



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 470**

51 Int. Cl.:  
**C07C 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04781132 .8**

96 Fecha de presentación : **13.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1658255**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **Inhibidores del proteasoma y procedimientos de utilización.**

30 Prioridad: **14.08.2003 US 495364 P**  
**12.08.2004 US 918610**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.06.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.06.2009**

73 Titular/es: **CEPHALON, Inc.**  
**41 Moores Road, P.O. Box 4011**  
**Frazer, Pennsylvania 19355, US**

72 Inventor/es: **Chatterjee, Sankar;**  
**Iqbal, Mohamed;**  
**Menta, Ernesto y**  
**Oliva, Ambrogio**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 322 470 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores del proteasoma y procedimientos de utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de ácido borónico y éster borónico útiles como inhibidores del proteasoma y para la modulación de la apoptosis.

10 **Antecedentes de la invención**

El proteasoma, (al que también se denomina proteasa multicatalítica (MCP), proteinasa multicatalítica, complejo de la proteinasa multicatalítica, complejo de la endopeptidasa multicatalítica, 20S, 26S, o ingensina) es un gran complejo multiproteína presente en el citoplasma y en el núcleo de todas las células eucariotas. Es una estructura celular altamente conservada que es responsable de la proteólisis dependiente de ATP de la mayoría de las proteínas celulares (Tanaka, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1998, 247, 537). El proteasoma 26S está constituido por un complejo catalítico nuclear 20S que está rematado en cada extremo por una subunidad reguladora 19S. El proteasoma 20S de las archaeobacterias contiene catorce copias de dos tipos de subunidades distintas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que forman una estructura cilíndrica constituida por cuatro anillos apilados. Los anillos superior e inferior contienen siete subunidades  $\alpha$  cada uno, mientras que los anillos internos contienen siete subunidades  $\beta$ . El proteasoma 20S eucariotas más complejo está compuesto de aproximadamente 15 subunidades distintas de 20-30 kDa y se caracteriza por tres actividades principales con respecto a los sustratos peptídicos. Por ejemplo, el proteasoma exhibe actividad tipo tripsina, actividad tipo quimotripsina, y actividad hidrolítica de péptidos peptidilglutamilo (Rivett, *Biochem. J.*, 1993, 291, 1 y Orłowski, *Biochemistry*, 1990, 29, 10289). Además, el proteasoma tiene un mecanismo de sitio activo único que se cree que usa un residuo de treonina como nucleófilo catalítico (Seemuller, y col., *Science*, 1995, 268, 579).

El proteasoma 26S es capaz de degradar proteínas que han sido marcadas por medio de la adición de moléculas de ubiquitina. Típicamente la ubiquitina se une a los grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas en un proceso de múltiples etapas que usa ATP y las enzimas E1 (activadora de ubiquitina) y E2 (conjugadora de ubiquitina). El proteasoma 26S reconoce las proteínas sustrato multiubiquitinadas y las degrada. Las cadenas multiubiquitina se liberan generalmente del complejo y la ubiquitina se recicla (Goldberg y col., *Nature*, 1992, 357, 375).

Numerosas proteínas reguladoras son sustratos para la proteólisis dependiente de la ubiquitina. Muchas de estas proteínas funcionan como reguladores de los procesos celulares patofisiológicos. Se ha implicado a las alteraciones en la actividad del proteasoma en una serie de patologías que incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, así como las heridas de reperfusión por oclusión/isquemia y el envejecimiento del sistema nervioso central.

La ruta de ubiquitina-proteasoma también desempeña una función en el crecimiento neoplásico. Se cree que la degradación regulada de las proteínas tales como las ciclinas, los inhibidores de CDK2, y los supresores tumorales es importante en la progresión del ciclo celular y la mitosis. Un sustrato conocido del proteasoma es el supresor de tumores p53 que está involucrado en varios procesos celulares (véase, por ejemplo, Ko, L. J. *Genes Dev.*, 1996, 10, 1054). Se ha mostrado que el supresor de tumores p53 induce la apoptosis en varias líneas celulares hematopoyéticas (Oren, M., *Semin. Cancer Biol.*, 1994, 5, 221). La inducción de p53 lleva a la parada del crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular así como a la muerte celular por apoptosis. Se sabe que la degradación del supresor de tumores p53 se lleva a cabo a través de la ruta de ubiquitina-proteasoma, y la interrupción de la degradación de p53 por medio de la inhibición del proteasoma es un modo posible de inducir la apoptosis.

El proteasoma también es necesario para la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por medio de la degradación de su proteína inhibidora, I $\kappa$ B (Palombella, y col., *Cell*, 1994, 78, 773). NF- $\kappa$ B tiene una función manteniendo la viabilidad celular a través de la transcripción de inhibidores de la apoptosis. Se ha demostrado que el bloqueo de la actividad del NF- $\kappa$ B hace a las células más susceptibles a la apoptosis.

Se han informado varios inhibidores de la actividad proteolítica del proteasoma. Véase, por ejemplo, Kisselev, y col., *Chemistry & Biology*, 2001, 8, 739. La lactacistina es un metabolito de *Streptomyces* que inhibe específicamente la actividad proteolítica del complejo proteasoma (Fenteany, y col., *Science*, 1995, 268, 726). Esta molécula es capaz de inhibir la proliferación de varios tipos de células (Fenteany, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 1994, 91, 3358). Se ha mostrado que la lactacistina se une de manera irreversible, a través de su resto  $\beta$ -lactona, a un residuo treonina localizado en el extremo amino terminal de la subunidad  $\beta$  del proteasoma.

Se ha informado que los aldehídos peptídicos inhiben la actividad análoga a la quimotripsina asociada con el proteasoma (Vinitzky, y col., *Biochemistry*, 1992, 31, 9421; Tsubuki, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 196, 1195; y Rock, y col., *Cell*, 1994, 78, 761). También se han informado inhibidores de dipeptidil aldehídos que tienen valores de  $CI_{50}$  en el intervalo de 10-100 nM *in vitro* (Iqbal, M., y col., *J. Med. Chem.* 1995, 38, 2276). También se ha informado una serie de inhibidores de potencia similar *in vitro* de dipéptidos derivados de éster borónico y de  $\alpha$ -cetocarbonilo (Iqbal, y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 287, Patentes de EEUU N° 5.614.649; 5.830.870; 5.990.083; 6.096.778; 6.310.057; Publicación de Solicitud de Patente de EEUU N° 2001/0012854 y documento WO 99/30707).

## ES 2 322 470 T3

Previamente se han informado compuestos de ácido y éster peptidil borónico N-terminal (Patentes de EEUU N° 4.499.082 y 4.537.773; documento WO 91/13904; Kettner, y col., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 15106). Se informó que estos compuestos son inhibidores de ciertas enzimas proteolíticas. Se ha mostrado que los compuestos de ácido y éster tri-peptido borónico N-terminal inhiben el crecimiento de las células cancerosas (Patente de EEUU N° 5.106.948).  
5 Se ha mostrado que una amplia clase de compuestos de ácido y éster tri-peptido borónico N-terminal y sus análogos inhiben la renina (Patente de EEUU N° 5.169.841).

También se han informado diversos inhibidores de las actividades peptidasa del proteasoma. Véase, por ejemplo, Dick, y col., *Biochemistry*, 1991, 30, 2725; Goldberg, y col., *Nature*, 1992, 357, 375; Goldberg, *Eur. J. Biochem.*, 1992, 203, 9; Orłowski, *Biochemistry*, 1990, 29, 10289; Rivett, y col., *Archs. Biochem. Biophys.*, 1989, 218, 1; Rivett, y col., *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 12215; Tanaka, y col., *New Biol.*, 1992, 4, 1; Murakami, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 7588; Li y col., *Biochemistry*, 1991, 30, 9709; Goldberg, *Eur. J. Biochem.*, 1992, 203, 9; y Aoyagi, y col., *Proteases and Biological Control*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1975), páginas 429-454.

