

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 484**

51 Int. Cl.:

C07D 223/08 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2012 PCT/SE2012/000158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13058691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12841677 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2780326**

54 Título: **Método para la inhibición de la actividad de desubiquitinación**

30 Prioridad:

19.10.2011 SE 1100776
16.05.2012 SE 1200303

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2019

73 Titular/es:

VIVOLUX AB (100.0%)
Uppsala Science Park, Hus Oscar II
751 83 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

LINDER, STIG y
LARSSON, ROLF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 713 484 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

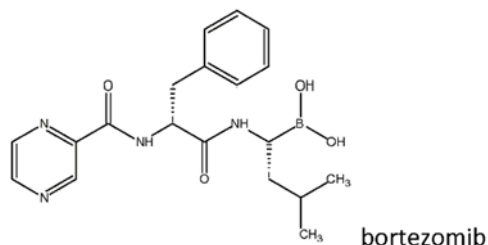
Método para la inhibición de la actividad de desubiquitinación

5 Campo de la invención

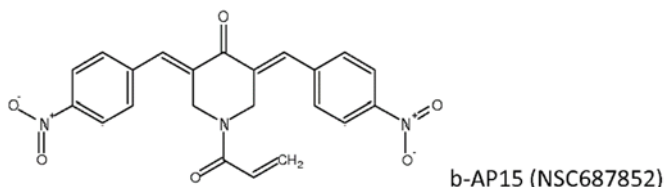
La invención se refiere a los compuestos y los compuestos para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente mediante la inhibición de la actividad de desubiquitinación. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos para uso en un método para tratar un cáncer en un paciente que ha demostrado ser resistente al tratamiento con al menos un medicamento anticanceroso. Más particularmente, la invención se refiere a un compuesto para uso en el método y a una composición farmacéutica que comprende el compuesto.

Antecedentes de la invención

15 Las células tumorales muestran una mayor sensibilidad a las interrupciones en el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS), lo que hace de este un objetivo atractivo para el desarrollo de terapias contra el cáncer (1). Los sustratos marcados con ubiquitina son degradados por el proteasoma 26S, un complejo de múltiples subunidades que comprende un núcleo proteolítico 20S (CP 20S) cubierto por partículas reguladoras 19S (RP 19S) (2,3). El CP 20S se ha convertido en un objetivo importante para el desarrollo de fármacos contra el cáncer, lo que ha dado como resultado la aprobación de bortezomib (Velcade®) para el tratamiento de la leucemia mieloide (4).



25 Se sabe que el compuesto b-AP15 (NSC687852) induce apoptosis independiente de p53 y dependiente de catepsina-D (5, 6).



Objetos de la invención

30 Un objeto de la invención es proporcionar un compuesto para su uso en un método para tratar el cáncer en un paciente mediante la inhibición de la actividad de desubiquitinación, en particular un cáncer resistente a la quimioterapia del estado de la técnica.

35 El documento WO 2007/007207 divulga compuestos útiles para tratar una variedad de trastornos proliferativos celular tales como cánceres. Los compuestos se basan en un núcleo de 6 carbonos que tiene anillos de fenilo unidos y actúa inhibiendo la actividad de la tirosina quinasa. No hay discusión sobre la inhibición del proteasoma mediante el bloqueo absoluto de la ubiquitinación.

40 Romantoli et al., (Symmetrical alfa bromoacryloylamido diaryldieone derivatives as a novel serie of antiproliferative agents. Design, synthesis and biological evaluation. Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 20, No. 9, 2010) divulga compuestos 1,5-diaril-3-oxo-1,4-pentadienilo (Ib) que demuestran actividad anticancerígena. El autor concluye que los compuestos híbridos que contienen las fracciones de bromoalfabromoacrililo son posibles fármacos anticancerosos. De nuevo, no hay discusión con respecto a la inhibición de la ubiquitinación del proteasoma y no hay información para desarrollar compuestos de fórmula general I de la presente solicitud.

El documento WO 2011/005790 divulga derivados de curcumina, que tienen propiedades antioxidantes y sugiere usarlos para proteger a las células normales de los daños oxidativos asociados durante la quimioterapia, aumentando así la eficacia anticancerígena.

50 Aleo et al., (Identification of new compounds that trigger apoptosome-independent caspase activation and apoptosis, Cancer Res, Vol. 66, No. 18, 2006) y Berndtsson et al., 2009 (6), ambos divulgan compuestos que tienen un 3,5-di

(fenilmetileno)-piperidin-4-ona que actúa contra el cáncer mediante la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma. Los compuestos inhiben la actividad isopeptidasa de la ubiquitina del proteasoma e inducen la apoptosis.

5 Los derivados de chalcona de Aleo et al., 2006, inhiben una gama más amplia de DUB, es decir, son menos específicos que los compuestos de la presente invención. Ambos artículos guardan silencio con respecto a la subunidad RP 19S del proteasoma, así como a los cánceres resistentes.

10 El documento WO 2007/059613 divulga derivados de 4-piperidona que tienen efecto anticanceroso pero no divulga compuestos de la presente invención (anillo de 7-14 miembros) ni discute la acción sobre la unidad 19S del proteasoma 26S.

Otro objeto de la invención es proporcionar un compuesto del tipo mencionado anteriormente, que tenga una solubilidad mejorada a pH fisiológico con respecto a compuestos funcionalmente equivalentes conocidos en la técnica.

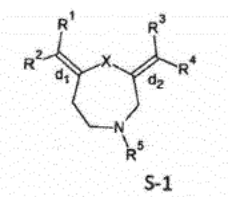
15 Un objeto adicional de la invención es proporcionar compuestos para uso en el tratamiento del cáncer.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el compuesto.

20 Otros objetos adicionales de la invención se harán evidentes al estudiar el siguiente resumen de la invención, una serie de realizaciones preferidas de la misma ilustradas en un dibujo, y las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

25 De acuerdo con la presente invención, se divulga un compuesto de la estructura general S:



capaz de anular la actividad de desubiquitinación (DUB) de las DUB RP 19S.

30 El compuesto de la invención se reconoce como perteneciente a una nueva clase de inhibidores de proteasoma de los cuales el compuesto conocido b-AP15 es un representante.

35 En particular, de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la invención inhibe la actividad de dos DUB RP 19S, UCHL5 y USP14, mientras que no afecta a las DUB no proteasómicas. Más particularmente, el compuesto de la invención tiene efecto en el tratamiento de un tumor cancerígeno resistente a la quimioterapia del estado de la técnica debido a la sobreexpresión del inhibidor intrínseco de apoptosis Bcl-2.

40 En otra realización preferida, el compuesto es eficaz en el tratamiento de un cáncer resistente a cualquier fármaco anticanceroso conocido en la técnica.

45 En esta solicitud, "resistente al tratamiento" significa que el tratamiento de un cáncer con una dosis única de un medicamento anticanceroso no reduce sustancialmente la tasa de crecimiento del cáncer observado inmediatamente antes del tratamiento, tal como la reducción de la tasa de crecimiento mensual en no más del 25 por ciento o el 10 por ciento o incluso el 5 por ciento o menos. Una medida aceptada del crecimiento tumoral es el cambio de volumen de un cáncer no diseminado.

50 Un ejemplo de un cáncer susceptible de tratamiento por el método de la invención es el mieloma múltiple. Otros ejemplos de cánceres susceptibles de tratamiento incluyen cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello.

En el compuesto de la invención de la estructura general S-1,

55 R¹, R² en el doble enlace d₁ y R³, R⁴ en el doble enlace d₂ pueden, independientemente entre sí, tener una configuración opuesta a la de la fórmula S-1, X es CO o CS;

R¹ y R³ son H;

R² y R⁴ son, independientemente entre sí, H; alquilo C₁₋₆; alquil C₁₋₅-CO; fenilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-3 de: alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, CN, -COO-alquilo C₁₋₆, COOH, NO₂, F, Cl, CF₃, NH₂, NH-

alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, CONR⁷R⁸, con la condición de que uno o más de H en alquilo y alcoxi pueden estar sustituidos con flúor;

5 R⁵ es H; alquilo C₁₋₆; alqueno C₂₋₆; alcoxi C₁₋₃-alquil C₂₋₆-; alcoxi C₁₋₃-alqueno C₂₋₆-; aril-C₀₋₆-alquil-; heteroaril-alquil C₀₋₆-; heterociclilo-alquil C₀₋₆-; cicloalquil-alquil C₀₋₆-; -alquil C₁₋₆-COO-alquilo C₁₋₆-; -alquil C₂₋₆-ariloxi; COR⁶;

R⁶ se selecciona de: alquilo C₁₋₆; alqueno C₂₋₆; alcoxi C₁₋₆; alcoxi C₁₋₃-alquilo C₁₋₆-;

10 alcoxi C₁₋₃-alqueno C₁₋₆-; aril-alquilo C₀₋₆-; heteroaril-alquil C₀₋₆-; heterociclilo-alquil C₀₋₆-; cicloalquil-alquil C₀₋₆-; -alquil C₁₋₆-COO-alquilo C₁₋₆-; NH₂; -NH-alquilo C₁₋₆-; -N(alquilo C₁₋₆)₂; -alquil C₀₋₆-ariloxi;

R⁷, R⁸ son, independientemente entre sí, H o alquilo C₁₋₃.

15 Se prefiere que tanto R² como R⁴ sean H; alquilo C₁₋₆; alquil C₁₋₅-CO; fenilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-3 de: alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, CN,

20 COO-alquilo C₁₋₆, COOH, NO₂, F, Cl, CF₃, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, CONR⁷R⁸, con la condición de que uno o más de H en alquilo y alcoxi puede estar sustituido con flúor, y en el que la sustitución de fenilo es preferiblemente en una o más de las posiciones 3, 4, 5.

25 Se prefiere particularmente que tanto R² como R⁴ sean fenilo sustituido en una o más de las posiciones 3, 4, 5 por 1-3, preferiblemente por 1 o 2, de: alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, CN, -COO-alquilo C₁₋₆, COOH, NO₂, F, Cl, CF₃, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, CONR⁷R⁸, con la condición de que uno o más de H en alquilo y alcoxi pueden estar sustituidos con flúor. Los más preferidos son los sustituyentes que retiran electrones, en particular F, Cl, trifluorometilo, NO₂, CN.

Se prefiere que R⁵ se seleccione del grupo que consiste en H, metilo, acetilo, COCH=CH₂, 2-acetoxietilo.

30 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, X = CO. Según otro aspecto preferido de la invención, R¹ y R³ son ambos H. De acuerdo con un tercer aspecto preferido de la invención, R² y R⁴ son, independientemente entre sí, fenilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-3 de: alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, CN, -COO-alquilo C₁₋₆, COOH, NO₂, F, Cl, CF₃, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, CONR⁷R⁸, siendo preferido fenilo y siendo preferida la sustitución de fenilo, si lo hubiera, en una o más de las posiciones 3, 4, 5.

35 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, R¹, R² en el enlace doble d1 y R³, R⁴ en el enlace doble d2 tienen la configuración de la fórmula S-1; X es CO o CS; R¹ y R³ son, independientemente uno del otro, H; R² y R⁴ son, independientemente entre sí, H; alquilo C₁₋₆; alquil C₁₋₅-CO; fenilo o heteroarilo de 6 miembros

40 sustituido con 1-3 de: CN, NO₂, F, Cl, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, CO-alquilo C₁₋₆; R⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alcoxi C₁₋₃-alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₃-alqueno C₁₋₆, arilo, heteroarilo, heterociclilo, alquil C₁₋₆-heteroarilo, alquil C₁₋₆-heterociclilo, alquil C₁₋₆-cicloalquilo, alquilarilo C₁₋₆, CO-alquilo C₁₋₆, CO-vinilo, CO-alilo, CO-arilo, CO-cicloalquilo. Se prefiere, independientemente uno del otro, que X sea CO, que R² y R⁴ sean fenilo sustituido, que R⁵ se seleccione de COR⁶, en particular de CO-alquilo C₁₋₆, CO-cicloalquilo, CO-vinilo, CO-alilo.

45 "Arilo" se refiere a un hidrocarburo monocíclico o bicíclico de 6 a 10 átomos de carbono que comprende al menos un anillo aromático. "Arioxi" se refiere a un grupo arilo unido a un átomo de oxígeno. "Heteroarilo" representa un sistema de anillo monocíclico que tiene 5 o 6 átomos en el anillo, de los cuales uno o más se seleccionan independientemente de oxígeno, nitrógeno, azufre. "Alquilo" denota alquilo lineal o ramificado. "Alqueno" denota alqueno lineal o ramificado. "Alcoxi" denota alcoxi lineal o ramificado. "Cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo monocíclico saturado de 3 a 7 átomos de carbono.

Los compuestos preferidos de la invención de la estructura general S-1 se divulgan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Compuestos preferidos de la invención.

X = CO, R ¹ = R ³ = H, R ⁵ es H o alquilo					
#	R ²	R ⁴	R ³	HCT116, FMCA, IC50 (µM)	MeJuSo-UB, concentración efectiva más baja por InCuCyte (µM)
1516	fenilo	fenilo	H		1,2
1517	4-metoxifenilo	4-metoxifenilo	H		
1518	4-clorfenilo	4-clorfenilo	H		1,6
1533	3-acetilfenilo	3-acetilfenilo	H		

ES 2 713 484 T3

X = CO, R ¹ = R ³ = H, R ⁵ es H o alquilo					
#	R ²	R ⁴	R ³	HCT116, FMCA, IC50 (µM)	MeJuSo-UB, concentración efectiva más baja por InCuCyte (µM)
1535	3-nitrofenilo	3-nitrofenilo	H	5,9	
1536	2-nitrofenilo	2-nitrofenilo	H	6,9	
1537	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	H	4,1	
1560	4-nitrofenilo*	H**	H	1,0	
1561	4-fluorofenilo	4-fluorofenilo	H	1,0	1
1562	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	H	0,5	0,25
1563	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	metilo	1,5	0,5
1564	4-fluorofenilo	4-fluorofenilo	metilo	0,9	16
1565	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	metilo	1,5	0,5
1566	3-nitrofenilo	3-nitrofenilo	metilo	2,3	0,5
1574	4-fluorofenilo	4-fluorofenilo	propil	2,8	0,5
1575	4-nitrofenilo	4-metoxifenilo	H	2,1	1
1576	4-fluorofenilo	4-metoxifenilo	H	1,6	8
1577	4-fluorofenilo	4-metoxifenilo	metilo	4,9	8
1582	4-fluorofenilo	4-clorofenilo	H	1,7	2
1583	4-clorofenilo	4-nitrofenilo	metilo	3,3	2
1584	4-clorofenilo	4-nitrofenilo	H	1,8	2
1585	4-fluorofenilo	4-nitrofenilo	H	1,5	2
1586	4-clorofenilo	4-fluorofenilo	H	1,1	0,5
1587	4-fluorofenilo	4-nitrofenilo	metilo	3,0	1
1588	4-nitrofenilo	4-metoxifenilo	metilo	3,1	1
1589	4-clorofenilo	4-fluorofenilo	metilo	2,5	1
1590	4-clorofenilo	4-metoxifenilo	metilo	2,0	1
1591	4-nitrofenilo	4-clorofenilo	H	0,9	0,5
1592	4-clorofenilo	4-nitrofenilo	H	12	4
1593	4-nitrofenilo	4-fluorofenilo	metilo	2,9	1
1594	4-nitrofenilo	4-clorofenilo	metilo	2,6	1
1595	4-fluorofenilo	4-clorofenilo	metilo	2,3	1
1596	4-nitrofenilo	4-fluorofenilo	H	2,6	2
1608	3-cloro-4-fluorofenilo	3-cloro-4-fluorofenilo	metilo	1,8	1
1609	4-fluoro-3-trifluorometilo-fenilo	4-fluoro-3- trifluorometilo-fenilo	metilo	1,4	1
1610	3,4-difluorofenilo	3,4-difluorofenilo	metilo	1,7	1
1611	3-fluoro-5- trifluorometilo-fenilo	3-fluoro-5- trifluorometilo-fenilo	H	1,1	0,5
1612	3-fluoro-5- trifluorometilo-fenilo	3-fluoro-5- trifluorometilo-fenilo	metilo	0,7	0,25
1613	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	H	25	32
1614	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	metilo	7,4	8
1615	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	4-cloro-3- trifluorometilo fenilo	metilo	0,9	0,5
1616	3,4,5-trifluorometil-fenilo	3,4,5-trifluorometil-fenilo	metilo	1,4	0,5
1617	4-trifluorometilofenilo	4-trifluorometilofenilo	metilo	1,6	1
1618	3-ciano-4-fluorofenilo	3-ciano-4-fluorofenilo	metilo	1,5	0,5
1619	3-carboniloaminofenilo	3-carboniloaminofenilo	H	30	32
1620	3-nitrofenilo	3-nitrofenilo	metilo	32	sin efecto
1621	4-cianofenilo	4-cianofenilo	metilo	4,5	2
1622	4-fluoro-3-trifluorometilo-fenilo	4-fluoro-3- trifluorometilo-fenilo	H	0,8	0,5
1623	3-ciano-4-fluorofenilo	3-ciano-4-fluorofenilo	H	1,0	0,5
1624	3-fluoro-4-trifluorometilo-fenilo	3-fluoro-4- trifluorometilo-fenilo	metilo	1,8	1

