sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, p.ej. los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos.
- 10 Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina y similares.

El término “heteroátomo”, como se usa en la presente memoria, significa un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Son heteroátomos preferidos nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre.

- 15 Los términos “heterociclilo” o “grupo heterocíclico” hacen referencia a estructuras de anillo no aromáticas sustituidas o no sustituidas de 3 a 10 miembros, más preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los términos “heterociclilo” o “grupo heterocíclico” incluyen también sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, donde al menos uno de los anillos es heterocíclico, p.ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfina, lactonas, lactamas y similares.
- 20

El término “hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>” hace referencia a un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con un grupo hidroxilo.

- 25 Como se usa en la presente memoria, el término “inhibidor” pretende describir un compuesto que bloquea o reduce una actividad de una enzima (por ejemplo, la inhibición de la escisión proteolítica de sustratos peptídicos fluorogénicos estándares tales como suc-LLVY-AMC, Box-LLR-AMC y Z-LLE-AMC, la inhibición de diversas actividades catalíticas del proteasoma de 20S). Un inhibidor puede actuar con inhibición competitiva, anticompetitiva o no competitiva. Un inhibidor puede unirse reversible o irreversiblemente, y por lo tanto el término incluye compuestos que son sustratos suicidas de una enzima. Un inhibidor puede modificar uno o más sitios en o cerca del sitio activo de la enzima, o puede causar un cambio conformacional en otro lugar de la enzima.
- 30

- Como se usa en la presente memoria, el término “péptido” incluye no solo el enlace amida estándar con sustituyentes  $\alpha$  estándares, sino peptidomiméticos utilizados comúnmente, otros enlaces modificados, cadenas laterales de origen no natural y modificaciones de cadena lateral, como se detalla a continuación.
- 35

- Los términos “policiclilo” o “policíclico” hacen referencia a dos o más anillos (p.ej., cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos) en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, p.ej. los anillos son “anillos fusionados”. Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido o no sustituido.
- 40

- El término “prevenir” está reconocido en la materia y, cuando se usa con relación a una afección tal como recurrencia local (p.ej. dolor), una enfermedad tal como cáncer, un síndrome complejo tal como insuficiencia cardiaca o cualquier otra afección médica, es bien entendida en la materia, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia, o retarda el inicio, de síntomas de una afección médica en un sujeto respecto a un sujeto que no recibe la composición. Por tanto, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir el número de crecimientos cancerosos detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico respecto a una población de control no tratada, y/o retardar la aparición de crecimientos cancerosos detectables en una población tratada frente a una población de control no tratada, p.ej. mediante una cantidad estadística y/o clínicamente significativa. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada frente a una población de control no tratada y/o retardar el inicio de síntomas de la infección en una población tratada frente a una población de control no tratada. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o como alternativa retardar, las sensaciones dolorosas experimentadas por sujetos en una población tratada frente a una población de control no tratada.
- 45
- 50
- 55

- El término “profármaco” engloba compuestos que, en condiciones fisiológicas, se convierten en agentes terapéuticamente activos. Es un procedimiento común para elaborar un profármaco incluir restos seleccionados que se hidrolizan en condiciones fisiológicas revelando la molécula deseada. En otras realizaciones, el profármaco se convierte por una actividad enzimática del animal hospedador.
- 60

El término tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” es reconocido en la materia e incluye la administración al hospedador de una o más de las composiciones en cuestión. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección indeseada (p.ej., enfermedad u otro estado indeseado del animal hospedador), entonces el tratamiento es  
 5 profiláctico (es decir protege al hospedador ante el desarrollo de la afección indeseada), mientras que, si se administra después de la manifestación de la afección indeseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, pretende disminuir, mejorar o estabilizar la afección indeseada existente o efectos secundarios de la misma).

El término “proteasoma” como se usa en la presente memoria pretende incluir inmunoproteasomas y proteasomas  
 10 constitutivos.

El término “sustituido” hace referencia a restos que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal. Se entenderá que “sustitución” o “sustituido con” incluye la condición implícita de que tal sustitución esté de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente y que la  
 15 sustitución dé como resultado un compuesto estable, p.ej. que no experimente espontáneamente transformación tal como por transposición, ciclación, eliminación, etc. Como se usa en la presente memoria, se contempla que el término “sustituido” incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno  
 20 o más e iguales o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Con los fines de esta divulgación, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en la presente memoria que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un  
 25 alcóxido, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitró, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo o un resto aromático o heteroaromático. Se entenderá por los especialistas en la materia que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo pueden estar ellos mismos sustituidos, si es apropiado.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un compuesto con respecto al procedimiento de tratamiento en cuestión hace referencia a una cantidad del compuesto o compuestos en preparación que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación deseado (a un mamífero, preferiblemente un ser humano) alivia un síntoma, mejora una afección o ralentiza el inicio de afecciones patológicas según estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección para tratar o con fines cosméticos, p.ej. a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a  
 35 cualquier tratamiento médico.

El término “tioéter” hace referencia a un grupo alquilo, como se define anteriormente, que tiene un resto azufre enlazado con el mismo. En realizaciones preferidas, el “tioéter” se representa por -S-alquilo. Los grupos tioéter representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.  
 40

Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” o “tratamiento” incluye revertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos y patología subyacente de una afección de manera que se mejore o estabilice la afección del sujeto.

#### 45 Selectividad por el proteosoma de 20S

Los inhibidores enzimáticos divulgados en la presente memoria son útiles en parte debido a que inhiben la acción del proteasoma de 20S. Adicionalmente, al contrario que otros inhibidores del proteasoma de 20S, los compuestos divulgados en la presente memoria son altamente selectivos hacia el proteasoma de 20S, con respecto a otras  
 50 enzimas proteasas. Es decir, los presentes compuestos muestran selectividades por el proteasoma de 20S frente a las demás proteasas tales como cathepsinas, calpaínas, papaína, quimotripsina, tripsina y tripeptidilpepsidasa II. Las selectividades de los inhibidores enzimáticos por el proteasoma de 20S son tales que, a concentraciones menores de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , los inhibidores enzimáticos muestran inhibición de la actividad catalítica del proteasoma de 20S, mientras que no muestran inhibición de la actividad catalítica de otras proteasas tales como cathepsinas,  
 55 calpaínas, papaína, quimotripsina, tripsina y tripeptidilpepsidasa II. Los inhibidores enzimáticos muestran inhibición de la actividad catalítica del proteasoma de 20S a concentraciones menores de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , mientras que no muestran inhibición de la actividad catalítica de otras proteasas a estas concentraciones. Además, los inhibidores enzimáticos muestran inhibición de la actividad catalítica del proteasoma de 20S a concentraciones menores de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , mientras que no muestran inhibición de la actividad catalítica de otras  
 60 proteasas a estas concentraciones. Se divulgan ensayos cinéticos enzimáticos en la solicitud de EE.UU. número de

serie 09/569748, Ejemplo 2 y en Stein et al., Biochem. (1996), 35, 3899-3908.

#### Selectividad por actividad de tipo quimotripsina

- 5 Son además útiles realizaciones particulares de los compuestos inhibidores enzimáticos descritos en la presente memoria porque pueden inhibir eficiente y selectivamente la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma de 20S, en comparación con las actividades de tipo tripsina y PGPH. La actividad de tipo quimotripsina del proteasoma de 20S se caracteriza por la escisión de péptidos en la inmediata vecindad de residuos hidrófobos grandes. En particular, la actividad de tipo quimotripsina de las hidrolasas Ntn puede determinarse mediante la escisión de un
- 10 sustrato estándar. Son conocidos en la materia ejemplos de tales sustratos. Por ejemplo, puede usarse un derivado de leucilvaliniltirosina. Se divulgan ensayos cinéticos enzimáticos en la solicitud de EE.UU. de número de serie 09/569748, Ejemplo 2 y Stein et al., Biochem. (1996), 35, 3899-3908.

#### Usos de inhibidores enzimáticos

- 15 Las consecuencias biológicas de la inhibición de proteasoma son numerosas. A nivel celular, se han reseñado acumulación de proteínas poliubiquitinadas, cambios morfológicos celulares y apoptosis tras el tratamiento de células con diversos inhibidores de proteasoma. La inhibición de proteasoma se ha sugerido también como una posible estrategia terapéutica antitumoral. El hecho de que la epoximicina se identificara inicialmente en un cribado
- 20 de compuestos antitumorales valida al proteasoma como una diana quimioterapéutica antitumoral. Por consiguiente, estos compuestos son útiles para tratar el cáncer. La inhibición de proteasoma se ha asociado también a la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B y la estabilización de los niveles de p53. Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse también para inhibir la activación de NF- $\kappa$ B y estabilizar los niveles de p53 en cultivo celular. Puesto que el NF- $\kappa$ B es un regulador clave de la inflamación, es una diana atractiva para intervención
- 25 terapéutica antiinflamatoria. Por tanto, los compuestos divulgados en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones asociadas a inflamación crónica incluyendo, pero sin limitación, EPOC, psoriasis, bronquitis, enfisema y fibrosis quística.

- Los compuestos divulgados pueden usarse para tratar afecciones mediadas directamente por la función proteolítica
- 30 del proteasoma tales como consunción muscular, o mediadas indirectamente a través de proteínas que se procesan por el proteasoma tales como NF- $\kappa$ B. El proteasoma participa en la eliminación rápida y procesamiento postraducciona de proteínas (p.ej. enzimas) implicadas en la regulación celular (p.ej., ciclo celular, transcripción génica y rutas metabólicas), comunicación intercelular y respuesta inmunitaria (p.ej., presentación antigénica). Los ejemplos específicos discutidos a continuación incluyen proteína  $\beta$ -amiloide y proteínas reguladoras tales como
- 35 ciclinas, TGF- $\beta$  y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

- Es otra realización de la divulgación el uso de los compuestos divulgados en la presente memoria para el tratamiento de enfermedades y afecciones neurodegenerativas incluyendo, pero sin limitación, apoplejía, daño isquémico al sistema nervioso, traumatismo neural (p.ej., daño cerebral percusivo, lesión de médula espinal y daño traumático al
- 40 sistema nervioso), esclerosis múltiple y otras neuropatías inmunomediadas (p.ej., síndrome de Guillain-Barre y sus variantes, neuropatía axonal motora, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y síndrome de Fisher), complejo de demencia por VIH/SIDA, axonomía, neuropatía diabética, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, meningitis bacteriana, parasitaria, fúngica y vírica, encefalitis, demencia vascular, demencia multiinfarto, demencia de cuerpos de Lewy, demencia de lóbulo frontal tal como enfermedad de Pick,
- 45 demencias subcorticales (tales como de Huntington o parálisis supranuclear progresiva), síndromes de atrofia cortical focal (tales como afasia primaria), demencias metabólicas-tóxicas (tales como hipotiroidismo crónico o deficiencia de B12) y demencias causadas por infecciones (tales como sífilis o meningitis crónica).