Stein y col., solicitud de Patente de EEUU N° de serie de 08/212.909, presentada el 15 de marzo de 1994, informan aldehídos de péptidos útiles para reducir la tasa de pérdida de masa muscular y la tasa de degradación de proteínas intracelulares en un animal. También se dice que los compuestos reducen la tasa de degradación de la proteína p53 en un animal. Palombella, y col., en el documento WO 95/25533, informan el uso de aldehídos de péptidos para reducir el contenido celular y la actividad de NF- $\kappa$ B en un animal poniendo en contacto las células del animal con un inhibidor de aldehído de péptido de la función del proteasoma o de la conjugación de la ubiquitina. Goldberg y Rock, en el documento WO 94/17816, informan el uso de inhibidores del proteasoma para inhibir la presentación de antígenos del MHC-1. Stein, y col., en la Patente de EEUU N° 5.693.617 informan compuestos de peptidil aldehídos como inhibidores de proteasoma útiles para reducir la tasa de degradación de proteínas en un animal. Lum y col., en la Patente de EEUU N° 5.834.487 informan la inhibición del proteasoma 26S y 20S por los derivados de la indanona y un procedimiento para inhibir la proliferación celular usando derivados de la indanona. Los compuestos alfa-cetoamida útiles para el tratamiento de trastornos mediados por el proteasoma 20S en mamíferos se informan en Wang y col., Patente de EEUU N° 6.075.150. France, y col., documento WO 00/64863, informan el uso de derivados del ácido 2,4-diamino-3-hidroxicarboxílico como inhibidores del proteasoma. Yamaguchi y col., en el documento EP 1166781 informan los derivados del ácido carboxílico como inhibidores del proteasoma. Ditzel, y col., documento EP 0 995 757 informan inhibidores bivalentes del proteasoma. Los derivados de 2-aminobenzilstatina que inhiben de manera no covalente la actividad análoga a la quitripsina del proteasoma 20S han sido informados por Garcia-Echeverria, y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 1317.

Algunos otros inhibidores del proteasoma pueden contener restos de boro. Por ejemplo, Drexler y col., documento WO 00/64467, informan un procedimiento para inducir selectivamente la apoptosis en células endoteliales activadas o en células leucémicas que tienen un nivel elevado de expresión de c-myc usando inhibidores del proteasoma que contienen boronato tetrapeptídico. Furet y col., documento WO 02/096933 informan ácidos y ésteres 2-[[N-(2-amino-3-(heteroaril o aril)propionil)aminoacil]amino]-alquilborónicos para el tratamiento terapéutico de enfermedades proliferativas en animales de sangre caliente. Las Patentes de EEUU N° 6,083,903; 6,297,217; 5,780,454; 6,066,730; 6,297,217; 6,548,668; la Publicación de Solicitud de Patente de EEUU N° 2002/0173488; y el documento WO 96/13266 informan compuestos de ácidos y ésteres borónicos y un procedimiento para reducir la tasa de degradación de proteínas. También se informa un procedimiento para inhibir la replicación viral usando ciertos ácidos y ésteres borónicos en la Patente de EEUU N° 6,465,433 y el documento WO 01/02424. Plamondon, y col., en la Publicación de Solicitud de Patente de EEUU N° 2002/0188100 informan composiciones farmacéuticamente aceptables de ácidos borónicos y anhídridos de ácidos borónicos nuevos y compuestos de éster de boronato. Se ha mostrado que una serie de ácidos di y tripeptidil borónicos son inhibidores del proteasoma 20S y 26S en Gardner, y col., *Biochem. J.*, 2000, 346, 447.

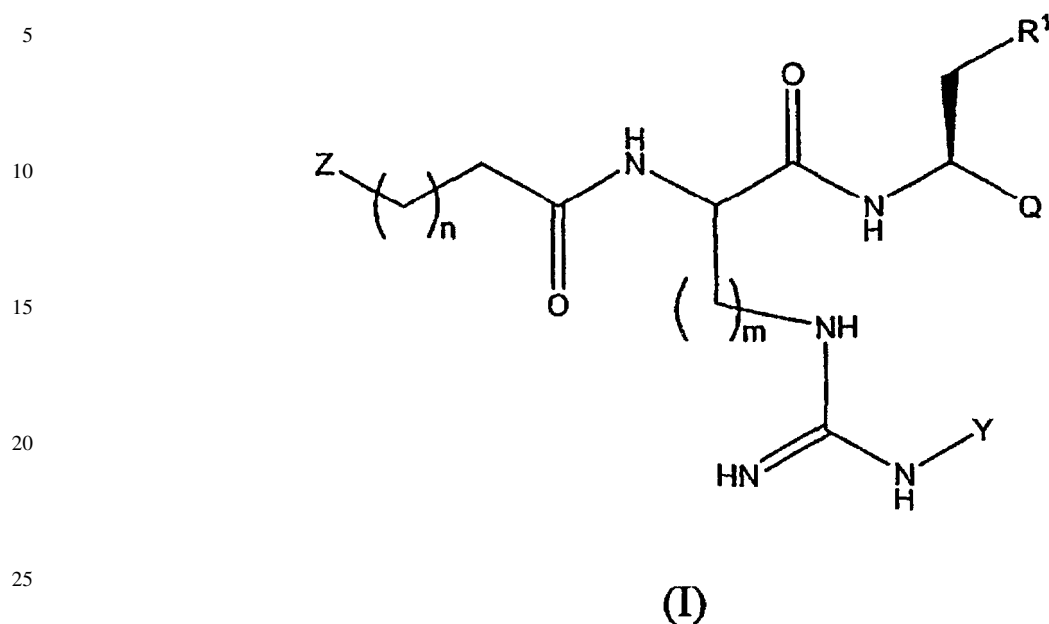
Otros compuestos peptidilo y relacionados que contienen boro se informan en las Patentes de EEUU N° 5.250.720; 5.242.904; 5.187.157; 5.159.060; 5.106.948; 4.963.655; 4.499.082; y en los documentos WO 89/09225, WO/98/17679, WO 98/22496, WO 00/66557, WO 02/059130, WO 03/15706, WO 96/12499, WO 95/20603, WO 95/09838, WO 94/25051, WO 94/25049, WO 94/04653, WO 02/08187, EP 632026, y EP 354522.

Existe un gran interés, como resulta evidente por las referencias anteriores, en fármacos que pueden modular la actividad del proteasoma. Por ejemplo, las moléculas capaces de inhibir la actividad del proteasoma pueden parar o retrasar la progresión del cáncer al interferir con la degradación ordenada de proteínas del ciclo celular o supresores tumorales. Por consiguiente, existe una necesidad actual de nuevos y/o mejores inhibidores del proteasoma.

### Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a compuestos nuevos de ácido borónico y éster borónico útiles como inhibidores del proteasoma y para la modulación de la apoptosis. El tema de la invención también comprende procedimientos para la inhibición de la proteasa multicatalítica ("MCP") asociada con ciertos trastornos, incluido el tratamiento trastornos consuntivos musculares.

En una forma de realización se proporcionan compuestos que tienen Fórmula (I):



30 en la que los miembros constituyentes se definen a continuación, así como los miembros constituyentes de preferencia.

35 En otra forma de realización la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero.

40 En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, y en la que dicho cáncer se selecciona de cáncer de piel, próstata, colorectal, de páncreas, riñón, ovario, mamario, de hígado, lengua, pulmón y tejido muscular liso.

45 En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, y en la que dicho cáncer se selecciona de leucemia, linfoma, linfoma no Hodgkin, mieloma y mieloma múltiple.

50 En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en combinación con uno o más agentes antitumorales o anticáncer y/o radioterapia.

En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad del factor de transcripción NF-κB.

55 En otra forma de realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I) para uso en terapia.

Éstas y otras características de los compuestos se expondrán de forma más extensa según continúe la descripción.