X = CO, R ¹ = R ³ = H, R ⁵ es H o alquilo					
#	R ²	R ⁴	R ³	HCT116, FMCA, IC50 (μM)	MeJuSo-UB, concentración efectiva más baja por InCuCyte (μM)
1625	4-cianofenilo	4-cianofenilo	H	0,9	0,5
1626	3-fluoro-4-trifluorometilo-fenilo	3-fluoro-4- trifluorometilo-fenilo	H	0,8	8
* o H o una mezcla de H y 4-nitrofenilo ** o 4-nitrofenilo o una mezcla de H y 4-nitrofenilo					

Debido a la protonación de su grupo amino, la solubilidad en medios acuosos de los compuestos de azepanona de la invención de los cuales R⁵ no es acilo, así como de piperidin-4-onas sustituidas correspondientemente aumenta con un pH decreciente. Sin embargo, de acuerdo con un aspecto importante, los compuestos de azepanona de la invención de los cuales R⁵ no es acilo (es decir, no -COR⁶) tienen una solubilidad superior en medios acuosos a pH fisiológico en comparación con las piperidin-4-onas sustituidas correspondientemente. Si bien la solubilidad de estas azepanonas y piperidin-4-onas aumenta al pasar de un pH alto a un pH bajo, el aumento comienza con valores de pH más altos para las azepanonas que para las piperidin-4-onas correspondientes. En esta solicitud, el "pH fisiológico" es un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, en particular de 7,0 a 7,5.

Tabla 2. Compuestos preferidos de la invención.

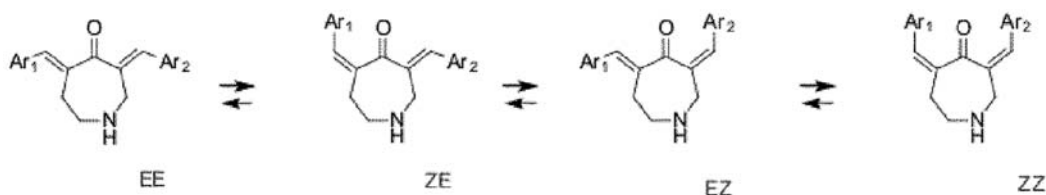
X = CO, R ¹ = R ³ = H, R ⁵ = COR ⁶					
#	R ²	R ⁴	R ⁶	HCT116, FMCA, IC50 (μM)	MeJuSo-UB, concentración efectiva más baja (μM)
1505	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	2-pirrolidinilo	5,2	16
1507	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	2-(1-carboxietil-etilo)	4,4	8
1520	fenilo	fenilo	vinilo		
1521	fenilo	fenilo	ciclobutilo		
1525	4-metoxifenilo	4-metoxifenilo	ciclobutilo		
1526	4-metoxifenilo	4-metoxifenilo	ciclopropilo		
1527	4-clorofenilo	4-clorofenilo	ciclobutilo		2
1546	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	vinilo	1,2	2
1567	4-nitrofenilo	4-nitrofenilo	metilo	0,6	0,5
1568	4-fluorofenilo	4-fluorofenilo	vinilo	1,5	2
1569	4-fluorofenilo	4-fluorofenilo	vinilo	2,0	4
1570	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	vinilo	0,5	0,25
1571	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	metilo	0,9	0,25
1572	3-nitrofenilo	3-nitrofenilo	vinilo	2,5	0,5
1578	4-fluorofenilo	4-metoxifenilo	metilo	7,0	8
1579	4-fluorofenilo	4-metoxifenilo	metilo	5,9	8
1580	4-nitrofenilo	4-metoxifenilo	vinilo	1,5	8
1581	4-nitrofenilo	4-metoxifenilo	metilo	7,2	8
1597	4-nitrofenilo	4-clorofenilo	metilo	1,3	1
1627	4-trifluorometilfenilo	4-trifluorometil-fenilo	metilo	0,7	1
1628	3,4-difluorofenilo	3,4-difluorofenilo	metilo	2,3	1
1629	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	metilo	0,6	1
1630	4-cloro-3-fluorofenilo	4-cloro-3- fluorofenilo	metilo	0,9	0,5
1631	3-cloro-4-fluorofenilo	3-cloro-4- fluorofenilo	metilo	1,0	32
1633	4-clorofenilo	4-clorofenilo	2-acetoxietilo	2,2	4
1635	4-clorofenilo	4-clorofenilo	bencilo	1,4	2
1636	4-clorofenilo	4-clorofenilo	1-(3-fenil-2-propenilo)	2,0	1

X = CO, R ¹ = R ³ = H, R ⁵ = COR ⁶					
#	R ²	R ⁴	R ⁶	HCT116, FMCA, IC50 (μ M)	MeJuSo-UB, concentración efectiva más baja (μ M)
1637	4-clorofenilo	4-clorofenilo	3-piridilo	2,1	2
1638	4-clorofenilo	4-clorofenilo	2-tiofenilo	2,0	2
1639	4-clorofenilo	4-clorofenilo	4-hidroxi-3-etoxibencilo	1,2	1
1640	4-clorofenilo	4-clorofenilo	metil-(2-metoxi-carboxil)fenilo	1,9	1
1641	4-trifluorometilfenilo	4-trifluorometil-fenilo	metil-3-piridilo	2,7	2
1642	4-trifluorometilfenilo	4-trifluorometil-fenilo	2-oxo-acetoxietilo	1,2	1
1643	4-trifluorometilfenilo	4-trifluorometil-fenilo	3-(3-oxo-propanoiloxi- metilo)	0,9	1
1644	4-trifluorometilfenilo	4-trifluorometil-fenilo	1-oxo-2-(2-piridil)etilo	1,4	1
1645	4-cloro-3-fluorofenilo	4-cloro-3- fluorofenilo	2-oxo-acetoxietilo	2,5	2
1646	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	2-oxo-acetoximetilo	1,1	1
1647	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	3-(3-oxo-propanoiloxi-metilo)	0,7	0,25
1648	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	1-oxo-2-(2-piridil)etilo	0,8	0,5
1649	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	metil-(2-metoxi-carboxil)fenilo	0,9	0,5
1650	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	metil-3-piridilo	1,9	1
1651	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	2-oxo-acetoxietilo	0,8	0,5
1652	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	3-(3-oxo-propanoiloxi-metilo	0,6	0,5
1653	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	1-oxo-2-(2-piridil)etilo	0,71	1
1654	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	4-cloro-3-fluorometil-fenilo	metil-(2-metoxi-carboxil)fenilo	1,2	1
1655	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	metil-3-piridilo	1,0	1
1656	4-cloro-3-trifluoro metil-fenilo	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	2-oxo-acetoxietilo	0,7	0,5
1657	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	acetilo	0,6	0,5
1658	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	4-cloro-3-trifluorometil-fenilo	1-oxo-2-(2-piridil)etilo	0,8	0,5
1659	4-trifluorometil-fenilo	4-trifluorometil-fenilo	2-acetoxietilo	2,4	2
1660	4-cloro-3-fluorofenilo	4-cloro-3-fluorofenilo	2-acetoxietilo	2,4	2
1661	4-cloro-3-fluorofenilo	4-cloro-3-fluorofenilo	metilcarboxilo	24	32
1662	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	2-acetoxietilo	2,1	1
1663	4-fluoro-3-nitrofenilo	4-fluoro-3-nitrofenilo	metilcarboxilo	3,1	4
1664	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	2-acetoxietilo	2,8	4
1665	3,4,5-trifluorofenilo	3,4,5-trifluorofenilo	metilcarboxilo	5,0	8
1666	4-cloro-3-trifluorometil fenilo	4-cloro-3-trifluorometilfenilo	2-acetoxietilo	1,3	1

La solubilidad en medios acuosos de compuestos de la invención de los cuales R⁵ es acilo (es decir, -COR⁶) es sustancialmente independiente del pH.

- 5 Los compuestos particularmente preferidos de la invención son los compuestos nos. 1561, 1562, 1567, 1570, 1571, 1586, 1591, 1600, 1612, 1618, 1622, 1625, 1643, 1647, 1648, 1649, 1652, 1653, 1656, 1657, 1658, 1662. Los compuestos más preferidos de la invención son los compuestos nos. 1570, 1571, 1625, 1662.

- 10 Dado que el compuesto de la invención comprende una fracción 1,4-penteno-3-ona disustituída en 1,5, puede existir en cuatro isómeros cis/trans EE, ZE, ES, ZZ. Al definir el compuesto de la invención, este isomerismo se definió anteriormente como "R¹, R² en el doble enlace d1 y R³, R⁴ en el doble enlace d2 puede, independientemente uno del otro, tener una configuración opuesta a la de fórmula S1". El compuesto de la invención comprende cualquiera de tales isómeros y cualquier mezcla de tales isómeros.



En síntesis, el compuesto de la invención se obtiene como una mezcla de isómeros pero a veces también en forma del isómero con la solubilidad más baja en el disolvente particular, del cual precipita o cristaliza. Mientras que los isómeros puros se pueden obtener de este modo bajo condiciones controladas, el efecto farmacológico del compuesto es exhibido por todos los isómeros. La razón de esto es su equilibrio en presencia de agua u otro disolvente o agente hidroxílico o sulfhidrónico, que se acelera por la catálisis ácida y básica.

Por consiguiente, el término "compuesto de la invención", como se usa en este documento, comprende un isómero puro del tipo mencionado anteriormente, así como una mezcla de dos o más de tales isómeros. La velocidad de equilibrio del compuesto de la invención en fluido corporal acuoso es suficiente para proporcionar un equilibrio sustancial dentro de un único período de tratamiento.

El compuesto de la invención comprende una fracción azepano, preferiblemente una fracción azepan-4-ona. De acuerdo con un aspecto importante de la invención, el compuesto de la invención exhibe una actividad citotóxica superior a la de un compuesto estructuralmente correspondiente que comprende una fracción de piperidina, tal como una fracción de 4-piperidinona.

De acuerdo con otro aspecto importante de la invención, el compuesto de la invención que comprende una fracción azepano, en particular una fracción azepan-4-ona presenta una solubilidad en un vehículo líquido adecuado para la administración a un paciente, tal como dimetilsulfóxido, superior a la de un compuesto estructuralmente correspondiente que comprende una fracción de piperidina, tal como una fracción de 4-piperidinona.

Un "período de tratamiento único" es el período de tiempo que transcurre entre la administración y el consumo del compuesto de la invención, es decir, el momento en el cual la concentración del compuesto de la invención en un sitio de acción, tal como en un tumor, se ha reducido en un 90% o 95% o 99% y más. En una composición farmacéutica, un isómero o una mezcla de isómeros del compuesto de la invención se estabiliza frente a la isomerización mediante la exclusión cuidadosa de la humedad.

El uso de la invención comprende administrar al paciente que lo requiera una dosis farmacológicamente eficaz del compuesto de la invención en un vehículo farmacéutico adecuado, tal como, por ejemplo, disuelto o suspendido en un vehículo acuoso o en un vehículo que comprende dimetil sulfóxido o N,N-dimetilacetamida. La administración puede ser por cualquier vía adecuada, tal como por inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. También se contemplan otros métodos de administración, en particular *per os*, tales como en forma de comprimidos o cápsulas de gelatina dura o blanda.

El experto en la materia sabe cómo determinar una dosis farmacológicamente eficaz. Dicha dosis puede ser de 0,0001 g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, en particular de 0,001 g/kg a 0,01 g/kg de peso corporal, dependiendo de si el agente se administra sistémicamente o localmente.

De acuerdo con la inhibición de DUB, el tratamiento con el compuesto de la invención provoca la acumulación de proteínas poliubiquitinadas de mayor peso molecular en comparación con el tratamiento con bortezomib, y da como resultado una respuesta de proteína no plegada más fuerte. De acuerdo con la invención, también se ha encontrado que la inducción de apoptosis por el compuesto de la invención difiere de la de bortezomib por ser insensible a la ruptura del supresor de tumores p53 e insensible a la sobreexpresión del inhibidor de la apoptosis Bcl-2.

De acuerdo con la presente invención, el uso de los compuestos para el tratamiento inhibe la progresión tumoral en modelos *in vivo* de tumores humanos y de ratón de carcinoma de pulmón, colon, cabeza y cuello, e inhibe la infiltración en un modelo de leucemia mieloide aguda (AML). En consecuencia, se divulga que la inhibición de la actividad de DUB de la RP 19S por el compuesto de la invención es una opción viable para el tratamiento del cáncer en seres humanos y animales.

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, las DUB de RP 19S comprenden UCHL5 y USP14. De acuerdo con otro aspecto preferido de la invención, la actividad de desubiquitinación (DUB) de las DUB no proteasómicas no se ve afectada por el compuesto de la invención. El compuesto de la invención se puede administrar disuelto o suspendido en un vehículo líquido por cualquier vía adecuada, tal como por administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. De forma alternativa o adicional, el compuesto de la invención se puede administrar por vía oral, tal como en forma de un comprimido o cápsula. Una dosis útil farmacológicamente eficaz del compuesto de la invención es de 0,0001 g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, en particular de 0,001 g/kg a 0,01 g/kg de peso corporal, dependiendo de si el compuesto se administra sistémicamente o localmente.

El compuesto de la invención bloquea la función del proteasoma celular, como se confirma mediante el uso de una línea celular informadora, que expresa ubiquitina marcada con proteína fluorescente amarilla (UbG76V-YFP) dirigida de forma constitutiva a la degradación proteasomal (12). La inmunotransferencia y la citometría de flujo revelaron una acumulación dependiente de la dosis del informador Ub-YFP (IC₅₀ = 0,8 μM), lo que sugiere un deterioro de la función del proteasoma. Dado que la inhibición de la función del proteasoma se caracteriza por defectos en la vida media de la ubiquitina (13), se trataron células HCT116 de carcinoma de colon con el compuesto de la invención y se analizó el nivel de conjugación de ubiquitina mediante inmunotransferencia. El tratamiento causó la rápida acumulación dependiente del tiempo de proteínas poliubiquitinadas de mayor peso molecular en comparación con el bortezomib inhibidor del CP 20S, lo que sugiere que el compuesto de la invención inhibe una rama alternativa del UPS. El aumento de la poliubiquitina se asocia con una fuerte respuesta proteotóxica caracterizada por la inducción de HSPA6 (Hsp70B¹), HSPA1B y DNAJB1 (Hsp40).

