República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014009365-2 B1

(22) Data do Depósito: 15/10/2012

(45) Data de Concessão: 03/08/2021

(54) Título: COMPOSTO PARA INIBIÇÃO DE ATIVIDADE DESUBIQUITINADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO-O E USO DO MESMO

(51) Int.Cl.: C07D 223/08; A61K 31/55; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2012 SE 1200303-4; 19/10/2011 SE 1100776-2.

(73) Titular(es): VIVOLUX AB.

(72) Inventor(es): STIG LINDER; ROLF LARSSON.

(86) Pedido PCT: PCT SE2012000158 de 15/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/058691 de 25/04/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/04/2014

(57) Resumo: MÉTODO PARA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE DESUBIQUITINADORA. Um composto com a estrutura geral é capaz de anular a atividade desubiquitinadora (DUB) dos 19s RP DUBs. O composto pode ser usado para tratar câncer, em particular, de câncer refratário ao tratamento pela quimioterapia do estado da técnica. Também revelados são métodos correspondentes de tratamento e uma composição farmacêutica compreendendo o composto.

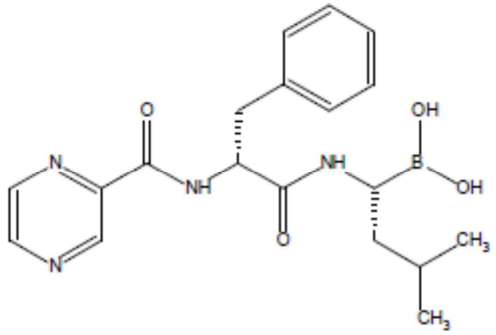
COMPOSTO PARA INIBIÇÃO DE ATIVIDADE DESUBIQUITINADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO-O E USO DO MESMO.

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção refere-se a um método de tratamento do câncer em um paciente inibindo a atividade desubiquitinadora. Mais particularmente, a invenção refere-se a um método de tratamento de um câncer em um paciente que provou ser resistente ao tratamento de pelo menos um medicamento anticâncer. Mais particularmente, a invenção refere-se a um composto para uso no método e a uma composição farmacêutica que compreende o composto.

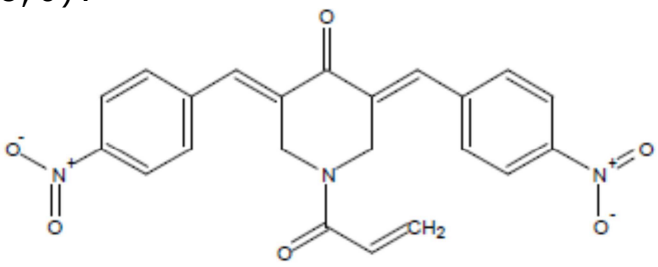
FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

[002] Células tumorais exibem maior sensibilidade a perturbações no sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), tornando esse um alvo atraente para o desenvolvimento de terapias anticâncer (1). Substratos de ubiquitina marcada são degradados pelo proteossoma 26S, um complexo de multi-subunidades que compreende um núcleo proteolítico 20S (20S CP) capeado por partículas reguladoras 19S (19S RP) (2,3). O 20S CP evoluiu como um alvo importante para o desenvolvimento de fármaco anticâncer, resultando na aprovação de bortezomibe (Velcade®) para o tratamento da leucemia mielóica (4).



Bortezomibe

[003] O composto b-AP15 (NSC687852) é conhecido por induzir apoptose p53-independente e catepsina-D-dependente (5,6).



b-AP15 (NSC687852)

OBJETOS DA INVENÇÃO

[004] É um objeto da invenção fornecer um composto para uso em um método de tratamento do câncer em um paciente inibindo a atividade desubiquitinadora, em particular, um câncer refratário à quimioterapia do estado da técnica.

[005] Em particular, é um objeto da invenção fornecer tal um composto para tratar o câncer em um paciente refratário ao tratamento com pelo menos bortezomibe ou um agente que compartilha o mecanismo de inibição da atividade desubiquitinadora de bortezomibe.

[006] Um outro objeto da invenção é fornecer um composto do tipo acima mencionado, que tem uma solubilidade melhorada em um pH fisiológico em relação a compostos funcionalmente equivalentes conhecidos na técnica.

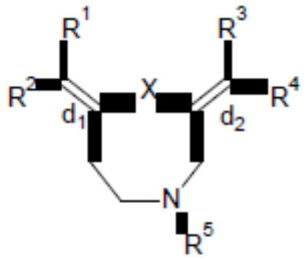
[007] Um objeto adicional da invenção é fornecer um método correspondente.

[008] Um outro objeto da invenção é fornecer uma composição farmacêutica que compreende o composto.

[009] Ainda outros objetos da invenção irão tornar-se evidentes através do estudo do sumário da invenção a seguir, um número de modalidades preferidas ilustradas em um desenho e as reivindicações anexas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[010] De acordo com a presente invenção é revelado um composto de estrutura geral S:



S-1

capaz de anular a atividade desubiquitinadora (DUB) dos 19S RP DUBs.

[011] O composto da invenção é reconhecido como pertencente a uma nova classe de inibidores de proteassoma da qual o composto conhecido b-AP15 é um representante.

[012] Em particular, de acordo com a presente invenção, o composto da invenção inibe a atividade de dois 19S RP DUBs, UCHL5 e USP14 enquanto não afeta DUBs não-proteossomal. Mais particularmente, o composto da invenção tem um efeito no tratamento de um tumor de câncer refratário à quimioterapia do estado da técnica, devido à super-expressão do inibidor de apoptose intrínseca Bcl-2.

[013] Mais particularmente, de acordo com a presente invenção, o composto da invenção é eficaz no tratamento de um câncer refratário ao tratamento com bortezomibe ou um agente que compartilha o mecanismo de inibição desubiquitinadora de bortezomibe. Em outra modalidade preferida, o composto é eficaz no tratamento de um câncer refratário a qualquer fármaco anticâncer conhecido na técnica.

[014] Nesse pedido, "refratário ao tratamento" significa que o tratamento de um câncer com uma dose única de um medicamento anticâncer não reduz substancialmente a taxa de crescimento do câncer observado imediatamente antes do tratamento, tal como a redução da taxa de crescimento por mês em não mais do que 25 por cento ou 10 por cento ou mesmo 5 por cento ou menos. Em particular, o método da invenção é eficaz no tratamento de um câncer em um paciente que, depois de ter recebido uma ou mais, em particular, duas ou três doses padrão de bortezomibe ou um agente que compartilha a atividade geradora de apoptose de bortezomibe ou qualquer outro fármaco anticâncer, apresenta uma taxa de crescimento do câncer por mês reduzido em não mais do que 25 por cento ou 10 por cento, ou mesmo 5 por cento ou menos, tal como qualquer taxa de crescimento positivo, em comparação com a taxa de crescimento do câncer observado imediatamente antes de um único tratamento ou os últimos dois ou três ou mais tratamentos, respectivamente. Uma medida aceita do crescimento do tumor é a mudança de volume de um câncer não-disseminado.

[015] Um exemplo de um câncer passível ao tratamento pelo método da invenção é o mieloma múltiplo. Outros exemplos de cânceres passíveis de tratamento incluem câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço.

[016] No composto da invenção da estrutura geral S-1,

[017] R^1, R^2 em ligação dupla d1 e R^3, R^4 em dupla ligação d2 podem, independente um do outro, tem uma configuração oposta àquela da fórmula S-1,

[018] X é CO, CS, CH_2, CHC_{1-6}-alquila, NH ou NC_{1-6}-alquila;

[019] R^1 e R^3 são, independentemente um do outro, H ou C_{1-6}-alquila; R^2 e R^4 são, independentemente um do outro, H, C_{1-6}-alquila, C_{1-5}-alquilCO, fenila ou heteroarila de 6 membros opcionalmente substituída por 1-3 de: C_{1-6}-alquila, C_{1-6}-alcoxi, CN, - $COOC_{1-6}$-alquila, COOH, NO_2, F, Cl, Br, I, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}$-alquila$)_2$, $CONR^7R^8$, com a condição de que um ou mais de H em alquila e alcoxi podem ser substituídos por flúor;

[020] R^5 é qualquer um de H, C_{2-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-3}-alcoxi-C_{2-6}-alquila-, aril-C_{0-6}-alquila-, heteroarila-C_{0-6}-alquila-, heterociclila-C_{0-6}-alquila-, cicloalquila-C_{0-6}-alquila-, -C_{1-6}-alquila-COOalquilaC_{1-6}-alquila, -C_{2-6}-alquila-arioxi, COR^6;

[021] R^6 é selecionado de: C_{1-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-6}-alcoxi, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquila-, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquenila-, aril-C_{0-6}-alquila-, heteroarila-C_{0-6}-alquila-, heterociclila-C_{0-6}- alquila-, cicloalquil-C_{0-6}-alquila-, -C_{1-6}-alquila-$COOC_{1-6}$-alquila, NH_2, -NHC_{1-6}-alquila, -N(C_{1-6}-alquila$)_2$, -C_{0-6}-alquila-arioxi;

[022] R^7, R^8 são, independentemente um do outro, H ou C_{1-3}-alquila.

[023] É preferível que ambos de R^1 e R^3 sejam ou C_1-$_3$-alquila.

[024] É preferível que ambos R^2 e R^4 sejam H, C_{1-6}-alquila, C_{1-5}-alquilCO, fenila ou heteroarila de 6 membros opcionalmente substituída por 1-3 de: C_{1-6}-alquila, C_{1-6}-alcoxi, CN, -$COOC_{1-6}$-alquila, COOH, NO_2, F, Cl, Br, I, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, N(C_{1-6}-alquila$)_2$, $CONR^7R^8$, com a condição

de que um ou mais de H em alquila e alcoxi podem ser substituídos por flúor, e que a substituição de fenila é preferivelmente em uma ou mais posições 3,4,5.

[025] É particularmente preferido para ambos R^2 e R^4 sejam fenila em uma ou mais de posições 3,4,5 por 1-3, preferivelmente por 1 ou 2, de: C_{1-6}-alquila, C_{1-6}-alcoxi, CN, -$COOC_{1-6}$-alquila, COOH, NO_2, F, Cl, Br, I, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}\text{-alquila})_2$, $CONR^7R^8$, com a condição de que um ou mais de H em alquila e alcoxi podem ser substituídos por átomos de flúor. Mais preferidos são substituintes removedores de elétrons, em particular, F, Cl, trifluorometila, NO_2, CN.

[026] É preferível para R^5 seja selecionado do grupo que consiste em H, metil, acetil, $COCH=CH_2$, 2- acetoxietil.

[027] De acordo com um aspecto preferido da invenção, X = CO. De acordo com um outro aspecto preferido da invenção, R^1 e R^3 são ambos H. De acordo com um terceiro aspecto preferido da invenção, R^2 e R^4 são, independentemente um do outro, fenila ou heteroarila de 6 membros opcionalmente substituída por 1-3 de: C_{1-6}-alquila, C_{1-6}-alcoxi, CN, -$COOC_{1-6}$-alquila, COOH, NO_2, F, Cl, Br, I, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}\text{-alquila})_2$, $CONR^7R^8$, fenila sendo preferida e substituição de fenila, se houver, sendo preferida uma ou mais posições 3,4,5.

[028] De acordo com um aspecto preferido da invenção, R^1, R^2 em ligação dupla d1 e R^3, R^4 em ligação dupla d2 tem a configuração da fórmula S-1; X é CO, CS, CH_2, CHC_{1-6}-alquila, NH ou NC_{1-6}-alquila; R^1 e R^3 são, independentemente um do outro, H ou C_{1-6}-alquila; R^2 e R^4 são, independentemente um do outro, H, C_{1-6}-alquila; C_{1-5}-

alquilCO, fenila ou heteroarila de 6 membros opcionalmente substituída com 1-3 de: CN, NO_2, F, Cl, Br, I, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}$-alquila$)_2$, COC_{1-6}-alquila; R^5 é H; C_{1-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquila-, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquenila-; arila, heteroarila, heterociclila, $C_{1–6}$-alquila-heteroarila, C_{1-6}-alquila-heterociclila, C_{1-6}-alquila-cicloalquila, C_{1-6}-alquila-arila, CO-C_{1-6}-alquila, CO-vinila, CO-alila, CO-arila, CO-cicloalquila. É preferido, independentemente um do outro, para X ser CO, para R^2 e R^4 ser fenila substituída, para R^5 ser selecionado de COR^6, em particular de CO-C_{1-6}-alquila, CO-cicloalquuila, CO-vinila, CO-alila.

[029] "Arila" refere-se a um hidrocarboneto monocíclico ou bicíclico de 6 a 10 átomos de carbono compreendendo pelo menos um anel aromático. "Ariloxi" refere-se a um grupo arila ligado a um átomo de oxigênio. "Heteroarila" representa um sistema de anel monocíclico tendo 5 ou 6 átomos de anel, dos quais um ou mais são selecionados independentemente de oxigênio, nitrogênio, enxofre. "Alquila" refere-se a alquila de cadeia linear ou ramificada. "Alquenila" refere-se a alquenila de cadeia linear ou ramificada. "Alcoxi" refere-se ao alcoxi de cadeia linear ou ramificada. "Cicloalquila" refere-se a um hidrocarboneto monoclíclico saturado de 3 a 7 átomos de carbono.

[030] Compostos preferidos da invenção da estrutura geral S-1 estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Compostos preferidos da invenção

X = CO, R^1 = R^3 = H, R^5 é H ou alquila

#	R^2	R^4	R^5	HCT116,	Menor

				FMCA, IC50 (μM)	conc., eficaz MeJuSo-UB, IncuCyte (μM)
1516	fenil	fenil	H		1,2
1517	4-metoxifenil	4-metoxifenil	H		
1518	4-clorfenil	4-clorofenil	H		1,6
1533	3-acetilfenil	3-acetilfenil	H		
1535	3-nitrofenil	3-nitrofenil	H	5,9	
1536	2-nitrofenil	2-nitrofenil	H	6,9	
1537	4-nitrofenil	4-nitrofenil	H	4,1	
1560	4-nitrofenil*	H**	H	1,0	
1561	4-fluorofenil	4-fluorofenil	H	1,0	1
1562	4-fluoro-3-nitrofenil	4-fluoro-3-nitrofenil	H	0,5	0,25
1563	4-nitrofenil	4-nitrofenil	metil	1,5	0,5
1564	4-fluorofenil	4-fluorofenil	metil	0,9	16
1565	4-fluoro-3-nitrofenil	4-fluoro-3-nitrofenil	metil	1,5	0,5
1566	3-nitrofenil	3-nitrofenil	metil	2,3	0,5
1574	4-fluorofenil	4-fluorofenil	propil	2,8	0,5
1575	4-nitrofenil	4-metoxifenil	H	2,1	1
1576	4-fluorofenil	4-metoxifenil	H	1,6	8
1577	4-fluorofenil	4-metoxifenil	metil	4,9	8
1582	4-fluorofenil	4-clorofenil	H	1,7	2
1583	4-clorofenil	4-nitrofenil	metil	3,3	2
1584	4-clorofenil	4-nitrofenil	H	1,8	2

1585	4-fluorofenil	4-nitrofenil	H	1,5	2
1586	4-clorofenil	4-fluorofenil	H	1,1	0,5
1587	4-fluorofenil	4-nitrofenil	metil	3,0	1
1588	4-nitrofenil	4-metoxifenil	metil	3,1	1
1589	4-clorofenil	4-fluorofenil	metil	2,5	1
1590	4-clorofenil	4-metoxifenil	metil	2,0	1
1591	4-nitrofenil	4-clorofenil	H	0,9	0,5
1592	4-clorofenil	4-nitrofenil	H	12	4
1593	4-nitrofenil	4-fluorofenil	metil	2,9	1
1594	4-nitrofenil	4-clorofenil	metil	2,6	1
1595	4-fluorofenil	4-clorofenil	metil	2,3	1
1596	4-nitrofenil	4-fluorofenil	H	2,6	2
1608	3-cloro-4-fluoro-fenil	3-cloro-4-fluoro-fenil	metil	1,8	1
1609	4-fluoro-3-trifluoro-metil-fenil	4-fluoro-3-trifluoro-metil-fenil	metil	1,4	1
1610	3,4-difluorofenil	3,4-difluorofenil	metil	1,7	1
1611	3-fluoro-5-trifluoro-metil-fenil	3-fluoro-5-trifluoro-metil-fenil	H	1,1	0,5
1612	3-fluoro-5-trifluoro-metil-fenil	3-fluoro-5-trifluoro-metil-fenil	metil	0,7	0,25
1613	4-nitrofenil	4-nitrofenil	H	25	32
1614	4-nitrofenil	4-nitrofenil	metil	7,4	8
1615	4-cloro-3-trifluoro-metilfenil	4-cloro-3-trifluoro-metilfenil	metil	0,9	0,5

1616	3,4,5-trifluorometil-fenil	3,4,5-trifluorometil-fenil	metil	1,4	0,5
1617	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	metil	1,6	1
1618	3-ciano-4-fluoro-fenil	3-ciano-4-fluoro-fenil	metil	1,5	0,5
1619	3-carbonilamino-fenil	3-carbonilamino-fenil	H	30	32
1620	3-nitrofenil	3-nitrofenil	metil	>32	Nenhum efeito
1621	4-cianofenil	4-cianofenil	metil	4,5	2
1622	4-fluoro-3-trifluoro-metil-fenil	4-fluoro-3-trifluoro-metil-fenil	H	0,8	0,5
1623	3-ciano-4-fluoro-fenil	3-ciano-4-fluoro-fenil	H	1,0	0,5
1624	3-fluoro-4-trifluoro-metil-fenil	3-fluoro-4-trifluoro-metil-fenil	metil	1,8	1
1625	4-cianofenil	4-cianofenil	H	0,9	0,5
1626	3-fluoro-4-trifluoro-metil-fenil	3-fluoro-4-trifluoro-metil-fenil	H	0,8	8

*ou H ou uma mistura de H e 4-nitrofenila

**ou 4-nitrofenil ou uma mistura de H e 4-nitrolfenil

[031] Devido a protonação de seu grupo amino a solubilidade em meio aquoso de compostos azepanona da invenção dos quais R^5 não é grupo acil assim como de piperidin-4-onas correspondentemente substituídas aumenta

com a diminuição do pH. No entanto, de acordo com um importante aspecto compostos azepanona da invenção dos quais R^5 não é acil (isto é, não-COR^6) tem solubilidade superior em meio aquoso em pH fisiológico em comparação com piperidin-4-onas correspondentemente substituídas. Enquanto a solubilidade destas azepanonas e piperidin-4-ones aumenta de um pH alto para um pH baixo, o aumento inicia em valores de pH mais altos para azepanonas do que para piperidin-4-onas correspondentes. Nesse pedido, "pH fisiológico" é um pH de cerca de 6 a cerca de 8, em particular, de 7,0 a 7,5.