60

65





## ES 2 322 470 T3

éster 1,2-diciclohexiletanodiol borónico, éster biciclohexil-1,1'-diol borónico,  
y éster 1,2-difenil-1,2-etanodiol borónico;

5  $R^9$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ ;

m es 3; y

n es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

10

En algunas formas de realización la presente invención proporciona compuestos de Fórmula (I-s):

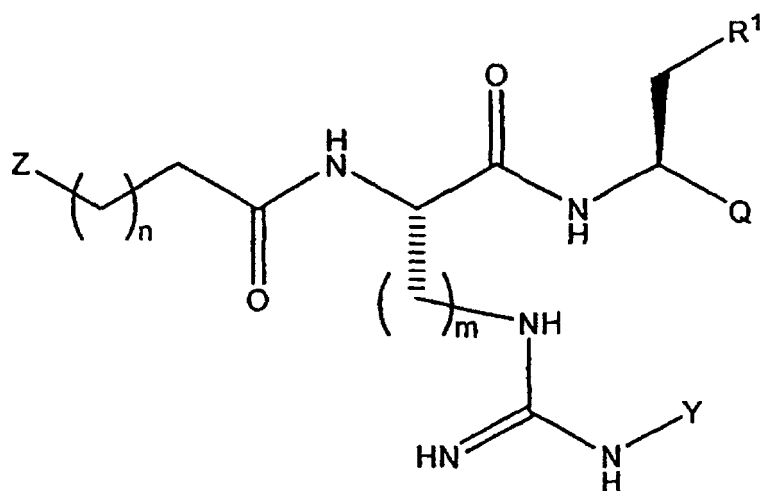
15

20

25

30

35



(I-s)

o una de sus sales, formas estereoisoméricas o tautoméricas farmacéuticamente aceptable, en la que:

40

$R^1$  es alquilo  $C_1-C_4$ ;

Y es CN o  $NO_2$ ;

45

Z es -CN,  $-C(=O)OR^5$ , ftalimido,  $-NHSO_2R^6$  o  $-NR^3R^4$ ;

$R^3$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ ;

50

$R^4$  se selecciona del grupo arilo- $SO_2$ -, alquilo- $SO_2$ -, arilo- $C(=O)$ -, aralquilo- $C(=O)$ -, alquilo- $C(=O)$ -, arilo- $OC(=O)$ -, aralquilo- $OC(=O)$ -, alquilo- $OC(=O)$ -, arilo-NHC(=O)- y alquilo-NHC(=O)-; en el que dicho arilo o aralquilo está opcionalmente sustituido por uno o más grupos metilo o metoxi;

55

$R^5$  es H, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenoilo  $C_2-C_6$ , alquinoilo  $C_2-C_6$ , en la que  $R^5$  está sustituido opcionalmente por uno o más halo, alquilo  $C_1-C_4$ , arilo o heteroarilo;

$R^6$  es alquilo  $C_1-C_8$ , alquenoilo  $C_2-C_8$ , alquinoilo  $C_2-C_8$ , en la que  $R^6$  está sustituido opcionalmente por uno o más halo, alquilo  $C_1-C_4$ , arilo o heteroarilo;

60

Q se selecciona de  $B(OR^9)_2$ , éster pinanediol borónico, éster 1,2-diciclohexiletanodiol borónico y éster biciclohexil-1,1'-diol borónico;

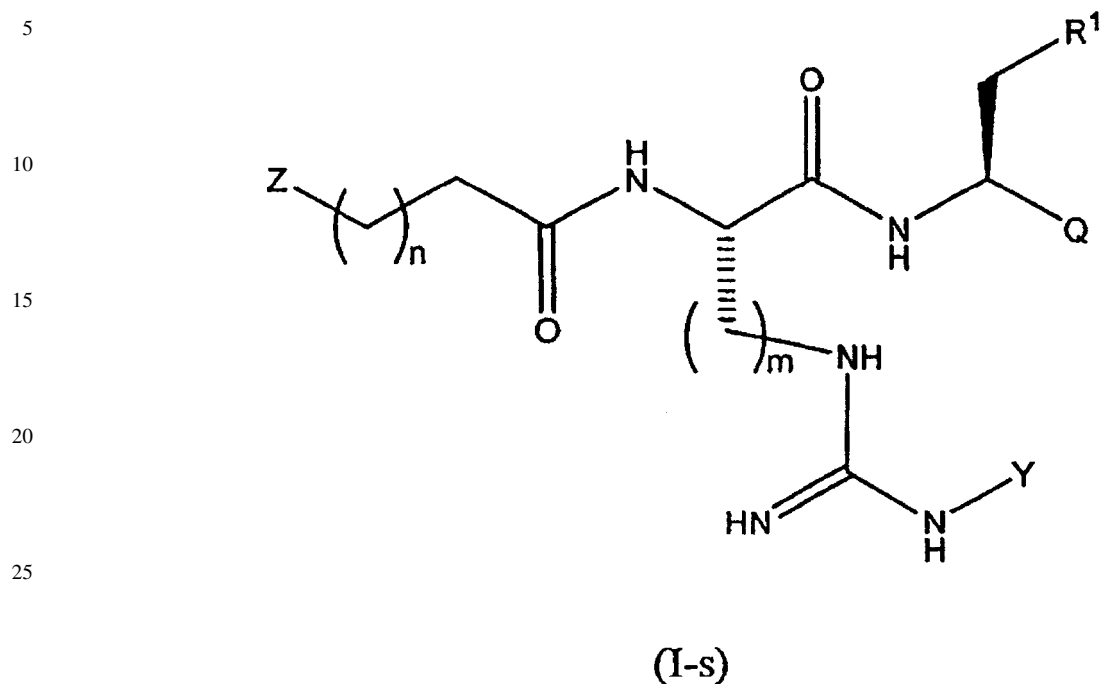
$R^9$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ ;

m es 2, 3 ó 4; y

65

n es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14.

En algunas formas de realización la presente invención proporciona compuestos de Fórmula (I-s):



o sus formas de sal farmacéuticamente aceptables.

35 En aún otras formas de realización, la presente invención proporciona compuestos de Fórmula (I-s) seleccionados de: Ejemplo 10, Ejemplo 11, Ejemplo 12, Ejemplo 13, Ejemplo 14, Ejemplo 15, Ejemplo 16, Ejemplo 17, Ejemplo 18, Ejemplo 19, Ejemplo 20, Ejemplo 21, Ejemplo 22, Ejemplo 23 y Ejemplo 24; o una de sus formas de sal o base libre farmacéuticamente aceptable.

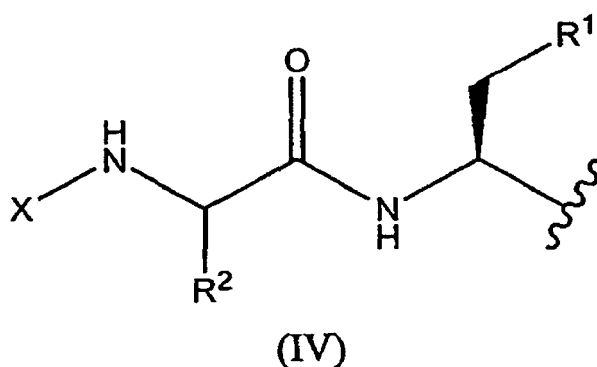
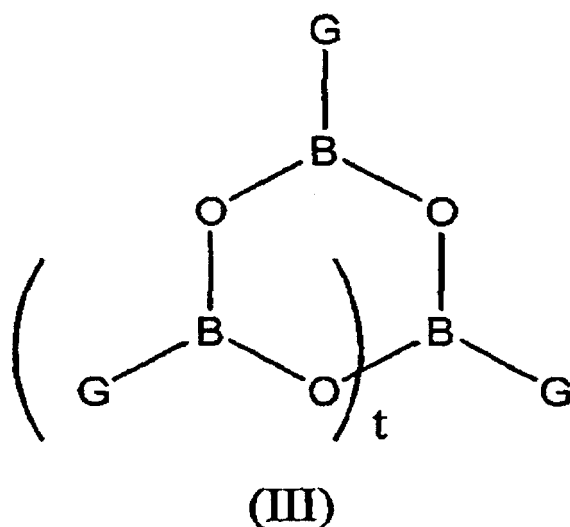
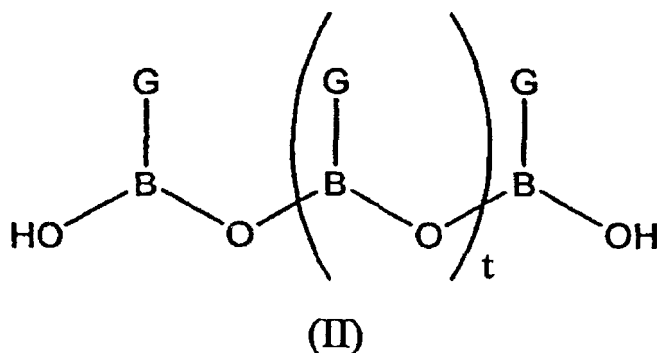
40 Es evidente que ciertas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de formas de realización separadas, pueden también proporcionarse en combinación en una única forma de realización. A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única forma de realización, pueden también proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