La vida media de muchas proteínas reguladoras del ciclo celular está controlada por el UPS que incluye inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y el supresor de tumores p53 (4). El tratamiento con el compuesto de la invención aumenta sus niveles de una manera dependiente de la dosis sin alterar los niveles de ornitina descarboxilasa 1 (ODC1), un sustrato de proteasoma independiente de ubiquitina (8). El aumento en los reguladores del ciclo celular fue concomitante con la detención del crecimiento en el límite de la fase G2/M y un mayor contenido de ADN sub G1. La detención del ciclo celular observada no se asocia con niveles aumentados de marcadores de daño del ADN tales como p53 fosforilado (en Ser 15) (9) o H₂AX (en Ser 139) (10), lo que sugiere que b-AP15 no es un agente genotóxico.

El aumento en el ADN sub G1, la activación de la caspasa-3 y la escisión de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) y la citoqueratina se asocian con una disminución general de la viabilidad celular en las concentraciones del fármaco que inducen la acumulación de poliubiquitina que conecta la inhibición de la UPS y la apoptosis. La inducción de apoptosis por bortezomib es sensible al estado del supresor de tumores p53 y la sobreexpresión de la oncoproteína Bcl-2 antiapoptótica (11, 12). Mediante el uso de clones isogénicos de células de cáncer de colon HCT116 se demostró que la apoptosis inducida por b-AP15 es insensible a la sobreexpresión de Bcl-2 y la interrupción de los reguladores apoptóticos p52, BAX o PUMA. La medición de la actividad citotóxica muestra que el compuesto de la invención es más tóxico para la línea celular de carcinoma de colon HTC-116 que para las células epiteliales de pigmento retinal inmortalizadas (hTERT-RPE1) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El compuesto de la invención exhibe un mayor grado de actividad citotóxica hacia las células HTC-116 que hacia los tipos de células normales.

La reducción observada en la actividad del proteasoma celular no se puede explicar por la inhibición de las actividades proteolíticas de las subunidades β del CP 20S. Los experimentos *in vitro* que usan sustratos específicos de actividad no muestran inhibición en ninguna de las actividades proteolíticas del CP 20S o del proteasoma 26S, disociación de las RP 19S y CP 20S o inhibición de la unión de poliubiquitina al proteasoma.

El compuesto de la invención comprende una entidad de dienona α-β con dos carbonos β accesibles estéricamente. Se ha descrito anteriormente que un farmacóforo estructuralmente similar está comprendido por una clase de inhibidores de la isopeptidasa de la ubiquitina (13). Sin embargo, cuando se probó la actividad de DUB celular usando ubiquitina 7-amido-4-metilumarina (Ub-AMC) en células tratadas, tratadas con el compuesto de la invención, no se observó reducción en la escisión de Ub-AMC. Esto demuestra que el compuesto de la invención no es un inhibidor general de DUB. Sin querer vincularse a ninguna teoría en particular, las similitudes en la estructura del farmacóforo y los datos que muestran que el compuesto de la invención inhibe la actividad del proteasoma independiente del CP 20S indican que el compuesto de la invención inhibe el proteasoma al bloquear la actividad de desubiquitinación de la RP 19S.

Los ensayos *in vitro* utilizando Ub-AMC y la RP 19S o los proteasomas 26S purificados confirmaron que el compuesto de la invención inhibe la actividad de desubiquitinación tanto de la RP 19S o el proteasoma 26S. La ubiquitina-GFP recombinante es un sustrato para la actividad de DUB de RP 19S (15). El tratamiento de RP 19S con b-AP15 inhibió eficazmente la escisión de Ub-GFP y HDM2 ubiquitinada. El tipo de enlaces de ubiquitina presentes en la cadena de poliubiquitina determina el destino de un sustrato modificado con ubiquitina.

Las cadenas de poliubiquitina unidas a K48 generalmente se dirigen a proteínas unidas para la degradación (14), mientras que las cadenas unidas a K63 participan en roles no proteolíticos que incluyen la reparación del ADN (15) y la segregación de cromosomas mitóticos (16). Las reacciones de desmontaje de la cadena de ubiquitina revelaron que el compuesto de la invención inhibe el procesamiento de RP 19S de tetrámeros de ubiquitina unidos a K48 y K63. La inhibición del desmontaje de la cadena de ubiquitina observada puede explicar la acumulación de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular en células tratadas con el compuesto de la invención.

La actividad de desubiquitinación del proteasoma se atribuye a la acción de tres DUB, UCHL5, USP14 y POH1, todos localizados dentro de la RP 19S (17-19). Tanto UCHL5 como USP14 son sensibles a la N-etilmaleimida (NEM), un inhibidor general de las cisteína proteasas, mientras que POH1 es insensible a la inhibición por NEM pero sensible a los quelantes de metales tales como N,N,N,N-tetrakis-(2-piridilmetilo)etilendiamina (TPEN) (20). Los experimentos de inhibición mostraron que la actividad residual de DUB está presente incluso después del tratamiento conjunto de RP

19S con NEM y el compuesto de la invención. Esta actividad de DUB residual se abolió después del tratamiento conjunto de RP 19S con el compuesto de la invención y TPEN, lo que sugiere que el compuesto de la invención inhibe principalmente uno o ambos DUB de cisteína sensibles a NEM. Los carbonos β del compuesto de la invención pueden servir como fracciones aceptoras de Michael, dando como resultado una unión covalente a residuos de cisteína en proteínas objetivo. Sin embargo, los ensayos *in vitro* mostraron que el compuesto de la invención es un inhibidor reversible y que el glutatión no excluye la actividad inhibitoria del compuesto.

Para identificar específicamente qué DUB fueron inhibidos por el tratamiento con el compuesto de la invención, se realizaron experimentos competitivos de marcación usando ubiquitina vinilsulfonona etiquetada con hemaglutinina (HA-UbVS), una sonda dirigida al sitio activo que reacciona irreversiblemente con DUB de la clase cisteína (17). La incubación de RP 19S o los proteasomas 26S con el compuesto de la invención abolió la marcación con Ub-VS de dos DUB de pesos moleculares correspondientes a UCHL5 y USP14. Se obtuvo un resultado similar utilizando UbV en lisados derivados de células tratadas con fármaco. El análisis de inmunotransferencia mostró un cambio descendente en el peso molecular tanto de USP14 como de UCHL5 debido a la pérdida de actividad y la disminución del etiquetado de UbV. Esto es consistente con los proteasomas purificados por afinidad del compuesto de la invención. Las células tratadas muestran una actividad de DUB reducidas confinadas al proteasoma y no es evidente en los lisados celulares. Los ensayos adicionales *in vitro* mostraron una inhibición mínima del compuesto de la invención en DUB de cisteína no proteasomal recombinante, lo que concuerda con la idea de que la inhibición no se debe a la reactividad general de la cisteína.

El compuesto de la invención disminuye sustancialmente e incluso detiene el crecimiento del tumor *in vivo*, como se muestra por su administración a ratones que portan un tumor humano o xenoinjertos de ratón. Cuando el compuesto de la invención se administra diariamente a ratones SCID que tienen xenoinjertos de carcinoma de cabeza y cuello FaDu, se observa una inhibición significativa del crecimiento del tumor FaDu después del tratamiento diario con el compuesto de la invención (volumen de tumor tratado/control, T/C = 0,4, $p < 0,001$). La muerte de células tumorales se analizó midiendo la citoqueratina derivada de xenoinjerto (CK18) en circulación. Citoqueratina 18 es un biomarcador para la apoptosis (21, 22); se observó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de CK18 humana total ($p = 0,01$). Los niveles de CK18 escindida por caspasa (CK18-Asp396) aumentaron moderadamente en comparación con los niveles totales, lo que sugiere que el compuesto de la invención tiene actividad contra las células tumorales *in vivo*. También se demostró que el compuesto de la invención inhibe el inicio tumoral de xenoinjertos de carcinoma de colon HCT-116^{Bcl2+} en ratones desnudos, como lo demuestra un retraso significativo en el inicio del tumor en comparación con los controles tratados con vehículo. De manera similar, el compuesto de la invención inhibe el crecimiento de tumores en modelos de ratones sinérgicos usando cronogramas de administración menos frecuentes.

Las hidrolasas C-terminal de ubiquitina (UCH) y las proteasas específicas de ubiquitina (USP) son subgrupos principales de las aproximadamente cien DUB codificadas por el genoma humano (23). El mecanismo de especificidad del compuesto de la invención para UCHL5 y USP14 en el RP 19S puede estar relacionado con conformaciones únicas de estas enzimas en el RP 19S o debido a alteraciones inducidas por fármacos de la estructura de RP 19S. Los presentes hallazgos son consistentes con los informes en la técnica que indican que la pérdida tanto de UCHL5 como de USP14, a diferencia de la pérdida de uno solo, conduce a la acumulación de proteínas poliubiquitinadas y la inhibición de la degradación de proteínas celulares (24).

La observación de que la inhibición de DUB está asociada con complejos de ubiquitina-sustrato de alto peso molecular parece ser de particular relevancia. Se observó una fuerte expresión de genes chaperones en células tratadas con el compuesto de la invención, lo que indica la inducción de una respuesta proteotóxica. Los complejos de ubiquitina-sustrato de alto peso molecular que se acumulan como resultado de la inhibición de DUB por el compuesto de la invención parecen generar una fuerte citotoxicidad.

A continuación, se describirá la invención con mayor detalle haciendo referencia a las realizaciones preferidas de la misma, ilustradas por un dibujo que comprende varias figuras.

Descripción de las figuras

Las Figuras 1a a 1o son diagramas que ilustran la inducción de la citotoxicidad dependiente de la dosis después de 72 horas de exposición continua de la línea celular informadora HCT-116 al compuesto por realizaciones del compuesto de la invención, de acuerdo con lo medido por FMCA (ensayo de citotoxicidad de microcultivos fluorométricos), así como la ausencia de dicha inducción por compuestos estructuralmente relacionados no comprendidos en la invención. Las células tratadas se compararon con los controles no tratados (índice de supervivencia);

Las Figuras 2a a 2e son diagramas que ilustran la solubilidad superior de los compuestos de la invención en un medio acuoso a pH fisiológico;

Las Figuras 3a a 3f son diagramas que ilustran, por el método de las Figs. 1a a 1o, la citotoxicidad superior de los compuestos de azepanona de la invención en relación con los compuestos de piperidin-4-ona estructuralmente correspondientes no comprendidos por la invención.

Descripción de las realizaciones preferidas

Métodos

- 5 Los ensayos de actividad del proteasoma *in vitro* se realizan en placas negras de microtitulación de 96 pozos utilizando proteasoma 20S humano (Boston Biochem) en regulador de reacción (Hepes 25 mM, EDTA 0,5 mM, SDS al 0,03%) con Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC o Boc-LRR-AMC usados como sustratos para la actividad del proteasoma. Los ensayos de actividad de desubiquitinasa se realizan con RP 19S humano (Boston Biochem) con ubiquitina-AMC como sustrato. Para los estudios de xenoinjerto de FaDu, se inyecta en forma subcutánea una suspensión de 100 μ L de células que contiene 1×10^6 células en el flanco de SCID. Tras la toma del tumor, los ratones se asignan al azar a grupos de control o tratamiento y se les administra 5 mg kg^{-1} del compuesto de la invención o el vehículo. Los niveles *in vivo* de apoptosis y muerte celular se determinan a partir de la detección de la caspasa escindida y los niveles totales de citoqueratina 18 en plasma utilizando los ensayos M30 Apoptosense® y M65 ELISA® (Peviva). Los métodos se describen a continuación con más detalle.
- 10
- 15 **Reactivos.** Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes: proteasoma 20S (E-360), proteasoma 26S (E-365), proteasoma 19S (E-366), Suc-LLVY-AMC (S-280), Z-LLE-AMC (S-230), Boc-LRR-AMC (S-300), Ubiquitina-AMC (U-550), Tetra-ubiquitina K63 (UC-310), Tetra-ubiquitina K48 (UC-210), conjunto de enzimas desconjugantes (KE10), vinil sulfona de HA-ubiquitina (U-212) (Boston Biochem); anti- β -actina (AC-15), ODC-1 (HPA001536) (Sigma Aldrich); anti-LC-3 (2775), anti-GAPDH (2118), MAPK anti-p44/42 (4695), MAPK anti-Fosfo-p44/42 (9101) (Cell Signaling); N-étilmaleimida (34115) (EMD Chemicals); anti-ubiquitina K48 (Apu2), anti-ubiquitina (MAB1510) (Millipore); anti-p53 (DO1), anti-UCHL5 (H-110), Hdm2 (SMP14) (Santa Cruz); anti-PARP (C2-10), anti-p27 (G173-524), anti-Caspasa 3 activa (C92-605) (BD Biosciences); anti-USP14 (A300-919A) (Bethyl Laboratories); anti-HA (12CA5) (Roche). Bortezomib se obtuvo del Departamento de Oncología del Hospital Karolinska, Suecia.
- 20
- 25 **Cultivo celular.** Las células de CMF7 se mantienen en MEM/suero de ternera fetal al 10%. Las células HCT-116 p53 +/+, p53 -/-, Bcl-2 +/+, PUMA -/- y BAX -/- se mantienen en medio modificado 5A de McCoy/suero de ternera fetal al 10%. Las HCT-116 p53 +/+, p53 -/-, PUMA -/- y BAX -/- se generan como se describió (25). La línea celular HCT-116 Bcl-2 +/+ se generó transfecando células HCT-116 p53 +/+ parentales con pCEP4 Bcl-2 (plásmido 16461 de Addgene) (26) y aislando clones de alta expresión. Las células FaDu y LLC3 se mantienen en medio DMEM alto en glucosa complementado con suero de ternera fetal al 10%, piruvato de Na, Hepes y aminoácidos no esenciales. Las células de carcinoma 4T1.12B se mantienen en medio RPMI suplementado con un 10% de suero de ternera fetal. La línea celular informadora de proteasoma MeJuSo Ub-YFP se generó como se describe (12). Todas las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco/suero de ternera fetal al 10%. La línea celular epitelial de la retina se generó como se describe (12). Todas las células se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco/suero de ternera fetal al 10%. La línea celular epitelial de la retina se generó como se describe (28). Todas las células se mantienen a 37°C en CO₂ al 5%.
- 30
- 35 **Ensayos de proteasoma y de inhibición de DUB.** Los ensayos *in vitro* de actividad de proteasoma usando CP 20S (2 nM) (Boston Biochem) se realizan a 37°C en 100 μ L de regulador de reacción (Hepes 25 mM, EDTA 0,5 mM, SDS al 0,03%). Las muestras se incuban durante 10 minutos con el compuesto indicado seguido de la adición de Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC o Boc-LRR-AMC 10 μ M para la detección de actividad similar a la quimotripsina, similar a la caspasa y similar a la tripsina respectivamente. Para los ensayos de inhibición de DUB se incuban RP 19S (5 nM), 26S (5 nM), UCH-L1 (5 nM), UCH-L3 (0,3 nM), USP2CD (5 nM), USP7CD (5 nM), USP8CD (5 nM) y BAP1 (5 nM) con el compuesto de la invención seguido de la adición de ubiquitina-AMC (1000 nM). La fluorescencia se monitorea utilizando el contador Wallac Multilabel o Tecan Infinite M1000 equipado con filtros de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm.
- 40
- 45 **Ensayos de superposición de sustrato.** La electroforesis en gel nativo se realiza como se describe (29). En resumen, 4 μ g de proteasoma 26S purificado (Boston Biochem) se mezclan con 10 o 50 μ M del compuesto de la invención y se incuban a 37°C durante 10 min. Las muestras se resuelven en PAGE no desnaturizante al 4%. Los geles se sumergen en regulador de ensayo (Tris-HCL 20 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 1 mM, Suc-LLVY-AMC 1 mM) y los proteasomas se visualizan bajo iluminación UV.
- 50
- 55 **Ensayo de escisión de ubiquitina.** El plásmido recombinante Ub-GFP pet19b Ub-M-GFP se genera como se describe (30). En resumen, Ub-GFP recombinante se purifica a partir de células de *E. coli* BL21 mediante purificación por afinidad. Para ensayos de escisión, se incuban RP 19S (25 nM) con NEM 10 mM, TPEN 250 μ M o 50 μ M del compuesto de la invención durante 10 minutos, seguido de la adición de Ub-GFP recombinante (200 nM). Las reacciones de desmontaje de la cadena de ubiquitina se realizan esencialmente como anteriormente, excepto que los tetrámeros de ubiquitina unidos a K48 o K63 (50 ng) se sustituyen por Ub-GFP. El nivel de escisión de Ub-GFP o el desensamblaje de ubiquitina se determina mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-ubiquitina. El sustrato Hdm2 ubiquitinado se genera de acuerdo con el protocolo Boston Biochem (K-200). Para el ensayo de escisión, se incuban RP 19S (25 nM) con 50 μ M del compuesto de la invención o DMSO durante 10 minutos, seguido de la adición de sustrato Hdm2 ubiquitinado (100 nM). La escisión del sustrato Hdm2 ubiquitinado y Hdm2 ubiquitinado se determina mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-Hdm2.
- 60
- 65

Aislamiento del proteasoma: las células HCT-116 se tratan con bortezomib (100 nM) o el compuesto de la invención (1 μ M) durante 3 horas. Después de la estimulación, las células se lisan en HEPES 50 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM y digitonina al 0,025%. Las muestras se sonicen brevemente y se incuban durante 15 minutos en hielo. Los proteasomas de estas muestras se aíslan de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Marcación con UbVS de las DUB. Para el etiquetado de las DUB en lisados celulares, las células subconfluentes se recolectan mediante tripsinización, se lavan tres veces con PBS y se centrifugan a 1500 RPM durante 5 min. Los sedimentos celulares se lisan con regulador (HEPES 50 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM) en hielo durante 15 min. Los residuos se eliminan por centrifugación y se marcan 25 μ g de proteína con HA-UbVS 1 μ M durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se resuelven mediante SDS-PAGE y se analizan mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados.