Tabela 2. Compostos preferidos da invenção

X = CO, R^1 = R^3 = H, R^5 = COR^6

#	R^2	R^4	R^6	HCT116, FMCA, IC50 (μM)	Menor conc. eficaz MeJuSo-UB, (μM)
1505	4-nitrofenil	4-nitrofenil	2-pirrolidinil	5,2	16
1507	4-nitrofenil	4-nitrofenil	2-(1-carboxietil-etil)	4,4	8
1520	fenil	fenil	vinil		
1521	fenil	fenil	ciclobutil		
1525	4-metoxifenil	4-metoxifenil	ciclobutil		
1526	4-metoxifenil	4-metoxifenil	ciclopropil		
1527	4-clorofenil	4-clorofenil	ciclobutil		2
1546	4-nitrofenil	4-nitrofenil	vinil	1,2	2
1567	4-nitrofenil	4-nitrofenil	metil	0,6	0,5
1568	4-fluorofenil	4-fluorofenil	vinil	1,5	2
1569	4-fluorofenil	4-fluorofenil	vinil	2,0	4
1570	4-fluoro-3-nitrofenil	4-fluoro-3-nitrofenil	vinil	0,5	0,25

1571	4-fluoro-3-nitrofenil	4-fluoro-3-nitrofenil	metil	0,9	0,25
1572	3-nitrofenil	3-nitrofenil	vinil	2,5	0,5
1578	4-fluorofenil	4-metoxifenil	metil	7,0	8
1579	4-fluorofenil	4-metoxifenil	metil	5,9	8
1580	4-nitrofenil	4-metoxifenil	vinil	1,5	8
1581	4-nitrofenil	4-metoxifenil	metil	7,2	8
1597	4-nitrofenil	4-clorofenil	metil	1,3	1
1627	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	metil	0,7	1
1628	3,4-difluorofenil	3,4-difluorofienil	metil	2,3	1
1629	3,4,5-trifluorofenil	3,4,5-trifluorofenil	metil	0,6	1
1630	4-cloro-3-fluoro-fenil	4-cloro-3-fluoro-fenil	metil	0,9	0,5
1631	3-cloro-4-fluoro-fenil	3-cloro-4-fluoro-fenil	metil	1,0	32
1633	4-clorofenil	4-clorofenil	2-acetoxietil	2,2	4
1635	4-clorofenil	4-clorofenil	benzil	1,4	2
1636	4-clorofenil	4-clorofenil	1-(3-fenil-2-propenil)	2,0	1
1637	4-clorofenil	4-clorofenil	3-piridil	2,1	2
1638	4-clorofenil	4-clorofenil	2-tiofenil	2,0	2
1639	4-clorofenil	4-clorofenil	4-hidroxi-3-etoxibenzil	1,2	1
1640	4-clorofenil	4-clorofenil	metil-(2-metoxi-	1,9	1

			carboxil)fenil		
1641	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	metil-3-piridil	2,7	2
1642	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	2-oxo-acetoxietil	1,2	1
1643	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	3-(3-oxo-propanoiloxi-metil)	0,9	1
1644	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	1-oxo-2-(2-piridil)etil	1,4	1
1645	4-cloro-3-fluoro-fenil	4-cloro-3-fluorofenil	2-oxo-acetoxietil	2,5	2
1646	4-fluoro-3-nitro-fenil	4-fluoro-3-nitro-fenil	2-oxo-acetoximetil	1,1	1
1647	4-fluoro-3-nitro-fenil	4-fluoro-3-nitro-fenil	3-(3-oxo-propanoiloxi-metil)	0,7	0,25
1648	4-fluoro-3-nitro-fenil	4-fluoro-3-nitro-fenil	1-oxo-2-(2-piridil)etil	0,8	0,5
1649	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	metil-(2-metoxi-carboxil)fenil	0,9	0,5
1650	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	metil-3-piridil	1,9	1
1651	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	2-oxo-acetoxietil	0,8	0,5

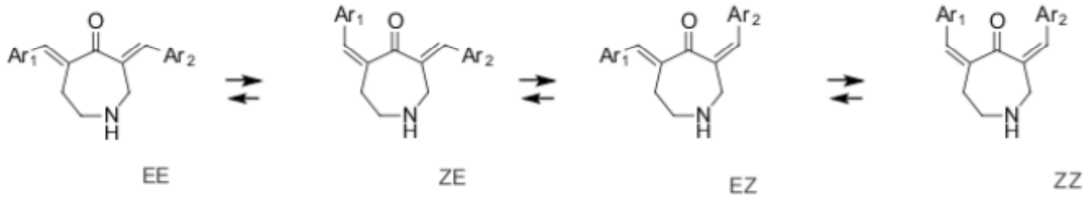
1652	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	3-(3-oxo-propanoiloxi-metil	0,6	0,5
1653	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	1-oxo-2-(2-piridil)etil	0,71	1
1654	4-cloro-3-trifluorometil-fenil	4-cloro-3-fluoro-metil-fenil	metil-(2-metoxi-carboxil)fenil	1,2	1
1655	4-cloro-3-trifluorometil-fenil	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	metil-3-piridil	1,0	1
1656	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	2-oxo-acetoxietil	0,7	0,5
1657	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	acetil	0,6	0,5
1658	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	4-cloro-3-trifluoro-metil-fenil	1-oxo-2-(2-piridil)etil	0,8	0,5
1659	4-trifluorometil-fenil	4-trifluorometil-fenil	2-acetoxietil	2,4	2
1660	4-cloro-3-fluoro-fenil	4-cloro-3-fluoro-fenil	2-acetoxietil	2,4	2
1661	4-cloro-3-fluoro-fenil	4-cloro-3-fluoro-fenil	metilcarboxil	24	32
1662	4-fluoro-3-nitro-fenil	4-fluoro-3-nitro-fenil	2-acetoxietil	2,1	1

1663	4-fluoro-3-nitro-fenil	4-fluoro-3-nitro-fenil	metilcarboxil	3,1	4
1664	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	2-acetoxiletil	2,8	4
1665	3,4,5-trifluoro-fenil	3,4,5-trifluoro-fenil	metilcarboxil	5,0	8
1666	4-cloro-3-trifluorometil-fenil	4-cloro-3-trifluorometil-fenil	2-acetoxietil	1,3	1

[032] A solubilidade em meio aquoso de compostos da invenção dos quais R^5 é acil (isto é, -COR^6) é substancialmente independente do pH.

[033] Os compostos particularmente preferidos da invenção são os compostos nºs 1561, 1562, 1567, 1570, 1571, 1586, 1591, 1600, 1612, 1618, 1622, 1625, 1643, 1644, 1647, 1648, 1649, 1652, 1653, 1656, 1657, 1658, 1662. Compostos mais preferidos da invenção são os compostos nºs 1570, 1571, 1625, 1662.

[034] Já que o composto da presente invenção compreende uma porção 1,4-penteno-3-ona 1,5-di-substituída, ele pode existir em quatro isômeros cis/trans EE, ZE, ES, ZZ. Na definição do composto da invenção, esse isomerismo é definido na parte anterior como "R^1, R^2 em ligação dupla d1 e R^3, R^4 em dupla ligação d2 podem, independentemente um do outro, ter uma configuração oposta àquela da fórmula S1". O composto da invenção compreende qualquer tal isômero e qualquer mistura de tais isômeros.



[035] Em síntese, o composto da invenção é obtido como uma mistura de isômero, mas, algumas vezes, também sob a forma do isômero com a solubilidade mais baixa no solvente particular, a partir do qual ele precipita ou cristaliza. Enquanto os isômeros puros, assim, podem ser obtidos sob condições controladas, o efeito farmacológico do composto é exibido por todos os isômeros. A razão para isso é o seu equilíbrio na presença de água ou outro agente ou solvente hidroxílico ou sulfidrílico, que é acelerado por catalisadores básicos ou ácidos.

[036] Por conseguinte, o termo "composto da invenção" como usado aqui compreende um isômero puro do tipo acima mencionado assim como uma mistura de dois ou mais de tais isômeros. A taxa de equilíbrio do composto da invenção no fluido corporal aquoso é suficiente para fornecer equilíbrio substancial dentro de um único período de tratamento.

[037] O composto da invenção compreende uma porção de azepano, de preferência, uma porção azepano-4-na. De acordo com um aspecto importante da invenção, o composto da invenção exibe uma atividade citotóxica superior à de um composto estruturalmente correspondente compreendendo uma porção de piperidina, tal como uma porção de 4-piperidinona.

[038] De acordo com um outro aspecto importante da invenção, o composto da invenção compreendendo uma porção

de azepano, em particular, uma porção de azepan-4-ona exibe uma solubilidade em um veículo líquido adequado para administração a um paciente, tal como dimetil sulfóxido, superior àquela de um composto estruturalmente correspondente compreendendo uma porção de piperidina, tal como uma porção de 4-piperidinona.

[039] Um "único período de tratamento" é o período de tempo decorrido entre a administração e consumo do composto da invenção, isto é, o ponto no tempo em que a concentração do composto da invenção no sítio de ação, tal como em um tumor, foi reduzida em 90% ou 95% ou 99% e mais. Em uma composição farmacêutica, um isômero ou uma mistura de isômeros do composto da invenção é estabilizado contra a isomerização por exclusão cuidadosa de umidade.

[040] O método da invenção compreende a administração ao paciente com necessidade de uma dose farmacologicamente eficaz do composto da invenção em um veículo farmacêutico adequado, tal como, por exemplo, dissolvido ou suspenso em um veículo aquoso ou em um veículo compreendendo dimetil sulfóxido ou N,N-dimetilacetamida. A administração pode ser por qualquer rota adequada, tais como por injeção ou infusão intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea. Outros métodos de administração, em particular *per os* (administração oral), também são contemplados, tal como na forma de comprimidos ou cápsulas de gelatina dura ou mole.

[041] A pessoa versada na técnica sabe como determinar uma dose farmacologicamente eficaz. Tal dose pode ser de 0,0001 g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, em particular, de 0,001 g/kg a 0,01 g/kg de peso corporal, consideração sendo

dada se o agente é administrado sistemicamente ou localmente.

[042] Consistente com a inibição de DUB, tratamento com o composto da invenção causa o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas de peso molecular mais alto em comparação com o tratamento com bortezomibe, e resulta em uma resposta mais forte da proteína não enovelada. De acordo com a invenção, foi também revelado que a indução da apoptose pelo composto da invenção difere daquela de bortezomibe por ser insensível a interrupção do supressor de tumor p53 e insensível à super-expressão do inibidor de apoptose Bcl-2.

[043] De acordo com a presente invenção, o tratamento com o composto da invenção inibe a progressão do tumor em humanos e tumor em camundongo em modelos *in vivo* de carcinoma de mama, pulmão, cólon, cabeça e pescoço e inibe a infiltração em um modelo de leucemia mielóide aguda (LMA). Em consequência, a inibição da atividade DUB do 19S RP pelo composto da invenção é revelada ser uma opção viável para o tratamento de câncer em humanos e animais. Assim, mais especificamente, é revelado um método de tratamento de uma pessoa com um tumor de câncer refratário à quimioterapia do estado da técnica que compreende a administração, em um veículo farmaceuticamente aceitável, de uma dose farmacologicamente eficaz do composto da invenção. O método da invenção é particularmente útil no tratamento de um paciente com um tumor cujas células são refratárias ao tratamento devido a super-expressão do inibidor de apoptose intrínseca Bcl-2.

[044] De acordo com um aspecto preferido da invenção, os 19S RP DUBs compreendem UCHL5 e USP14. De acordo com um

outro aspecto preferido da invenção, a atividade desubiquitinadora (DUB) de DUBs não-proteossomal não é afetada pelo composto da invenção. O composto da invenção pode ser administrado dissolvido ou suspenso em um veículo líquido por qualquer rota adequada, tal como pela administração intravenosa, intramuscular e subcutânea. Alternativamente ou adicionalmente, o composto da invenção pode ser administrado peroralmente, tal como na forma de um comprimido ou cápsula. Uma dose eficaz farmacologicamente útil do composto da presente invenção é de 0,0001g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, em particular, de 0,001 g/kg a 0,01 g/kg de peso corporal, sendo considerada dada se o composto é administrado sistemicamente ou localmente. O método pode compreender selecionar uma pessoa a ser tratada por meio da determinação da taxa de crescimento do câncer, antes e após a administração de bortezomibe ou dito princípio ativo que compartilha o mecanismo de inibição da atividade desubiquitinadora de bortezomibe ou dito outro fármaco anticâncer, uma taxa de crescimento positivo, em particular uma taxa de crescimento de mais de 5% ou mais que 10% ou mais que 25% por mês constituindo um marcador de seleção.

[045] O composto da invenção bloqueia a função do proteassoma celular, como confirmado pelo uso de uma linhagem de células repórter, que expressa a ubiquitina marcada com a proteína fluorescente amarela (UbG76V-YFP) constitutivamente alvo da degradação proteossomal (12). Immunoblotting e citometria de fluxo revelaram um acúmulo dose-dependente do Ub-YFP repórter (IC_{50} = 0,8 μM) sugerindo um comprometimento da função do proteassoma. Uma vez que a inibição da função do proteassoma é caracterizada

por defeitos no turnover de ubiquitina (13) células HCT-116 de carcinoma do cólon foram tratadas com o composto da invenção e o nível de conjugação de ubiquitina analisado por immunoblotting. O tratamento causou rápido acúmulo dependente do tempo de proteínas poliubiquitinadas de um peso molecular mais alto em comparação com o inibidor 20S CP de bortezomibe, sugerindo que o composto da invenção inibe uma parte alternativa do UPS. O aumento em poliubiquitina está associado com uma resposta forte proteotóxica caracterizada pela indução de HSPA6 (Hsp70B'), HSPA1B e DNAJB1 (Hsp40).

[046] O turnover de muitas proteínas reguladoras do ciclo celular é controlado pelo UPS incluindo inibidores da quinase dependente de ciclina $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ e o supressor de tumor p53 (4). Tratamento com o composto da invenção aumenta os níveis em uma maneira dose-dependente, sem alterar os níveis de ornitina descarboxilase 1 (ODC1), um substrato de proteassoma independente de ubiquitina (8). O aumento nos reguladores do ciclo celular foi concomitante com a parada do crescimento no limite da fase G2/M e um aumento do conteúdo de sub G1 DNA. A parada do ciclo celular observada não está associada com o aumento dos níveis de marcadores de lesão do DNA, tal como p53 fosforilado (em Ser 15) (9) ou H2AX (em Ser 139) (10), sugerindo que b-AP15 não é um agente genotóxico.

[047] O aumento em sub G1 DNA, ativação de caspase-3 e clivagem de poli-ADP ribose polimerase (PARP) e citoqueratina está associado com uma diminuição global na viabilidade das células em concentrações de fármaco que induzem o acúmulo de poliubiquitina conectando inibição e

apoptose de UPS. A indução da apoptose por bortezomibe é sensível ao estado do supressor do tumor p53 e super-expressão da oncoproteína anti-apoptótica Bcl-2 (11,12). Usando clones isogênicos de células de câncer do cólon HCT-116 foi demonstrado que apoptose induzida por b-AP15 é insensível à super-expressão de Bcl-2 e interrupção dos reguladores de apoptose p52, BAX ou PUMA. Medição da atividade citotóxica mostra que o composto da invenção é mais tóxico para a linhagem celular do carcinoma do cólon HTC-116 do que para células epiteliais de pigmento retinal imortalizadas (hTERT-RPE1) e células mononucleares do sangue periférico. O composto da presente invenção exibe um grau mais alto de atividade citotóxica para células HTC-116 do que para os tipos de células normais.