45 Según se usa en este documento, la frase “ácido borónico” se refiere a un compuesto que contiene un resto  $B(OH)_2$ . En algunas formas de realización, los compuestos de ácido borónico pueden formar anhídridos oligoméricos por deshidratación del resto borónico. Por ejemplo, Snyder, y col., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3611 informan ácidos arilborónicos oligoméricos. Por consiguiente, a menos que se indique de otra manera, “ácido borónico”, o una Fórmula química que contiene un resto  $-B(OH)_2$ , pretende abarcar los ácidos borónicos libres, anhídridos oligoméricos, incluidos pero no limitados a, dímeros, trímeros, tetrámeros, y sus mezclas.

50 Según se usa en este documento, “anhídrido de ácido borónico” o “anhídrido borónico” se refiere a un compuesto formado por la combinación de dos o más moléculas de un compuesto de ácido borónico de Fórmula (I), con pérdida de una o más moléculas de agua de los restos ácido borónico. Cuando se pone en contacto con agua, el compuesto de anhídrido de ácido borónico puede hidratarse para liberar el compuesto de ácido borónico libre. En algunas formas de realización, la estructura del anhídrido de ácido borónico puede contener dos, tres, cuatro o más unidades de ácido borónico y puede tener una configuración cíclica o lineal. En algunas formas de realización, el compuesto de anhídrido de ácido borónico existe sustancialmente en una forma oligomérica única; sin embargo, los anhídridos de ácido borónico también abarcan mezclas de diferentes anhídridos de ácido borónico oligoméricos así como ácidos borónicos libres.

ES 2 322 470 T3

Los ejemplos no limitantes de anhídridos de ácido borónico de la invención incluyen compuestos de Fórmula (II) y (III) en las que G es un resto de Fórmula (IV) y t es 0 a 10 ó 1, 2, 3 ó 4.



55 En algunas formas de realización, aproximadamente al menos el 80% del ácido borónico presente en un compuesto de anhídrido de ácido borónico existe en una forma de anhídrido oligomérico única. En otras formas de realización, al menos aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, o aproximadamente 99% del ácido borónico presente en el anhídrido de ácido borónico existe en una forma de anhídrido oligomérico única. En algunas formas de realización, el compuesto de anhídrido de ácido borónico está constituido esencialmente por un único anhídrido de ácido borónico oligomérico. En aún otras formas de realización, el compuesto de anhídrido de ácido borónico está constituido por un único anhídrido de ácido borónico oligomérico. En otras formas de realización, el compuesto de anhídrido de ácido borónico contiene una boroxina para la Fórmula (III), en la que t es 1.

65 Los compuestos de anhídrido de ácido borónico pueden prepararse a partir del correspondiente compuesto de ácido borónico por exposición a condiciones de deshidratación, incluyendo, por ejemplo, la cristalización, liofilización, exposición al calor, y/o exposición a un agente de secado. Algunos disolventes de cristalización adecuados incluyen acetato de etilo, diclorometano, hexanos, éter, benceno, acetonitrilo, etanol, y sus mezclas.

## ES 2 322 470 T3

Según se usa en este documento, la frase “éster borónico” o “éster de ácido borónico” se refiere a un derivado éster de un compuesto de ácido borónico.

Según se usa en este documento, “éster borónico cíclico” pretende significar un resto borónico cíclico estable de fórmula general -B(OR)(OR) en la que los dos sustituyentes R tomados juntos contienen desde 2 hasta 20 átomos de carbono, y opcionalmente, un heteroátomo que puede ser N, S u O. Los ésteres borónicos cíclicos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de éster borónico cíclico incluyen, pero no se limitan a, éster pinanediol borónico, éster pinacol borónico, éster 1,2-etanodiol borónico, éster 1,3-propanodiol borónico, éster 1,2-propanodiol borónico, éster 2,3-butanodiol borónico, éster 1,1,2,2-tetrametiletanodiol borónico, éster 1,2-diisopropiletanodiol borónico, éster 5,6-decanodiol borónico, éster 1,2-diciclohexiletanodiol borónico, biciclohexil-1,1'-diol, éster dietanolamino borónico y éster 1,2-difenil-1,2-etanodiol borónico.

Según se usa en este documento, el término “alquilo” o “alquileo” se refiere a un grupo de hidrocarburos saturados que tienen de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo), pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo) y similares. Un grupo alquilo puede contener desde 1 hasta aproximadamente 20, desde 2 hasta aproximadamente 20, desde 1 hasta aproximadamente 10, desde 1 hasta aproximadamente 8, desde 1 hasta aproximadamente 6, desde 1 hasta aproximadamente 4, o desde 1 hasta aproximadamente 3 átomos de carbono.

Según se usa en este documento, “alqueno” se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo y similares.

Según se usa en este documento, “alquino” se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y similares.

Según se usa en este documento, “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más sustituyentes halógeno. Los ejemplos de grupos haloalquilo incluyen CF<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, CHF<sub>2</sub>, CCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>Cl<sub>5</sub> y similares. Un grupo alquilo en el que todos los átomos de hidrógeno están reemplazados con átomos de halógeno puede denominarse “perhaloalquilo”. Los ejemplos de grupos perhaloalquilo incluyen CF<sub>3</sub> y C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>.

Según se usa en este documento, grupos “carbociclilo” son restos hidrocarburo cíclicos saturados (es decir, que no contienen enlaces dobles o triples) o insaturados (es decir, que contienen uno o más enlaces dobles o triples). Los grupos carbociclilo pueden ser mono- o policíclicos. Los ejemplos de grupos carbociclilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, 1,3-ciclopentadienilo, ciclohexenilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo, fenilo y similares. Los grupos carbociclicos pueden ser aromáticos (por ejemplo, “arilo”) o no aromáticos (por ejemplo, “cicloalquilo”). En algunas formas de realización, los grupos carbociclicos pueden tener desde 3 hasta aproximadamente 20, 3 hasta aproximadamente 10, ó 3 hasta aproximadamente 7 átomos de carbono.

Según se usa en este documento, “arilo” se refiere a grupos carbociclilo aromáticos que incluyen hidrocarburos aromáticos monocíclicos o policíclicos como, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno y similares. En algunas formas de realización, los grupo arilo tienen desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono.

Según se usa en este documento, “cicloalquilo” se refiere a grupos carbociclilo no aromáticos que incluyen grupos alquilo, alqueno y alquino ciclizados. El grupo cicloalquilo puede incluir sistemas de anillos bi- o policíclicos. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo y similares. También están incluidos en la definición de cicloalquilo los restos que tienen uno o más anillos aromáticos condensados (es decir, que tienen un enlace en común con) al anillo cicloalquilo, por ejemplo, benzo derivados de ciclopentano (indanilo), ciclohexano (tetrahidronaftilo) y similares.