- La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por depósitos extracelulares de proteína  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -AP) en placas
- 50 seniles y vasos cerebrales. La  $\beta$ -AP es un fragmento peptídico de 39 a 42 aminoácidos derivado del precursor de proteína amiloide (APP). Son conocidas al menos tres isoformas de APP (695, 751 y 770 aminoácidos). El corte y empalme alternativo de ARNm genera las isoformas; el procesamiento normal afecta a una porción de la secuencia de  $\beta$ -AP, previniendo así la generación de  $\beta$ -AP. Se cree que el procesamiento de proteína anormal por el proteasoma contribuye a la abundancia de  $\beta$ -AP en el cerebro de Alzheimer. La enzima de procesamiento de APP
- 55 en ratas contiene aproximadamente diez subunidades diferentes (22 kDa-32 kDa). La subunidad de 25 kDa tiene una secuencia N-terminal X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, que es idéntica a la subunidad  $\beta$  de macropainina humana (Kojima, S. et al., Fed. Eur. Biochem. Soc., (1992) 304: 57-60). La enzima de procesamiento de APP escinde en el enlace Gln<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>; en presencia de ión de calcio, la enzima escinde también en el enlace Met<sup>1</sup>-Asp<sup>1</sup> y los enlaces Asp<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>, liberando el dominio extracelular de  $\beta$ -AP.

60

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un compuesto (p.ej. composición farmacéutica) divulgado en la presente memoria. Tal tratamiento incluye reducir la velocidad de procesamiento de  $\beta$ -AP, reducir la velocidad de formación de placa de  $\beta$ -AP, reducir la velocidad de generación de  $\beta$ -AP y reducir los signos clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

Otras realizaciones de la divulgación se refieren a caquexia y enfermedades de consunción muscular. El proteasoma degrada muchas proteínas en eritrocitos en maduración y fibroblastos en crecimiento. En células desprovistas de insulina o suero, la velocidad de proteólisis casi se duplica. Inhibir el proteasoma reduce la proteólisis, reduciendo así tanto la pérdida de proteína muscular como la carga de nitrógeno en riñones o hígado. Los inhibidores de la invención son útiles para tratar afecciones tales como cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, fiebre, atrofia muscular (atrofia) y denervación, lesión nerviosa, ayuno, insuficiencia renal asociada a acidosis, diabetes e insuficiencia hepática. Véase, p.ej., Goldberg, patente de EE.UU. n° 5.340.736.

Las realizaciones de la divulgación engloban por lo tanto procedimientos para: reducir la velocidad de degradación de proteína muscular en una célula; reducir la velocidad de degradación de proteína intracelular; reducir la velocidad de degradación de proteína p53 en una célula e inhibir el crecimiento de cánceres relacionados con p53. Cada uno de estos procedimientos incluye poner en contacto una célula (in vivo o in vitro, p.ej., un músculo en un sujeto) con una cantidad efectiva de un compuesto (p.ej., composición farmacéutica) divulgado en la presente memoria.

La fibrosis es una formación excesiva y persistente de tejido cicatricial resultante del crecimiento hiperproliferativo de fibroblastos, y está asociada a la activación de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ . La fibrosis implica una deposición extensa de matriz extracelular y puede aparecer en prácticamente cualquier tejido o entre varios tejidos diferentes. Normalmente el nivel de proteína de señalización intracelular (Smad) que activa la transcripción de los genes diana tras estimulación con TGF- $\beta$  está regulado por la actividad de proteasoma (Xu et al., 2000). Sin embargo, se ha observado una degradación acelerada de los componentes de señalización de TGF- $\beta$  en cánceres y otras afecciones hiperproliferativas. Por tanto, ciertos aspectos de la divulgación se refieren a un procedimiento para tratar afecciones hiperproliferativas tales como retinopatía diabética, degeneración macular, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, nefropatía de IgA, cirrosis, atresia biliar, insuficiencia cardíaca congestiva, escleroderma, fibrosis inducida por radiación y fibrosis pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de colágeno vascular, sarcoidosis, enfermedades pulmonares intersticiales y trastornos pulmonares extrínsecos). El tratamiento de las víctimas de quemaduras está a menudo dificultado por la fibrosis, por tanto, es una realización adicional de la divulgación la administración tópica o sistémica de los inhibidores para tratar quemaduras. El cierre de heridas después de cirugía está a menudo asociado a cicatrices desfigurantes, que pueden prevenirse mediante la inhibición de la fibrosis. Por tanto, en ciertos aspectos, la divulgación se refiere a un procedimiento para la prevención o reducción de la cicatrización.

Otra proteína procesada por el proteasoma es NF- $\kappa$ B, un miembro de la familia de proteínas Rel. La familia Rel de proteínas activadoras transcripcionales puede dividirse en dos grupos. El primer grupo requiere procesamiento proteolítico, e incluye p50 (NF- $\kappa$ B1, 105 kDa) y p52 (NF- $\kappa$ 2, 100 kDa). El segundo grupo no requiere procesamiento proteolítico, e incluye p65 (RelA, Rel (c-Rel), y RelB). Pueden formarse tanto homodímeros como heterodímeros por los miembros de la familia Rel; NF- $\kappa$ B, por ejemplo, es un heterodímero de p50-p65. Después de la fosforilación y ubiquitinación de I $\kappa$ B y p105, las dos proteínas se degradan y procesan, respectivamente, produciendo NF- $\kappa$ B activa que se transloca del citoplasma al núcleo. La p105 ubiquitinada se procesa también por proteasomas purificados (Palombella et al., Cell (1994) 78: 773-785). El NF- $\kappa$ B activo forma un complejo potenciador estereoespecífico con otros activadores transcripcionales y, p.ej., HMG I(Y), induciendo la expresión selectiva de un gen particular.

El NF- $\kappa$ B regula los genes implicados en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, y los eventos mitóticos. Por ejemplo, se requiere NF- $\kappa$ B para la expresión del gen de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina, el gen de cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, el gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y una serie de genes de citocina que codifican, por ejemplo, IL-2, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos e IFN- $\beta$  (Palombella et al., Cell (1994) 78: 773-785). Algunas realizaciones de la invención incluyen procedimientos para afectar al nivel de expresión de IL-2, CMH-I, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$  o cualquiera de las otras proteínas anteriormente mencionadas, incluyendo cada procedimiento administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un compuesto divulgado en la presente memoria. Los complejos que incluyen p50 son mediadores rápidos de las respuestas inflamatorias e inmunitarias agudas (Thanos, D. y Maniatis, T., Cell (1995) 80: 529-532).

El NF- $\kappa$ B participa también en la expresión de los genes de adhesión celular que codifican E-selectina, P-selectina, ICAM y VCAM-1 (Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68: 499-508). Es una realización de la divulgación un procedimiento para inhibir la adhesión celular (p.ej., adhesión celular mediada por E-selectina, P-selectina, ICAM o VCAM-1),



incluyendo poner en contacto una célula con (o administrar a un sujeto) una cantidad efectiva de un compuesto (o una composición farmacéutica) divulgado en la presente memoria.

- La lesión por isquemia y reperfusión da como resultado hipoxia, una afección en que hay deficiencia del oxígeno que alcanza los tejidos del cuerpo. Esta afección causa una degradación aumentada de  $I\kappa B\alpha$ , dando así como resultado la activación de NF- $\kappa B$  (Koong et al., 1994). Se ha demostrado que la gravedad de la lesión que da como resultado hipoxia puede reducirse con la administración de un inhibidor de proteasoma (Gao et al., 2000; Bao et al., 2001; Pye et al., 2003). Por lo tanto, ciertas realizaciones de la divulgación se refieren a un procedimiento de tratamiento de una afección isquémica o lesión por reperfusión que comprende administrar a un sujeto necesitado de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto divulgado en la presente memoria. Los ejemplos de tales afecciones o lesiones incluyen, pero sin limitación, síndrome coronario agudo (placas vulnerables), enfermedad oclusiva arterial (oclusiones cardíaca, cerebral, arterial periférica y vascular), aterosclerosis (esclerosis coronaria, enfermedad arterial coronaria), infartos, insuficiencia cardíaca, pancreatitis, hipertrofia miocárdica, estenosis y reestenosis.
- El NF- $\kappa B$  se une específicamente también al potenciador/promotor de VIH. Cuando se compara con la Nef de mac239, la proteína reguladora de VIH Nef de pbj14 difiere en dos aminoácidos en la región que controla la unión a proteína cinasa. Se cree que la proteína cinasa señala la fosforilación de  $I\kappa B$ , desencadenando la degradación de  $I\kappa B$  a través de la ruta de ubiquitina-proteasoma. Después de la degradación, se libera el NF- $\kappa B$  en el núcleo, potenciando por tanto la transcripción de VIH (Cohen, J., Science, (1995) 267: 960). Son dos realizaciones de la divulgación un procedimiento para inhibir o reducir la infección por VIH en un sujeto y un procedimiento para disminuir el nivel de expresión génica vírica, incluyendo cada procedimiento administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto divulgado en la presente memoria.

- Se considera que la sobreproducción de citocinas inducidas por lipopolisacárido (LPS) tales como  $TNF\alpha$  es básica para los procesos asociados al choque séptico. Además, se acepta generalmente que la primera etapa en la activación de células por LPS es la unión de LPS a receptores de membrana específicos. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo de proteasoma de 20S se han identificado como proteínas de unión a LPS, sugiriendo que la transducción de señal inducida por LPS puede ser una diana terapéutica importante en el tratamiento o la prevención de la sepsis (Qureshi, N. et al., J. Immun. (2003) 171: 1515-1525). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, pueden usarse los compuestos de la divulgación para la inhibición de  $TNF\alpha$  para prevenir y/o tratar choque séptico.