Determinación de la apoptosis y viabilidad celular. Para la determinación de la apoptosis, se tratan las células HCT-116 p53 +/- parentales con las dosis crecientes del compuesto de la invención durante 24 h. Las dosis de tratamiento se basan en la concentración del fármaco que dio lugar a la apoptosis máxima durante un período de 24 h. Las células HCT-116 se siembran en placas de microtitulación de 96 pozos a razón de 10.000 células por pozo y se incuban durante la noche. Las células se tratan con el fármaco indicado durante 24 h. Al final del período de incubación, se agrega NP40 al medio de cultivo tisular al 0,1% y se analizan 25 μ L del contenido de cada pozo utilizando el ELISA M30-Apoptosense® como se describió anteriormente (31). La viabilidad celular se determina midiendo la actividad de la fosfatasa ácida o utilizando el método FMCA (32). Para la actividad de la fosfatasa ácida, las células se siembran a razón de 5.000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se incuban durante 12 horas a 37°C. Los compuestos se agregan a las células en medios de cultivo y se incuban durante 72 horas a 37°C. Las células se lavan con 200 μ L de PBS caliente. Se añaden 100 μ L de fosfato de para-nitrofenilo (pNPP, 2 mg/mL) en regulador de acetato de Na pH 5 (NaAc 0,1 M, Triton-X-100 al 0,1%) por pozo. Las células se incuban durante 2 h, después de lo cual se detiene la reacción mediante la adición de NaOH 1 N. La absorbancia se mide a 405 nm. La citotoxicidad dependiente de la dosis de varias realizaciones del compuesto de la invención se ilustra en las Figs. 1a-1o.

Para el ensayo de FMCA, las células se siembran en las placas de 384 pozos preparadas con el fármaco utilizando el robot de pipeteo Precision 2000 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT). Las placas se incuban durante 72 horas y luego se transfieren a un Sistema HTS SAIGAN Core integrado que consiste en un robot ORCA (Beckman Coulter) con una incubadora de CO₂ (Cytomat 2C, Kendro, Sollentuna, Suecia), módulo dispensador (Multidrop 384, Titertek, Huntsville, AL), módulo de lavado (ELx 405, Bio-Tek Instruments Inc), estación de destapado, alojamiento de placas, lector de código de barras (Beckman Coulter), manipulador de líquidos (Biomek 2000, Beckman Coulter) y lector multiusos (FLUOstar Optima, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Alemania) para FMCA automatizada. El índice de supervivencia (SI) se define como la fluorescencia de los pozos de prueba en porcentaje de controles con valores restados del blanco.

Análisis del ciclo celular. Para la determinación del ciclo celular, las células HCT-116 se tratan con el compuesto de la invención o las células DMSO se recogen mediante tripsinización, se lavan y se fijan en EtOH al 70% enfriado en hielo durante 12 h. Las células se resuspenden en una solución de tinción que contiene yoduro de propidio (50 μ g/mL) y RNasa A (0,5 μ g/mL) en PBS. Las muestras se procesan en BD FACScalibur. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determina utilizando el software ModFit.

Ejemplo 1. Ejemplos de síntesis de realizaciones preferidas del compuesto de la invención

Información general. Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC o mejor. Cuando se requirieron condiciones anhidras, se agregó un exceso de tamices moleculares de 3 Å al disolvente por lo menos 24 h antes de su uso para asegurar la sequedad. La resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H se registró en un espectrómetro Bruker Advance DPX 400 a 400,1 MHz. Los espectros de masas de ionización por electroaspersión de baja resolución se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas Agilent en modo de ionización positiva. La cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice 60 de Merck (malla 230-400). Los datos analíticos de LCMS se obtuvieron con un espectrómetro de masas Agilent; Sistema Agilent 1100; A: columna C8 ACE (50 x 3,0 mm, 5 μ M); gradiente: 10-97% de acetonitrilo en agua/TFA al 0,1%, en 3 minutos a razón de 1,0 mL/min, o B: columna C18 xBridge (3,5 μ M, 50 x 3,0 mm), gradiente de 10% a 97% de acetonitrilo en 10 mM NH₄HCO₃ (pH 10) en 3 min, 1 mL/min). Los nombres de las estructuras químicas se determinaron utilizando Marvin Szech 5.2.6, ChemAxon.

(3E, 5E)-3,5-Bis(fenilmetiliden)azepan-4-ona (# 1516) y (3E, 5E)-3,5-bis(4-metoxifenilmetiliden)-azepan-4-ona (# 1517)

Se disolvió hexahidro-4H-azepin-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol), junto con cualquiera de benzaldehído (0,70 g, 7,0 mmol), 4-metoxibenzaldehído (0,90 g, 7,0 mmol) o 4-clorobenzaldehído (0,92 g, 7,0 mmol) en ácido acético (10 mL). Luego se agregó gota a gota ácido sulfúrico (1 mL, concentrado) y las reacciones se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Se agregó agua (30 mL) y se filtró el precipitado y se secó al vacío durante la noche. No se realizó ninguna purificación adicional. El compuesto # 1516 se obtuvo con una pureza del 99% determinada por LCMS (Sistema A) MS ESI⁺ m/z 290 [M + H]⁺. El compuesto # 1517 también se obtuvo con una pureza del 99% determinada por LCMS

(Sistema A), MS ESI+ m/z 350 [M + H]⁺. El compuesto # 1518 se obtuvo con una pureza del 91%; LCMS (Sistema A). MS ESI+ m/z 358 [M]⁺, 360 [M + 2]⁺.

(3E, 5E)-3,5-bis(fenilmetiliden)-1-(prop-2-enoil)-azepan-4-ona (# 1520)

Se disolvieron (3E, 5E)-3,5-Bis(fenilmetiliden)azepan-4-ona (# 1516) (50,0 mg, 0,182 mmol) y ácido acrílico (14,4 mg, 0,20 mmol), HBTU (58,4 mg, 0,182 mmol), trietilamina (36,7 mg, 0,364 mmol) en DMF (2 mL) y se agitó durante una noche. Se agregaron acetato de etilo y salmuera y se extrajeron los productos. Las capas orgánicas combinadas se secaron y se evaporaron. El producto crudo se diluyó con metanol y se purificó por HPLC preparativa. El compuesto # 1520 se obtuvo con una pureza del 96%, MS-ESI⁺ m/z 344 [M + H]⁺.

Trifluoroacetato de (2R)-[(3E, 5E)-3,5-Bis(4-nitrofenilmetiliden)-4-oxo-1-(pirrolidin-2-il-carbonil)-azepan (# 1505)

Se disolvieron N-Boc-azepanona (100 mg, 0,47 mmol) y 4-nitrobenzaldehído (156 mg, 1,03 mmol) en ácido acético (10 mL). Luego se agregó gota a gota ácido sulfúrico (1 mL concentrado) y las reacciones se agitaron a temperatura ambiente durante tres días. Luego se agregaron más aldehído y ácido sulfúrico y la reacción se agitó otras 24 horas, se agregó más ácido dos veces con 24 horas de diferencia. La reacción se detuvo mediante la adición de agua y los compuestos intermedios crudos precipitados se separaron por filtración y se lavaron con agua. Después de secar el producto al vacío durante la noche, se pesaron 2 x 35 mg (0,09 mmol) del compuesto intermedio crudo en dos matraces y se disolvieron junto con succinato de monoetilo (14,8 mg, 0,10 mmol) en DCM/DMF (2 mL, 4:1). Se agregó trietilamina (19,3 µL, 0,14 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos antes de la adición de HATU (38,6 mg, 0,10 mmol). Después de continuar la agitación durante 12 horas, se agregó más trietilamina y HATU y se continuó la agitación durante 4 horas. Los disolventes se evaporaron y el residuo se purificó por HPLC preparativa. El residuo se disolvió en diclorometano/ácido trifluoroacético (5 mL, 4:1), se agitó durante 40 minutos y se concentró nuevamente. El compuesto # 1505 se obtuvo con una pureza del 93% mediante LCMS (Sistema A). MS ESI⁺ m/z 477 [M + H]⁺.

Ejemplo 2. Otros ejemplos de síntesis de realizaciones preferidas del compuesto de la invención

Trifluoroacetato de (2R)-2-[(3E, 5E)-3,5-bis[(4-nitrofenil)metiliden]-4-oxoazepan-1-carbonil pirrolidinio (compuesto # 1505). Se disolvieron N-Boc azepan-4-ona (0,10 g, 0,47 mmol) y 4-nitrobenzaldehído (156 mg, 1,0 mmol) en ácido acético (10 mL), se agregó gota a gota H₂SO₄ concentrado (1 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. Se agregaron más aldehído (156 mg) y H₂SO₄ (1 mL) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó otro mL de H₂SO₄ concentrado y la reacción se agitó durante la noche nuevamente. Se agregó H₂SO₄ concentrado una vez más y la reacción se agitó hasta completar (durante dos semanas). Tras la adición de agua, se formó un precipitado marrón, se separó por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para obtener 339,5 mg de un compuesto intermedio 1 sólido marrón, que se usó sin purificación adicional. El compuesto intermedio 1 (35 mg, 0,09 mmol) y N-Boc prolina (22 mg, 0,10 mmol) se disolvieron en DCM/DMF (4:1, 2 mL). Se agregó TEA (19 µL, 0,14 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se agregó HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó más TEA (19 µL, 0,14 mmol) y HATU (38,6 mg, 0,10 mmol), y la reacción se agitó durante otras 4 h. La mezcla de reacción se concentró y luego se purificó por LC preparativa (40-70% de ACN en TFA al 0,1%) para obtener el producto como un sólido amarillo. El sólido se disolvió en DCM/TFA (4:1, 5 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos para eliminar el grupo protector BOC. La sal de TFA del producto se recuperó como un sólido amarillo de 93% de pureza. LCMS A: Rt 1,94/1,99, m/z [M + H]⁺ 477,1, B: Rt 2,28.

Trifluoroacetato de (3E, 5E)-1-(4-etoxi-4-oxobutanoil)-3,5-bis[(4-nitrofenil)metiliden]-4-oxoazepan-1-ol (compuesto # 1507). El compuesto intermedio 1 (35 mg, 0,09 mmol) y N-Boc prolina (22 mg, 0,10 mmol) se disolvieron en DCM/DMF (4:1, 2 mL). Se agregó TEA (19 µL, 0,14 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se agregó HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron más TEA (19 µL, 0,14 mmol) y HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) y la reacción se agitó durante otras 4 h. La mezcla de reacción se concentró y luego se purificó por LC preparativa (40-70% de ACN en TFA al 0,1%) para obtener la sal de TFA del producto como un sólido amarillo de 95% de pureza. LCMS A: Rt 2,48/2,50 m/z [M + H]⁺ 508,1. B: Rt 2,48/2,52.

[3E, 5E)-3,5-bis[(4-clorofenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1518). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol) y 4-clorobenzaldehído (0,92 g, 6,6 mmol) en ácido acético (10 mL), se agregó gota a gota H₂SO₄ concentrado (1 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Después de la adición de agua (30 mL), se formó un precipitado, se separó por filtración y se secó al vacío para obtener el producto con una pureza del 91% como un sólido amarillo. LCMS A: Rt 2,04 m/z [M]⁺ 358,1.

(3E, 5E)-3,5-bis(fenilmetiliden)-1-(prop-2-enoil)azepan-4-ona (compuesto # 1520). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (50 mg, 0,182 mmol), ácido acrílico (14 µL, 0,20 mmol), TBTU (58 mg, 0,182 mmol) y TEA (37 mg, 0,364 mmol) en DMF (2 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron salmuera y acetato de etilo y se separaron las fases. La fase orgánica se secó y los disolventes se evaporaron después de la filtración. El producto crudo se disolvió en ácido acético (2 mL) y H₂SO₄ (0,2 mL). Se agregó benzaldehído (50 µL) y la reacción se agitó durante 24 horas. Se agregaron metanol y agua a la mezcla, que se purificó mediante LC preparativa. El compuesto del título se aisló con una pureza del 96% como un sólido amarillo. LCMS A: Rt 2,68 m/z [M + H]⁺ 344,1.