Según se usa en este documento, grupos “heterocarbociclilo” pueden ser grupos carbociclilo saturados o insaturados en los que uno o más átomos de carbono que forman el anillo del grupo carbociclilo están reemplazados por un heteroátomo tal como O, S o N. Los grupos heterocarbociclilo pueden ser aromáticos (por ejemplo, “heteroarilo”) o no aromáticos (por ejemplo, “heterocicloalquilo”). Los grupos heterocarbociclilo pueden corresponder a grupos heteroarilo hidrogenados y parcialmente hidrogenados. Los grupos heterocarbociclilo pueden contener, además de al menos un heteroátomo, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10, o aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7 átomos de carbono y pueden estar unidos a través de un átomo de carbono o un heteroátomo. Además, los grupos heterocarbociclilo pueden estar sustituidos o insustituidos. Los ejemplos de grupos heterocarbociclilo incluyen morfolino, tiomorfolino, piperazinilo, tetrahidrofurano, tetrahidrotienilo, 2,3-dihidrobenzofurilo, 1,3-benzodioxol, benzo-1,4-dioxano, piperidinilo, pirrolidinilo, isoxazolidinilo, isotiazolidinilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, imidazolidinilo y similares.

Según se usa en este documento, grupos “heteroarilo” son grupos heterocarbociclilo aromáticos e incluyen hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos que tienen al menos un miembro del anillo heteroátomo tal como azufre, oxígeno o nitrógeno. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furilo, quinolilo, isoquinolilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, indolilo, pirrolilo, oxazolilo, benzofurilo,

## ES 2 322 470 T3

benzotienilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolil indazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, benzotienilo, purinilo, carbazolilo, bencimidazolilo, y similares. En algunas formas de realización, los grupos heteroarilo pueden tener desde 1 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono, y en otras formas de realización desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono. En algunas formas de realización, los grupos heteroarilo tienen 1 hasta aproximadamente 4, 1 hasta aproximadamente 3 ó 1 a 2 heteroátomos.

Según se usa en este documento, “heterocicloalquilo” se refiere a un grupo heterocarbocíclico no aromático que incluye grupos alquilo, alquenilo y alquinilo ciclizados en los que uno o más átomos de carbono que forman el anillo están reemplazados por un heteroátomo tal como un átomo de O, N o S. También están incluidos en la definición de heterocicloalquilo los restos que tienen uno o más anillos condensados (es decir, que tienen un enlace en común con) al anillo heterocíclico no aromático, por ejemplo ftalimidilo, naftalimidil diimidil piromelítico, ftalanilo, y benzo derivados de heterociclos saturados tales como los grupos indoleno e isoindoleno.

Según se usa en este documento, “halo” o “halógeno” incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Según se usa en este documento, “alcoxi” se refiere a un grupo -O-alquilo. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi (por ejemplo, n-propoxi e isopropoxi), t-butoxi y similares.

Según se usa en este documento, “tioalcoxi” se refiere a un grupo alcoxi en el que el átomo de O está reemplazado por un átomo de S.

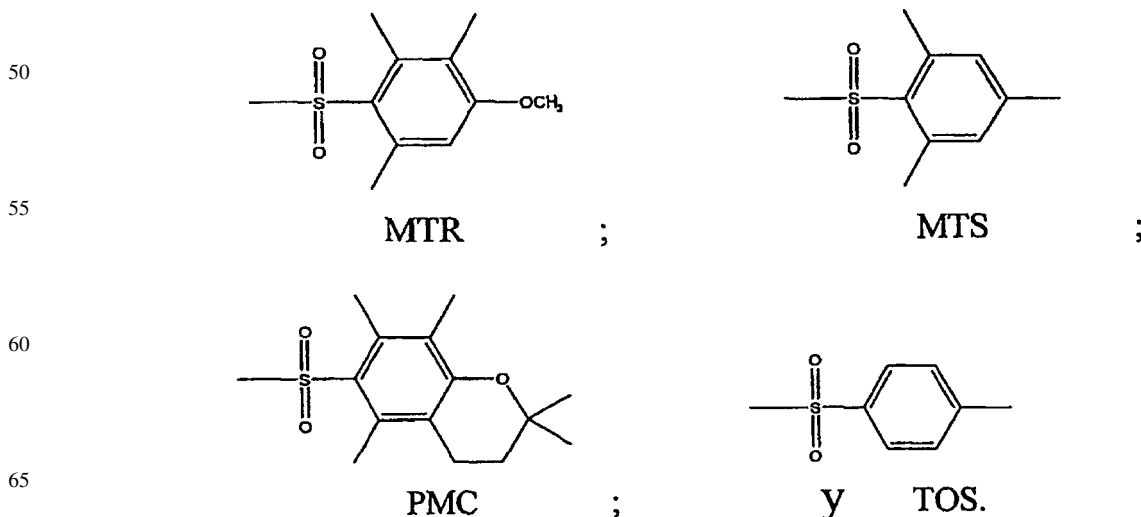
Según se usa en este documento, “ariloxi” se refiere a un grupo -O-arilo. Un ejemplo de grupo ariloxi es fenoxi.

Según se usa en este documento, “aralquilo” se refiere a un resto alquilo sustituido por un grupo arilo. Los ejemplos de grupos aralquilo incluyen grupos bencilo y naftilmetilo. En algunas formas de realización, los grupos arilalquilo tienen desde 7 hasta 11 átomos de carbono.

Según se usa en este documento, “amino” se refiere a un grupo  $\text{NH}_2$ . “Alquilamino” se refiere a un grupo amino sustituido por un grupo alquilo y “dialquilamino” se refiere a un grupo amino sustituido por dos grupos alquilo. Por el contrario, “aminoalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo amino.

Según se usa en este documento, “cicloalquilalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo cicloalquilo.

Según se usa en este documento, la frase “grupo protector” se refiere a un grupo químico funcional que puede selectivamente añadirse a y eliminarse de funcionalidades, tales como grupos hidroxilo, grupos amino y grupos carboxilo. Los grupos protectores se introducen usualmente en un compuesto químico para convertir tal funcionalidad en inerte para las condiciones de la reacción química a las que se expone el compuesto. Con la presente invención puede usarse cualquiera de una diversidad de grupos protectores. Un grupo protector de un resto amino puede denominarse un “grupo protector de amino” y un grupo protector de un resto guanidino puede denominarse un “grupo protector de guanidino”. Los grupos protectores de amino y de guanidino pueden tener las fórmulas arilo- $\text{SO}_2$ -, alquilo- $\text{SO}_2$ -, arilo- $\text{C}(=\text{O})$ -, aralquilo- $\text{C}(=\text{O})$ -, alquilo- $\text{C}(=\text{O})$ -, arilo- $\text{OC}(=\text{O})$ -, aralquilo- $\text{OC}(=\text{O})$ -, alquilo- $\text{OC}(=\text{O})$ -, arilo-NHC(=O)-, alquilo-NHC(=O)- y similares, en las que dichos grupos alquilo, arilo y aralquilo pueden estar sustituidos o insustituidos. Los ejemplos de grupos protectores de amino y de guanidino también pueden incluir t-butiloxicarbonilo (BOC), fluorenilmtoxycarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz) y un grupo ftalimido. Otros grupos protectores incluyen los siguientes restos:



## ES 2 322 470 T3

Pueden encontrarse otros grupos protectores representativos en T.W. Green y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>o</sup> Ed., Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999), que se incorpora en este documento en su totalidad por referencia.

5 Según se usa en este documento, “sustituido” indica que al menos un átomo de hidrógeno de un grupo químico está reemplazado por un resto diferente de hidrógeno. Los ejemplos de sustituyentes incluyen F, Cl, Br, I, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo, haloalquilo, NR<sup>E</sup>R<sup>F</sup>, N<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, CNO, CNS, C(=O)OR<sup>E</sup>, R<sup>E</sup>CO, R<sup>E</sup>C(=O)O, R<sup>E</sup>CONR<sup>E</sup>, R<sup>E</sup>R<sup>F</sup>NCO, ureido, OR<sup>E</sup>, SR<sup>E</sup>, SO<sub>2</sub>-alquilo, SO<sub>2</sub>-arilo, y SO<sub>2</sub>-NR<sup>E</sup>R<sup>F</sup>, en los que R<sup>E</sup> y R<sup>F</sup> son cada uno, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Como alternativa, R<sup>E</sup> y R<sup>F</sup> pueden estar combinados, con el nitrógeno al que están unidos, para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros, por ejemplo pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo y N-metilpiperazinilo. Cuando en este documento un grupo químico está “sustituido” puede tener hasta el equilibrio total de sustitución, a condición de que el compuesto resultante sea un compuesto estable o una estructura estable; por ejemplo, un grupo metilo puede estar sustituido por 1, 2 ó 3 sustituyentes, un grupo metileno puede estar sustituido por 1 ó 2 sustituyentes, un grupo fenilo puede estar sustituido 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes, y similares.