- La proteólisis intracelular genera péptidos pequeños para presentación ante linfocitos T para inducir respuestas inmunitarias mediadas por CMH de clase I. El sistema inmunitario criba las células autólogas que están infectadas víricamente o han experimentado transformación oncogénica. Es un aspecto un procedimiento para inhibir la presentación de antígeno en una célula, incluyendo exponer la célula a un compuesto descrito en la presente memoria. Puede usarse un compuesto de la divulgación para tratar afecciones inmunorrelacionadas tales como alergia, asma, rechazo de órgano/tejido (enfermedad de injerto contra hospedador) y enfermedades autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitación, lupus, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedades intestinales inflamatorias (tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn). Por tanto, se divulga además en la presente memoria un procedimiento para suprimir el sistema inmunitario de un sujeto (p.ej., inhibir rechazo de trasplante, alergias, enfermedades autoinmunitarias y asma), que incluye administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente memoria.

- Es otro aspecto adicional un procedimiento para alterar el repertorio de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma u otra Ntn con actividad multicatalítica. Por ejemplo, si la actividad PGPH del proteasoma de 20S se inhibe selectivamente, se producirá un conjunto diferente de péptidos antigénicos por el proteosoma y se presentará en moléculas de CMH sobre la superficie de las células que se producirían y presentarían sin inhibición enzimática o, por ejemplo, con inhibición selectiva de la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma.

- Ciertos inhibidores de proteasoma bloquean tanto la degradación como el procesamiento de NF- $\kappa B$  ubiquitinada in vitro e in vivo. Los inhibidores de proteasoma bloquean también la degradación de  $I\kappa B\alpha$  y la activación de NF- $\kappa B$  (Palombella, et al. Cell (1994) 78: 773-785 y Traenckner, et al., EMBO J. (1994) 13: 5433-5441). Es una realización de la divulgación un procedimiento para inhibir la degradación de  $I\kappa B\alpha$ , que incluye poner en contacto la célula con un compuesto descrito en la presente memoria. Es un aspecto adicional de la divulgación un procedimiento para reducir el contenido celular de NF- $\kappa B$  en una célula, músculo, órgano o sujeto, incluyendo poner en contacto la célula, músculo, órgano o sujeto con un compuesto descrito en la presente memoria.

- Otros factores de transcripción eucarióticas que requieren procesamiento proteolítico incluyen el factor de transcripción general TFIIA, proteína accesoria VP16 de herpesvirus simple (factor de célula hospedadora), proteína 2 factor regulador de IFN inducible por virus y proteína 1 de unión al elemento regulador de esterol unido a

membrana.

- Otras realizaciones de la divulgación son procedimientos para afectar a los ciclos celulares eucarióticos dependientes de ciclina, que incluyen exponer una célula (in vitro o in vivo) a un compuesto divulgado en la presente memoria. Las ciclinas son proteínas implicadas en el control del ciclo celular. El proteasoma participa en la degradación de ciclinas. Los ejemplos de ciclinas incluyen ciclinas mitóticas, ciclinas de G1 y ciclina B. La degradación de ciclinas posibilita que una célula salga de una fase del ciclo celular (p.ej., mitosis) y entre en otra (p.ej., división). Se cree que todas las ciclinas están asociadas con la proteína cinasa p34<sup>sup.cdc2</sup> o cinasas relacionadas. La señal de orientación a proteólisis está localizada en los aminoácidos 42-RAALGNISEN-50 (secuencia de destrucción). Hay evidencias de que la ciclina se convierte en una forma vulnerable a ubiquitina ligasa o que se activa una ligasa específica de ciclina durante la mitosis (Ciechanover, A., Cell, (1994) 79: 13-21). La inhibición del proteasoma inhibe la degradación de ciclina, y por lo tanto inhibe la proliferación celular, por ejemplo, en cánceres relacionados con ciclina (Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 7071-7075).
- 15 Es una realización de la divulgación un procedimiento para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto (p.ej., cáncer, psoriasis o reestenosis), que incluye administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto divulgado en la presente memoria.

- La divulgación engloba también un procedimiento para tratar la inflamación relacionada con ciclina en un sujeto, que incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente memoria.

- Son aspectos adicionales de la divulgación procedimientos para afectar a la regulación dependiente de proteasoma de oncoproteínas y procedimientos de tratamiento o inhibición del crecimiento canceroso, incluyendo cada procedimiento exponer una célula (in vivo, p.ej., en un sujeto, o in vitro) a un compuesto divulgado en la presente memoria. Las proteínas E6 derivadas de HPV-16 y HPV-18 estimulan la conjugación dependiente de ATP y ubiquitina y la degradación de p53 en lisados reticulocíticos brutos. Se ha mostrado que el oncogén recesivo p53 se acumula a temperatura no permisiva en una línea celular con una E1 termolábil mutada. Los niveles elevados de p53 pueden conducir a apoptosis. Los ejemplos de protooncoproteínas degradadas por el sistema de ubiquitina incluyen c-Mos, c-Fos y c-Jun. Es un aspecto de la divulgación un procedimiento para tratar la apoptosis mediada por p53, que incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un compuesto divulgado en la presente memoria.

- En otro aspecto de la divulgación, los compuestos divulgados son útiles para el tratamiento de una infección parasitaria, tal como infecciones causadas por parásitos protozoarios. Se considera que el proteasoma de estos parásitos está implicado principalmente en la diferenciación celular y actividades de replicación (Paugam et al., Trends Parasitol. 2003, 19(2): 55-59). Además, se ha mostrado que especies de Entamoeba pierden la capacidad de enquistación cuando se exponen a inhibidores de proteasoma (Gonzales, et al., Arch. Med. Res. 1997, 28, n° espec: 139-140). En ciertos de tales aspectos, los compuestos divulgados son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en seres humanos causadas por un parásito protozoario seleccionado de entre Plasmodium sps. (incluyendo P. falciparum, P. vivax, P. malariae y P. ovale, que causan malaria), Trypanosoma sps. (incluyendo T. cruzi, que causa la enfermedad de Chagas, y T. brucei que causa la enfermedad del sueño africana), Leishmania sps. (incluyendo L. amazonensis, L. donovani, L. infantum, L. mexicana, etc.), Pneumocystis carinii (un protozoo conocido por causar neumonía en SIDA y otros pacientes inmunosuprimidos), Toxoplasma gondii, Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens y Giardia lamblia. En ciertos aspectos de la divulgación, los compuestos divulgados son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en animales y ganado causadas por un parásito protozoario seleccionado de entre Plasmodium hermani, Cryptosporidium sps., Echinococcus granulosus, Eimeria tenella, Sarcocystis neurona y Neurospora crassa. Se describen otros compuestos útiles como inhibidores de proteasoma en el tratamiento de enfermedades parasitarias en el documento WO 98/10779.

- 50 En ciertos aspectos de la divulgación, los compuestos divulgados inhiben la actividad de proteasoma irreversiblemente en un parásito. Se ha mostrado que tal inhibición irreversible induce la detención de la actividad enzimática sin recuperación en eritrocitos y leucocitos. En ciertos de tales aspectos, la larga semivida de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la terapia contra exposiciones recurrentes a parásitos. En ciertos aspectos, la larga semivida de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la quimioprofilaxis frente a una futura infección.

- Se ha demostrado que los inhibidores que se unen a proteasoma de 20S estimulan la formación ósea en cultivos orgánicos óseos. Además, cuando se han administrado tales inhibidores sistémicamente a ratones, ciertos inhibidores de proteasoma aumentaban el volumen óseo y las velocidades de formación ósea más de un 70 % (Garrett, I. R. et al., J. Clin. Invest. (2003) 111: 1771-1782), sugiriendo por lo tanto que la maquinaria de ubiquitina-

proteasoma regula la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea. Por lo tanto, los compuestos divulgados pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas a la pérdida ósea, tales como osteoporosis.

- 5 El tejido óseo es una excelente fuente de factores que tienen la capacidad de estimular células óseas. Por tanto, los extractos de tejido óseo bovino contienen no solo proteínas estructurales que son responsables de mantener la integridad estructural, sino también factores de crecimiento óseo biológicamente activos que pueden estimular las células óseas a proliferar. Entre estos últimos factores, están una familia recién descrita de proteínas llamada proteínas morfogenéticas (BMP). Todos estos factores de crecimiento tienen efectos sobre otros tipos de células, así  
 10 como sobre células óseas incluidas. Hardy, M. H., et al., Trans Genet (1992) 8: 55-61 describe evidencias de que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) se expresan diferencialmente en folículos pilosos durante el desarrollo. Harris, S. E., et al., J Bone Miner Res (1994) 9: 855-863 describe los efectos de TGF- $\beta$  sobre la expresión de BMP-2 y otras sustancias en células óseas. La expresión de BMP-2 en folículos maduros aparece también durante la maduración y después del periodo de proliferación celular (Hardy, et al. (1992, supra)). Por tanto, los compuestos de  
 15 la divulgación pueden ser también útiles para la estimulación del crecimiento de folículos pilosos.

- Finalmente, los compuestos divulgados son también útiles como agentes de diagnóstico (p.ej., en kits de diagnóstico o para uso en laboratorios clínicos) para el cribado de proteínas (p.ej., enzimas, factores de transcripción) procesadas por hidrolasas Ntn, incluyendo el proteasoma. Los compuestos divulgados son también útiles como  
 20 reactivos de investigación para unión específica a la subunidad X/BM1 o cadena  $\alpha$  e inhibición de las actividades proteolíticas asociadas con ella. Por ejemplo, puede determinarse la actividad (e inhibidores específicos) de otras subunidades del proteasoma.

- La mayoría de proteínas celulares se someten a procesamiento proteolítico durante la maduración o activación. Los  
 25 inhibidores enzimáticos divulgados en la presente memoria pueden usarse para determinar si un proceso celular, de desarrollo o fisiológico o resultado clínico está regulado por la actividad proteolítica de una hidrolasa Ntn particular. Uno de dichos procedimientos incluye obtener un organismo, una preparación celular intacta o un extracto celular; exponer el organismo, preparación celular o extracto celular a un compuesto divulgado en la presente memoria; exponer el organismo, preparación celular o extracto celular expuesto al compuesto a una señal y monitorizar el  
 30 proceso o resultado clínico. La alta selectividad de los compuestos divulgados en la presente memoria permite una eliminación o implicación rápida y precisa de la Ntn (por ejemplo, el proteasoma de 20S) en un proceso celular, de desarrollo o fisiológico dado.