[048] A redução observada na atividade do proteassoma celular não pode ser explicada pela inibição das atividades proteolíticas das subunidades ß do 20S CP. Experimentos *in vitro* usando substratos atividade-específica não mostram a inibição em qualquer uma das atividades proteolíticas do proteassoma 20S CP ou 26S, dissociação do 19S RP e 20S CP ou inibição da ligação do proteassoma à poliubiquitina.

[049] O composto da invenção compreende uma entidade α-ß dienona com dois carbonos ß estericamente acessíveis. Um farmacóforo estruturalmente semelhante foi descrito anteriormente por ser constituído por uma classe de inibidores de ubiquitina isopeptidase (13). No entanto, quando a atividade de DUB celular foi testada usando ubiquitina 7-amido-4-metilcumarina (Ub-AMC) em células tratadas tratado com o composto da invenção, nenhuma redução na clivagem de Ub-AMC foi observada. Isso demonstra

que o composto da invenção não é um inibidor de DUB em geral. Embora não desejando ser limitado pela teoria, as semelhanças na estrutura do farmacóforo e os dados que mostram que o composto da invenção inibe a atividade do proteassoma independente do 20S CP indicam que o composto da invenção inibe o proteassoma bloqueando a atividade desubiquitinadora do 19S RP.

[050] Nos ensaios *in vitro* usando Ub-AMC e proteassomas 19S RP ou 26S purificadas confirmou que o composto da invenção inibe a atividade desubiquitinadora de ambos proteassomas 19S RP e 26S. Ubiquitina-GFP recombinante é um substrato para a atividade de19S RP DUB (15). Tratamento de 19S RP com b-AP15 eficientemente inibiu a clivagem de Ub-GFP e HDM2 ubiquitinado. O tipo de ligações de ubiquitina presentes na cadeia de poliubiquitina determina o destino de um substrato de ubiquitina modificada.

[051] Cadeias de poliubiquitina ligadas a K48 geralmente proteínas alvos co-unidas para a degradação (14), enquanto que cadeias ligadas a K63 estão envolvidas em funções não proteolíticas incluindo a reparação do DNA (15) e segregação cromossômica mitótica (16). As reações de desligamento da cadeia de ubiquitina revelaram que o composto da invenção inibe o processamento de 19s RP de ambos tetrâmeros de ubiquitina ligada a K48 e K6. A inibição do desligamento da cadeia de ubiquitina observada pode ser responsável pelo acúmulo de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular em células tratadas com o composto da invenção.

[052] A atividade desubiquitinadora do proteassoma é atribuída à ação de três DUBs, UCHL5, USP14 e POH1, todos

localizados dentro do 19S RP (17-19). Ambos UCHL5 e USP14 são sensíveis à N-etilmaleimida (NEM), um inibidor geral de proteases de cisteína, enquanto que POH1 é insensível à inibição por NEM, mas sensível aos agentes quelantes de metal, tais como N,N,N,N-tetraquis-(2-piridilmetil)etilenodiamina (TPEN) (20). Experimentos de inibição demonstraram que a atividade de DUB residual está presente mesmo após o co-tratamento de 19S RP com NEM e o composto da invenção. Essa atividade de DUB residual foi abolida após o co-tratamento de RP 19S com o composto da invenção e TPEN, sugerindo que o composto da invenção inibe principalmente um ou ambos dos DUBs de cisteína sensíveis ao NEM. Os ß-carbonos do composto da invenção podem servir como porções aceptoras de Michael, resultando em ligação covalente aos resíduos de cisteína nas proteínas alvo. Os ensaios *in vitro* mostraram, no entanto, que o composto da invenção é um inibidor reversível e que a glutationa não se opõe a atividade inibidora do composto.

[053] Para identificar especificamente que DUBs foram inibidos pelo tratamento com o composto da invenção, experimentos de marcação competitivos foram realizados usando ubiquitina vinilsulfonona marcada com hemaglutinina (HA-UbVS), uma sonda direcionada a um sitio ativo que irreversivelmente reage com DUBs da classe da cisteína (17). Incubação de proteassomas 19S RP ou 26S com o composto da invenção aboliu a marcação de Ub-VS de dois DUBs de pesos moleculares correspondentes ao UCHL5 e USP14. Um resultado similar foi obtido usando UbVs em lisatos derivados de células tratadas com fármaco. A análise por immunoblotting mostrou uma mudança para baixo no peso

molecular de ambos USP14 e UCHL5 devido à perda de atividade e diminuiu a marcação de UbVs. Isso é consistente com os proteossomas purificados por afinidade do composto da invenção, células tratadas exibindo atividade de DUB reduzida confinada ao proteassoma e não evidentes em lisatos celulares. Ensaios *in vitro* adicionais mostraram inibição mínima do composto da invenção em DUB de cisteína não-proteossomal recombinante, consistente com a noção de que a inibição não se deve à reatividade da cisteína em geral. O composto da invenção não diminui substancialmente e até mesmo para o crescimento do tumor *in vivo*, como demonstrado pela sua administração a camundongos portadores do tumor ou tumor em humano ou xenotransplantados em camundongos. Quando o composto da invenção é administrado diariamente a camundongos SCID portadores de xenotransplante de carcinoma de cabeça e pescoço FaDu, a inibição significativa do crescimento do tumor FaDu é observada após o tratamento diário com o composto da invenção (volume de tumor tratado/ controle, T/C = 0,4, p = < 0,001). A morte de células do tumor foi analisada medindo o xenotransplante derivado de citoqueratina (CK18) em circulação. Citoqueratina-18 é um biomarcador para apoptose (21,22); um aumento significativo nos níveis plasmáticos de CK18 humano total (p = 0,01) foi observado. Os níveis de caspase clivada de CK18 (CK18-Asp396) aumentaram moderadamente em comparação com os níveis totais, sugerindo que o composto da invenção tem atividade contra células do tumor *in vivo*. O composto da invenção também mostrou inibir o aparecimento de xenotransplantes de carcinoma do cólon HCT-116^{Bcl2+} em camundongos nus, como demonstrado pelo

atraso significativo no aparecimento do tumor em comparação com os controles tratados com veículo. Do mesmo modo, o composto da invenção inibe o crescimento do tumor em modelos de camundongos singênicos que utilizam esquemas de administração menos frequente.

[054] Hidrolases C-terminais de ubiquitina (UCH) e proteases específicas de ubiquitina (USP) são os importantes subgrupos de aproximadamente cem DUBs codificados pelo genoma humano (23). O mecanismo de especificidade do composto da invenção para UCHL5 e USP14 no 19S RP pode ser relacionado com conformações originais destas enzimas no 19S RP ou devido a alterações induzidas pelo fármaco da estrutura de 19S RP. As presentes revelações são consistentes com relatos na técnica indicando que a perda de ambos UCHL5 e USP14, ao contrário, da perda de qualquer um dos dois sozinhos, leva ao acúmulo de proteínas poliubiquitinadas e inibição da degradação da proteína celular (24).

[055] A observação que a inibição de DUB está associada com os complexos de substrato-ubiquitina de alto peso molecular parece ser de particular relevância. Forte expressão dos genes chaperones foi observada em células tratadas com o composto da presente invenção, indicando a indução de uma resposta proteotóxica. Os complexos de substrato-ubiquitina de alto peso molecular que acumulam como resultado da inibição de DUB pelo composto da invenção parecem gerar forte citotoxicidade.

[056] Em seguida, a invenção será descrita em maior detalhe por referência às suas modalidades preferidas

ilustradas por um desenho que compreende um número de figuras.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[057] As figuras 1a a 1o são diagramas que ilustram a indução de citotoxicidade dose-dependente depois de 72 horas de exposição contínua do composto à linhagem de células repórter HCT-116 por modalidades do composto da invenção, como medido por FMCA (Ensaio de citotoxicidade de microcultura fluorométrico), assim como a ausência de tal indução por compostos estruturalmente relacionados não compreendidos pela invenção. As células tratadas foram comparadas com controles não tratados (índice de sobrevivência).

[058] As figuras De 2a a 2e são diagramas que ilustram a solubilidade superior dos compostos da invenção em um meio aquoso em pH fisiológico.

[059] As figuras 3a a 3f são diagramas ilustrando, pelo método das figuras 1a a 1o, a citotoxicidade superior dos compostos de azepanona da invenção em relação aos compostos de piperidin-4-ona estruturalmente correspondentes não compreendidos pela invenção.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

Métodos

[060] Os ensaios *in vitro* da atividade de proteassoma são realizados em placas de microtitulação 96 poços pretas usando um proteassoma 20S humano (Boston Biochem) em tampão para reação (25 mM de HEPES, 0,5 mM de EDTA, 0,03% de SDS) com Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC ou Boc- LRRAMC usados como substratos para a atividade do proteassoma. Ensaios da atividade de desubiquitinase são realizados com 19S RP

humano (Boston Biochem) com ubiquitina-AMC como substrato. Para os estudos de xenotransplante FaDu uma suspensão de 100 µl de células contendo $1x10^6$ células é injetada por via subcutânea no flanco de SCID. Sob tumor os camundongos são distribuídos aleatoriamente em grupos de controle ou tratamento e administrados com 5 $mgkg^{-1}$ de composto da invenção ou veículo. Níveis *in vivo* da apoptose e morte celular são determinados a partir da detecção de caspase clivada e os níveis totais de citoqueratina-18 no plasma usando M30 Apoptosense® e ensaios ELISA® M65 (Peviva). Os métodos são descritos abaixo em mais detalhe.

[061] *Reagentes.* Reagentes foram obtidos a partir das seguintes fontes: proteassoma 20S (E-360), proteassoma 26S (E-365), proteassoma 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 enzima desconjugadora (KE10), HA-Ubiquitina Vinil Sulfona (U-212) (Boston Biochem), anti-β-actina (CA-15), ODC-1 (HPA001536) (Sigma Aldrich), anti-LC-3(2775), anti-GAPDH (2118), anti-p44/42 MAPK (4695), anti-fosfo-p44/42 MAPK (9101) (Cell Signaling), N-etilmaleimida (34115) (Merck), 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), caspase anti-ativa 3 (C92-605) (BD Biosciences), anti-USP14 (A300-919A) (Bethyl Laboratories), anti-HA (12CA5)(Roche). Bortezomibe foi obtido do Departamento de Oncologia do Hospital de Karolinska, na Suécia.

[062] *Cultura de células.* As células MCF-7 são mantidas em soro fetal de vitelo MEM/10%. Células HCT-116 p53+/+, p53-/-, Bcl-2+/+, PUMA-/- e BAX-/- são mantidas em soro fetal de vitelo a 10%/meio modificado McCoy 5A. HCT-116 p53+/+, p53-/-, PUMA-/- e BAX-/- são gerados como descrito (25). A linhagem de células HCT-116 Bcl-2+/+ foi gerada por transfecção de células HCT-116 p53+/+ parentais com pCEP4 Bcl-2 (plasmídeo Addgene 16461)(26) e isolamento de clones de alta expressão. Células FaDu e LLC3 são mantidas em meio de alto teor de glucose DMEM suplementado com soro fetal de vitelo a 10%, piruvato de Na, HEPES e aminoácidos não essenciais. Células de carcinoma 4T1.12B são mantidas em meio RPMI suplementado com soro fetal de vitelo a 10%. A linhagem de células repórter do proteassoma MelJuSo Ub-YFP foi gerada como descrito (12). As células foram mantidas em soro fetal de vitelo a 10%/meio Eagle modificado por Dulbecco. A linhagem de células do epitélio retinal foi gerada como descrito (12). Todas as células são mantidas em soro fetal de vitelo a 10%/meio Eagle modificado por Dulbecco. A linhagem de células do epitélio retinal foi gerada como descrito (28). Todas as células são mantidas a 37°C em 5% de CO_2.

[063] *Proteassoma e ensaios de inibição de DUB.* Ensaios de atividade *in vitro* usando proteassoma 20S CP (2 nM) (Boston Biochem) são realizados a 37°C em tampão de reação de 100 µl (25 mM de Hepes, 0,5 mM de EDTA, 0,03% de SDS). As amostras são incubadas durante 10 minutos com o composto indicado seguida pela adição de 10 µM de Suc-LLVY-AMC, Z-LLE - AMC ou Boc-LRR-AMC para a detecção da atividade semelhante à quimotripsina, semelhante à caspase e

semelhante à tripsina, respectivamente. Para os ensaios de inibição de DUB 19S RP (5 nM), 26S (5 nM), UCH-L1 (5 nM), UCH-L3 (0,3 nM), USP2CD (5 nM), USP7CD (5 nM), USP8CD (5 nM) e BAP1 (5 nM) são incubados com o composto da invenção seguida pela adição de ubiquitina-AMC (1000 nM). A fluorescência é monitorada usando contador Wallac Multilabel ou Tecan Infinito M1000 equipado com excitação de 360 nm e filtros de emissão de 460 nm.

[064] *Ensaios de sobreposição de substrato.* Eletroforese em gel nativa é realizada como descrito (29). Em resumo 4 µg de proteassoma purificado 26S (Boston Biochem) é misturado com 10 ou 50 µM do composto da invenção e incubado a 37ºC durante 10 minutos. As amostras são resolvidas em PAGE não desnaturante a 4%. Os géis são submersos em tampão do ensaio (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de ATP, 0,1 mM de Suc-LLVY-AMC) e os proteossomas são visualizados sob iluminação ultravioleta.

Ensaio de clivagem de ubiquitina

[065] O plasmídeo Ub-GFP pET19b Ub-M-GFP recombinante é gerado como descrito (30). Em resumo Ub-GFP recombinante é purificado a de células de E.coli BL21 pela purificação por afinidade His. Para os ensaios de clivagem 19S RP (25 nM) é incubado com 10 mM NEM, 250 µM de TPEN ou 50 µM do composto da invenção por 10 minutos seguido pela adição de Ub-GFP recombinante (200 nM). Reações de desligamento de cadeia de ubiquitina são realizadas essencialmente como acima, exceto tetrâmeros de ubiquitina ligada a K48 ou K63 (50 ng) são substituídos por Ub-GFP. O nível de clivagem de Ub-GFP ou desligamento de ubiquitina é determinado por immunoblotting com anticorpos anti-ubiquitina. O substrato HDM2

ubiquitinado é gerado de acordo com o protocolo de Boston Biochem (K-200). Para o ensaio de clivagem 19S RP (25 nM) é incubado com 50 μM do composto da invenção ou DMSO por 10 minutos seguida da adição de substrato HDM2 ubiquitinado (100 nM). A clivagem do substrato HDM2 ubiquitinado e HDM2 ubiquitinado é determinada por immunoblotting com anticorpos anti-HDM2.

[066] *Isolamento de proteassoma.* Células HCT-116 são tratadas com bortezomibe (100 nM) ou o composto da invenção (1 μM) por 3 horas. Após estimulação, as células foram lisadas em 50 mM de HEPES em pH 7,4, 250 mM de sacarose, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de ATP, 1 mM de DTT e 0,025% de digitonina. As amostras são sonicadas brevemente e incubadas por 15 minutos em gelo. Proteassomas destas amostras são isoladas de acordo com o protocolo do fabricante.

[067] *Marcação UbVS de DUBs.* Para a marcação de DUBs em lisados celulares células sub-confluentes são colhidas por tripsinização, lavadas três vezes com PBS, e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. As pelotas de células são lisadas com tampão (50 mM de HEPES em pH 7,4, 250 mM de sacarose, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de ATP, 1 mM de DTT) em gelo por 15 minutos. Os resíduos são removidos por centrifugação e 25 μg de proteína é marcada com 1 μM de HA-UbVS por 30 minutos a 37ºC. As amostras são resolvidas por SDS-PAGE e analisadas por immunoblotting com anticorpos indicados.

[068] *Determinação de apoptose e viabilidade celular*. Para determinação de apoptose células HCT-116 p53+/+ parentais são tratadas com doses crescentes do composto da invenção por 24 horas. As doses de tratamento baseiam-se na

concentração do fármaco que resultou em apoptose máxima ao longo de um período de 24 horas. Células HCT–116 são semeadas em placas de microtitulação de 96 poços em 10.000 células por poço e incubadas durante a noite. As células são tratadas com o fármaco indicado por 24 horas. No final do período de incubação, NP40 é adicionado ao meio de cultura de tecido a 0,1% e 25 µl do conteúdo de cada poço foi determinado usando o M30-Apoptosense ELISA® como anteriormente descrito (31). A viabilidade celular é determinada medindo a atividade de fosfatase ácida ou utilizando o método FMCA (32). Para as células de atividade de fosfatase ácida são semeadas em 5000 células por poço em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 12 horas a 37ºC. Os compostos são adicionados às células em meio de crescimento e incubadas por 72 horas a 37ºC. As células são lavadas com 200 µl de PBS aquecido. 100 µl de fosfato de para-nitrofenila (pNPP, 2mg/ml) em tampão acetato de Na em pH 5 (NaAc 0,1 M, 0,1% de Triton-X-100) são adicionados por poço. As células são incubadas durante 2 horas após o que a reação foi parada para adição de NaOH a 1N. A absorbância é medida a 405 nm. A citotoxicidade dose-dependente de uma série de modalidades do composto da invenção é ilustrada nas figuras 1a-1o.