20 Según se usa en este documento “compuesto estable” o “estructura estable” se refiere a un compuesto que es suficientemente fuerte para superar el aislamiento hasta un grado de pureza útil de una mezcla de reacción, y de preferencia es capaz de formularse en un agente terapéutico eficaz. La presente invención está dirigida sólo a compuestos estables.

25 Los compuestos descritos en este documento pueden ser asimétricos (por ejemplo, teniendo uno o más estereocentros). Están previstos todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, a menos que se indique de otra manera. Los compuestos de la presente invención que contienen átomos de carbono sustituidos de manera asimétrica pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Los procedimientos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos son conocidos en la técnica, tales como por medio de resolución de mezclas racémicas o por medio de síntesis estereoselectiva.

30 Los compuestos de la invención también pueden incluir formas tautoméricas, tales como tautómeros de ceto-enol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o pueden bloquearse estéricamente en una forma por sustitución adecuada.

35 Los compuestos de la invención también pueden incluir todos los isótopos de átomos que se presentan en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

40 La frase “farmacéuticamente aceptable” se utiliza en este documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del criterio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin producir toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable.

45 La presente invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento. Según se usa en este documento, “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original está modificado por la conversión de un resto ácido o base existente a su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales convencionales no tóxicas o las sales de amonio cuaternario de los compuestos originales formados, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales convencionales no tóxicas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido por medio de procedimientos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o del ácido adecuado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, son de preferencia los medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los listados de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>o</sup> edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág. 1418, cuya descripción se incorpora en este documento por referencia.

### *Síntesis*

65 Los compuestos de la invención, incluidas las sales y los solvatos de los mismos, pueden prepararse usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden sintetizarse según cualquiera de las numerosas rutas sintéticas posibles.

Las reacciones para preparar los compuestos de la invención pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que un experto en la técnica de síntesis orgánica puede seleccionar fácilmente. Los disolventes adecuados pueden

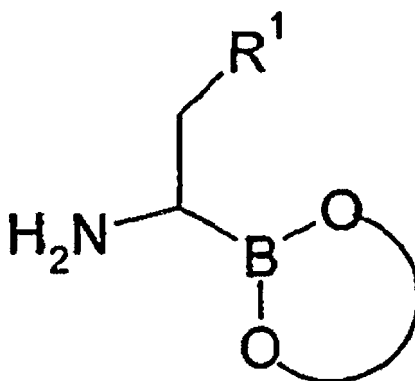
ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermediarios, o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o en una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa particular de la reacción, pueden seleccionarse los disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

La preparación de los compuestos de la invención puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. Un experto en la técnica puede determinar la necesidad de protección y desprotección y la selección de los grupos protectores adecuados. La química de los grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en T.W. Green and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>o</sup> Edición, Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999), que se incorpora en este documento en su totalidad por referencia.

Los compuestos de la invención pueden prepararse por el acoplamiento secuencial de tres componentes fragmento (F1, F2 y F3).

Fragmento F1

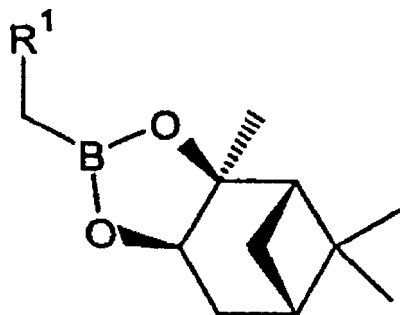
La síntesis de los compuestos de la invención puede incluir un fragmento que contiene boro (F1) que tiene una estructura indicada por la Fórmula (A).



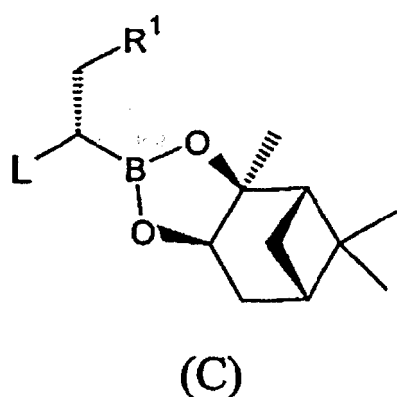
(A)

El resto de éster borónico de F1 puede incluir, por ejemplo, un éster de diol tal como está indicado por medio del bucle que conecta los átomos de oxígeno en la Fórmula (A).

La estereoquímica en el átomo de carbono alfa al átomo de boro en la Fórmula (A) puede controlarse usando un grupo éster borónico asimétrico en la preparación de F1. Por ejemplo, los ésteres de ácido borónico de pinanediol pueden facilitar la preparación del fragmento F2 estereoquímicamente puro, o estereoquímicamente sustancialmente puro. Como un ejemplo, el fragmento F1 puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula (B) (que muestra un éster borónico de pinanediol obtenido a partir de (+)-pinanediol) con una base fuerte (por ejemplo, diisopropilamida de litio o dicitclohexilamida de litio) en presencia de un exceso de diclorometano o dibromometano, seguido por la adición de un ácido de Lewis, (por ejemplo,  $ZnCl_2$ ,  $ZnBr_2$  o  $FeCl_3$ ) para dar un compuesto de Fórmula (C) (donde L es halo) que tiene un nuevo esteroecentro introducido en el carbono alfa al boro.



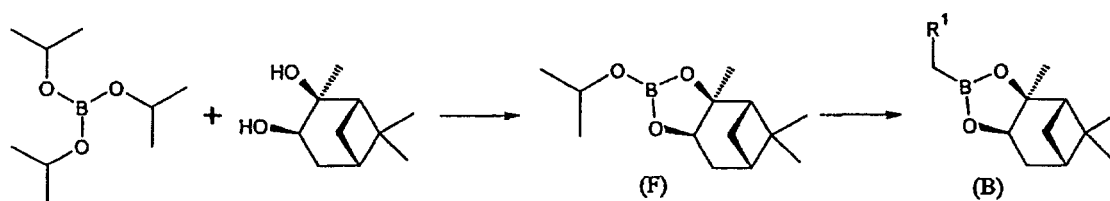
(B)



20

25

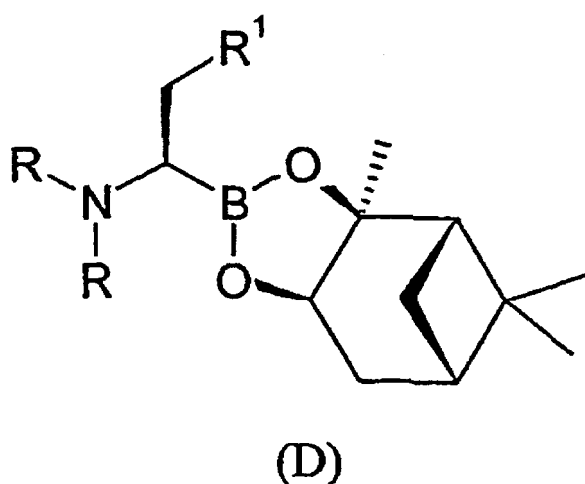
El compuesto de Fórmula (B) también puede prepararse según un procedimiento de dos etapas que involucra la reacción de un trialcoxiborano, de preferencia triisopropoxiborano, con (1S, 2S, 3R, 5S)-(+)-pinanediol, para dar un intermedio mono-alcoxi [(1S, 2S, 3R, 5S)-(+)-pinanediol]borano en el que dos de los grupos alcoxi del trialcoxi borano se han reemplazados por (1S, 2S, 3R, 5S)-(+)-pinanediol. Este pinanediol alcoxi borano mezclado, tras la reacción con el derivado organometálico adecuado, por ejemplo el reactivo de Grignard  $R^1CH_2MgBr$  o el alquil litio  $R^1CH_2Li$ , da el compuesto (B) en buen rendimiento y pureza. El procedimiento comenzando desde triisopropoxiborano para dar el intermedio mezclado pinanediol isopropoxi borano (F) y los compuestos de fórmula (B) se representa a continuación en el siguiente esquema.