#### Administración

- 35 Los compuestos preparados como se describen en la presente memoria pueden administrarse de diversas formas, dependiendo del trastorno para tratar y la edad, afección y peso corporal del paciente, como es bien conocido en la materia. Por ejemplo, cuando los compuestos se van a administrar por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes; o para administración parenteral, pueden formularse como  
 40 inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones de infusión por gotas o supositorios. Para aplicación por la vía de membrana mucosa oftálmica, pueden formularse como gotas oculares o pomadas oculares. Estas formulaciones pueden prepararse por medios convencionales y, si se desea, puede mezclarse el ingrediente activo con cualquier aditivo o excipiente convencional, tal como un aglutinante, agente disgregante, lubricante, corrector, agente solubilizante, auxiliar de suspensión, agente emulsionante, agente de recubrimiento, ciclodextrina  
 45 y/o tampón. Aunque la dosificación variará dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno para tratar o prevenir, la vía de administración y la forma del fármaco, en general se recomienda una dosificación diaria de 0,01 a 2000 mg del compuesto para un paciente humano adulto, y esta puede administrarse en una sola dosis o en dosis divididas. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del  
 50 compuesto que produzca un efecto terapéutico.

- El momento preciso de administración y/o la cantidad de composición que procurará los resultados más efectivos en términos de eficacia de tratamiento en un determinado paciente dependerán de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de un compuesto particular, la condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y fase  
 55 de la enfermedad, condición física general, sensibilidad a una dosificación dada y tipo de medicación), la vía de administración, etc. Sin embargo, pueden usarse las directrices anteriores como base para el ajuste fino del tratamiento, p.ej. determinando el momento y/o cantidad óptimos de administración, que requerirá solo experimentación rutinaria consistente en monitorizar el sujeto y ajustar la dosificación y/o momento.

- 60 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para hacer referencia a aquellos

ligandos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que sean, dentro del alcance del criterio médico genérico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, proporcionalmente a una relación de beneficio/riesgo razonable.

5

La frase “portador farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente memoria significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones tales como almidón de maíz, almidón de patata y  $\beta$ -ciclodextrina sustituida o no sustituida; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y celulosa acetato; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponación tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. En ciertos aspectos de la divulgación, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria son no pirogénicas, es decir, no inducen elevaciones de temperatura significativas cuando se administran a un paciente.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” hace referencia a las sales de adición de ácido inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas del inhibidor o inhibidores. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y purificación del inhibidor o inhibidores, o haciendo reaccionar separadamente el inhibidor o inhibidores purificados en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, laurilsulfonato y sales de aminoácido, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts” J. Pharm. Sci. 66: 1-19.)

En otros casos, los inhibidores útiles en los procedimientos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término “sales farmacéuticamente aceptables” en estos aspectos hace referencia a sales de adición de base inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas de un inhibidor o inhibidores. Estas sales pueden prepararse igualmente in situ durante el aislamiento final y purificación del inhibidor o inhibidores, o haciendo reaccionar separadamente el inhibidor o inhibidores purificados en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amonio o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., supra).

Pueden estar también presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio o sulfito de sodio; (2) antioxidantes oleosolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo o alfa-tocoferol; y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico o ácido fosfórico.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos (que usan una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una matriz inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de un inhibidor o inhibidores como ingrediente activo. Una composición puede administrarse

también como bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, o gránulos), el ingrediente activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, ciclodextrinas, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol vinílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes de tamponación. Pueden emplearse también composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellena blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Puede elaborarse un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden elaborarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del inhibidor o inhibidores en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden ranurarse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la materia de la formulación farmacéutica. Pueden formularse también para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso. Estas composiciones pueden contener opcionalmente también agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libere el ingrediente o ingredientes activos solo, o preferiblemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de imbibición que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo puede estar también en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la materia, tales como por ejemplo agua u otros disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos.

Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también coadyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además del inhibidor o inhibidores activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio bentonita, agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más inhibidores con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados, que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, que sean sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundan en el recto o la cavidad vaginal y liberen el agente activo.

Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal incluyen también pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverizador que contienen portadores tales como son conocidos en la materia por ser apropiados.

5 Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un inhibidor o inhibidores incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.

10 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de inhibidor o inhibidores, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de un inhibidor o inhibidores, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. 15 Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

El inhibidor o inhibidores pueden administrarse como alternativa por aerosol. Esto se consigue preparando un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contengan la composición. Podría usarse una suspensión no acuosa (p.ej., propelente fluorocarburo). Se prefieren los nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente al cizallamiento, lo que puede dar como resultado la degradación del compuesto. 20

Ordinariamente, se elabora un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa del agente junto con portadores y estabilizantes convencionales farmacéuticamente aceptables. Los portadores y estabilizantes varían con los requisitos de la composición particular, pero incluyen típicamente tensioactivos no iónicos (Tween, Pluronic, ésteres de sorbitán, lecitina, Cremophor), codisolventes farmacéuticamente aceptables tales como polietilenglicol, proteínas inocuas como seroalbúmina, ácido oleico, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan generalmente a partir de soluciones isotónicas. 25

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un inhibidor o inhibidores al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden elaborarse disolviendo o dispersando el agente en el medio apropiado. Pueden usarse también potenciadores de la absorción para aumentar el flujo de inhibidor o inhibidores a través de la piel. Tal velocidad de flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el inhibidor o inhibidores en una matriz polimérica o gel. 30 35

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más inhibidores en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que vuelven la solución isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes. 40

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. 45 50

Estas composiciones pueden contener también coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, o ácido fenolsorbico. Puede ser también deseable incluir agentes de ajuste de la tonicidad, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede originarse por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina. 55

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco por inyección subcutánea o intramuscular. Por ejemplo, se logra la absorción retardada de una forma de fármaco 60

administrada parenteralmente disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

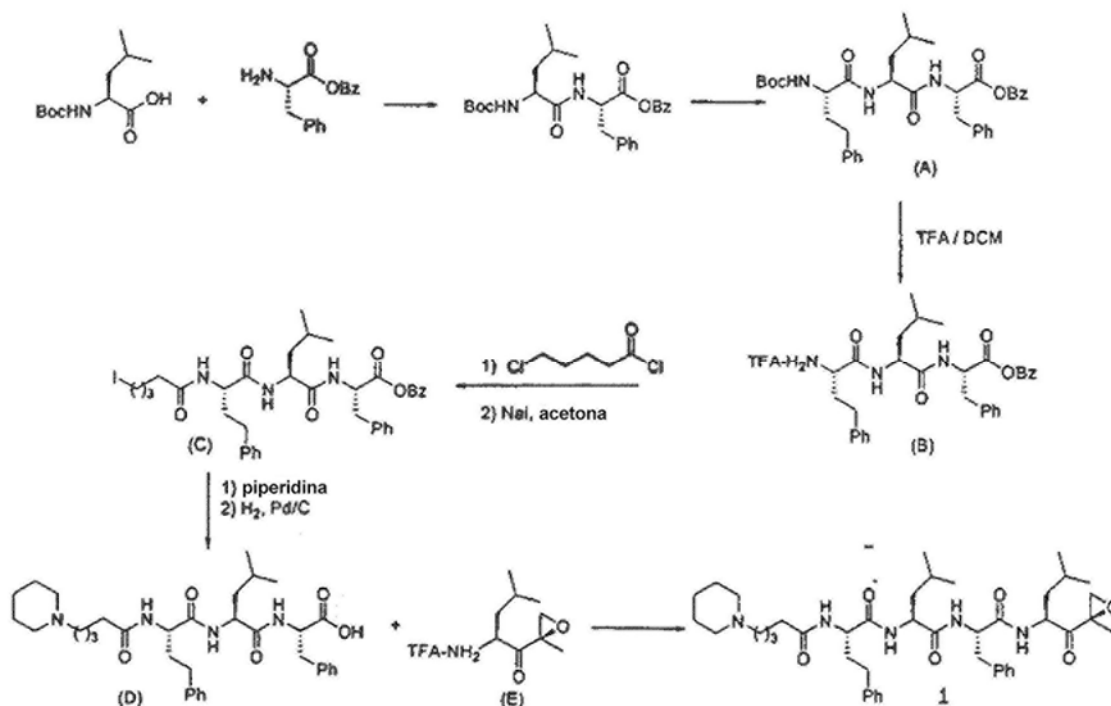
- Las formas de depósito inyectables se elaboran formando matrices de microencapsulación de inhibidor o inhibidores en polímeros biodegradables tales como polilactida-polglicolida. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito se preparan también atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.
- 10 Las preparaciones de agentes pueden darse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Se dan, por supuesto, en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsula, por inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, infusión; por vía tópica por loción o pomada y por vía rectal por supositorios. Se prefiere la administración oral.
- 15 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, e infusión.
- 20 Las frases "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica" como se usan en la presente memoria significan la administración de un ligando, fármaco u otro material de forma distinta que directamente al sistema nervioso central, de tal modo que entre en el sistema del paciente y, por tanto, se someta al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.
- 25 Estos inhibidores pueden administrarse a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo oral, nasal como por ejemplo un pulverizador, rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, como por polvos, pomadas o gotas, incluyendo bucal y sublingual.
- 30 Independientemente de la vía de administración seleccionada, el inhibidor o inhibidores, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los especialistas en la materia.
- 35 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta divulgación pueden variar para obtener una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente.
- 40 La concentración de compuesto divulgado en una mezcla farmacéuticamente aceptable variará dependiendo de varios factores, incluyendo la dosificación del compuesto para administrar, las características farmacocinéticas del compuesto o compuestos empleados y la vía de administración. En general las composiciones de esta divulgación pueden proporcionarse en una solución acuosa que contiene aproximadamente 0,1-10 % p/v de un compuesto divulgado en la presente memoria, entre otras sustancias, para administración parenteral. Los intervalos de dosis
- 45 típicos son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal al día, dados en 1-4 dosis divididas. Cada dosis dividida puede contener los mismos o diferentes compuestos de la invención. La dosificación será una cantidad efectiva dependiendo de varios factores, incluyendo la salud global del paciente y la formulación y vía de administración del compuesto o compuestos seleccionados.
- 50 Otro aspecto de la divulgación proporciona una terapia conjunta donde se administran uno o más de otros agentes terapéuticos con el inhibidor de proteasoma. Tal tratamiento conjunto puede conseguirse mediante dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento.
- En ciertos aspectos de la divulgación, se administra un compuesto descrito en la presente memoria conjuntamente con uno o más de otros inhibidores de proteasoma.
- 55 En ciertas realizaciones, se administra un compuesto de la divulgación conjuntamente con un producto quimioterapéutico. Los productos quimioterapéuticos adecuados pueden incluir productos naturales tales como alcaloides de la vinca (es decir, vinblastina, vincristina y vinorelbina), paclitaxel, epidipodofilotoxinas (es decir, etopósido, tenipósido), antibióticos (dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina e idarubicina),
- 60

- antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina, enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente L-asparagina y agota las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquilsulfonatos (busulfán), nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos-dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (fluorouracilo, floxuridina y citarabina), análogos de purina e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina); inhibidores de aromatasas (anastrozol, exemestano y letrozol); y complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino),
- 5 procarbazona, hidroxiurea, mitotano, aminoglutetimida; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) (tricostatina, butirato de sodio, apicidán, suberoilánilida del ácido hidroxámico); hormonas (es decir, estrógeno) y agonistas hormonales tales como agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (goserelina, leuprolida y triptorelina). Otros agentes quimioterapéuticos pueden incluir mecloretamina, camptotecina, ifosfamida, tamoxifeno, raloxifeno, gemcitabina, navelbina o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores.
- 15 En ciertos aspectos de la divulgación, se administra un compuesto descrito en la presente memoria conjuntamente con una citocina. Las citocinas incluyen, pero sin limitación, interferón  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , interleucinas 1-8, 10 y 12, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), TNF- $\alpha$  y  $\beta$  y TGF- $\beta$ .
- 20 En ciertos aspectos de la divulgación, se administra un compuesto descrito en la presente memoria conjuntamente con un esteroide. Los esteroides adecuados pueden incluir, pero sin limitación, 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clocortolona; cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difuprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida,
- 25 acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednidenol, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, hidrocortisona, loteprednol etabonato, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarbato, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona de sodio, prednisona, prednival, prednilideno,
- 30 rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona y sales y/o derivados de los mismos.
- En ciertos aspectos de la divulgación, se administra un compuesto descrito en la presente memoria conjuntamente con un agente inmunoterapéutico. Los agentes inmunoterapéuticos adecuados pueden incluir, pero sin limitación,
- 35 moduladores de MDR (verapamilo, valspordar, biricodar, tariquidar, laniquidar), ciclosporina, talidomida y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser desnudos o conjugados tales como rituximab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, ibritumomab tiuxetán, gemtuzumab ozogamicina, bevacizumab, cetuximab, erlotinib y trastuzumab.

#### 40 **Ejemplificación**

Esquema 1: Síntesis del Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia)





#### Síntesis de (A)

- 5 Se añadió DIEA (44,29 g, 60 ml, 342,68 mmol, 4,0 eq.) a una solución de NBoc-leucina (19,81 g, 85,67 mmol, 1,0 eq.) y éster bencílico de fenilalanina (25,0 g, 85,67 mmol, 1,0 eq.) en 900 ml de MeCN y se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió a esta mezcla HOBt (18,52 g, 137,08 mmol, 1,6 eq) seguido de PyBOP (71,33 g, 137,08 mmol, 1,6 eq), que se añadió en varias porciones durante cinco minutos. Se colocó la reacción en atmósfera de argón y se agitó durante una noche. Se retiraron los productos volátiles a presión reducida, se tomó el material
- 10 restante en 500 ml de AcOEt, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat., H<sub>2</sub>O y salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se añadió BocNHLeuPheOBz (25,0 g, 53,35 mmol, 1,0 eq.) a una solución enfriada a 0 °C de TFA al 70 %/DCM (150 ml). Se agitó la solución y se dejó calentar a temperatura ambiente durante 2 h, en cuyo momento se concentró la mezcla y se colocó a alto vacío durante 2 horas, dando la sal de TFA de la amina dipeptídica. Se añadieron al aceite resultante BocNHHPheCO<sub>2</sub>H (14,68 g,
- 15 53,35 mmol, 1,0 eq.), 550 ml de MeCN y DIEA (27,58 g, 37,2 ml, 213,4 mmol, 4,0 eq.) y se enfrió la mezcla a 0°C en un baño de hielo. Se añadió a la mezcla enfriada HOBt (11,53 g, 85,36 mmol, 1,6 eq.) seguido de PyBOP (44,42 g, 85,36 mmol, 1,6 eq.), que se añadió en varias porciones durante cinco minutos. Se colocó la reacción en argón y se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche, en cuyo momento se formó un precipitado blanco. Se enfrió la mezcla de reacción, se recogieron los sólidos por filtración y se lavaron entonces con MeCN frío, dando (A)
- 20 (24,86 g).

#### Síntesis de (B)

- Se mezcló intermedio (A) (23,0 mmol, 14,5 g) con TFA/DCM (al 80 %) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora, en cuyo momento se concentró la mezcla y se colocó a alto vacío durante 2 horas, dando (B).
- 25

#### Síntesis de (C)

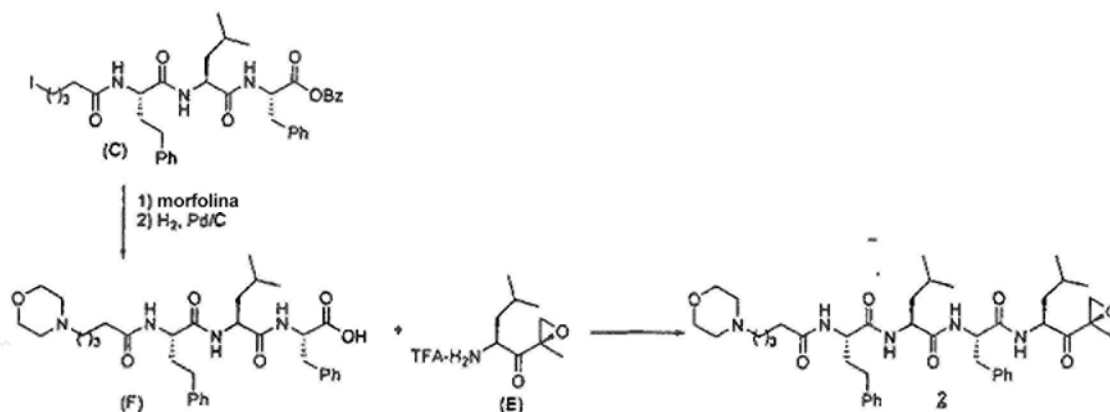
- Se añadieron cloruro de 5-clorovalerilo (1,9 mmol, 0,24 ml, 1,2 eq.) y DIEA (6,4 mmol, 1,2 ml, 4 eq.) a una solución de (B) (1,6 mmol, 1 eq.) en MeCN (100 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche y se concentró entonces dando un sólido. Se recogió el sólido y se lavó con éter, dando el cloruro de alquilo. Se añadió NaI (2,5 mmol, 0,387 mmol) a una solución del cloruro de alquilo (0,21 mmol, 0,134 g) en acetona seca (100 ml) y se calentó la reacción a reflujo durante una noche. Se concentró entonces la mezcla de reacción a vacío y se disolvió el residuo en AcOEt, se lavó con agua y salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, dando (C).
- 30
- 35

*Síntesis de (D)*

Se añadieron piperidina (0,048 mmol, 5,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (C) (0,040 mmol, 30,0 mg) en THF (2 ml). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en AcOEt/ MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (30,0 mg) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, procurando (D) (11,0 mg).

*Síntesis del compuesto 1*

Se añadieron (D) (0,019 mmol, 0,014 g, 1 eq.), DIEA (0,50 mmol, 88  $\mu$ l, 20 eq.) y HOBT (0,20 mmol, 0,0272 g, 10,5 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,098 mmol, 5,2 eq.) en DMF (3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,20 mmol, 0,105 g, 10,5 eq.) en varias porciones. Se agitó entonces la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 1 (5,1 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L de base celular <50 nM.

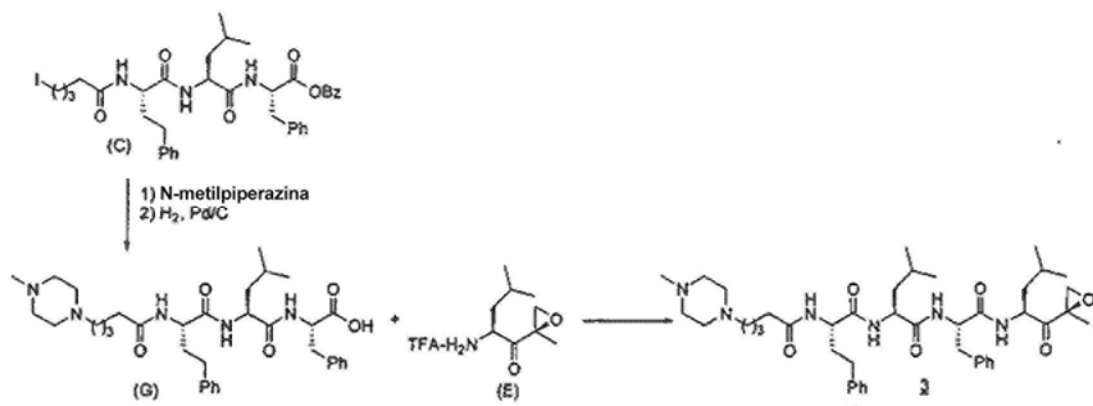
Esquema 2: síntesis del Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)*Síntesis de (F)*

Se añadieron morfolina (0,050 mmol, 5,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (C) (0,040 mmol, 0,030 g) en THF (2 ml). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en AcOEt/MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (30,0 mg) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, facilitando (F) (19,0 mg).

*Síntesis del compuesto 2*

Se añadieron (F) (0,030 mmol, 0,018 g, 1 eq.), DIEA (0,50 mmol, 88  $\mu$ l, 17 eq.) y HOBT (0,20 mmol, 27,2 mg, 6,7 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,098 mmol, 3,2 eq.) en DMF (3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,20 mmol, 0,105 g, 6,7 eq.) en varias porciones. Se agitó entonces la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 2 (6,0 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

Esquema 3: Síntesis del Ejemplo 3 (ejemplo de referencia)



#### Síntesis de (G)

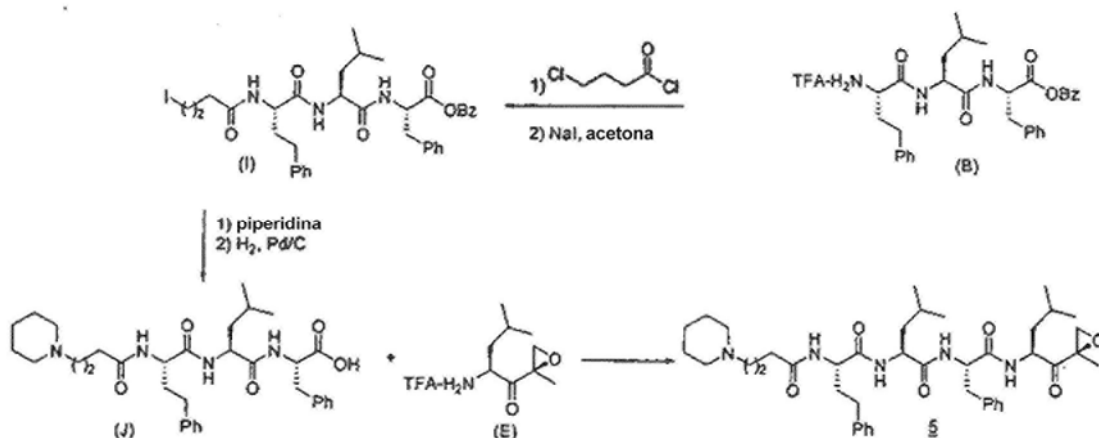
- 5 Se añadieron N-metilpiperazina (0,050 mmol, 5,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (C) (0,040 mmol, 30,0 mg) en THF (2 ml). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en
- 10 AcOEt/MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (30,0 mg) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, facilitando (G) (31,0 mg).