[069] Para o ensaio FMCA células são semeadas nas placas de 384 poços preparas com fármaco utilizando a pipetagem de precisão 2000 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT). As placas são incubadas por 72 horas e, em seguida, transferidas para um sistema central integrado HTS SAIGAN consistindo de um robô ORCA (Beckman Coulter) com incubadora de CO_2 (Cytomat 2C, Kendro, Sollentuna, Suécia),

módulo de distribuição (Multidrop 384, Titertek, Huntsville, AL), módulo de lavar (ELX 405, Bio-Tek Instruments Inc), estação de destamponamento, plate hotels, leitor de código de barras(Beckman Coulter), manipulador de líquido (Biomek 2000, Beckman Coulter) e um leitor de multipropósitos (Fluostar Optima, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Alemanha) para FMCA automático. Índice de sobrevivência (IS) é definido como a fluorescência de poços de teste em percentagem de controles com os valores em branco subtraídos.

[070] *Análise do ciclo celular.* Para a determinação do ciclo celular células HCT-116 são tratadas com o composto da invenção ou células de DMSO são colhidas por tripsinização, lavadas e fixadas em gelo e resfriadas a 70% EtOH por 12 h. As células são re-suspensas em solução de colorida contendo iodeto de propídio (50 µg/ml) e RNAse A (0,5 ug/ml) em PBS. As amostras são executadas em BD FACScalibur. A percentagem de células em cada fase do ciclo celular é determinada usando Software ModFit.

EXEMPLO 1. Exemplo de síntese de modalidades preferidas para o composto da invenção

[071] *Informações gerais.* Todos os solventes utilizados eram de grau de HPLC ou melhor. Quando condições anidras foram necessárias, um excesso de moleculares molecular de 3 Å foram adicionadas ao solvente pelo menos 24 horas antes do uso para assegurar a secura. Ressonância magnética nuclear ^{1}H RMN (RMN) foi registrada em um espectrômetro Bruker Advance DPX 400 em 400,1 MHz. Os espectros de massa por ionização por eletrospray de baixa resolução foram obtidos usando um espectrômetro de massa Agilent em modo de

ionização positiva. A cromatografia flash foi realizada em sílica gel 60 Merck (230-400 mesh). Dados analíticos de LCMS foram obtidos com um espectrômetro de massa Agilent; sistema Agilent 1100; A: coluna ACE C8 (50x3,0 mm, 5μM); gradiente: 10 a 97% de acetonitrila em água/0,1% de TFA, em 3 minutos 1,0 ml/min, ou B: coluna C18 XBridge (3,5 μM. 50x3,0 mm), gradiente de 10% a 97% de acetonitrila em 10 mM de NH_4HCO_3 (pH 10) em 3 minutos, 1 ml/min). Nomes de estruturas químicas foram determinados usando Marvin Scech 5.2.6, ChemAxon.

(3E,5E)-3,5-bis(fenilmetilideno)azepan-4-ona(#1516) e (3E, 5E)-3,5-bis(4-metoxifenilmetilideno)-azepan-4-ona (# 1517)

[072] Hexahidro-4H-azepin-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol), junto com ou benzaldeído (0,70 g, 7,0 mmol), 4-metoxibenzaldeído (0,90 g, 7,0 mmol) ou 4-clorobenzaldeído (0,92 g, 7,0 mmol) foi dissolvido em ácido acético (10 ml). Em seguida, o ácido sulfúrico (conc. 1 ml) foi adicionado gota a gota, e as reações foram agitadas por 24 horas à temperatura ambiente. Água (30 ml) foi adicionada e o precipitado foi filtrado e seco a vácuo durante a noite. Nenhuma purificação adicional foi realizada. Composto # 1516 foi obtido com 99% de pureza determinada por LCMS (Sistema A) MS ESI^+ m/z 290 $[M+H]^+$. Composto # 1517 foi também obtido com 99% de pureza determinada por LCMS (Sistema A), MS ESI^+ m/z 350 $[M+H]^+$. Composto # 1518 foi obtido em 91% de pureza; LCMS (Sistema A). MS ESI^+ m/z 358 $[M]^+$, 360 $[M+2]^+$.

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

[073] (3E,5E)-3,5-Bix(fenilmetilideno)azepan-4-ona (# 1516) (50,0 mg, 0,182 mmol) e ácido acrílico (14,4 mg, 0,20 mmol), HBTU (58,4 mg, 0,182 mmol), trietilamina (36,7 mg, 0,364 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml) e agitados durante a noite. Acetato de etila e soro fisiológico foram adicionados e os produtos foram extraídos. As camadas orgânicas combinadas foram secas e evaporadas. O produto bruto foi diluído com metanol e purificado por HPLC preparativa. Composto # 1520 foi obtido em 96% de pureza, MS-ESI$^+$ m/z 344 $[M+H]^+$.

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

[074] N-Boc-azepanona (100 mg, 0,47 mmol) e 4 -nitrobenzaldeído (156 mg, 1,03 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (10 ml). Em seguida, o ácido sulfúrico (conc. 1 ml) foi adicionado gota a gota, e as reações foram agitadas à temperatura ambiente por três dias. Em seguida, mais aldeído e ácido sulfúrico foram adicionados e a reação foi agitada mais 24 horas, mais ácido foi adicionado duas vezes em 24 horas de intervalo. A reação foi temperada pela adição de água e os intermediários brutos precipitados foram separados por filtração e lavados com água. Após a secagem do produto sob vácuo durante a noite 2 x 35 mg (0,09 mmol) do intermediário bruto foi pesado para em dois frascos e dissolvido junto com o succinato de monoetila (14,8 mg, 0,10 mmol) em DCM/DMF (2 ml, 4:1). Trietilamina (19,3 ml, 0,14 mmol) foi adicionada e a mistura agitada por 5 minutos antes da adição de HATU (38,6 mg, 0,10 mmol). Após agitação contínua durante 12 horas mais trietilamina e HATU foram adicionados e a agitação continuou por 4 horas.

Os solventes foram evaporados e o resíduo purificado por HPLC preparativa. O resíduo foi dissolvido em diclorometano/ácido trifluoroacético (5 ml, 4:1), agitado por 40 minutos e concentrado novamente. Composto # 1505 foi obtido em 93% de pureza por LCMS (Sistema A). MS ESI^+ m/z 477 $[M+H]^+$.

EXEMPLO 2. *Outros exemplos de sínteses de modalidades preferidas do composto da invenção*

(2R)-2-{[(3E,5E)-3,5-bis[(4-nitrofenil)-metilideno]-4-oxoazepan-1-carbonil}pirrolidínio trifluoroacetato (composto # 1505).

[075] N-boc azepan-4-ona (0,10 g, 0,47 mmol) e 4-nitrobenzaldeído (156 mg, 1,0 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (10 ml), conc. H_2SO_4 (1 ml) foi adicionado gota a gota e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante o fim de semana. Mais aldeído (156 mg) e H_2 SO_4 (1 ml) foram adicionados e a agitação continuou à temperatura ambiente durante a noite. Outro H_2SO_4 concentrado em ml foi adicionado e a reação foi agitada durante a noite novamente. H_2SO_4 concentrado foi adicionado mais uma vez e a reação foi agitada até estar completa (duas semanas). Sob adição de água um precipitado marrom foi separado por filtração, lavado com água, e seco sob vácuo para fornecer 339,5 mg de intermediário 1 sólido marrom, o qual foi utilizado sem purificação adicional. Intermediário 1 (35 mg, 0,09 mmol) e N-Boc (22 mg, 0,10 mmol) foram dissolvidos em DCM/DMF (4:1, 2 ml). TEA (19 ml, 0,14 mmol) foi adicionado e a mistura foi agitada durante 5 minutos, em seguida HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) foi adicionado e a reação agitada à temperatura ambiente durante a noite. Mais TEA

(19 ml, 0,14 mmol) e HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) foram adicionados, e a reação foi agitada por mais 4 horas. A mistura de reação foi concentrada e, em seguida, purificada por LC preparativa (40 a 70 % de ACN em 0,1% de TFA) para fornecer o produto como um sólido amarelo. O sólido foi dissolvido em DCM/TFA (4:1, 5 ml) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 20 minutos para remover o grupo de proteção Boc. O sal de TFA do produto foi recuperado como um sólido amarelo com 93% de pureza. LCMS A: Rt 1,94/1,99, m/z $[M+H]^+$ 477,1, B: Rt 2,28.

(3E,5E)-1-(4-etoxi-4-oxobutanoil)-3,5-bis[(4-nitrofenil)metilideno]-4-oxoazepan-1-io trifluoroacetato (composto # 1507).

[076] Intermediário 1 (35 mg, 0,09 mmol) e N-Boc prolina (22 mg, 0,10 mmol) foram dissolvidos em DCM/DMF (4:1, 2 ml). TEA (19 ml, 0,14 mmol) foi adicionado e a mistura agitada por 5 minutos, em seguida HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) foi adicionado e a reação agitada à temperatura ambiente durante a noite. Mais TEA (19 ml, 0,14 mmol) e HATU (38,6 mg, 0,10 mmol) foram adicionados e a reação foi agitada por mais 4 horas. A mistura de reação foi concentrada e depois purificada em LC preparativa (40 a 70% de ACN em 0,1% de TFA) para fornecer o sal de TFA do produto como um sólido amarelo com 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)metilideno]-azepan-4-ona (composto # 1518).

[077] Azepan-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol) e 4-clorobenzaldeído (0,92 g, 6,6 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (10 ml), H_2SO_4 concentrado (1 ml) foi

adicionado gota a gota e a reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas. Após a adição de água (30 ml) um precipitado foi formado, filtrado, e seco em vácuo para fornecer o produto em 91% de pureza como um sólido amarelo. LCMS A: Rt 2,04 m/z $[M]^+$ 358,1.

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

[078] Azepan-4-ona (50 mg, 0,182 mmol), ácido acrílico (14 ml, 0,20 mmol), TBTU (58 mg, 0,182 mmol) e TEA (37 mg, 0,364 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml) e agitados à temperatura ambiente durante a noite. Soro fisiológico e acetato de etila foram adicionados e as fases separadas. A fase orgânica foi seca e os solventes evaporados após filtração. O produto bruto foi dissolvido em ácido acético (2 ml) e H_2SO_4 (0,2 ml). Benzaldeído (50 ml) foi adicionado e a reação foi agitada por 24 horas. Metanol e água foram adicionados à mistura, que foi purificada por LC preparativa. O composto titulado foi isolado com 96% de pureza como um sólido amarelo. LCMS A: Rt 2,68 m/z $[M+H]^+$ 344,1.

(3E,5E)-3,5-bis(fenilmetilideno)-1-ciclobutanocarbonilazepan-4-ona (Composto # 1521).

[079] Azepan-4-ona (50 mg, 0,182 mmol), ácido ciclobutírico (14 ml, 0,20 mmol), TBTU (58 mg, 0,182 mmol) e TEA (37 mg, 0,364 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml) e agitados à temperatura ambiente durante a noite. Soro fisiológico e acetato de etila foram adicionados e as fases separadas. A fase orgânica foi seca e os solventes evaporados após filtração. O produto bruto foi dissolvido em ácido acético (2 ml) e H_2SO_4 (0,2 ml). Benzaldeído (50

ml) foi adicionado e a reação foi agitada por 24 horas. Metanol e água foram adicionados à mistura, que foi purificada por LC preparativa. O composto titulado foi isolado com 96% de pureza como um sólido amarelo. LCMS A: Rt 2,68 m/z $[M+H]^+$ 372,1.

(3E,5E)-1-(2-ciclopropilacetil)-3,5-bis[(4-metoxifenil)metilideno]azepan-4-ona (Composto # 1526)

[080] Azepan-4-ona (0,45 g, 3,0 mmol) e 4-metoxibenzaldeído (0,90 g, 6,6 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (10 ml), H_2SO_4 concentrado (1 ml) foi adicionado gota a gota, e a reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas. Água (30 ml) foi adicionada. O precipitado foi filtrado e seco a vácuo durante a noite. O material bruto (30 mg, 0,107 mmol), ácido ciclopropilacético (12 mg, 0,12 mmol), TBTU (41 mg, 0,13 mmol) e TEA (26 mg, 0,26 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml) e agitados à temperatura ambiente durante a noite. Metanol (1,5 ml) e água (0,5 ml) foram adicionados e o produto foi purificado por LC preparativa, para se obter o produto sólido em 95% de pureza. LCMS A: Rt 2,51 m/z $[M+H]^+$ 432,2.

(3E,5E)-5-[(3-nitrofenil)metilideno]-3-(fenilmetilideno)azepan-4-ona (composto # 1560)

[081] N-boc-azepan-4-ona (0,10 g, 0,47 mmol) e 3-nitrobenzaldeído (156 mg, 1,0 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (5 ml), H_2SO_4 concentrado (0,5 ml) foi adicionado gota a gota e a reação agitada à temperatura ambiente durante 4 dias. Em seguida, mais H_2SO_4 concentrado (0,5 ml) e aldeído (156 mg, 1,0 mmol) foram adicionados e a agitação continuou à temperatura ambiente durante três

semanas. Uma mistura dos produtos mono- e di- da condensação foi obtida. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna (DCM/metanol) para fornecer o intermediário amina intermediário 2 como um óleo marrom (19 mg). Intermediário 2 foi dissolvido em ácido acético (1,5 ml) em conjunto com benzaldeído. H_2SO_4 concentrado (0,05 ml) foi adicionado e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, mais H_2SO_4 foi adicionado e a agitação continuou durante uma semana. Mais aldeído (156 mg, 1,0 mmol) e H_2SO_4 foram adicionados e a agitação continuou durante um adicional 4 dias. A mistura de reação foi concentrada e purificada por LC preparativa para fornecer sal-TFA do produto como um sólido amarelo em 98% de pureza. Sistema de LCMS A: Rt 1,78 m/z $[M+H]^+$ 335,1, Sistema B: Rt 2,43/2,28.

(3E,5E)-1-metil-3,5-bis[(4-nitrofenil)-metilideno]-azepan-4-ona (composto # 1563)

[082] N-metilazepan-4-ona·HCl (50 mg, 0,30 mmol) e 4-nitrobenzaldeido foram dissolvidos em ácido acético (5 ml) e agitados por 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (50 ml) foi adicionado lentamente e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Mais H_2SO_4 concentrado (100 ml) foi adicionado e a agitação continuou à temperatura ambiente durante 6 horas. 500 µl adicionais de H_2SO_4 concentrado foram adicionados e a reação foi agitada durante a noite. Mais 350 µl de H_2SO_4 concentrado foi adicionado e a agitação continuou por mais 5 horas, durante as quais mais H_2SO_4 foi adicionado em duas porções (500 µl e 250 µl). Em seguida, água (3 x volume de reação) foi adicionada e a mistura foi agitada até a temperatura

ambiente ser atingida. A mistura de reação foi extraída com acetato de etila (3 x volume de reação). As fases foram separadas e a fase orgânica foi concentrada para produzir um óleo viscoso amarelo escuro. O produto bruto foi purificado por HPLC preparativa (coluna XBridge; eluentes tampão de carbonato de amônio 50 mM em pH 10 e metanol) fornecendo o produto titulado como um sólido amarelo (26,3 mg). Sistema de LCMS A: Rt 1,87 m/z $[M+H]^+$ 394,1, Sistema B: Rt 2,57.

(3E,5E)-3,5-bis[(4-fluorofenil)metilideno]-1-propilazepan-4-ona (composto # 1574)

[083] Azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) e 4-fluorobenzaldeído (0,416 g, 3,36 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (20 ml) e a solução foi agitada por 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (200 ml) foi adicionado lentamente e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Mais H_2SO_4 concentrado (1 ml) foi adicionado e a agitação continuou à temperatura ambiente. Outro ml de H_2SO_4 concentrado foi adicionado depois de 6 horas, e a reação foi agitada de novo durante a noite. No dia seguinte, outros 800 µl de H_2SO_4 concentrado foram adicionados e a agitação continuou durante um período de cinco dias, durante o qual duas porções de H_2SO_4 (1 ml e 0,5 ml) foram adicionadas à mistura de reação. Em seguida, água (3 x volume de reação) foi adicionada e a mistura agitada até temperatura ambiente ser atingida. A mistura de reação foi extraída com acetato de etila (10 x volume de reação). A fase orgânica foi concentrada por evaporação. Água foi adicionada ao resíduo. Um precipitado foi formado e filtrado. O sólido foi lavado com água e seco sob vácuo

para fornecer o intermediário 3 como um sólido amarelo. Uma porção (15 mg, 0,05 mmol) do mesmo foi dissolvido em DCE-propanal (4 µl, 0,06 mmol) adicionado, e a mistura foi agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, $NaBH(OAc)_3$ (15,7 mg 0,07 mmol) e ácido acético (2,6 ml, 0,05 mmol) foram adicionados e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A reação foi concentrada e o produto bruto foi purificado por LC preparativa, fornecendo o produto (7,2 mg) em 90% de pureza. Sistema de LCMS A: Rt 2,02 m/z $[M+H]^+$ 368,1, Sistema B: Rt 3,21.