40

45

El compuesto de Fórmula (C) puede, a su vez, hacerse reaccionar con una amida alcalina (por ejemplo, bis(trimetilsilil)amida de litio, bis(trimetilsilil)amida de sodio, y bis(trimetilsilil)amida de potasio) u otro nucleófilo que invierta eficazmente el estereocentro formado nuevo (tal como por un mecanismo de tipo  $SN_2$ ) e introduce un grupo amina ( $NR^2$ ) en lugar del grupo halo (por ejemplo, cloro), formando un compuesto de Fórmula (D) (donde R puede ser, por ejemplo, alquilo,  $Si(\text{alquilo})_3$ , arilo o aralquilo).

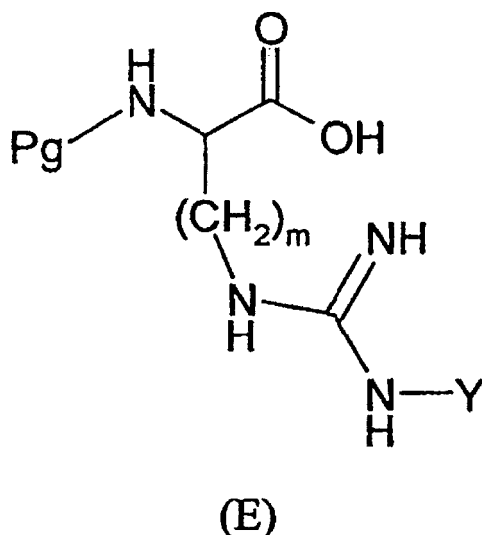


65

El compuesto de Fórmula (D) puede reaccionar además con un agente capaz de convertir el grupo  $NR^2$  en  $NH_2$ , o una de sus sales, para formar un fragmento F1 sustancialmente capaz de acoplarse con otro fragmento a través de la amina. Un agente adecuado para convertir el grupo  $NR^2$  en  $NH_2$  puede ser un ácido prótico tal como HCl tal como cuando R es un grupo sililo (por ejemplo, trimetilsililo).

## Fragmento F2

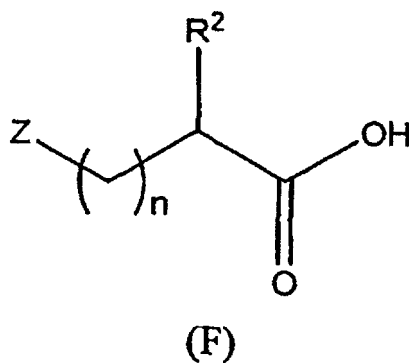
La sección media de los compuestos de la presente invención puede representarse por el fragmento F2 que se acopla al fragmento F1 por medio de la formación de enlaces peptídicos para formar un intermedio F2-F1. Los procedimientos para acoplar compuestos a través de enlaces peptídicos, o enlaces amidas, son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. I., ediciones. Gross, y col., Academic Press, 1979. Un ejemplo de fragmento F2 se proporciona en la Fórmula (E) (Pg es un grupo protector de amino, Y y m están definidos en este documento). Además, la protección del grupo amino de aminoácidos usando Boc u otros grupos protectores amino es bien conocida en la técnica.



Los compuestos de la Fórmula (E) son aminoácidos o derivados de aminoácidos disponibles comercialmente o preparados por medio de procedimientos de rutina conocidos por un experto en la técnica.

## Fragmentos F3

Otro fragmento (F3) puede acoplarse al fragmento F2 del intermedio F2-F1 por medio de la formación de enlaces peptídicos. Los procedimientos para acoplar compuestos a través de enlaces peptídicos, o enlaces amida, son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. I., ediciones Gross, y col., Academic Press, 1979. Un ejemplo de fragmento F2 se proporciona en la Fórmula (F) ( $R^2$  es H, y Z y n están definidos en este documento).



Otros medios de acoplamiento son conocidos en la técnica y también son adecuados. Los F3 fragmentos pueden obtenerse de fuentes comerciales o pueden fabricarse por medio de procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

Las reacciones pueden controlarse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos puede controlarse por medios espectroscópicos, tales como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopía infrarroja, espectrometría (por ejemplo, UV-visible), o espectrometría de masas, o por medio de cromatografía tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina.

Los compuestos de la invención pueden prepararse según los procedimientos para preparar ácidos aminoborónicos, sus ésteres, y compuestos relacionados descritos en la técnica, tal como en las Patentes de EEUU N° 4.537.773 y 5.614.649, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en este documento por referencia.

Los compuestos de la invención que contienen ésteres borónicos, tales como ésteres de pinanediol, pueden hidrolizarse por cualquier medio adecuado para preparar los derivados de ácido borónico ( $-\text{B}(\text{OH})_2$ ) correspondientes. Las condiciones de hidrólisis pueden incluir poner en contacto un éster borónico con ácido en exceso, tal como un ácido prótico como HCl.

A la inversa, los ácidos borónicos pueden esterificarse poniendo en contacto el compuesto ácido ( $-\text{B}(\text{OH})_2$ ) con un alcohol tal como un diol durante el tiempo suficiente para producir el éster correspondiente. La reacción de esterificación puede catalizarse con ácido o base.

La invención se describirá en mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para obtener esencialmente los mismos resultados.

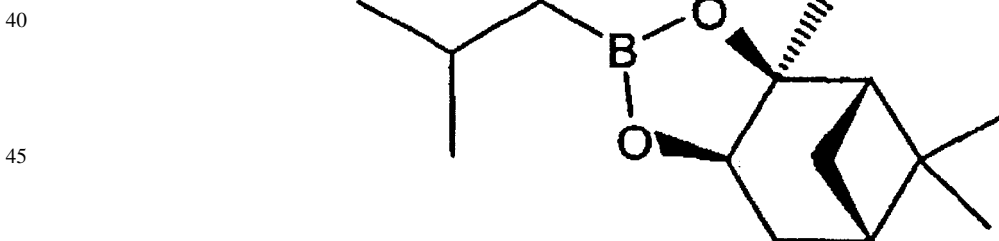
## Ejemplos

### Ejemplo 1

*Síntesis de sal clorhidrato de (1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina*

#### Etapa 1

*2-(2-Metilpropil)-(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol*



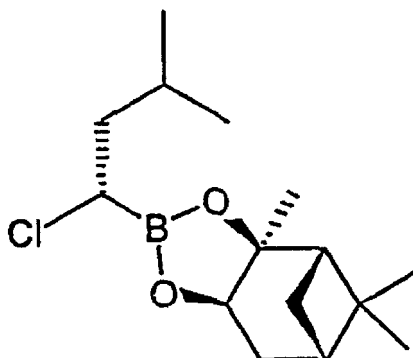
Se agitó una mezcla de (+)-pinanediol (23,9 g, 0,140 mol) y ácido 2-metilpropilborónico (15 g, 0,147 mol) en éter dietílico (300 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se purificó por medio de cromatografía en columna (gel de sílice, tamiz 230-400), eluyendo con mezcla de hexano:acetato de etilo 90:10. El producto se obtuvo como un aceite transparente (32,6 g, rendimiento: 94%).

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 4,28 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz, 2,0); 2,30 (1H, m); 2,18 (1H, m); 1,96 (1H, t,  $J = 5,3$ ); 1,86 (1H, m); 1,78 (1H, set,  $J = 6,8$ ); 1,68 (1H, m); 1,30 (3H, s); 1,25 (3H, s); 1,01 (1H, d); 0,9 (6H, d,  $J = 6,6$ ); 0,81 (3H, s); 0,69 (2H, m).