- 5 (3E, 5E)-3,5-bis(fenilmetiliden)-1-ciclobutancarboxilazepan-4-ona (compuesto # 1521). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (50 mg, 0,182 mmol), ácido ciclobutírico (14 μ L, 0,20 mmol), TBTU (58 mg, 0,182 mmol) y TEA (37 mg, 0,364 mmol) en DMF (2 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron salmuera y acetato de etilo y se separaron las fases. La fase orgánica se secó y los disolventes se evaporaron después de la filtración. El producto crudo se disolvió en ácido acético (2 mL) y H₂SO₄ (0,2 mL). Se agregó benzaldehído (50 μ L) y la reacción se agitó durante 24 h. Se agregaron metanol y agua a la mezcla, que se purificó mediante LC preparativa. El compuesto del título se aisló con una pureza del 96% como un sólido amarillo. LCMS A: Rt 2,68 m/z [M + H]⁺ 372,1.
- 10 [3E, 5E)-1-(2-ciclopropilacetil)-3,5-bis[(4-metoxifenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1526). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol) y el 4-metoxibenzaldehído (0,90 g, 6,6 mmol) en ácido acético (10 mL), se agregó gota a gota H₂SO₄ concentrado (1 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se agregó agua (30 mL). El precipitado se separó por filtración y se secó al vacío durante una noche. El material crudo (30 mg, 0,107 mmol), ácido ciclopropilacético (12 mg, 0,12 mmol), TBTU (41 mg, 0,13 mmol) y TEA (26 mg, 0,26 mmol) se disolvieron en DMF (2 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron metanol (1,5 mL) y agua (0,5 mL) y el producto se purificó por LC preparativa para obtener el producto sólido con una pureza del 95%. LCMS A: Rt 2,51 m/z [M + H]⁺ 432,2.
- 15
- 20 (3E, 5E)-5-[(3-nitrofenil)metiliden]-3-(fenilmetiliden)azepan-4-ona (compuesto # 1560). Se disolvieron N-Boc-azepan-4-ona (0,10 g, 0,47 mmol) y 3-nitrobenzaldehído (156 mg, 1,0 mmol) en ácido acético (5 mL), se agregó H₂SO₄ concentrado (0,5 mL) gota a gota y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. Luego se agregaron más H₂SO₄ concentrado (0,5 mL) y aldehído (156 mg, 1,0 mmol) y se continuó agitando a temperatura ambiente durante tres semanas. Se obtuvo una mezcla de los productos de mono y di-condensación. La mezcla se purificó por cromatografía en columna (DCM/metanol) para obtener el compuesto intermedio de amina, el compuesto intermedio 2 como un aceite marrón (19 mg). El compuesto intermedio 2 se disolvió en ácido acético (1,5 mL) junto con benzaldehído. Se agregó H₂SO₄ concentrado (0,05 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego se agregó más H₂SO₄ y se continuó la agitación durante una semana. Se agregó más aldehído (156 mg, 1,0 mmol) y H₂SO₄ y se continuó la agitación durante 4 días adicionales. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por LC preparativa para obtener la sal de TFA del producto como un sólido amarillo con una pureza del 98%. LCMS Sistema A: Rt 1,78 m/z [M + H]⁺ 335,1, Sistema B: Rt 2,43/2,28.
- 25
- 30 (3E, 5E)-1-metil-3,5-bis[(4-nitrofenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1563). Se disolvieron N-metilazepan-4-ona · HCl (50 mg, 0,30 mmol) y 4-nitrobenzaldehído en ácido acético (5 mL) y se agitó durante 10 minutos, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (50 μ L) lentamente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó más H₂SO₄ concentrado (100 μ L) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 6 h. Se agregaron 500 μ L adicionales de H₂SO₄ concentrado y la reacción se agitó durante la noche. Se agregaron otros 350 μ L de H₂SO₄ concentrado y se continuó la agitación durante 5 h adicionales, período durante el cual se agregó H₂SO₄ adicional en dos porciones (500 μ L y 250 μ L). Luego se agregó agua (3 x volumen de reacción) y la mezcla se agitó hasta que se alcanzó la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x volumen de reacción).
- 35
- 40 Las fases se separaron y la fase orgánica se concentró para obtener un aceite viscoso amarillo oscuro. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa, (columna XBridge; eluyentes, regulador de carbonato de amonio 50 mM a pH 10 y metanol) obteniéndose el producto del título como un sólido amarillo (26,3 mg). LCMS Sistema A: Rt 1,87 m/z [M + H]⁺ 394,1, Sistema B: Rt 2,57.
- 45 (3E, 5E)-3,5-bis[(4-fluorofenil)metiliden]-1-propilazepan-4-ona (compuesto # 1574). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) y 4-fluorobenzaldehído (0,416 g, 3,36 mmol) en ácido acético (20 mL) y la solución se agitó durante 10 min, luego se agregó lentamente H₂SO₄ concentrado (200 μ L) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó más H₂SO₄ concentrado (1 mL) y se continuó la agitación a temperatura ambiente. Se agregó otro mL de H₂SO₄ concentrado después de 6 h, y la reacción se agitó nuevamente durante la noche. Al día siguiente se agregaron 800 μ L adicionales de H₂SO₄ concentrado y se continuó agitando durante un período de cinco días, durante los cuales se agregaron dos porciones de H₂SO₄ (1 mL y 0,5 mL) a la mezcla de reacción. Luego se agregó agua (3 x volumen de reacción) y la mezcla se agitó hasta alcanzar la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (10 x volumen de reacción). La fase orgánica se concentró por evaporación. Se agregó agua al residuo. Se formó un precipitado y se separó por filtración. El sólido se lavó con agua y se secó al vacío para obtener el compuesto intermedio 3 como un sólido amarillo. Una porción (15 mg, 0,05 mmol) del mismo se disolvió en DCE-Propanal (4 μ L, 0,06 mmol), se agregó y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron NaBH(OAc)₃ (15,7 mg, 0,07 mmol) y ácido acético (2,6 μ L, 0,05 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se concentró y el producto crudo se purificó por LC preparativa obteniendo el producto (7,2 mg) con una pureza del 90%. LCMS Sistema A: Rt 2,02 m/z [M + H]⁺ 368,1, Sistema B: Rt 3,21.
- 50
- 55
- 60 [3E, 5E)-3-[(4-metoxifenil)metiliden]-5-[(4-nitrofenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1575). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) y 4-nitrobenzaldehído (253 mg, 1,68 mmol) en ácido acético (20 mL) y se agitaron durante 10 minutos, luego se concentraron. Se agregó lentamente H₂SO₄ concentrado (1 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 días. En los días 1-3 se agregó una porción de H₂SO₄ concentrado por día (0,5 mL, 0,75 mL y 0,5 mL). Se agregó agua (2 x volumen de reacción) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2
- 65

x volumen de reacción). La fase orgánica se concentró por evaporación y se secó para producir el compuesto intermedio 4 crudo. Una porción del compuesto intermedio 4 (100 mg, 0,41 mmol) se disolvió en ácido acético (6 mL) y se agitó durante 10 minutos, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (0,6 mL) lentamente y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la adición de agua, el producto precipitó como un sólido amarillo. El precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para obtener el compuesto del título en forma de un sólido amarillo con una pureza del 98%. LCMS Sistema A: Rt 1,82 m/z [M + H]⁺ 365,1, Sistema B: Rt 2,41. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) [ppm] = 2,97-2,99 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H), 3,83 (bs, 3H), 4,28 (s, 2H), 7,06-7,08 (d, 2H), 7,47 (s, 1H), 7,59-7,62 (d, 2H), 7,76 (s, 1H), 7,78-7,80 (d, 2H), 8,27-8,29 (d, 2H).

(3E, 5E)-5-[(4-fluorofenil)metiliden]-3-[(4-metoxifenil)metiliden]-1-metilazepan-4-ona (compuesto # 1577). Se disolvieron clorhidrato de N-metilazepan-4-ona (75 mg, 0,46 mmol) y 4-fluorobenzaldehído en ácido acético (7 mL) y se agitaron durante 10 minutos, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (350 µL) lentamente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 días. Se agregó más H₂SO₄ concentrado durante los días 2-4 (0,175 mL, 0,35 mL, 0,25 mL respectivamente). Se agregó agua y la solución se extrajo con acetato de etilo (dos veces el volumen de la mezcla de reacción). La fase orgánica se concentró para obtener el compuesto intermedio 5. Una porción de este compuesto intermedio (35 mg, 0,15 mmol) y 4-metoxibenzaldehído (17 µL, 0,15 mmol) se disolvieron en ácido acético (2,5 mL) y se agitó durante 10 minutos, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (0,20 mL) lentamente y la reacción se agitó durante cinco días. Se agregó agua (2 x volumen de reacción) y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (2 x volumen de reacción). La capa orgánica se concentró y se agregó agua. Se formó un precipitado y se filtró para obtener el producto del título (11,2 mg) con una pureza del 91% como un sólido amarillo. LCMS Sistema A: Rt 1,86 m/z [M + H]⁺ 352,1, Sistema B: Rt 2,79.

(3E, 5E)-1-acetil-5-[(4-fluorofenil)metiliden]-3-[(4-etoxifenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1579). Se disolvieron clorhidrato de azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) y 4-fluorobenzaldehído (179 µL, 1,68 mmol) en ácido acético (20 mL) y se agitaron durante 10 minutos, luego se agregó lentamente H₂SO₄ concentrado (1 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 días con la adición de H₂SO₄ concentrado durante los primeros tres días (0,5 mL, 0,75 mL y 0,5 mL respectivamente). Se agregó agua (2 x volumen de reacción) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x volumen de mezcla). La fase orgánica se concentró y se secó para obtener el compuesto intermedio 6 crudo. Una porción de este compuesto intermedio (100 mg, 0,46 mmol) se disolvió en ácido acético (6 mL) y se agitó durante 10 minutos, luego se agregó lentamente H₂SO₄ concentrado (0,6 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Se agregó agua (1 x volumen) y la mezcla se neutralizó con NaHCO₃ acuoso saturado. El precipitado formado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para producir el compuesto intermedio 7 (31,5 mg) en forma de un sólido amarillo con una pureza del 91%. LCMS Sistema A: Rt 1,85 m/z [M + H]⁺ 338. El compuesto intermedio 7 (10 mg) se disolvió en DCM (1 mL) y se agregó TEA (5,0 µL, 0,04 mmol). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego se agregó cloruro de acetilo (2,3 µL, 0,03 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se lavó con agua, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se concentró para obtener el compuesto del título (6,4 mg) en forma de un sólido amarillo con una pureza del 90%. LCMS Sistema A: Rt 2,35 m/z [M + H]⁺ 380,1, Sistema B: Rt 2,37. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): [ppm] = 1,70, 1,90, 1,98 y 1,99 (4 x s, 3H, CH₃CO-, señales de los dos regioisómeros y sus rotámeros de acetato), 2,89-3,01 (m, 2H), 3,68-3,77 (m, 2H), 3,79, 3,79, 3,79, 3,08 (4 x s, 3H, -OMe, señales de los dos regioisómeros y sus rotámeros de acetato), 4,65-4,68 (m, 2H), 7,0-7,04 y 7,098-7,103 (2 x m, 2H), 7,22-7,30 (m, 3H), 7,48-7,62 (m, 5H).

(3E, 5E)-5-[(4-clorofenil)metiliden]-3-[(4-nitrofenil)metiliden]azepan-4-ona (compuesto # 1583). Se disolvieron clorhidrato de N-metilazepan-4-ona (75 mg, 0,46 mmol) y 4-clorobenzaldehído (64 mg, 0,46 mmol) en ácido acético (7 mL) y se agitaron durante 10 min, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (350 µL) lentamente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 días. Se agregó más H₂SO₄ concentrado durante los días 2-4 (0,175 mL, 0,35 mL, 0,25 mL respectivamente). Se agregó agua (2 x volumen de reacción) y la solución se extrajo con acetato de etilo (2 x volumen de reacción). La fase orgánica se concentró para obtener el compuesto intermedio 8. Una porción del compuesto intermedio (35 mg, 0,14 mmol) y 4-nitrobenzaldehído (69,5 mg, 0,46 mmol) se disolvieron en ácido acético (2,5 mL) y se agitó durante 10 minutos, luego se agregó H₂SO₄ concentrado (200 µL) lentamente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se agregó más H₂SO₄ concentrado (0,2 mL) y la agitación continuó durante 5 días más. Se agregó agua (2 x volumen de reacción) y la solución se extrajo con acetato de etilo (2 x volumen de reacción). La fase orgánica se concentró y el residuo se purificó por LC preparativa para obtener el compuesto del título (1,8 mg) en forma de un sólido amarillo de 94% de pureza. LCMS Sistema A: Rt 1,98/2,04 m/z [M + H]⁺ 383,1, Sistema B: Rt 2,82/2,98.

Abreviaturas

Boc terc-butiloxycarbonilo

ACN acetonitrilo

DCM diclorometano

AGT ácido trifluoroacético

	DMF	dimetilformamida
	TEA	triethylamina
5	Rt	tiempo de retención
	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	rt	temperatura ambiente
10	LC	cromatografía líquida
	EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
15	HATU	hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio;
	DCE	1,2-dicloroetano

20 Ejemplo 3. Composición farmacéutica A (suspensión acuosa). El compuesto de la invención (25 mg) se disuelve en 1 mL de dimetilsulfóxido. La solución se agrega gota a gota a 10 mL de solución salina agitada vigorosamente. La suspensión formada, que se puede estabilizar agregando 1% en peso de PVP, se puede usar para administración intramuscular, intravenosa o subcutánea.

25 Ejemplo 4. Composición farmacéutica B (comprimido). Los comprimidos para administración oral se producen mezclando 2,0 g del compuesto de la invención (polvo, < 10 µm, 90%) con celulosa microcristalina (1,30 g), almidón de maíz (0,50 g), sílice (0,20 g), estearato de Mg (0,12 mg). La mezcla se comprime en seco en comprimidos de 400 mg, que están recubiertos con azúcar.

30 Ejemplo 5. Composición farmacéutica C (solución). El compuesto de la invención (10 mg) se disuelve en 0,5 mL de Cremophor EL (BASF Corp.) y se agrega etanol absoluto hasta 1,0 mL. La solución transparente se llena en viales de vidrio para inyección.

35 Ejemplo 6. Composición farmacéutica D (solución). Para la administración intraperitoneal en estudios con animales, se preparó una solución madre disolviendo el compuesto de la invención hasta una concentración de 2 mg/mL en Cremophor EL/polietilenglicol 400 en proporción 1:1 (v/v) a temperatura ambiente o calentando hasta aproximadamente 80°C asistida por ultrasonido. Una parte alícuota de la solución madre se diluyó 1:10 con solución salina al 0,9% y se usó inmediatamente para inyección IP.

40 Ejemplo 7. Composición farmacéutica E (solución). Para administración intraperitoneal, se preparó una solución madre de Kolliphor HS15 al 25% en peso al fundir todo un recipiente de Kolliphor HS15 (Sigma 42966) calentando a 60°C y diluyendo con agua desionizada hasta 25% p/p. Al compuesto # 1570 (18,0 mg) en un tubo de muestra de 10 mL, se le agregaron 10,0 mL de la solución madre y el tubo se agitó con agitación tipo vórtice, se trató con ultrasonido a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 2 h, y ocasionalmente se calentó a aproximadamente 83°C. La solución transparente obtenida se filtró de forma estéril a través de un filtro de jeringa de celulosa de 0,2 µm antes de la inyección. Por el mismo procedimiento se prepararon soluciones de los compuestos # 1546 y # 1571; sin embargo, estos compuestos no estaban completamente disueltos. Se pesó el residuo no disuelto y se dedujo el peso del peso inicial del compuesto (18 mg). Se encontró que las soluciones preparadas (10 mL) contenían 8,5 mg y 11,0 mg, respectivamente, de los compuestos # 1546 y # 1571.

50 Ejemplo 8. Composición farmacéutica F (solución). Para administración intraperitoneal, se preparó una solución madre de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Aldrich 332593) disolviendo la ciclodextrina en agua desionizada hasta una concentración de 30% p/p. Al compuesto # 1649 (15,0 mg) en un tubo de muestra de 10 mL, se le agregaron 10 mL de la solución madre. El tubo se agitó con agitación tipo vórtice, se trató con ultrasonidos a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 2 h, y ocasionalmente se calentó a aproximadamente 83°C. La solución obtenida se filtró de forma estéril a través de un filtro de jeringa de celulosa de 0,2 µm antes de la inyección. Se determinó el peso del compuesto # 1659 residual no disuelto y se usó para corregir la concentración de la solución filtrada hasta el 82,5% de la concentración pretendida. Por el mismo procedimiento, se preparó una solución del compuesto # 1546.

60 Ejemplo 9. El compuesto de la invención induce la inhibición del proteasoma. La línea celular informadora MeJuSo Ub-YFP, que está modificada para acumular proteína fluorescente amarilla (YFP) tras la inhibición del proteasoma (12), se usó para la evaluación del compuesto. La acumulación de YFP se midió durante 48 horas en un sistema IncuCyte-FLR (Essen Bioscience, Essen, Reino Unido), que es un microscopio de fluorescencia automatizado. Se usó el número de células positivas por campo como medida de la inhibición del proteasoma.

65 Ejemplo 10. Determinación de la solubilidad de los compuestos de la invención en medios acuosos. En los diagramas de las Figs.2a-2e, la solubilidad se expresa como Log S (mmol/mL; software ACD/Labs Inc.) La solubilidad se

determina en regulador acuoso a diversos valores de pH y predicho para agua pura a 25°C. El algoritmo utiliza un conjunto de > 6.800 compuestos como referencia. Los diagramas muestran que las azepanonas de la invención pueden tener una solubilidad sustancialmente mayor, tal como por un factor 2 o más, en medios acuosos a pH fisiológico, tal como a un pH de 6 a 8, en particular de 7,0 a 7,5, en comparación con las piperidin-4-onas correspondientemente sustituidas.