(3E,5E)-3-[(4-metoxifenil)metilideno]-5-[(4-nitrofenil)-metilideno]-azepan-4-ona (composto #1575)

[084] Azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) e 4-nitrobenzaldeído (253 mg, 1,68 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (20 ml) e agitados durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (1 ml) foi adicionado lentamente e a mistura agitada à temperatura ambiente durante 8 dias. em dias. Nos dias 1 a 3, uma porção de H_2SO_4 concentrado por dia foi adicionada (0,5 ml, 0,75 ml e 0,5 ml). Água (2 x volume de reação) foi adicionado e a mistura foi extraída com acetato de etila (2 x volume de reação). A fase orgânica foi concentrada por evaporação e seca para produzir o intermediário bruto 4. Uma porção do intermediário 4 (100 mg, 0,41 mmol) foi dissolvida em ácido acético (6 ml) e agitada durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (0,6 ml) foi adicionado lentamente e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante 6 dias. Após a adição de água, o produto precipitou como um sólido amarelo. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco

sob vácuo para fornecer o composto titulado como um sólido amarelo com 98% de pureza. Sistema de LCMS A: Rt 1,82 m/z $[M+H]^+$ 365,1, Sistema B: Rt 2,41. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) [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)metilideno]-3-[(4 metoxifenil)metilideno]-1-metilazepan-4-ona (composto # 1577)

[085] N-metilazepan-4-ona (75 mg, 0,46 mmol) e 4-fluorobenzaldeído foi dissolvido em ácido acético (7 ml) e agitada durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (350 ml) foi adicionado lentamente e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 dias. Mais H_2SO_4 concentrado foi adicionado durante os dias 2 a 4 (0,175 ml, 0,35 ml, 0,25 ml, respectivamente). Água foi adicionada e a solução foi extraída com acetato de etila (duas vezes o volume da mistura de reação). A fase orgânica foi concentrada para produzir o intermediário 5. Uma porção desse intermediário (35 mg, 0,15 mmol) e 4-metoxibenzaldeído (17 µl, 0,15 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (2,5 ml) e agitada durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (0,20 ml) foi adicionado lentamente e a reação foi agitada durante cinco dias. Água (2 x o volume de reação) foi adicionada e a mistura de reação extraída com acetato de etila (2 x volume de reação). A camada orgânica foi concentrada e água foi adicionada. Um precipitado foi formado e filtrado para fornecer o produto titulado (11,2 mg) em 91% de pureza como

um sólido amarelo. Sistema de LCMS A: Rt 1,86 m/z $[M+H]^+$ 352,1, Sistema B: Rt 2,79.

(3E,5E)-1-acetil-5-[(4-fluorofenil)metilideno]-3-[(4 etoxifenil)metilideno]azepan-4-ona (composto # 1579)

[086] Azepan-4-ona (0,25 g, 1,68 mmol) e 4-fluorobenzaldeído (179 µl, 1,68 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (20 ml) e agitados durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (1 ml) foi adicionado lentamente e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 dias com a adição de H_2SO_4 concentrado durante os primeiros três dias (0,5 ml, 0,75 ml e 0,5 ml, respectivamente). Água (2 x o volume de reação) foi adicionada e a mistura foi extraída com acetato de etila (2 x volume de mistura). A fase orgânica foi concentrada e seca para fornecer o intermediário bruto 6. Uma porção desse intermediário (100 mg, 0,46 mmol) foi dissolvida em ácido acético (6 ml) e agitada durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (0,6 ml) foi adicionado lentamente e a reação agitada à temperatura ambiente durante 7 dias. Água foi adicionada (1 x volume) e a mistura foi neutralizada com $NaHCO_3$ aquoso saturado. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água e seco sob vácuo para obter o intermediário 7 (31,5 mg) como um sólido amarelo com 91% de pureza. Sistema de LCMS A: Rt 1,85 m/z $[M+H]^+$ 338. Intermediário 7 (10 mg) foi dissolvido em DCM (1 ml) e TEA (5,0 ml, 0,04 mmol) foi adicionado. A mistura foi agitada durante 10 minutos, em seguida, cloreto de acetila (2,3 µl, 0,03 mmol) foi adicionado e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos. A reação foi lavada com água, $NaHCO_3$ aquoso saturado e soro fisiológico. A fase orgânica foi

concentrada para fornecer o composto titulado (6,4 mg) como um sólido amarelo com 90% de pureza. Sistema de LCMS A: Rt 2,35 m/z $[M+H]^+$ 380,1, Sistema B: Rt 2,37. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): [ppm] = 1,70, 1,90, 1,98 e 1,99 (4 x s, 3H, CH_3-CO-, os sinais provenientes dos dois regioisômeros e seus rotâmeros de etila), 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, os sinais provenientes dos dois regioisômeros e seus rotâmeros de acetato), 4,65-4,68 (m, 2H), 7,0-7,04 e 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)metilideno]-3-[(4-nitrofenil)-metilideno]-azepan-4-ona (composto # 1583)

[087] N-metilazepan-4-ona (75 mg, 0,46 mmol) e 4-clorobenzaldeído (64 mg, 0,46 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (7 ml) e agitados durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (350 ml) foi adicionado lentamente e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 dias. Mais H_2SO_4 concentrado foi adicionado durante os dias 2 a 4 (0,175 ml, 0,35 ml, 0,25 ml, respectivamente). Água (2 x volume de reação) foi adicionado e a solução foi extraída com acetato de etila (2 x volume de reação). A fase orgânica foi concentrada para fornecer o intermediário 8. Uma porção do intermediário (35 mg, 0,14 mmol) e 4-nitrobenzaldeído (69,5 mg, 0,46 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (2,5 ml) e agitados durante 10 minutos, em seguida, H_2SO_4 concentrado (200 µl) foi adicionado lentamente e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 5 dias. Mais H_2SO_4 concentrado (0,2 ml) foi adicionado, e a agitação continuou por 5 dias. Água (2 x volume de reação) foi adicionada e a solução foi

extraída com acetato de etila (2 x volume de reação). A fase orgânica foi concentrada e o resíduo foi purificado por LC preparativa para fornecer o composto titulado (1,8 mg) como um sólido amarelo com 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-butiloxicarbonil
ACN	acetonitrila
DCM	diclorometano
TFA	ácido trifluoroacético
DMF	dimetilformamida
TEA	trietilamina
Rt	tempo de retenção
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio)
Rt	Temperatura ambiente
LC	Cromatografia líquida
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
DCE	1,2-dicloroetano

[088] EXEMPLO 3. *Composição farmacêutica A (suspensão aquosa*). O composto da invenção (25 mg) é dissolvido em 1 ml de dimetil sulfóxido. A solução é adicionada gota a gota a 10 ml de solução soro fisiológico agitada vigorosamente. A suspensão formada, que pode ser estabilizada por adição de 1% em peso de PVP, pode ser usada para a administração intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

[089] EXEMPLO 4. Composição farmacêutica B (comprimido). Os comprimidos para administração oral são produzidos misturando 2,0 g do composto da presente

invenção (pó, < 10 mμ, 90%) com celulose microcristalina (1,30 g), amido de milho (0,50) g, sílica (0,20) g, estearato de Mg (0,12 mg). A mistura é comprimida a seco em comprimidos de 400 mg que são revestidos com açúcar.

[090] EXEMPLO 5. Composição farmacêutica C (solução). O composto da invenção (10 mg) é dissolvido em 0,5 ml de Cremophor EL (BASF Corp) e etanol absoluto foi adicionado a 1,0 ml. A solução transparente é vertida em frascos de vidro para injeção.

[091] EXEMPLO 6. *Composição farmacêutica D (solução).* Para a administração intraperitoneal em estudos em animais uma composição aquosa de uma solução estoque foi preparada por dissolução do composto da invenção a uma concentração de 2 mg/ml em Chremaphor EL/ polietilenoglicol 400 a 1:1. (v/v), à temperatura ambiente ou por aquecimento até cerca de 80°C assistida por ultrassonicação. Uma alíquota da solução estoque foi diluída 1:10 com soro fisiológico 0,9% e usada imediatamente para a injeção IP.

[092] EXEMPLO 7. *Composição farmacêutica E (solução).* Para administração intraperitoneal uma solução estoque Kolliphor HS15 25% em peso foi preparada por fusão de um recipiente inteiro de Kolliphor HS15 (Sigma 42966) por aquecimento a 60°C e diluição com água deionizada até 25% p/p. Ao composto # 1570 (18,0 mg) em um tubo de ensaio 10 ml foram adicionados 10,0 ml da solução estoque e o tubo vórtificado, tratado com ultrassom em cerca de 50°C durante cerca 2 horas, e, ocasionalmente, aquecida a cerca de 83°C. A solução transparente obtida foi filtrada por esterilização através de um filtro de seringa de celulose de 0,2 μm antes da injeção. Pelo mesmo procedimento

soluções de compostos # 1546 e # 1571 foram preparadas; estes compostos não foram, contudo, totalmente dissolvidos. O resíduo não dissolvido foi pesado, e o peso deduzido do peso inicial do composto (18 mg). Verificou-se que as soluções preparadas (10 ml) continham 8,5 mg e 11,0 mg, respectivamente, dos compostos # 1546 e # 1571.

[093] *EXEMPLO 8. Composição farmacêutica F (solução).* Para administração intraperitoneal uma solução estoque de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Aldrich 332593) foi preparada por dissolução da ciclodextrina em água deionizada a uma concentração de 30 % p/p. Ao composto # 1649 (15,0 mg) em um tubo de ensaio de 10 ml foram adicionados 10,0 ml de solução estoque. O tubo foi submetido ao vórtice, tratado com ultrassom em cerca de 50°C durante cerca de 2 horas, e, ocasionalmente, aquecida a cerca de 83°C. A solução obtida foi filtrada por esterilização através de um filtro de seringa de celulose de 0,2 µm antes da injeção. O peso residual composto # 1659 não dissolvido foi determinado e usado para corrigir a concentração da solução filtrada para 82,5% da concentração tentada. Pelo mesmo processo uma solução do composto # 1546 foi preparada.

[094] EXEMPLO 9. *Composto da invenção induz a inibição do proteassoma.* A linhagem de células repórter MelJuSo Ub-YFP, que é desenhada para acumular proteína fluorescente amarela (YFP) sobre a inibição do proteassoma (12), foi utilizada para a avaliação do composto. O acúmulo de YFP foi medido durante 48 horas em um sistema IncuCyte-FLR (Essen Bioscience, Essen, Reino Unido), que é um microscópio de fluorescência automático. Números de células

positivas por campo foram usados como uma medida da inibição de proteassoma.

[095] EXEMPLO 10. *Determinação da solubilidade de compostos da presente invenção em meio aquoso.* Nos diagramas das Figuras 2a a 2e solubilidade é expressa como log S (mmol/ml; software ACD/Labs Inc.). Solubilidade é determinada em tampão aquoso em vários valores de pH e previstos por água pura a 25°C. O algoritmo utiliza um conjunto de > 6.800 compostos como referências. Os diagramas mostram que azepanonas da invenção podem ter uma solubilidade substancialmente aumentada, por exemplo, por um fator de 2 ou mais, em meio aquoso com um pH fisiológico, tal como em um pH de 6 a 8, em particular de 7,0 a 7,5, em comparação com piperidin-4-onas correspondentemente substituídas.

Exemplo 11. Azepanos/azepanonas da invenção exibem maior citotoxicidade do que piperidinas/piperidin-4-ones estruturalmente correspondentes.

[096] As Figuras 3b, 3d, 3f são diagramas que ilustram a citotoxicidade dos compostos de acordo com a invenção nºs 1546, 1547, e 1570 com uma porção de anel de 7 membros, em comparação com compostos estruturalmente correspondentes não abrangidos pela invenção, com uma porção de anel de 6 membros. A sua indução de citotoxicidade, dose-dependente foi determinada após 72 horas de exposição do composto contínua à linhagem de células repórteres HCT-116. As células tratadas foram comparadas com controles não tratados. A citotoxicidade é visualizada como índice de sobrevivência (IS) sobre faixa de cerca de 90% de IS a cerca de 0% IS, em dependência da concentração do composto.

Depreende-se das figuras que os compostos da invenção são mais citotóxicos que os compostos de referência, uma vez que eles estão produzindo o mesmo nível de citotoxicidade com menor concentração.

Referências

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 69, 20878-20884,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed &dopt=Citation&list_uids=8063704 (1994) (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 activate p53-independent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 192-197, *permeabilization by compounds that* 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, 333-338 333-338, 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 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).

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).

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).

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. 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).

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).

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).

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 da*mage. Science 282, 1497-1501 (1998).

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).

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).

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).

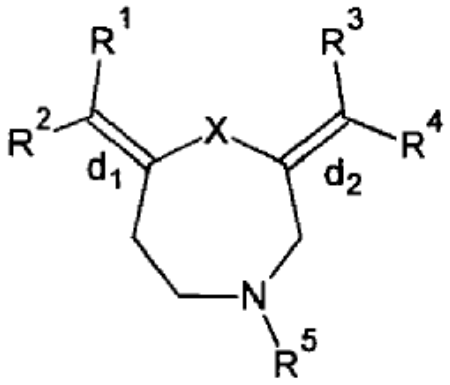
30. Guterman, A & Glickman, M H, *Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome*. J Biol Chem 279, 1729-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200M307050200 [pii] (2004).

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).

REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado pelo fato de que apresenta a estrutura geral S-1 capaz de inibir a atividade desubiquitinadora (DUB) do 19S RP Dubs



S-1

em que R^1, R^2 em ligação dupla d1 e R^3, R^4 em dupla ligação d2 podem, independente um do outro, ter uma configuração oposta àquela da fórmula S1,

X é CO ou CS;

R^1 e R^3 são H,

R^2 e R^4 são, independentemente um do outro, H, C_{1-6}-alquila; C_{1-5}-alquil-CO; fenila ou heteroarila de 6 membros opcionalmente substituída por 1-3 de: C_{1-6}-alquila, C_{1-6}-alcoxi, CN, -$COOC_{1-6}$-alquila, COOH, NO_2, F, Cl, CF_3, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}\text{-alquila})_2$, $CONR^7R^8$, com a condição de que um ou mais de H em alquila e alcoxi podem ser substituídos por flúor;

R^5 é qualquer de H, C_{1-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-3}-alcoxi-C_{2-6}-alquila-, C_{1-3}-alcoxi-C_{2-6}-alquenila-, aril-C_{0-6}-alquila-, heteroarila-C_{0-6}-alquila-, heterociclila-C_{0-6}-alquila-, cicloalquila-C_{0-6}-alquila-, -C_{1-6}-alquila-$COOC_{1-6}$-alquila, -C_{2-6}-alquila-ariloxi, COR^6;

R^6 é qualquer de C_{1-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-6}-alcoxi, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquila-, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquenila-, aril-C_{0-6}-alquila-, heteroarila-C_{0-6}-alquila-, heterociclila-C_{0-6}-alquila-, cicloalquil-C_{0-6}-alquila-, -C_{1-6}-alquila-$COOC_{1-6}$-alquila, NH_2, -NHC_{1-6}-alquila, -$N(C_{1-6}$-alquila$)_2$, -C_{0-6}-alquila-ariloxi;

R^7, R^8 são, independentemente um do outro, H ou C_{1-3}-alquila.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X = CO.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R^2 e R^4 são fenil substituído em uma ou mais das posições 3, 4, 5.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R^5 é COR^6 e R^6 é C_{1-6}-alquila ou C_{2-6}-alquenila.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R^6 é C_{2-6}-alquenila.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R^6 é C_{1-6}-alquila.

7. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^1, R^2 em ligação dupla d1 e R^3, R^4 em ligação dupla d2 tem a configuração da fórmula S-1,

X é CO ou CS;

R^1 e R^3 são, independentemente um do outro, H;

R^2 e R^4 são, independentemente um do outro, H, C_{1-6}-alquila, C_{1-5}-alquil-CO, fenila ou heteroarila de 6 membros substituída com 1-3 de: CN, NO_2, F, Cl, NH_2, NHC_{1-6}-alquila, $N(C_{1-6}$-alquila$)_2$, COC_{1-6}-alquila;

R^5 é H, C_{1-6}-alquila, C_{2-6}-alquenila, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquila, C_{1-3}-alcoxi-C_{1-6}-alquenila-, arila, heteroarila, heterociclila, -C_{1-6}-alquila-heteroarila, C_{1-6}-alquila-heterociclila, C_{1-6}-alquila-cicloalquila, C_{1-6}-alquila-arila, CO-C_{1-6}-alquila, CO-vinila, CO-alila, CO-arila, CO-cicloalquila.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que X é CO.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que R^2 e R^4 são fenila substituída.

10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que R^5 é selecionado dentre CO-C_{1-6}-alquila, CO-cicloalquila, CO-vinila, CO-alila.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que R^5 é CO-vinila.

12. Composto, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que R^5 é CO-C_{1-6}-alquila.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de ser na forma de um comprimido ou cápsula, ou outra preparação de dose única para administração peroral.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de ser na forma

de uma solução ou suspensão em um veículo líquido farmaceuticamente aceitável para injeção ou infusão.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de ser para administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou injeção subcutânea ou infusão.

17. Uso de um composto, como definido em qualquer das reivindicações 1 a 12, ou de uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor cancerígeno em um paciente.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir de mieloma múltiplo, câncer da mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de pâncreas.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a dose farmaceuticamente eficaz é de 0,0001g/kg a 0,1 g/kg de peso corporal, em particular a partir de 0,001g/kg a 0,01g/kg de peso corporal, sendo administrado sistemicamente ou localmente.