#### Síntesis del compuesto 3

- 15 Se añadieron (G) (0,030 mmol, 18,0 mg, 1 eq.), DIEA (0,50 mmol, 88  $\mu$ l, 17 eq.) y HOBT (0,20 mmol, 27,2 mg, 6,7 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,098 mmol, 3,2 eq.) en DMF (3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,20 mmol, 0,105 g, 6,7 eq.) en varias porciones. Se agitó entonces la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó
- 20 entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 3 (3,9 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

#### Esquema 4: Síntesis del Ejemplo 5 (ejemplo de referencia)

25



#### Síntesis de (I)

Se añadieron cloruro de 4-clorobutirilo (2,8 mmol, 0,32 ml, 1,2 eq.) y DIEA (8 mmol, 1,4 ml, 4 eq.) a una solución de (B) (2,0 mmol, 1 eq.) en MeCN (120 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche y se concentró entonces, dando un sólido. Se recogió el sólido y se lavó con éter, dando el cloruro de alquilo (0,808 g). Se añadió NaI (0,86 mmol, 0,130 g) a una solución del cloruro de alquilo (0,09 mmol, 0,060 g) en acetona seca (10 ml) y se calentó la reacción a reflujo durante una noche. Se concentraron los contenidos a vacío y se disolvió el residuo en DCM, se lavó con agua y salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida facilitó (I) (0,050 g).

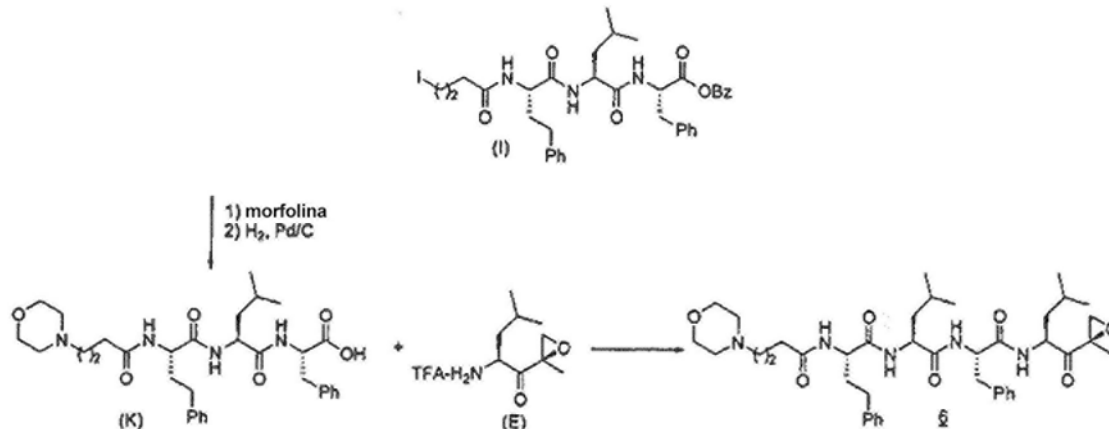
#### Síntesis de (J)

Se añadieron piperidina (0,050 mmol, 4,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (I) (0,040 mmol, 30,0 mg) en THF (2 ml). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en AcOEt/MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (0,020 g) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, facilitando (J).

#### Síntesis del compuesto 5

Se añadieron (J) (0,020 mmol, 1 eq.), DIEA (0,18 mmol, 31  $\mu$ l, 9 eq.) y HOBt (0,074 mmol, 10,0 mg, 3,7 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,098 mmol, 4,9 eq.) en DMF (3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,07 mmol, 36,0 mg, 3,7 eq.) en varias porciones. Se agitó la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 5 (18,2 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

#### Esquema 5: Síntesis del Ejemplo 6 (ejemplo de referencia)



#### Síntesis de (K)

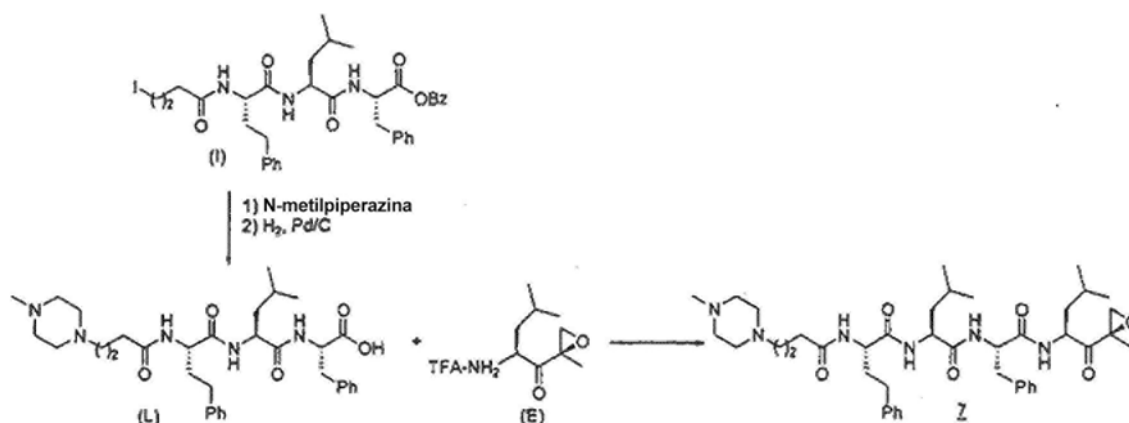
Se añadieron morfolina (0,050 mmol, 5,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (I) (0,040 mmol, 30,0 mg) en THF (2 ml). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos, se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en AcOEt/MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (20,0 mg) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida facilitando (K).

#### Síntesis del compuesto 6

Se añadieron (K) (0,126 mmol, 0,075 g, 1 eq.), DIEA (0,50 mmol, 88  $\mu$ l, 4 eq.) y HOBt (0,20 mmol, 27,0 mg, 1,6 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,151 mmol, 1,2 eq.) en DMF

(3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,202 mmol, 0,105 g, 1,6 eq.) en varias porciones. Se agitó la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 6 (46,6 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CL-L basado en célula <50 nM.

Esquema 6: Síntesis del Ejemplo 7 (ejemplo de referencia)



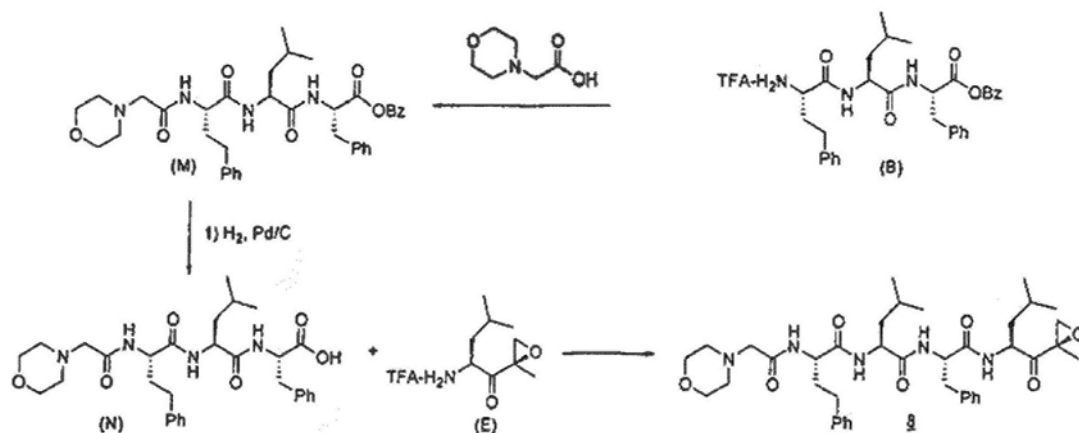
*Síntesis de (L)*

Se añadieron N-metilpiperazina (0,050 mmol, 5,0 mg) y DIEA (0,040 mmol, 0,5 mg) a una solución de (I) (0,040 mmol, 30,0 mg) en THF (2 ml). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se disolvió el éster bruto en AcOEt/MeOH 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (20,0 mg) y se colocó la mezcla a 1 atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, facilitando (L).