Ejemplo 11. Los azepanes/azepanonas de la invención exhiben una mayor citotoxicidad que las piperidinas/piperidin-4-onas estructuralmente correspondientes.

Las Figuras 3b, 3d, 3f son diagramas que ilustran la citotoxicidad de los compuestos de la invención nos. 1546, 1547 y 1570 con una fracción de anillo de 7 miembros en comparación con los compuestos estructuralmente correspondientes no comprendidos en la invención con una fracción de anillo de 6 miembros. Su inducción de citotoxicidad dependiente de la dosis se determinó después de 72 horas de exposición continua del compuesto a la línea celular informadora HCT-116. Las células tratadas se compararon con los controles no tratados. La citotoxicidad se visualiza como un índice de supervivencia (SI) en el intervalo de aproximadamente 90% de SI hasta aproximadamente 0% de SI en función de la concentración del compuesto. De las Figuras se desprende que los compuestos de la invención son más citotóxicos que los compuestos de referencia, ya que producen el mismo nivel de citotoxicidad a una concentración más baja.

Referencias

1. Masdehors, P et al., Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* 105, 752-757, doi:bjh1388 [pii] (1999).

2. DeMartino, G N et al., PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide binding protein family. *J Biol Chem* 269, 20878-20884, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063704 (1994).

3. Rechsteiner, M et al., The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol Chem* 268, 6065-6068, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8454582 (1993).

4. Adams, J & Kauffman, M, Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 22, 304-311, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15199612 (2004).

5. Erdal, H et al., Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 192-197, doi:0408592102 [pii]10.1073/pnas.0408592102 (2005).

6. Berndtsson, M et al., Induction of the lysosomal apoptosis pathway by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Cancer* 124, 1463-1469, doi:10.1002/ijc.24004 (2009).

7. Lamb, J et al., The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-1935, doi:313/5795/1929 [pii]10.1126/science.1132939 (2006).

8. Adams, J et al., Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 333-338, doi:S0960894X98000298 [pii] (1998).

9. Shibata, T et al., An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on proteasome. *Biochemistry* 42, 13960-13968, doi:10.1021/bi035215a (2003).

10. Yang, H et al., Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res* 66, 4758-4765, doi:66/9/4758 [pii]10.1158/0008-5472.CAN05-4529 (2006).

11. Yang, H et al., The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". *Mol Pharmacol* 71, 426-437, doi:mol.106.030015 [pii]10.1124/mol.106.030015 (2007).

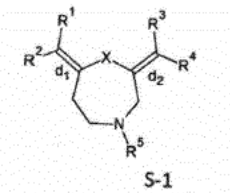
12. Menendez-Benito, V et al., Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 14, 2787-2799, doi:ddi312 [pii]10.1093/hmg/ddi312 (2005).

13. Mullally, J E & Fitzpatrick, F A, Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death. *Mol Pharmacol* 62, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12130688 (2002).

14. Guterman, A & Glickman, M H, Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 17291738, doi:10.1074/jbc.M307050200 [pii] (2004).
- 5 15. Hofmann, R M & Pickart, C M et al., Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-653, doi:S0092-8674(00)80575-9 [pii] (1999).
16. Vong, Q P et al., Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of surviving cells. *Science* 310, 1499-1504, doi:310/5753/1499 [pii]10.1126/science.1120160 (2005).
- 10 17. Borodovsky, A et al., A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J* 20, 5187-5196, doi:10.1093/emboj/20.18.5187 (2001).
- 15 18. Lam, Y A et al., Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes. *J Biol Chem* 272, 28438-28446, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353303 (1997).
19. Verma, R et al., Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615, doi:10.1126/science.10758981075898 [pii] (2002).
- 20 20. Yao, T & Cohen, R E, A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407, doi:10.1038/nature01071nature01071 [pii] (2002).
- 25 21. Kramer, G et al., Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* 64, 1751-1756 (2004) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14996736 (2004).
22. Olofsson, MH et al., Specific demonstration of drug-induced tumour cell apoptosis in human xenograft models using a plasma biomarker. *Cancer Biomarkers* 5, 117-125, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407366> (2009).
- 30 23. Reyes-Turcu, F E et al., Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363-397, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19489724 (2009).
- 35 24. Koulich, E et al., Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 19, 1072-1082, doi:E07-10-1040 [pii]10.1091/mbc.E07-10-1040 (2008).
25. Bunz, F. et al., Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501 (1998).
- 40 26. Pietenpol, J A et al., Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. *Cancer Res* 54, 3714-3717 (1994).
27. Bodnar, A G et al., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352 (1998).
- 45 28. Lamb, J et al., The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-1935, doi:313/5795/1929 [pii] 10.1126/science.1132939 (2006).
- 50 29. Elsasser, S et al., Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 398, 353-363, doi:S0076-6879(05)98029-4 [pii]10.1016/S0076-6879(05)98029-4 (2005).
30. Guterman, A & Glickman, M H, Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 1729-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200M307050200 [pii] (2004).
- 55 31. Hagg, M et al., A novel high-through-put assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 20, 253-259 (2002).
32. Lindhagen, E et al., The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc* 3, 1364-1369, doi:nprot.2008.114 [pii]10.1038/nprot.2008.114 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la estructura general S-1



5

en el que,

10 R^1 , R^2 en el doble enlace d_1 y R^3 , R^4 en el doble enlace d_2 pueden, independientemente entre sí, tener una configuración opuesta a la de la fórmula S-1,

X es CO o CS;

15

R^1 y R^3 son H;

R^2 y R^4 son, independientemente entre sí, H; alquilo C_{1-6} ; alquil C_{1-5} -CO; fenilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-3 de: alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , CN, -COO-alquilo C_{1-6} , COOH, NO_2 , F, Cl, CF_3 , NH_2 , NH-alquilo C_{1-6} , N(alquilo C_{1-6})₂, CONR⁷R⁸, con la condición de que uno o más de H en alquilo y alcoxi pueden estar sustituidos con flúor;

20

R^5 es cualquiera de H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} ; alcoxi C_{1-3} -alquil C_{2-6} -; alcoxi C_{1-3} -alqueno C_{2-6} -; aril- C_{0-6} -alquil-; heteroaril-alquil C_{0-6} -; heterociclilo-alquil C_{0-6} -; cicloalquil-alquil C_{0-6} -;

-alquil C_{1-6} -COO-alquilo C_{1-6} ; -alquil C_{2-6} -ariloxi; COR⁶;

25

R^6 se selecciona de: alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} ; alcoxi C_{1-6} ; alcoxi C_{1-3} -alquilo C_{1-6} -;

alcoxi C_{1-3} -alqueno C_{1-6} -; aril-alquilo C_{0-6} -; heteroaril-alquil C_{0-6} -; heterociclilo-alquil C_{0-6} -; cicloalquil-alquil C_{0-6} -; -alquil C_{1-6} -COO-alquilo C_{1-6} ; NH_2 ; -NH-alquilo C_{1-6} ; -N(alquilo C_{1-6})₂; -alquil C_{0-6} -ariloxi;

30

R^7 , R^8 son, independientemente entre sí, H o alquilo C_{1-3} .

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X = CO.

35

3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que R^2 y R^4 son fenilo sustituido en una o más de las posiciones 3, 4, 5.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^5 es COR⁶ y R^6 es alquilo C_{1-6} o alqueno C_{2-6} .

40

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R^6 es alqueno C_{2-6} .

6. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R^6 es alquilo C_{1-6} .

45

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 , R^2 en el enlace doble d^1 y R^3 , R^4 en el enlace doble d^2 tienen la configuración de la estructura S-1,

X es CO o CS;

50

R^1 y R^3 son, independientemente entre sí, H;

R^2 y R^4 son, independientemente entre sí, H; alquilo C_{1-6} ; alquilo C_{1-5} -CO; fenilo o heteroarilo de 6 miembros sustituido con 1-3 de: CN, NO_2 , F, Cl, NH_2 , NH-alquilo C_{1-6} , N(alquilo C_{1-6})₂; CO-alquilo C_{1-6} ;

55

R^5 es H, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alcoxi C_{1-3} -alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-3} -alqueno C_{1-6} , arilo, heteroarilo, heterociclilo, alquil C_{1-6} -heteroarilo, alquil C_{1-6} -heterociclilo, alquil C_{1-6} -cicloalquilo, alquilarilo C_{1-6} , CO-alquilo C_{1-6} , CO-vinilo, CO-alilo, CO-arilo, CO-cicloalquilo.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que X es CO.

60

9. El compuesto de la reivindicación 7 u 8, en el que R² y R⁴ son fenilo sustituido.
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que R⁵ se selecciona entre CO-alquilo C₁₋₆, CO-cicloalquilo, CO-vinilo, CO-alilo.
- 5 11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que R⁵ es CO-vinilo.
12. El compuesto de la reivindicación 10, en el que R⁵ es CO-alquilo C₁₋₆.
- 10 13. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en forma de un comprimido o cápsula u otra preparación de dosis única para administración oral.
- 15 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en forma de una solución o suspensión en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable para inyección o infusión.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, para infusión o inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea.
- 20 17. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, para uso como un medicamento.
- 25 18. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, para uso en el tratamiento del cáncer.
19. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el cáncer se selecciona de mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de páncreas.
- 30 20. El compuesto o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la dosis farmacológicamente eficaz es de 0,0001 g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, en particular de 0,001 g/kg a 0,01 g/kg de peso corporal, teniendo en cuenta si el agente se administra sistémicamente o localmente.
- 35