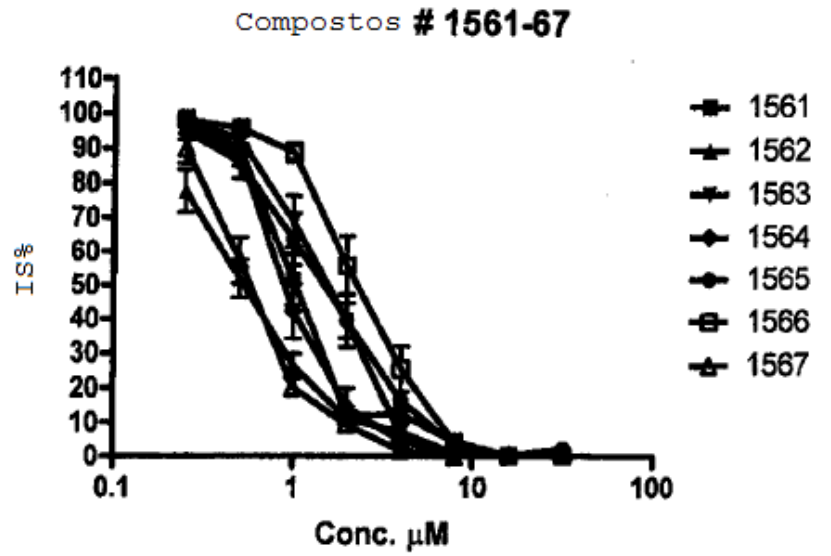


Fig. 1a

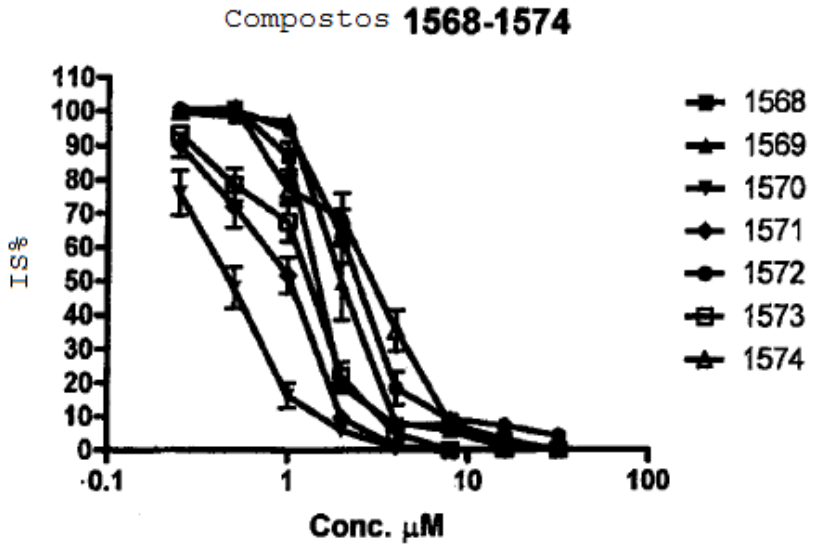


Fig. 1b

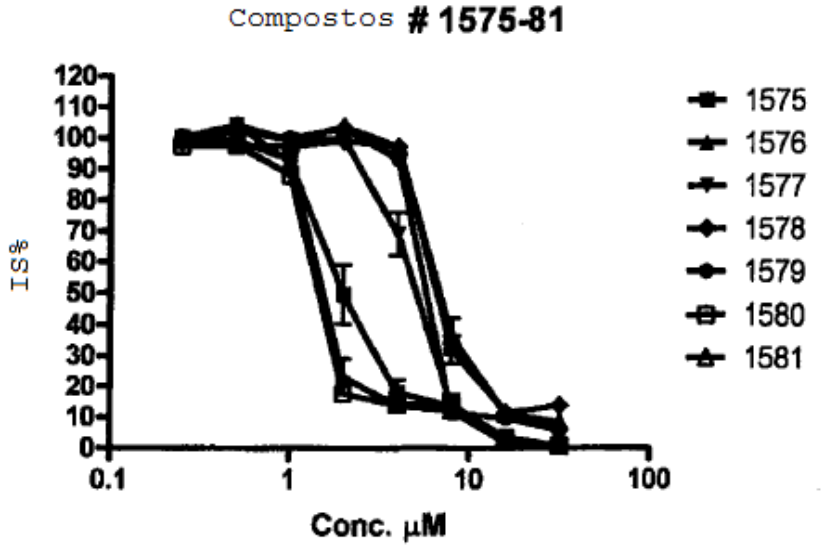


Fig. 1c

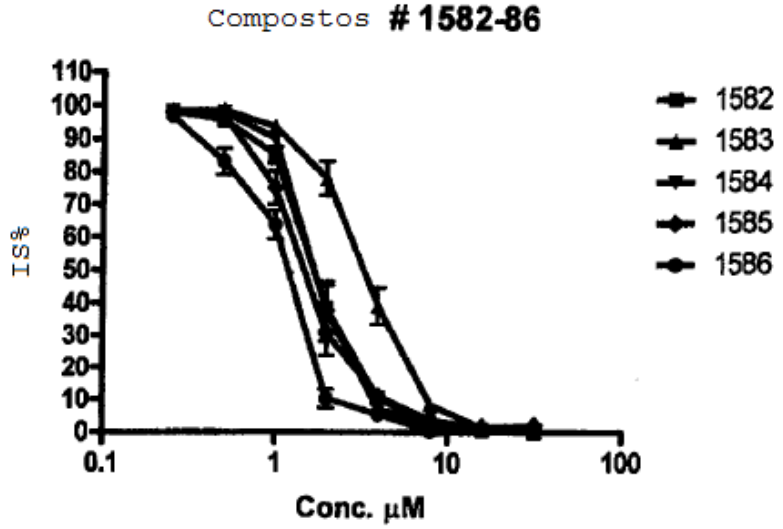


Fig. 1d

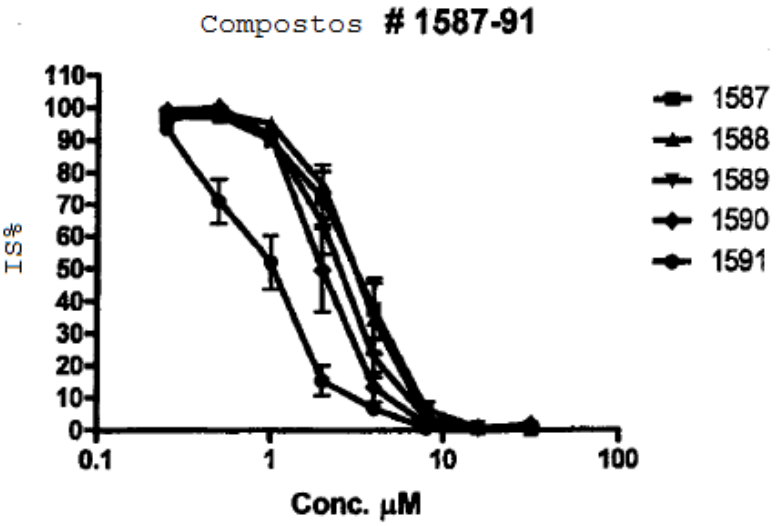


Fig. 1e

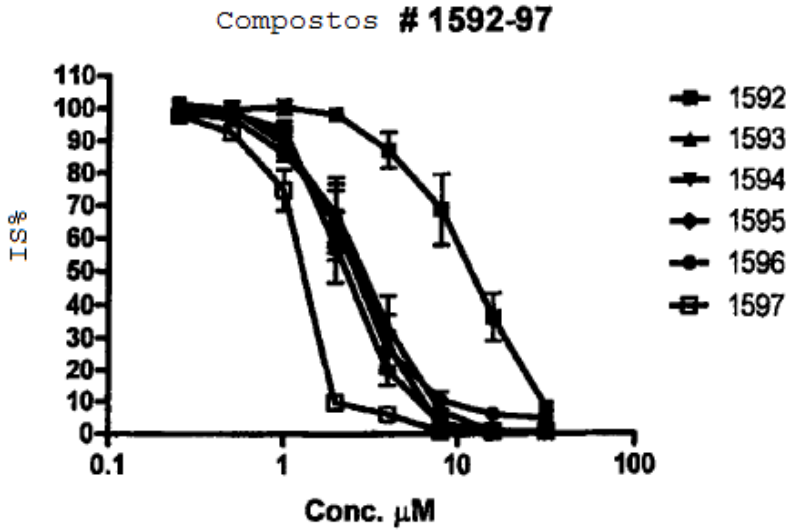


Fig. 1f

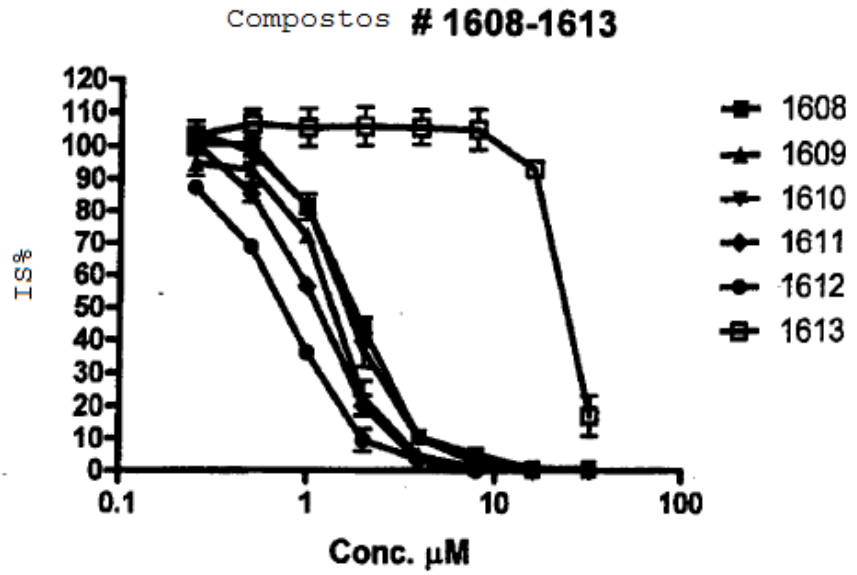


Fig. 1g

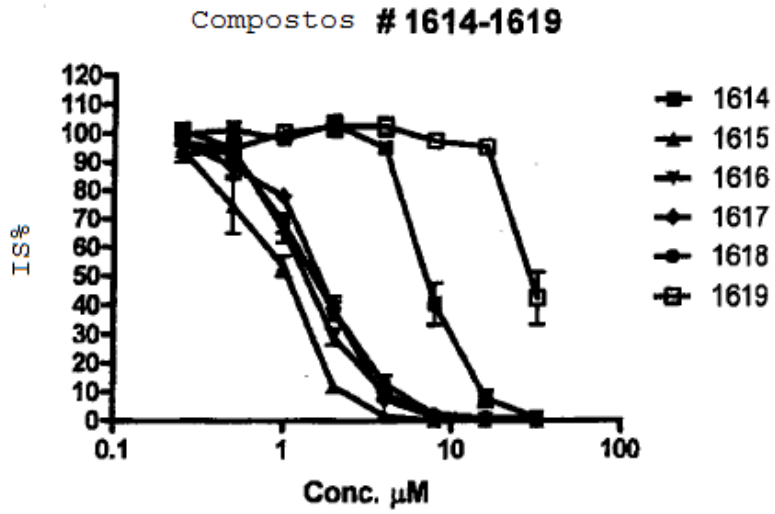


Fig. 1h

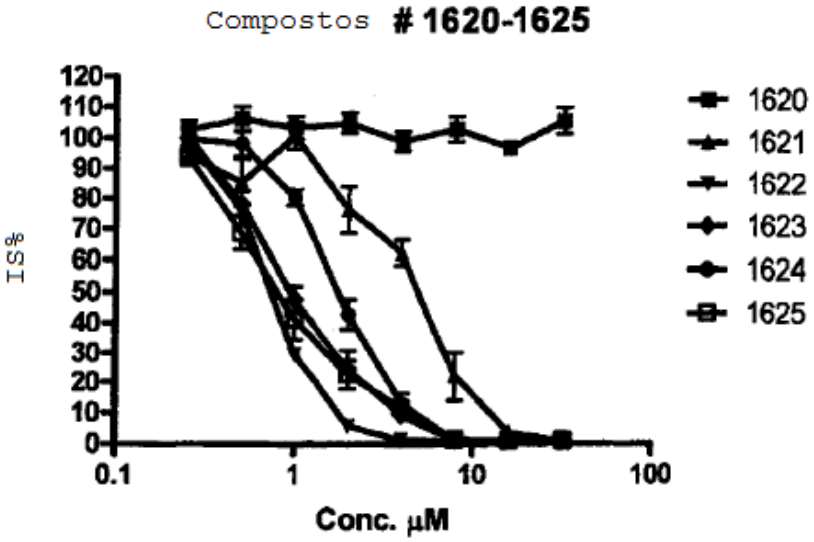


Fig. 1i

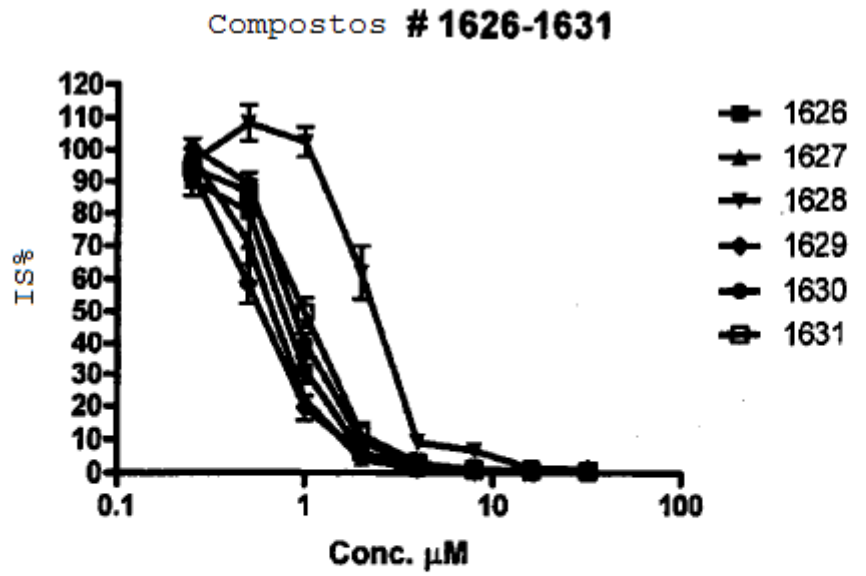


Fig. 1j

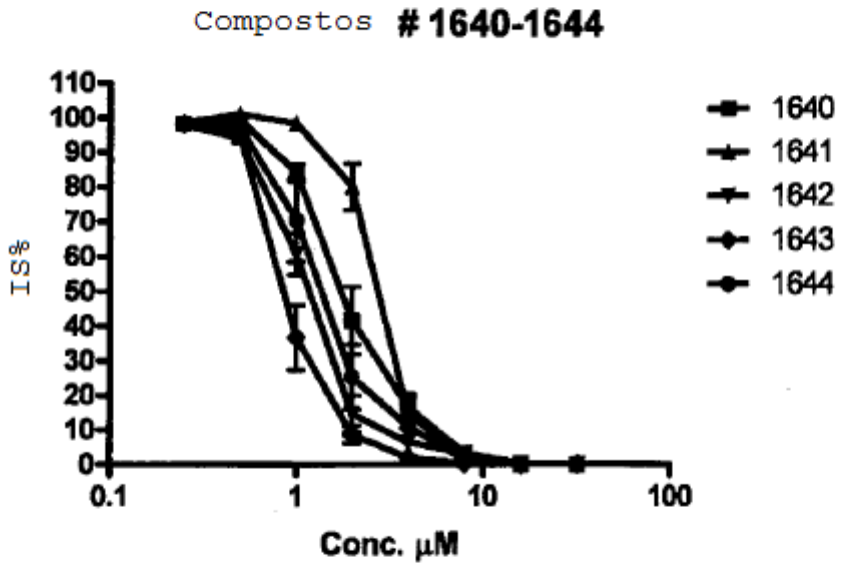


Fig. 1k