*Síntesis del compuesto 7*

Se añadieron (L) (0,065 mmol, 0,075 g, 1 eq.), DIEA (0,50 mmol, 88 µl, 8 eq.) y HOBt (0,20 mmol, 27,0 mg, 3,1 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,098 mmol, 1,5 eq.) en DMF (3 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,20 mmol, 0,105 g, 3,1 eq.) en varias porciones. Se agitó entonces la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 7 (4,8 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

Esquema 7: Síntesis del Ejemplo 8



#### Síntesis de (N)

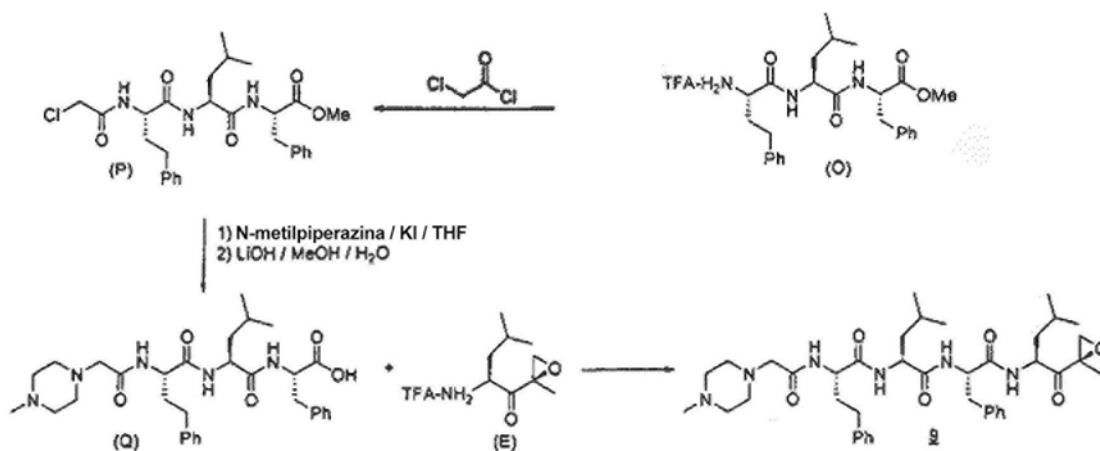
- 5 Se disolvió el compuesto (B) (0,39 mmol) en DMF (6 ml) y se añadió ácido 4-morfolinoacético (0,507 mmol, 0,074 g) seguido de DIEA (3,90 mmol, 0,504 g, 0,68 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo, se añadió PyBOP (0,62 mmol, 0,32 g) y se agitó en atmósfera de argón con calentamiento hasta temperatura ambiente durante una noche. Se diluyó la mezcla con salmuera (50 ml) y se extrajo con AcOEt (5x20 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (5x15 ml) y salmuera (1x25 ml) y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el
- 10 MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, dando el éster intermedio (M) (0,195 g). Se añadió Pd al 10 %/C (0,05 g) a (M) (0,150 g, 0,23 mmol), seguido de 5 ml de una mezcla 1:1 de MeOH y AcOEt y se colocó la mezcla en atmósfera de hidrógeno. Después de 2 h, se filtraron los contenidos a través de un tapón de Celite y se concentraron a vacío, dando (N) (0,12 g).

#### 15 Síntesis del compuesto 8

- Se añadieron (N) (0,17 mmol, 0,10 g, 1 eq.), DIEA (1,73 mmol, 0,30 ml, 10 eq.) y HOBT (0,27 mmol, 0,037 mg, 1,6 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,27 mmol, 0,083 mg, 1,3 eq.) en MeCN (5 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,27 mmol, 0,14 g, 1,6 eq.)
- 20 en varias porciones. Se agitó la mezcla a 5 °C en atmósfera de argón durante una noche, después de lo cual se diluyó la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta una pasta. Se disolvió el material bruto en la cantidad mínima de MeOH y se añadió lentamente a agua enfriada a 0°C agitada rápidamente (100 ml). Se aisló entonces el compuesto 8 por filtración (0,080 g). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

25

Esquema 8: Síntesis de Ejemplo 9 (ejemplo de referencia)



#### Síntesis de (P)

- 5 Se añadieron cloruro de cloroacetilo (2,7 mmol, 0,22 ml, 1,5 eq.) y DIEA (3,5 mmol, 1,4 ml, 3 eq.) a una solución a 0 °C de (O) [preparado siguiendo el mismo procedimiento que para las síntesis de (B) excepto por sustituir éster metílico de fenilalanina por éster bencílico de fenilalanina] (1,8 mmol, 1 eq.) en DMF (10 ml). Se dejó calentar la mezcla y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se concentró la reacción a vacío y se disolvió en AcOEt, se lavó con agua y salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se retiró el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los  
 10 productos volátiles a presión reducida, facilitando (P) (0,64 g).

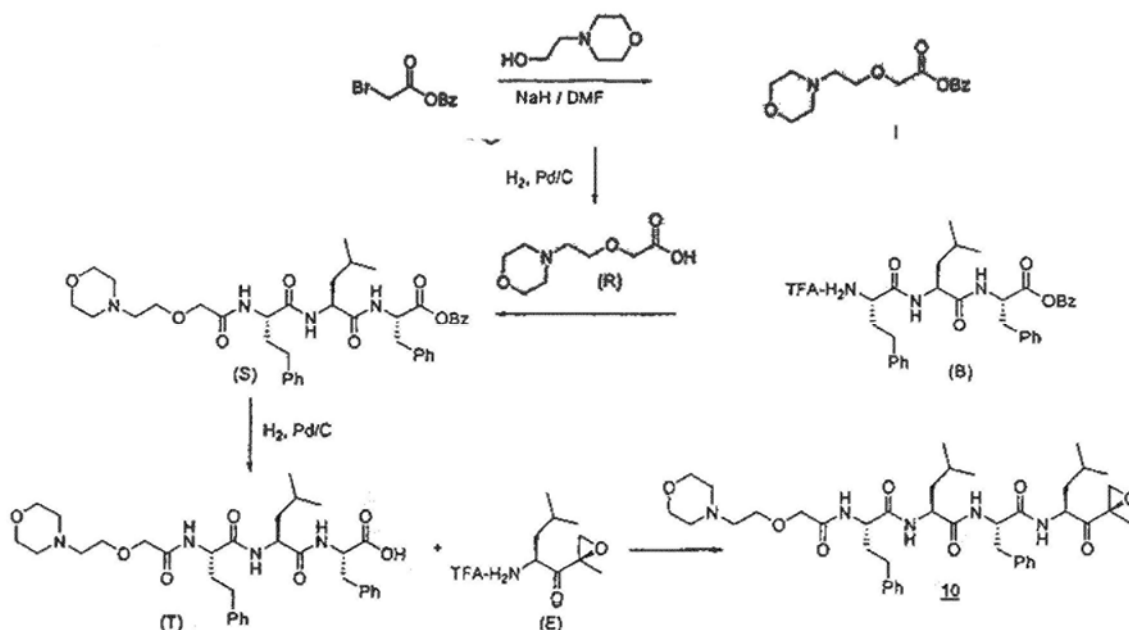
#### Síntesis de (Q)

- Se añadieron N-metilpiperazina (0,226 mmol, 22,0 mg) y KI (0,04 mmol, 6,4 mg) a una solución de (P) (0,188 mmol, 0,10 g) en THF (20 ml). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, se concentraron los contenidos y se disolvieron en AcOEt, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, dando el éster bruto (0,095 g). Se disolvió el éster bruto (0,095 g) en MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 (8 ml), se enfrió a 0 °C y se añadió LiOH (1,6 mmol, 39,0 mg). Se agitó la mezcla a 5 °C durante una noche, se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl sat., se diluyó con agua (20 ml) y se ajustó el pH a  
 20 3 con HCl 1 N. Se extrajo la mezcla con cloroformo, se combinaron las capas orgánicas y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se retiró el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, facilitando (Q) (20,0 mg).

#### Síntesis del compuesto 9

- 25 Se añadieron (Q) (0,034 mmol, 0,075 g, 1 eq.), DIEA (0,29 mmol, 50  $\mu$ l, 8,5 eq.) y HOBt (0,13 mmol, 180 mg, 3,8 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,082 mmol, 2,4 eq.) en DMF (1 ml). Se enfrió la mezcla a 0° C en un baño de hielo y se añadió BOP (0,13 mmol, 0,058 g, 3,8 eq.) en varias porciones. Se agitó entonces la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>  
 30 anhidro, se filtró y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 9. Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

Esquema 9: Síntesis del Ejemplo 10 (ejemplo de referencia)



#### Síntesis de (R)

- 5 Se añadió NaH (5,7 mmol, 0,136 g) a una solución de 2-bromoacetato de bencilo (4,56 mmol, 0,715 ml) y 4-(2-hidroxietil)morfolina (3,8 mmol, 0,466 ml) en DMF (4 ml) y se agitó la mezcla durante una noche en atmósfera de nitrógeno. Se diluyó la reacción con salmuera y se extrajo con AcOEt. Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se purificó el éster bruto por cromatografía ultrarrápida. Se disolvió el éster
- 10 purificado en MeOH/AcOEt 1:1 (10 ml), se añadió Pd al 5 %/C (0,100 g) y se colocó la mezcla en atmósfera de hidrógeno durante una noche. Se purgó la reacción, se filtró a través de Celite y se concentró a vacío, facilitando (R) (0,107 g).

#### Síntesis de (S)

- 15 Se añadió compuesto (R) (0,56 mmol, 0,107 g) seguido de DIEA (2,24 mmol, 0,391 ml) a una solución de (B) (0,56 mmol) en DMF (15 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo, se añadieron HOBT (0,90 mmol, 0,121 g) y PyBOP (0,90 mmol, 0,466 g) y se agitó la reacción en atmósfera de argón con calentamiento a temperatura ambiente durante una noche. Se diluyó la mezcla con salmuera (50 ml) y se extrajo con AcOEt (5x20 ml). Se
- 20 combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (5x15 ml) y salmuera (1x25 ml) y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida, dando (S).