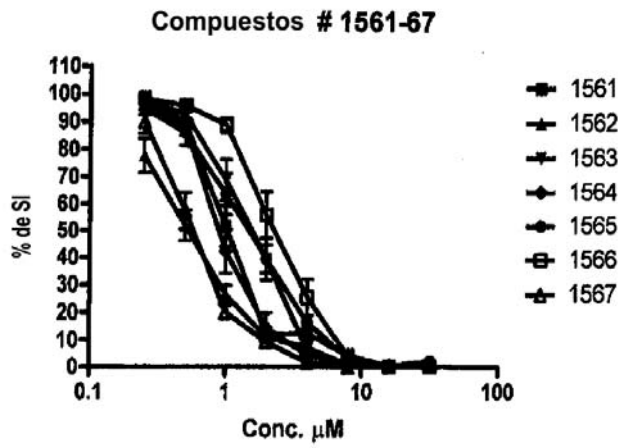


Fig. 1a

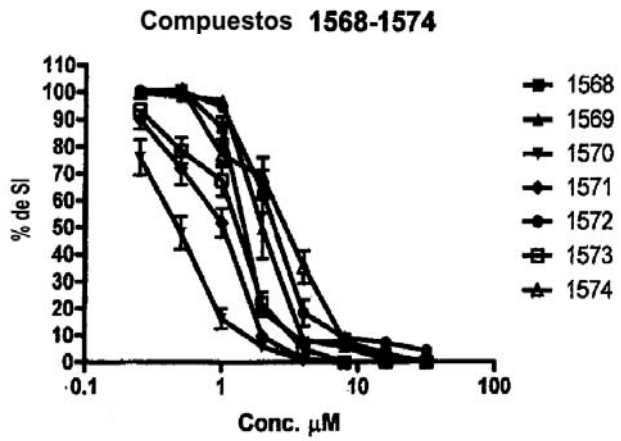


Fig. 1b

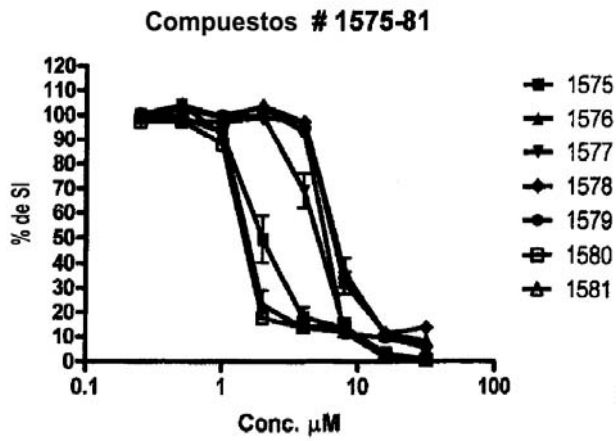


Fig. 1c

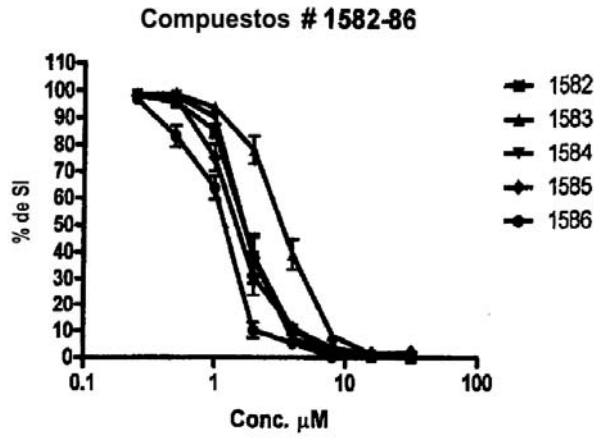


Fig. 1d

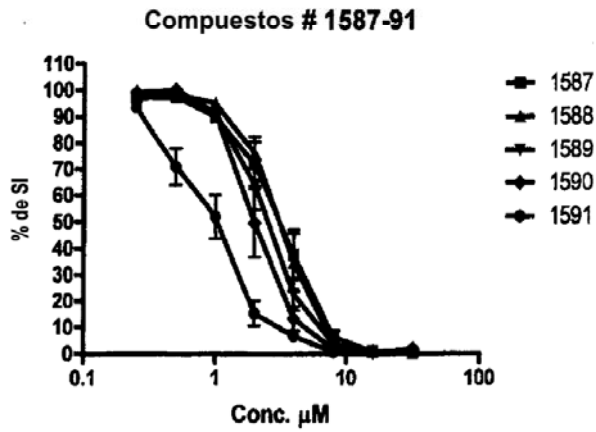


Fig. 1e

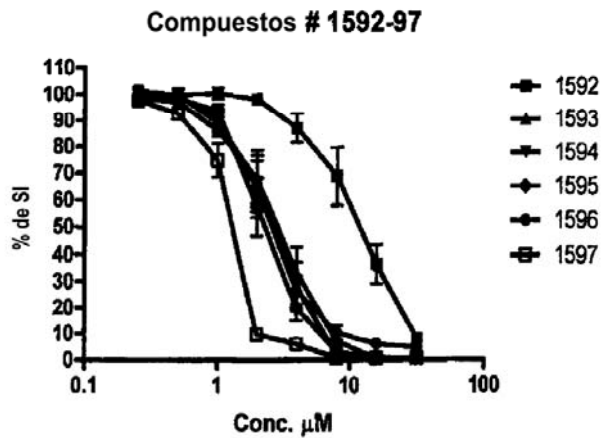


Fig. 1f

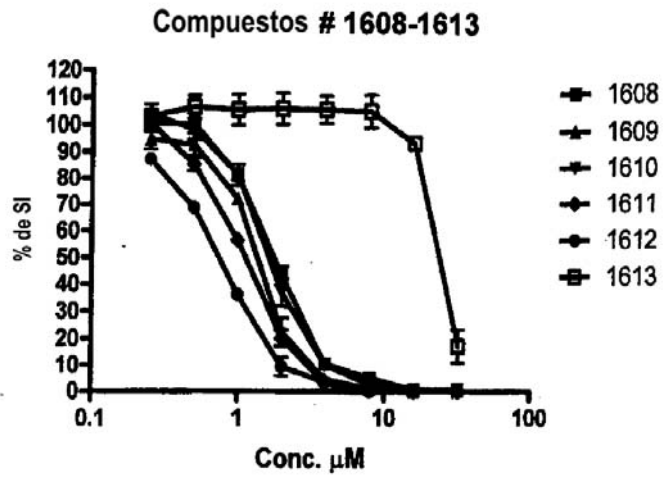


Fig. 1g

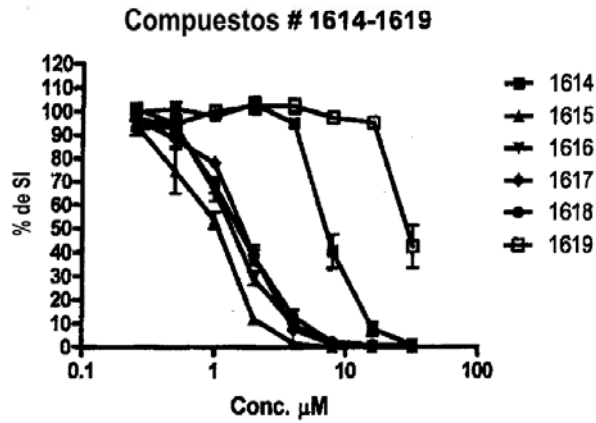


Fig. 1h

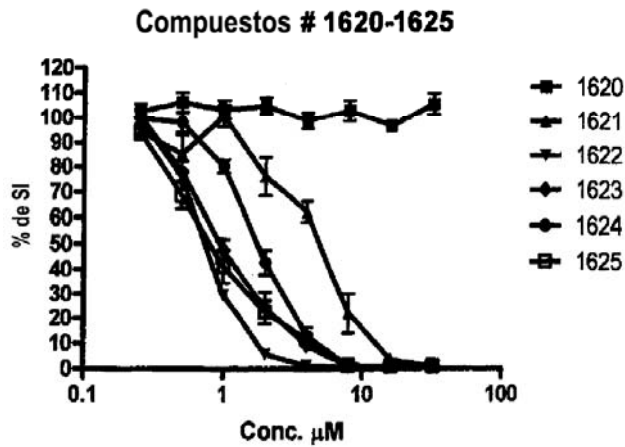


Fig. 1i

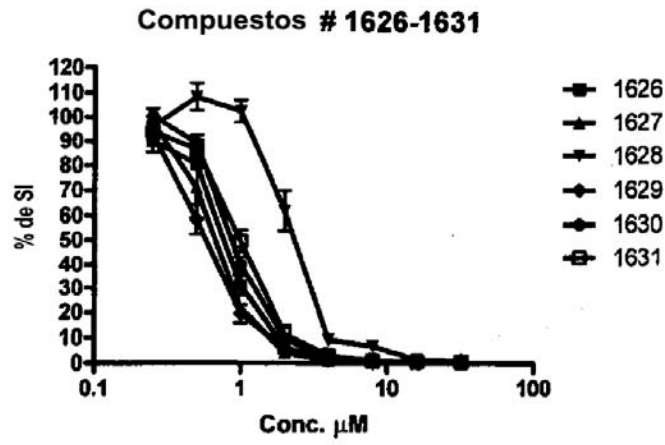


Fig. 1j

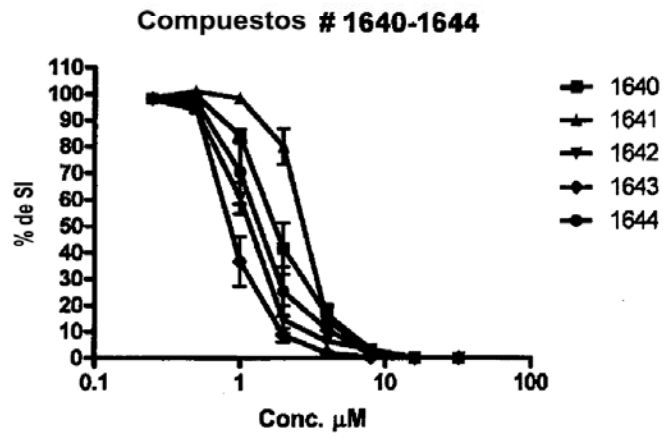


Fig. 1k

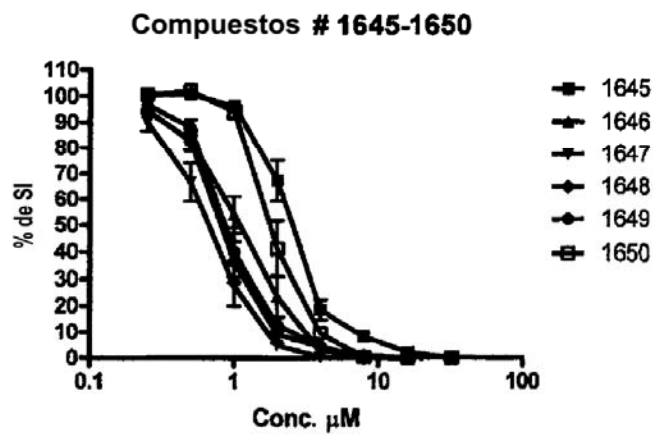


Fig. 1l

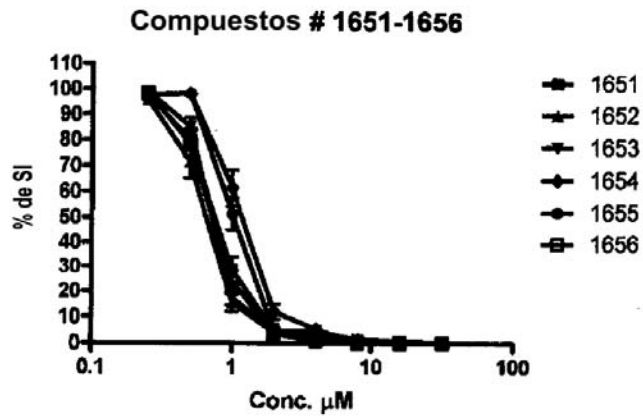


Fig. 1m