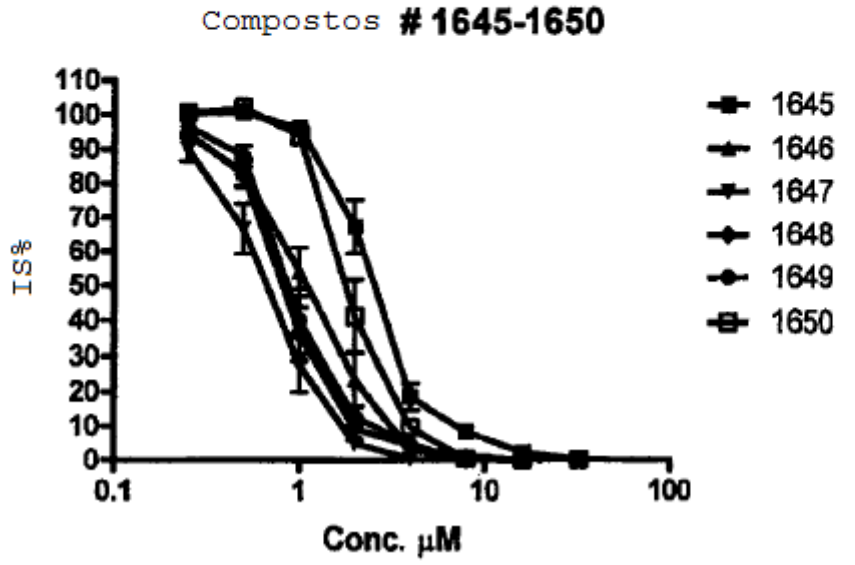


Fig. 1l

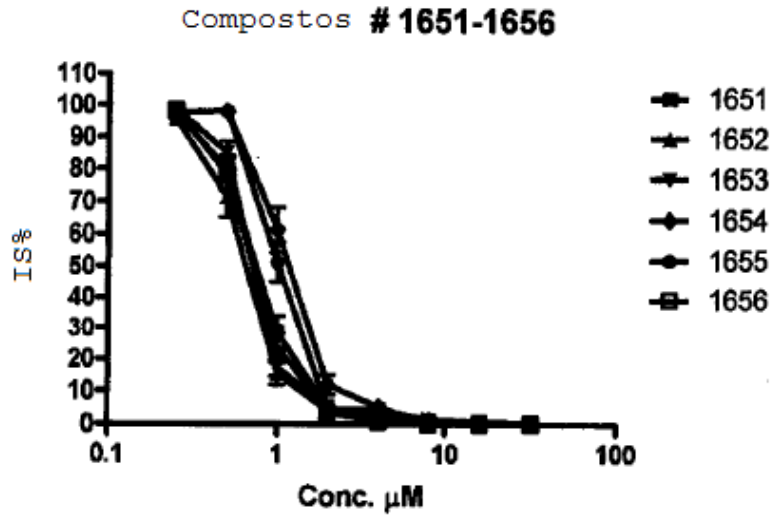


Fig. 1m

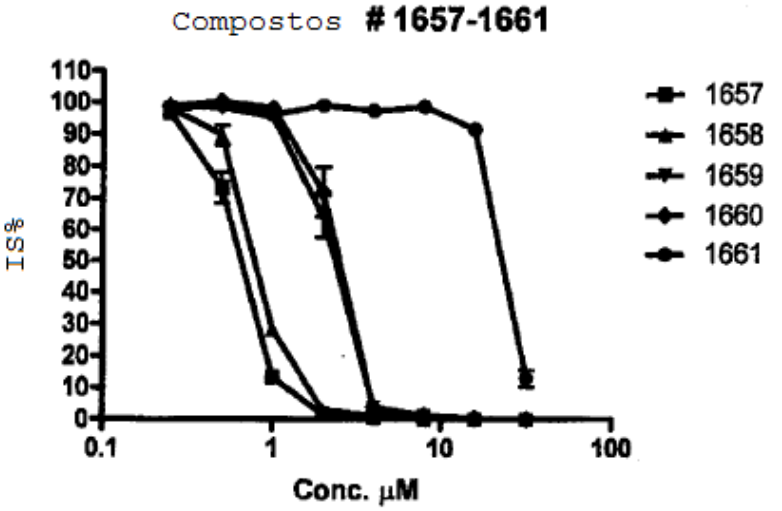


Fig. 1n

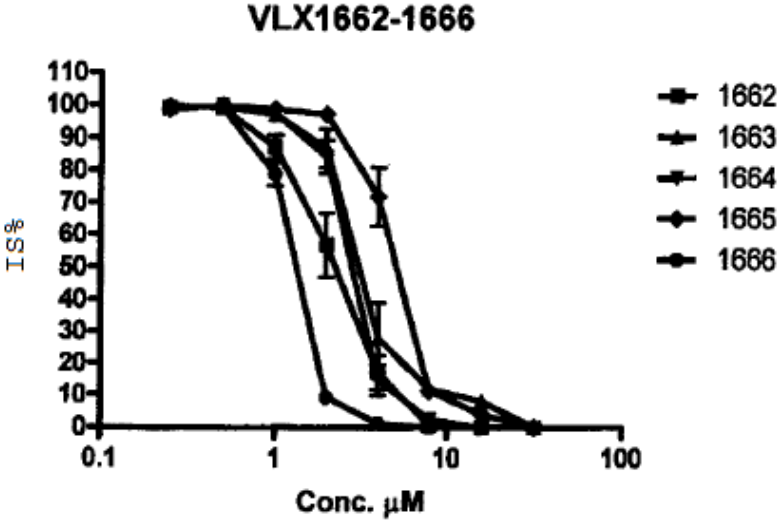


Fig. 1o

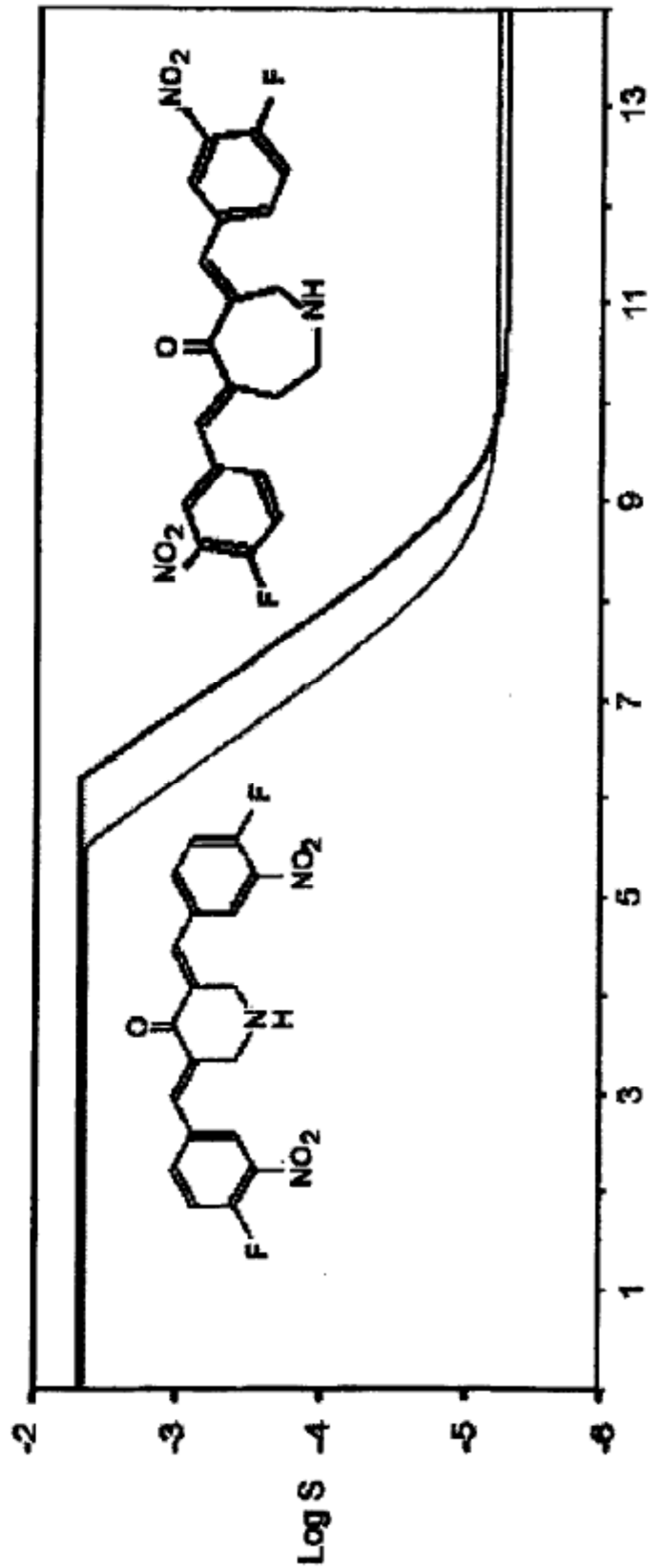


Fig. 2a

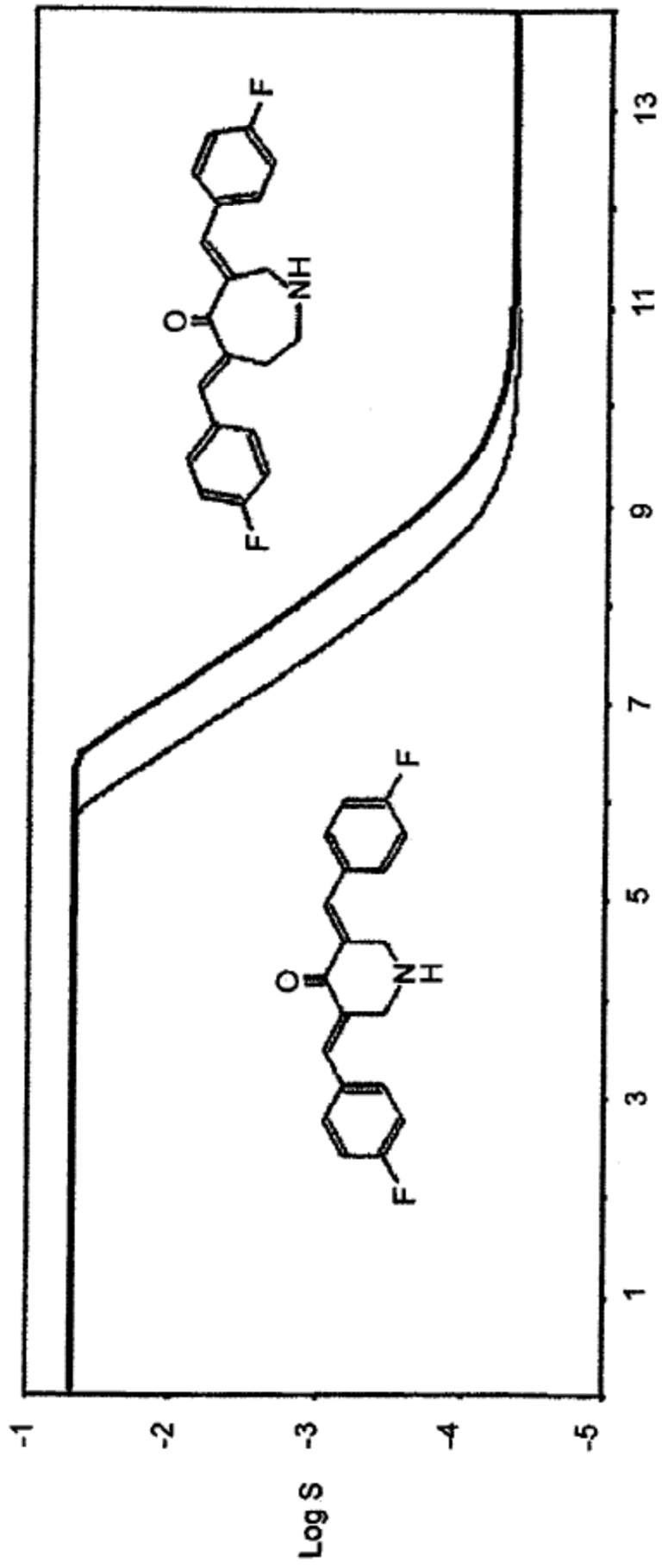


Fig. 2b

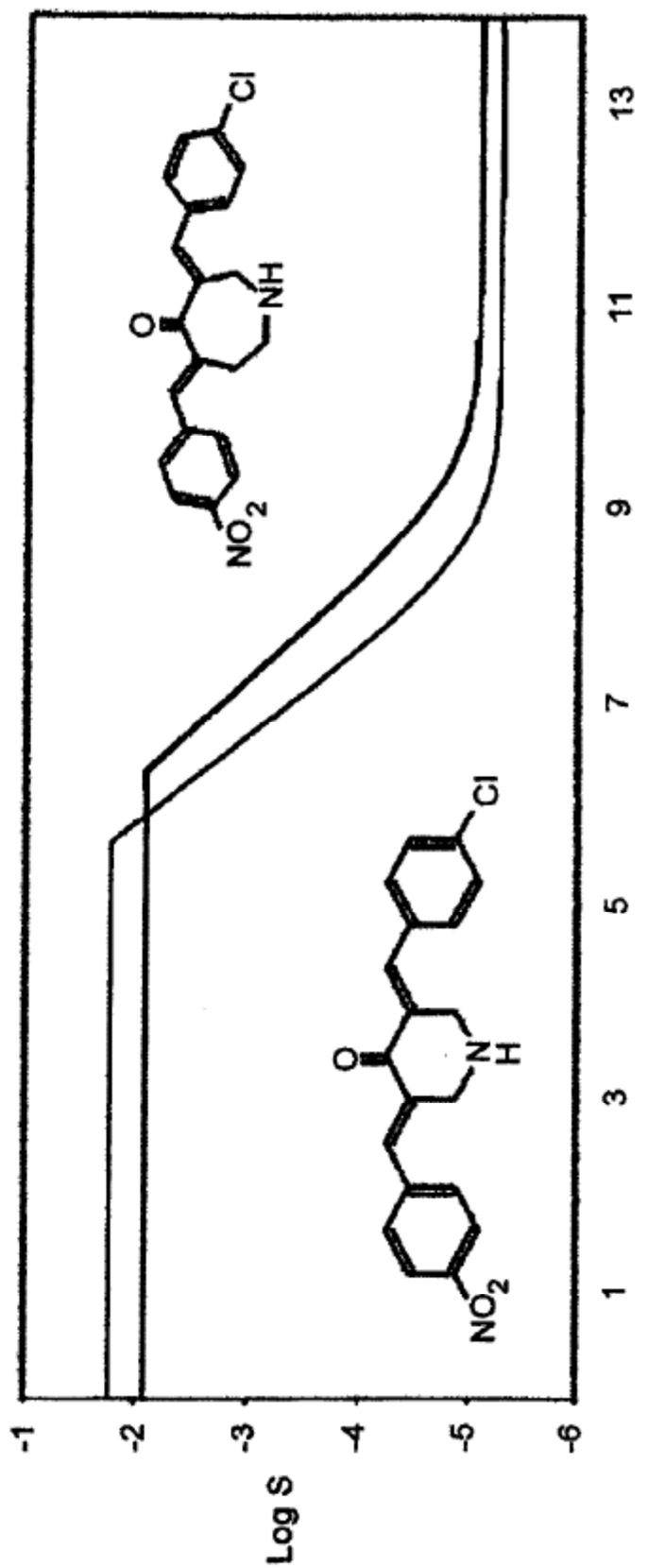


Fig. 2c

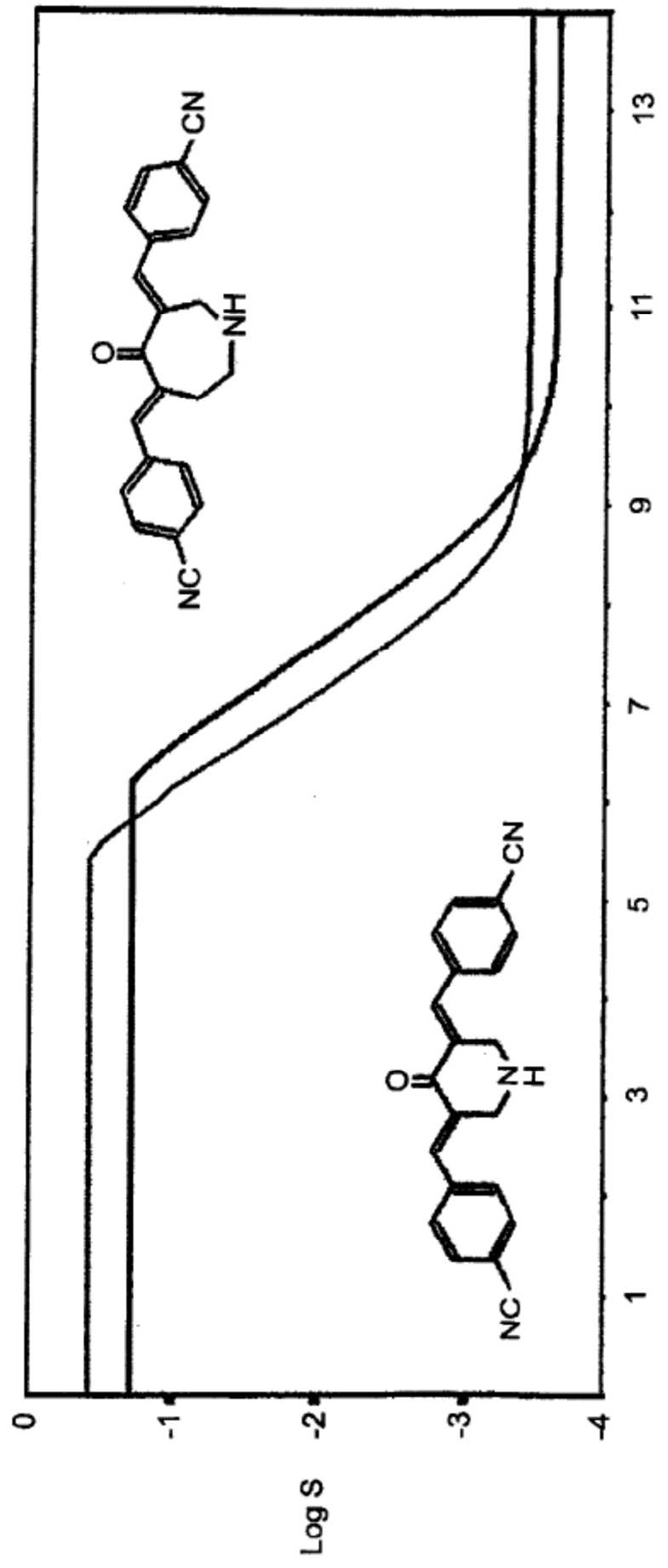


Fig. 2d

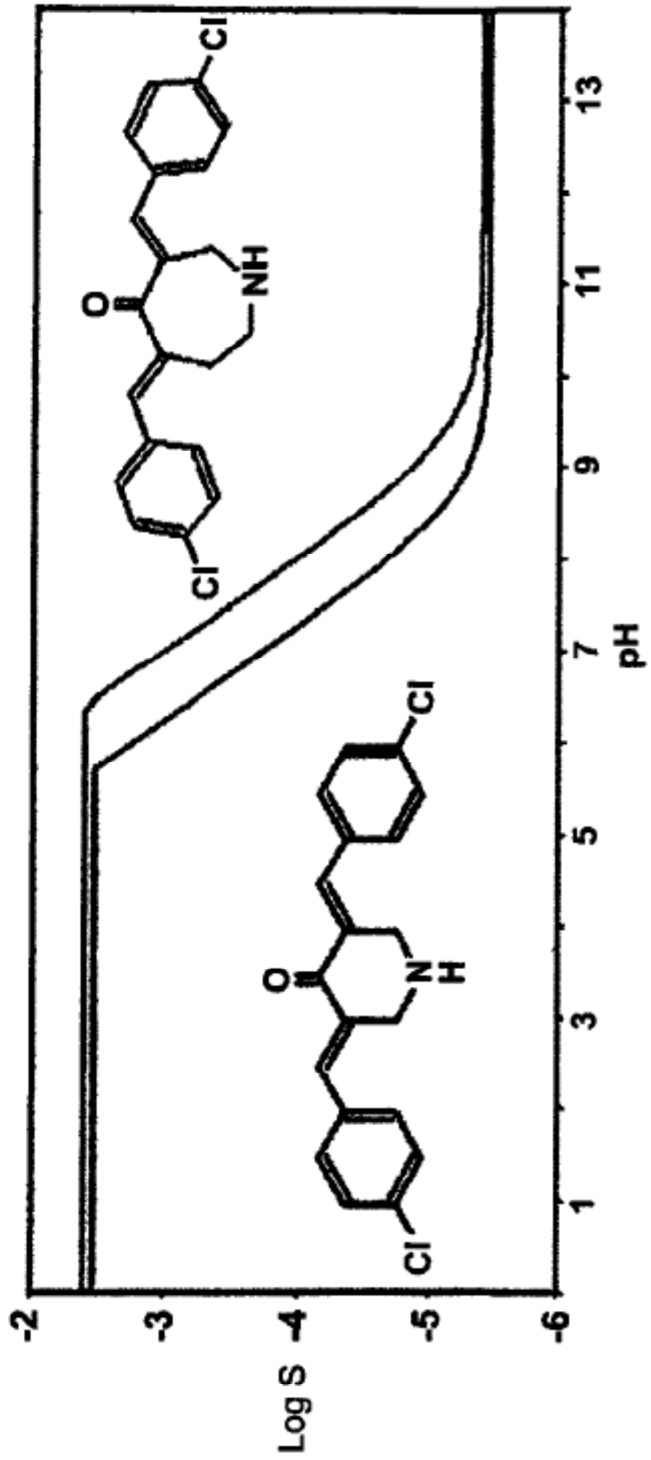


Fig. 2e

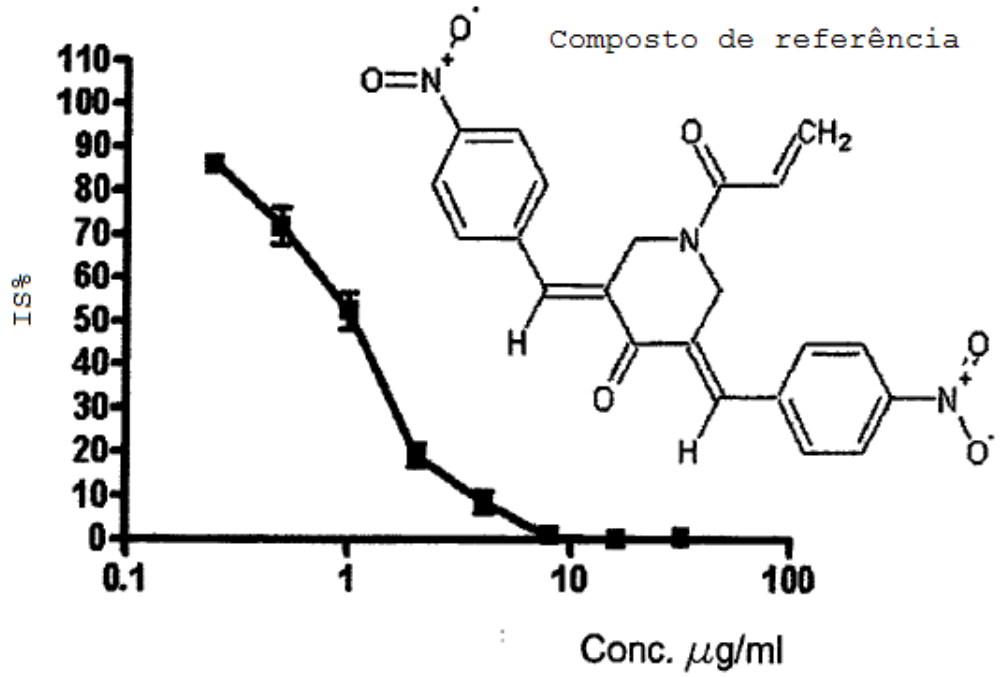

Composto de referência
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3a