#### Síntesis de (T)

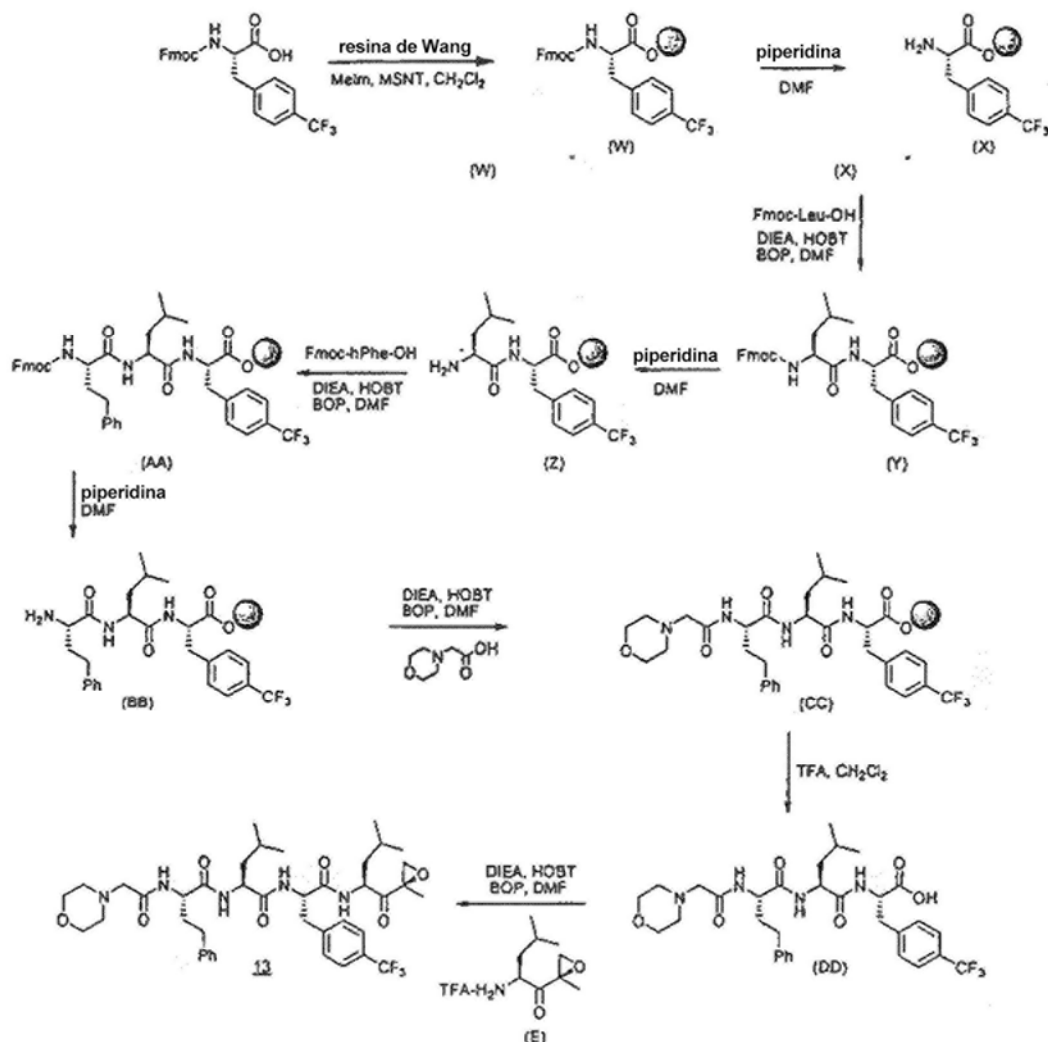
- 25 Se añadió Pd al 5 %/C (0,1 g) a una solución de (S) (0,56 mmol) en MeOH/AcOEt 1:1 (10 ml) y se colocó la mezcla en atmósfera de hidrógeno durante una noche. Se purgó la reacción, se filtró a través de Celite y se concentró a vacío, dando (T).

#### Síntesis del compuesto 10

- 30 Se añadieron (T) (0,16 mmol, 0,100 g, 1 eq.), DIEA (0,64 mmol, 112 µl, 4,0 eq.) y HOBT (0,25 mmol, 35,0 mg, 1,6 eq.) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,164 mmol, 1,0 eq.) en DMF (10 ml). Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo y se añadió PyBOP (0,25 mmol, 0,133 g, 1,6 eq.) en varias porciones. Se agitó la mezcla a 5 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. Se diluyó entonces la
- 35 reacción con NaCl sat. y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró hasta un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida facilitando el compuesto 10 (19,0 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 50 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.



Esquema 10: Síntesis del Ejemplo 13 (ejemplo de referencia)



5

*Síntesis de (W)*

Se añadió 1-metilimidazol (6,7 mmol, 0,370 ml) a una solución de Fmoc-Phe (4-CF<sub>3</sub>)-OH (2,2 mmol, 1,0 g.) en DCM (20 ml). Cuando la solución fue homogénea, se añadió 1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT) (2,9 mmol, 0,870 g). Una vez se disolvió el MSNT, se añadió la mezcla de reacción a resina de Wang (0,8 mmol, 1,0 g) y se dejó remover la solución resultante durante 45 minutos. Se filtró la resina y se lavó con DMF (50 ml), MeOH (50 ml) y DCM (50 ml). Se dejó secar al aire la resina resultante, procurando (W).

15

*Síntesis de (X)*

Se añadió piperidina al 20 %/DMF (10 ml) a (W) (0,40 mmol, 0,5 g) y se dejó remover la solución heterogénea resultante durante 20 minutos. Se filtró la mezcla, se lavó la resina con DMF (20 ml), MeOH (20 ml) y DCM (20 ml) y se dejó secar al aire. Se sometió la resina a las condiciones de reacción anteriores una segunda vez, procurando (X).

20

*Síntesis de (Y)*

Se añadieron DMF (20 ml), Fmoc-Leu-OH (0,40 mmol, 0,143 g), DIEA (1,6 mmol, 0,12 ml), HOBT (0,64 mmol, 0,086 g) y BOP (0,64 mmol, 0,178 g) a (X) (0,40 mmol) y se dejó remover la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción, se lavó la resina con DMF (40 ml), MeOH (40 ml) y DCM (40 ml), y se dejó secar al aire, procurando (Y).

#### Síntesis de (Z)

Se añadió piperidina al 20 %/DMF (2 ml) a (Y) (0,08 mmol, 0,10 g) y se dejó remover la solución heterogénea resultante durante 20 minutos. Se filtró la solución, se lavó la resina con DMF (10 ml), MeOH (10 ml) y DCM (10 ml) y se dejó secar al aire. Se sometió la resina a las condiciones de reacción anteriores una segunda vez, procurando (Z).

#### Síntesis de (AA)

Se añadieron DMF (20 ml), Fmoc-hPhe-OH (0,40 mmol, 0,143 g), DIEA (1,6 mmol, 0,12 mL), HOBT (0,64 mmol, 0,062 mg) y BOP (0,64 mmol, 0,178 g) a (Z) (0,08 mmol, 0,10 g) y se dejó remover la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción, se lavó la resina con DMF (40 ml), MeOH (40 ml) y DCM (40 ml) y se dejó secar al aire, procurando (AA).

#### Síntesis de (BB)

Se añadió piperidina al 20 %/DMF (2 ml) a (AA) (0,08 mmol, 0,10 g) y se dejó remover la solución heterogénea resultante durante 20 minutos. Se filtró la solución, se lavó la resina con DMF (10 ml), MeOH (10 ml) y DCM (10 ml) y se dejó secar al aire. Se sometió la resina a las condiciones de reacción anteriores una segunda vez procurando (BB).

#### Síntesis de (CC)

Se añadieron DMF (2 ml), ácido 4-morfolinoacético (0,10 mmol, 0,015 g), DIEA (0,17 mmol, 0,029 ml), HOBT (0,11 mmol, 0,016 g) y BOP (0,11 mmol, 0,051 g) a (BB) (0,08 mmol, 0,10 g) y se dejó remover la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción, se lavó la resina con DMF (15 ml), MeOH (15 ml) y DCM (15 ml) y se dejó secar al aire, procurando (CC).

#### Síntesis de (DD)

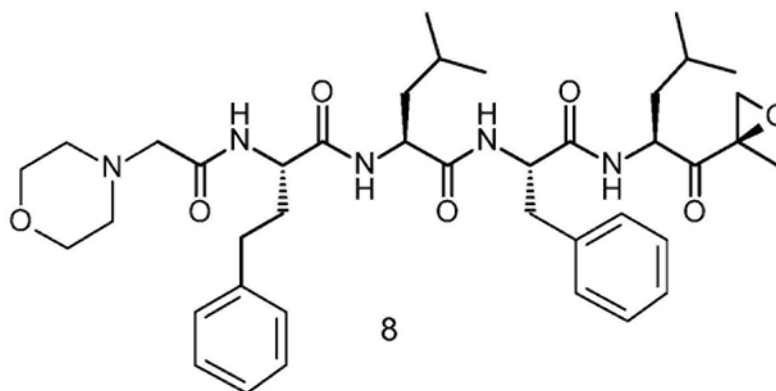
Se añadió TFA al 50 %/DCM (2 ml) a (CC) (0,08 mmol, 0,10 g) y se dejó remover la mezcla durante 20 minutos (la resina se volvió morada). Se filtró la reacción y se lavó la resina con DCM (10 ml). Se retiraron los productos volátiles a presión reducida, se diluyó el aceite resultante con DCM (10 ml) y se evaporó un total de tres veces, procurando (DD).

#### Síntesis del compuesto 13

Se añadieron (DD) (0,1 mmol), DIEA (2,9 mmol, 0,5 ml), HOBT (0,2 mmol, 0,032 g) y BOP (0,23 mmol, 0,103 g) a una solución agitada de (E) [véase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2283-2288] (0,11 mmol, 0,019 g) en MeCN (2 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche. Se diluyó la reacción con salmuera (15 ml) y se extrajo con AcOEt. Se lavó la capa orgánica con agua, NaHCO<sub>3</sub> sat. y salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Se retiró el MgSO<sub>4</sub> por filtración y se retiraron los productos volátiles a presión reducida. Se purificó el material bruto por cromatografía ultrarrápida, procurando 13 (12,6 mg). Cl<sub>50</sub> de CT-L de 20S < 500 nM, Cl<sub>50</sub> de CT-L basado en célula <50 nM.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de síntesis del compuesto 8

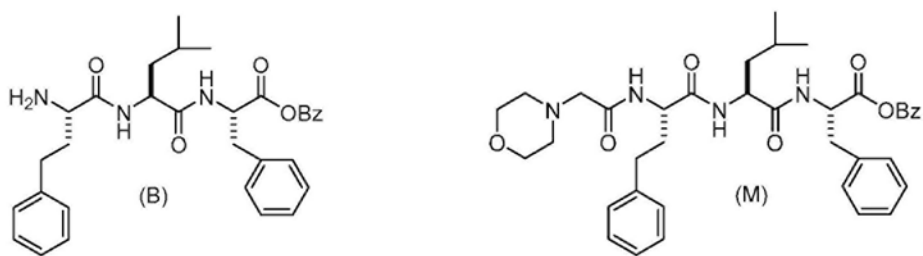


5

que comprende

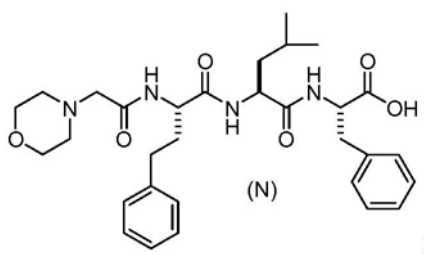
- (a) mezclar el compuesto (B) y ácido 4-morfolinoacético formando el compuesto (M):

10

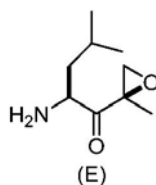


- (b) hacer reaccionar el compuesto (M) con hidrógeno y paladio sobre carbón formando el compuesto (N):

15



- (c) mezclar el compuesto (N) y el compuesto (E), formando el compuesto 8



20

2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el compuesto (B) es una sal trifluoroacetato.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la etapa (a) comprende además  
5 hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio (PyBOP).
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto (E) es una sal trifluoroacetato.
- 10 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la etapa (c) comprende además hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio (PyBOP).
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además (d) aislar el compuesto 8 a mediante filtración.