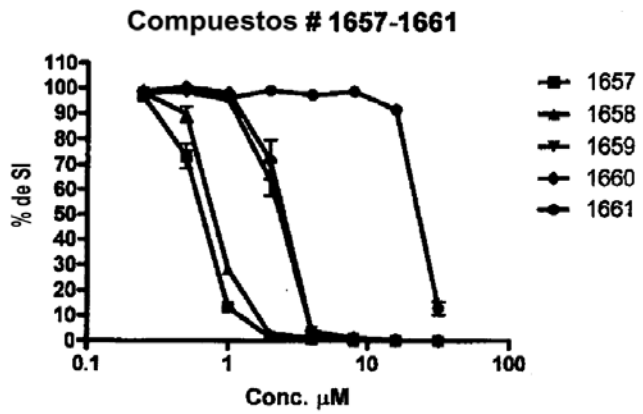


Fig. 1n

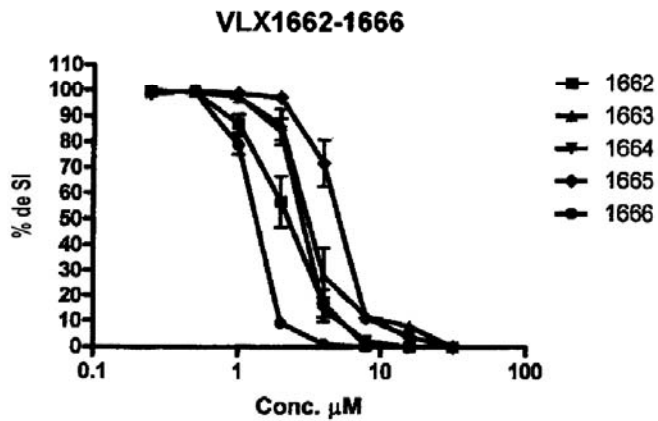


Fig. 1o

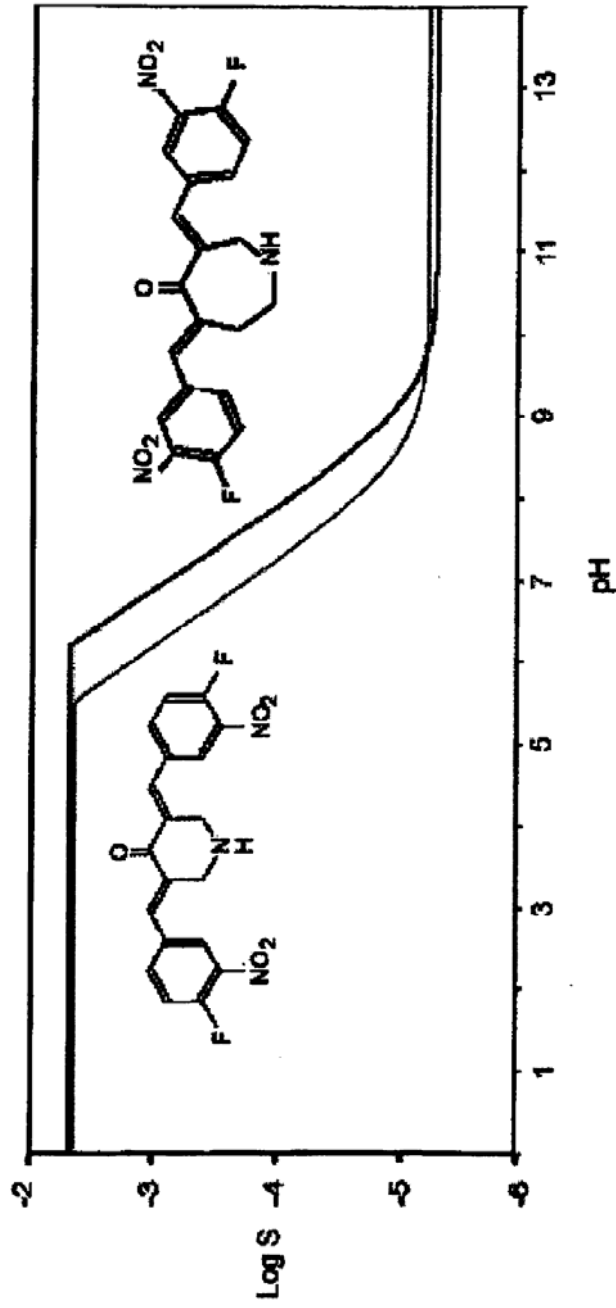


Fig. 2a

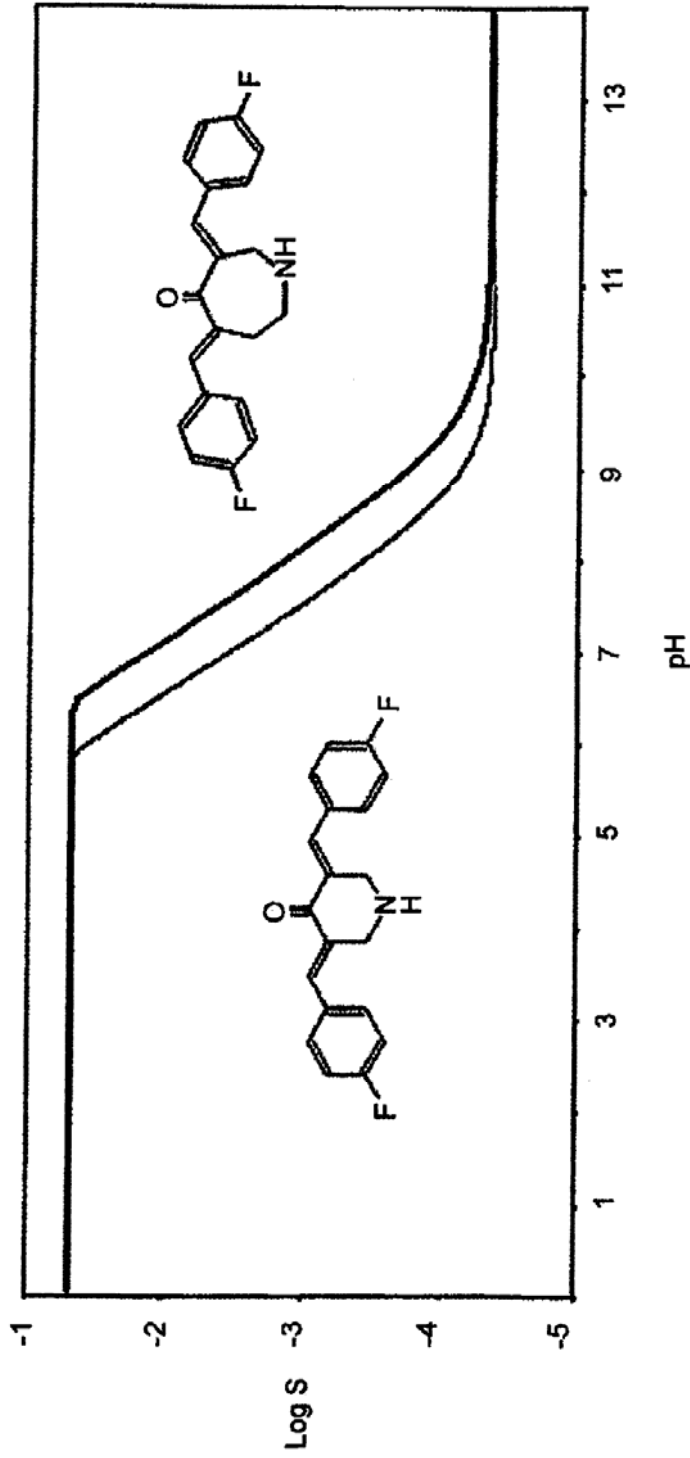


Fig. 2b

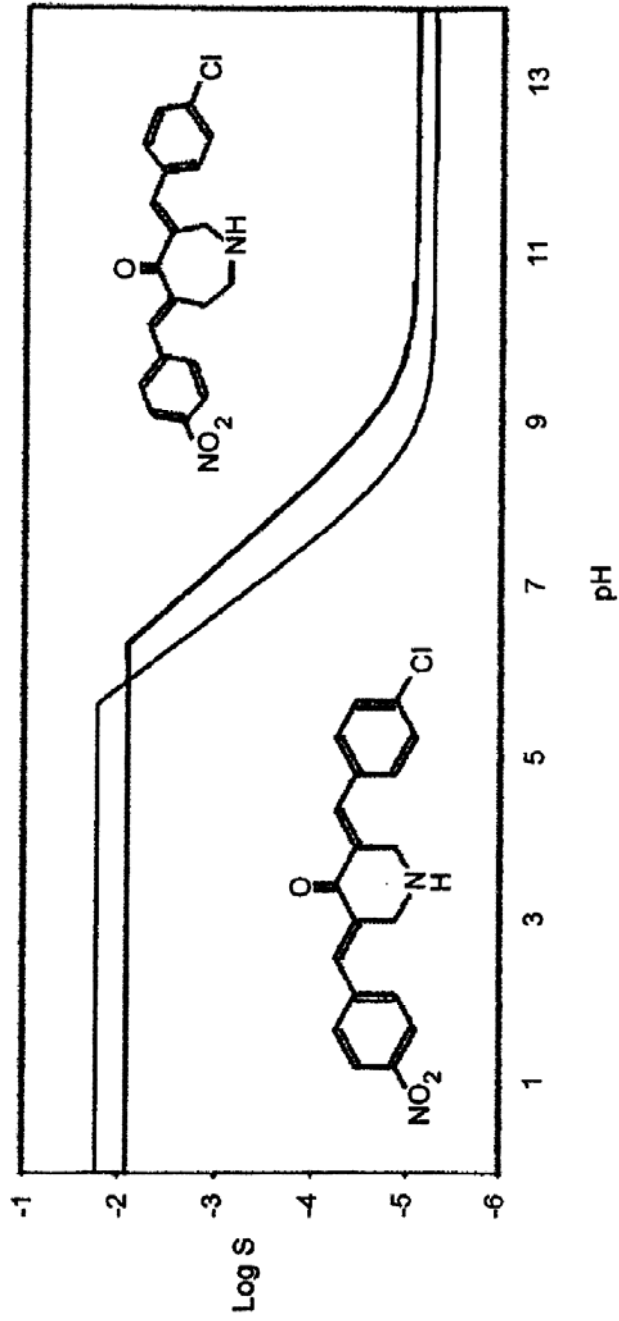


Fig. 2c

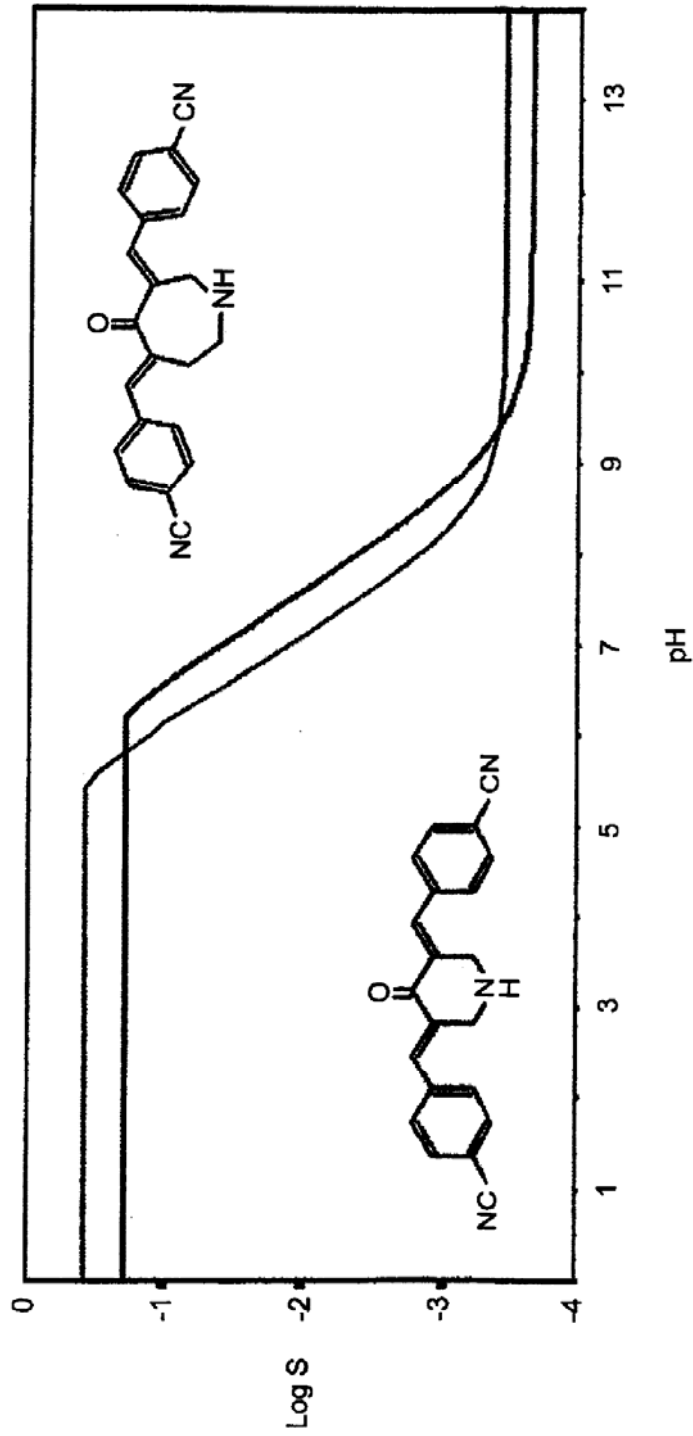


Fig. 2d

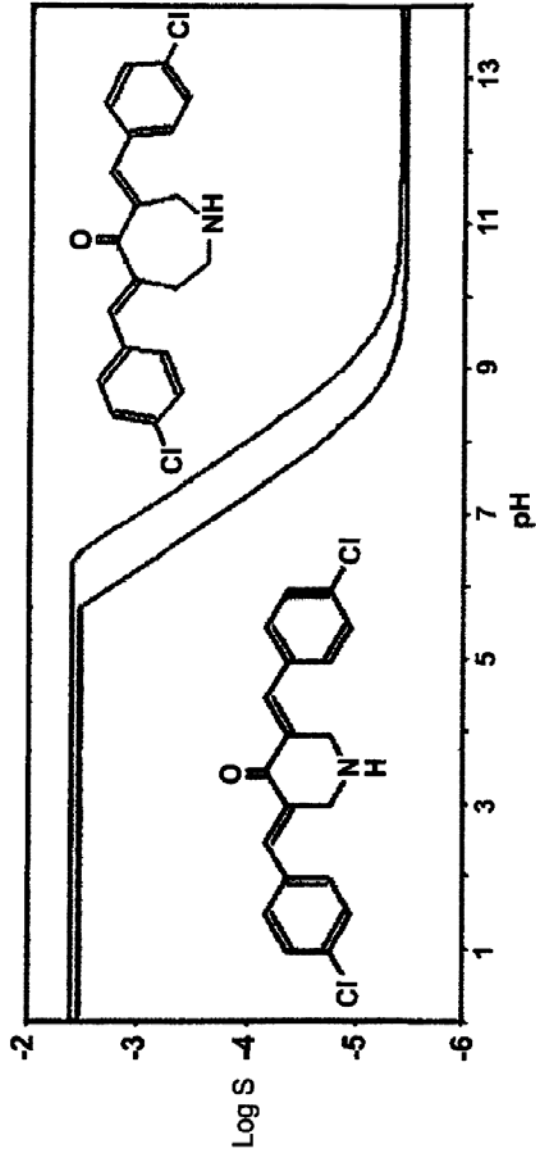


Fig. 2e

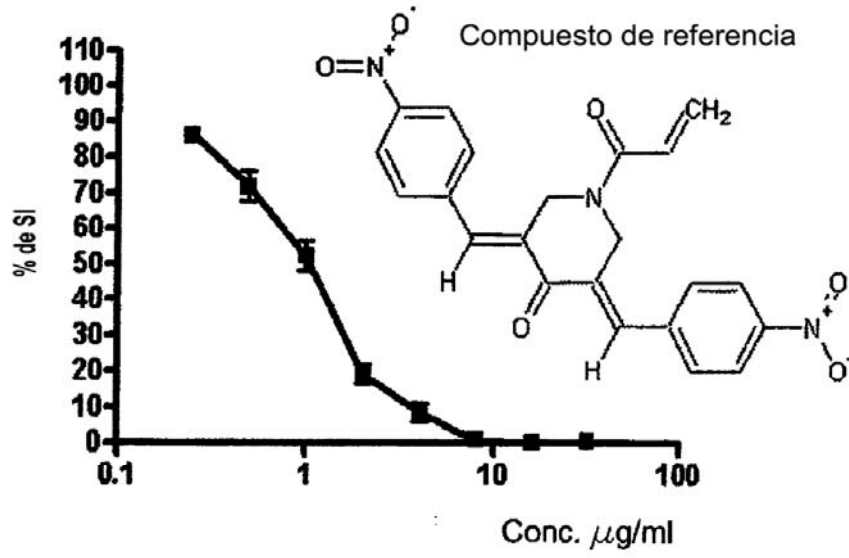


Fig. 3a

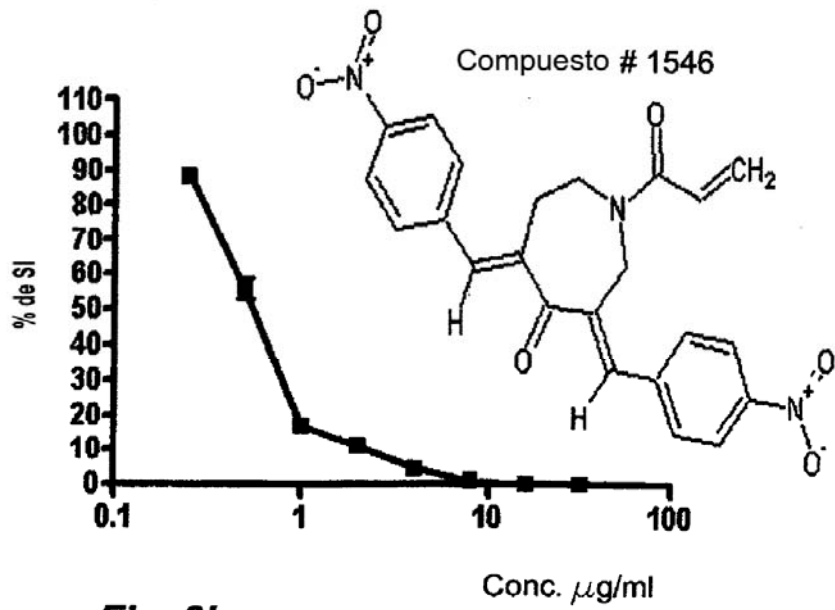


Fig. 3b

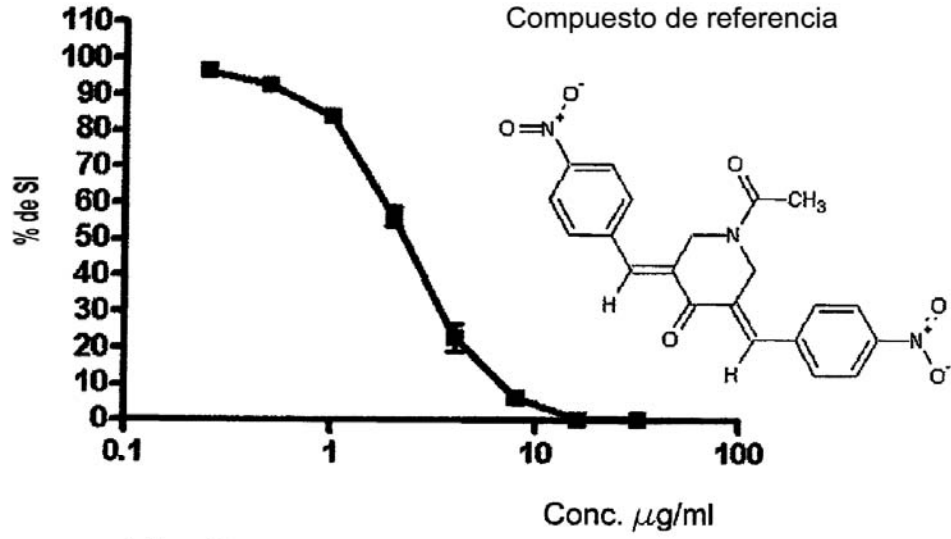


Fig. 3c

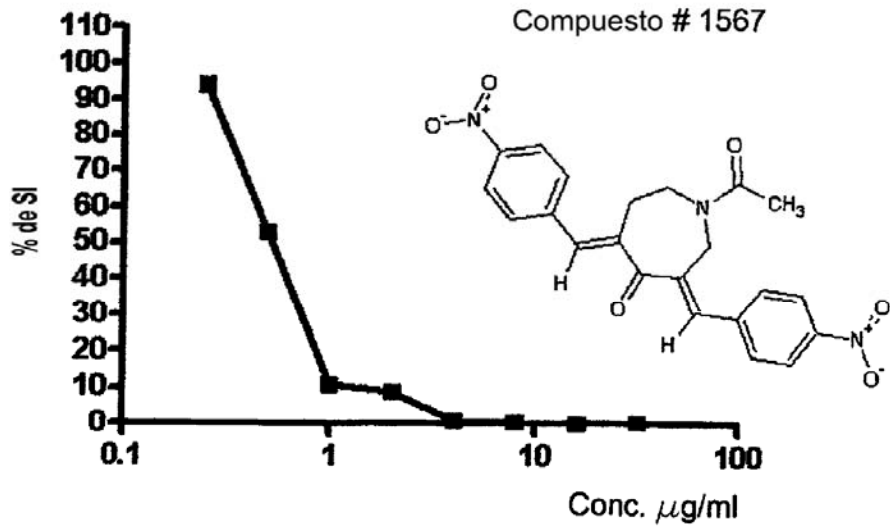


Fig. 3d

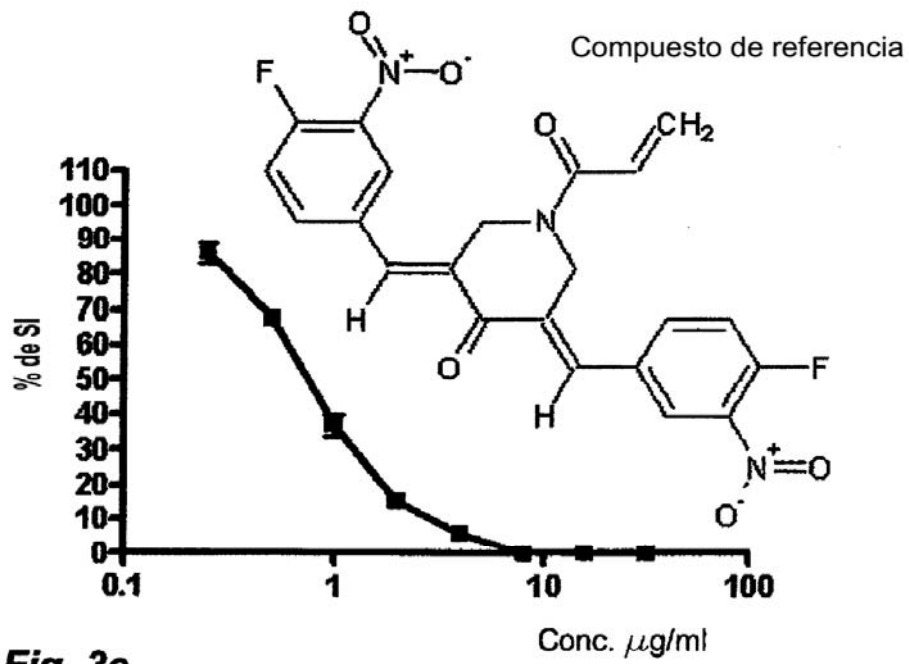


Fig. 3e

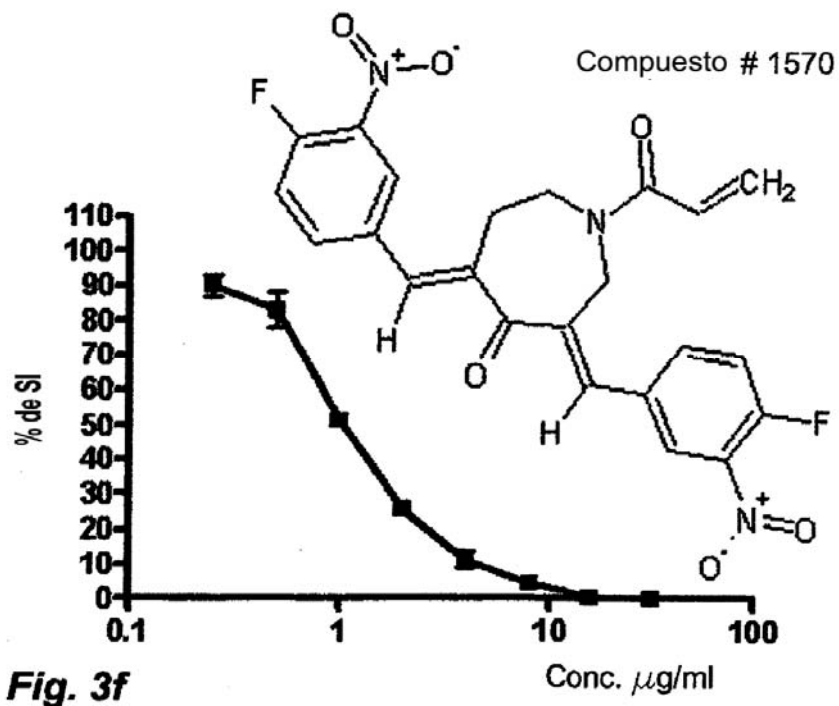


Fig. 3f