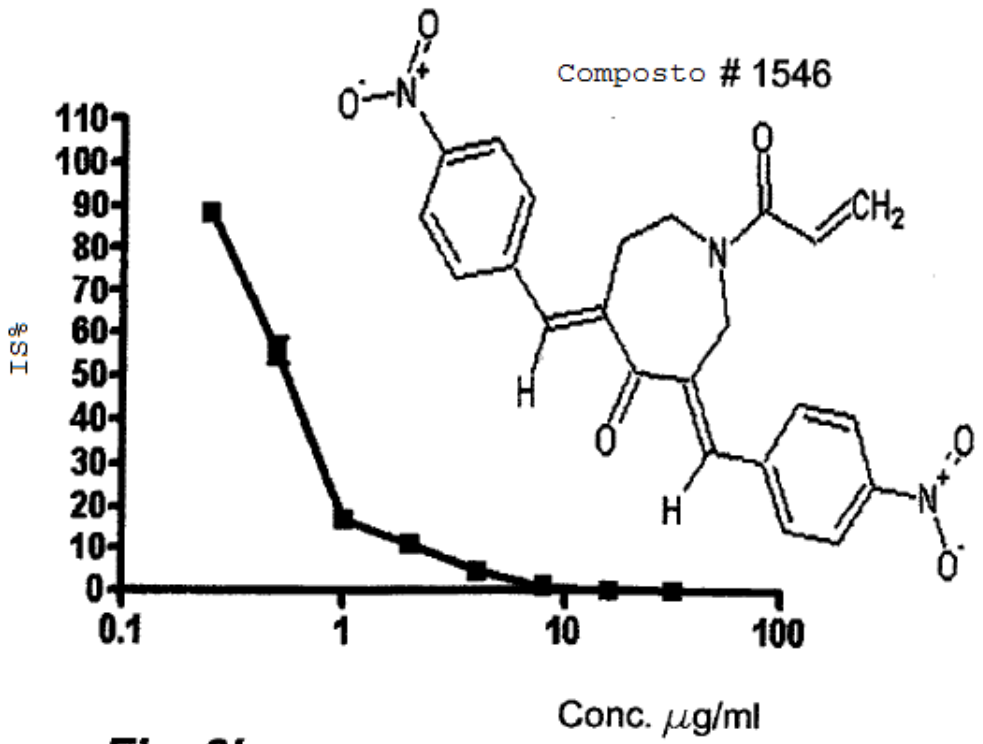

Composto # 1546
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3b

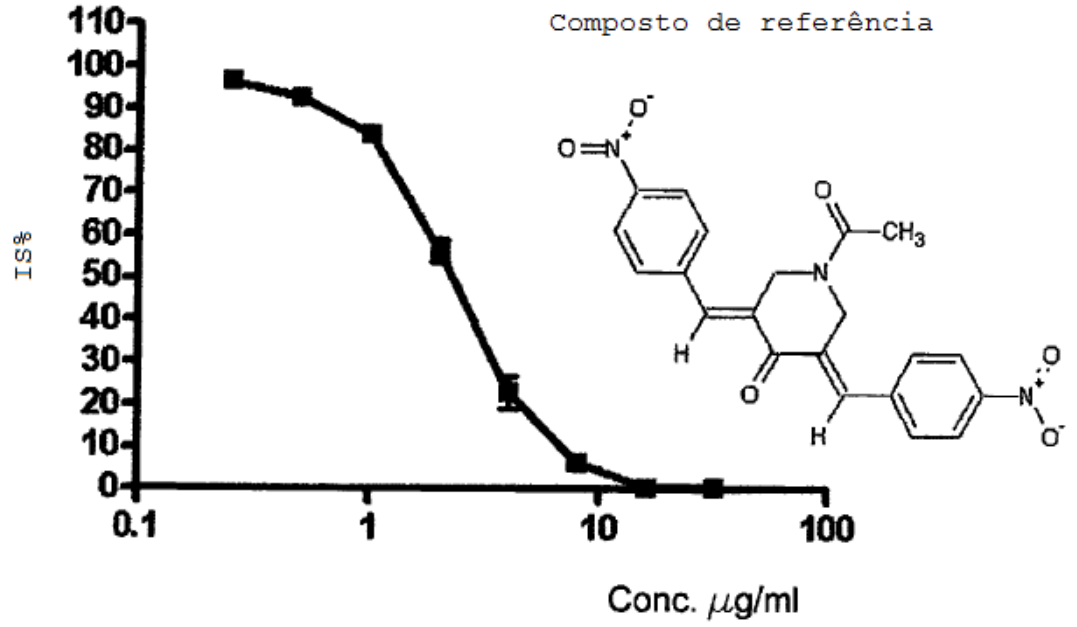

Composto de referência
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3c

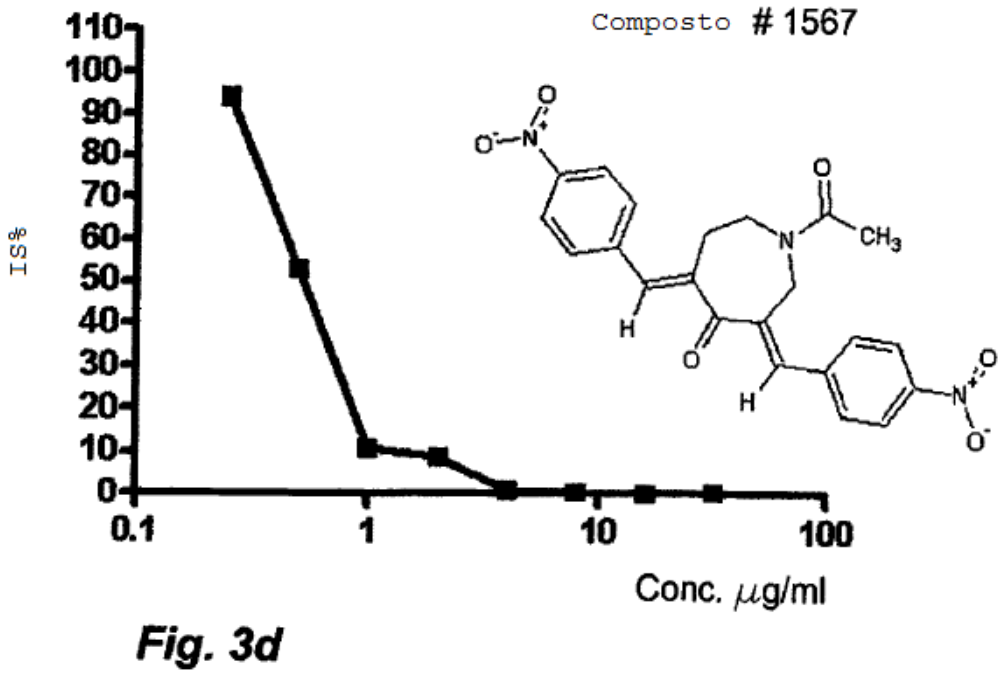

Composto # 1567
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3d

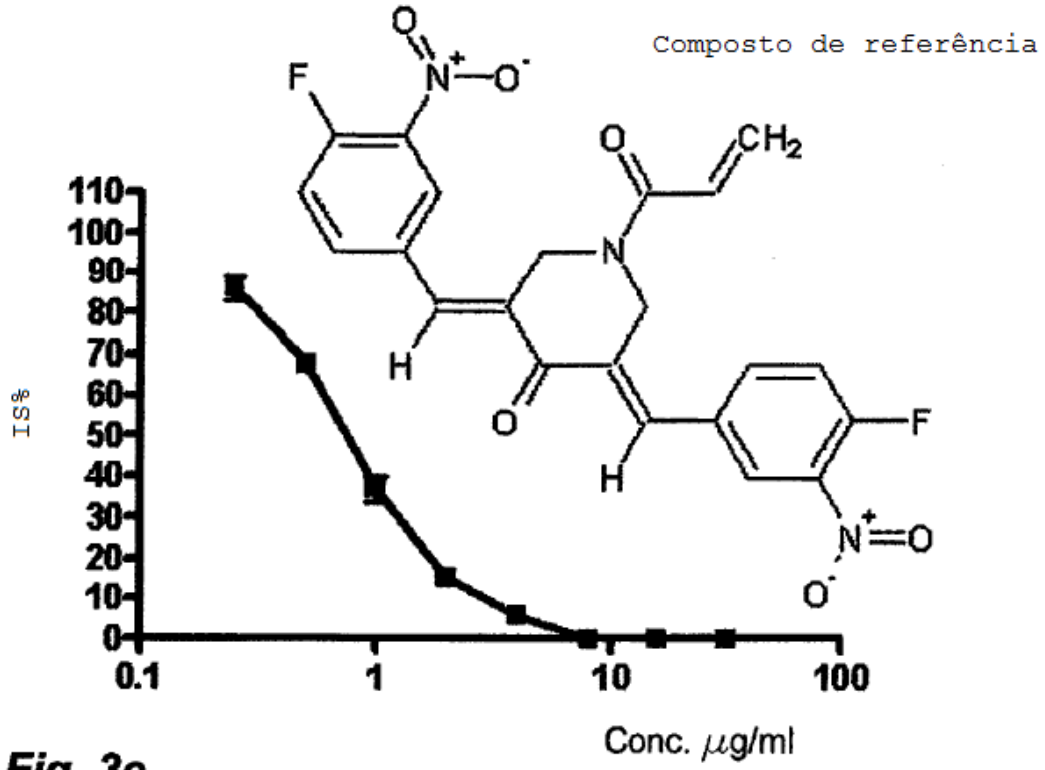

Composto de referência
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3e

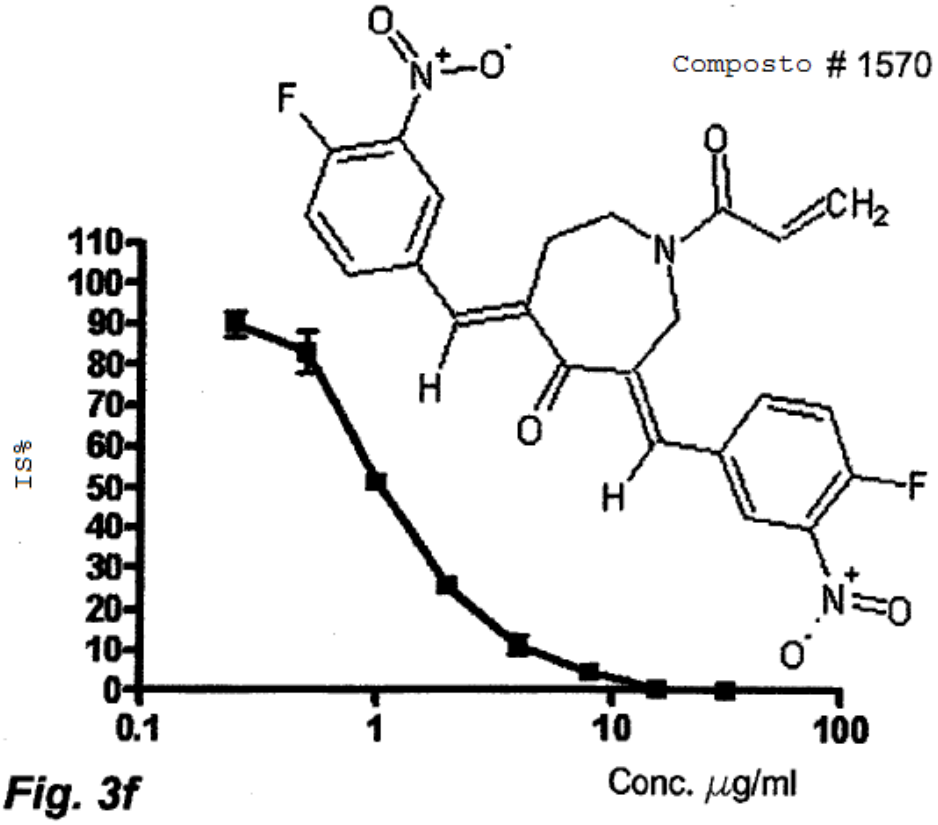

Composto # 1570
IS%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Conc. μg/ml

Fig. 3f