## ES 2 322 470 T3

### Etapa 2

2-[(1S)-1-Cloro-3-metilbutil]-(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol

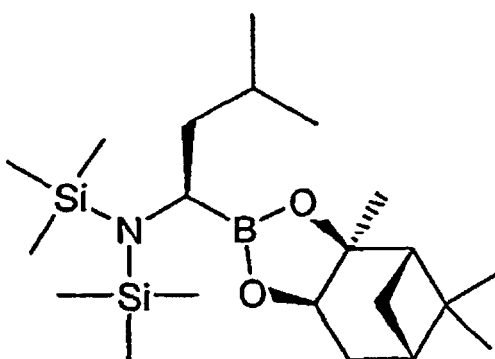


Se preparó una disolución de diisopropilamida de litio por medio de la adición de solución de butilo de litio 10,0 M en hexano (25,4 ml, 0,254 mol) a una disolución de diisopropilamina (35,7 ml, 0,254 mol) en tetrahydrofurano seco (60 ml), a  $-50^{\circ}\text{C}$ , y dejando elevar la temperatura hasta  $-30^{\circ}\text{C}$ . Se transfirió esta disolución por medio de una cánula en una disolución de 2-(2-metilpropil)-(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol de la Etapa 1 (50 g, 0,212 mol) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml, 0,848 mol) en tetrahydrofurano seco (700 ml), mientras se mantenía la temperatura por debajo de  $-70^{\circ}\text{C}$ . A continuación se añadió una disolución de cloruro de cinc 1,0 M en éter dietílico (339 ml, 0,339 mol) durante un período de 30 minutos mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de  $-70^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de reacción se agitó a  $-78^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, a continuación se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Tras eliminar los disolventes por medio de evaporación rotativa, se repartió el residuo entre éter de petróleo (1000 ml) y una disolución acuosa de cloruro de amonio al 10% (800 ml). La fase acuosa se extrajo además con éter de petróleo (300 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El producto se obtuvo como un aceite marrón (59,0 g, rendimiento: 98%) conteniendo aproximadamente 9% mol/mol del material de partida (RMN de  $^1\text{H}$ ), y se usó en la etapa posterior sin otra purificación.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 4,43 (1H, dd,  $J = 8,8, 1,8$ ); 3,59 (1H, m); 2,33 (1H, m); 2,21 (1H, m); 2,01 (1H, m); 1,88 (1H, m); 1,84-1,55 (5H, m); 1,34 (3H, s); 1,26 (3H, s); 1,09 (1H,  $J = 10,1$ ); 0,9 (3H, d,  $J = 6,8$ ); 0,87 (3H, d,  $J = 6,4$ ); 0,82 (3H, s).

### Etapa 3

*N,N*-Bis(trimetilsilil)-(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina



Se añadió una disolución de bis(trimetilsilil)amida de litio 1,0 M en tetrahydrofurano (189 ml, 0,189 mol), durante 30 minutos, a una disolución de 2-[(1S)-1-cloro-3-metilbutil]-(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol bruto de la Etapa 2 (59,0 g, pureza del 91%, 0,189 mol) en tetrahydrofurano (580 ml) mientras se enfriaba hasta  $-78^{\circ}\text{C}$ . Se dejó calentar lentamente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el disolvente por medio de evaporación rotativa y se retomó el residuo con hexano seco (800 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, a continuación se eliminó el sólido por medio de filtración en una torta de celite, que se lavó con hexano seco (3 x 100 ml). El filtrado se concentró dando un producto satisfactoriamente puro como un aceite marrón (79 g) en rendimiento prácticamente cuantitativo. El producto se usó para la etapa posterior sin otra purificación.

## ES 2 322 470 T3

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 4,33 (1H, dd,  $J = 1,5$  Hz, 8,6); 2,58 (1H, m); 2,29 (1H, m); 2,18 (1H, m); 1,95 (1H, t,  $J = 5,9$ ); 1,85 (1H, m); 1,9-1,55 (3H, m); 1,31 (3H, s); 1,24 (3H, s); 1,17 (1H, m); 1,01 (1H, d,  $J = 10,6$ ); 0,85 (3H, d,  $J = 6,6$ ), 0,83 (3H, d,  $J = 6,6$ ); 0,80 (3H, s); 0,08 (18H; s).

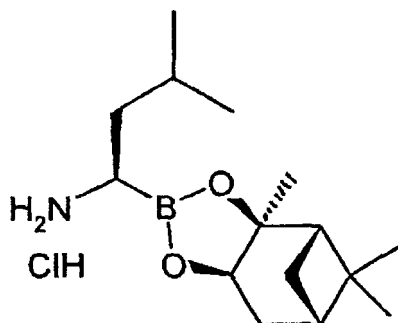
### 5 Etapa 4

*Sal clorhidrato de (1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina*

10

15

20



25

A una disolución de N,N-Bis(trimetilsilil)-(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-etilbutilamina bruta de la Etapa 3 (79 g, 0,193 mol) en una mezcla de dioxano (100 ml) y éter dietílico (200 ml), se le añadió una disolución de cloruro de hidrógeno 4 N en dioxano (193 ml, 0,772 mol), mientras se enfriaba a  $0^\circ\text{C}$ . A continuación se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas y se concentró. El residuo se retomó con hexano anhidro (500 ml) y se añadió una disolución de cloruro de hidrógeno 2 M en éter dietílico (48 ml, 0,096 mol). La mezcla se agitó a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 hora, a continuación se concentró. El residuo se retomó con hexano anhidro y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se recogió el sólido por medio de filtración y se secó bajo vacío dando 38,1 g del producto (rendimiento: 66%). Se obtuvo una segunda recogida (4,13 g, rendimiento: 7%) a partir de los licores madre.

35

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 7,85 (3H, a); 4,45 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz); 2,78 (1H, m); 2,34 (1H, m); 2,21 (1H, m); 2,01 (1H, t,  $J = 5,3$ ); 1,89 (1H, m); 1,82-1,65 (2H, m); 1,49 (1H, m); 1,38 (3H, s); 1,27 (3H, s); 1,12 (1H, d,  $J = 1,12$ ); 0,87 (6H, d,  $J = 6,6$ ); 0,83 (3H, s).

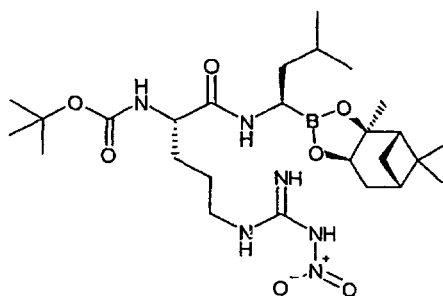
### 40 Ejemplo 2

*1,1-dimetiletiléster del ácido N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonyl]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-carbámico*

45

50

55



### Procedimiento A

60

#### HOAt/HATU

65

A una disolución de BocNH(NO<sub>2</sub>)ArgOH (15,7 g, 49,3 mmol) en DMF anhidro (100 ml) se le añadió HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; 18,7 g, 49,3 mmol) y HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol; 6,71 g, 49,3 mmol). La mezcla se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$  y se añadió N-metilmorfolina (13,6 ml, 0,123 mol). Tras 10 minutos se añadió la sal clorhidrato de (1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina del Ejemplo 1 (12,4 g, 41,1 mmol). Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó a t.a. durante 4,5 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (800 ml), se lavó con una disolución

## ES 2 322 470 T3

de ácido cítrico al 2% (2 x 150 ml), disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 2% (2 x 150 ml) y disolución de NaCl al 2% (2 x 150 ml). Las fases acuosas se extrajeron además con acetato de etilo (150 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo oleoso resultante se redisolvió en acetato de etilo (500 ml) y la disolución se lavó con agua fría (200 ml). Las fases acuosas se extrajeron además con acetato de etilo (500 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se disolvió en éter dietílico (100 ml) y se añadió lentamente la disolución al hexano (600 ml) mientras se agitaba. Se recogió el sólido blanco mediante filtración (43,4 g) y se purificó por medio de cromatografía en columna eluyendo inicialmente con mezcla de hexano:acetato de etilo 50:50 y a continuación con acetato de etilo. Se concentraron las fracciones que contenían el producto, el residuo se disolvió en éter dietílico (100 ml) y la disolución resultante se añadió lentamente al hexano (600 ml) mientras se agitaba. El sólido blanco se recogió mediante filtración (15,2 g, rendimiento: 66%).

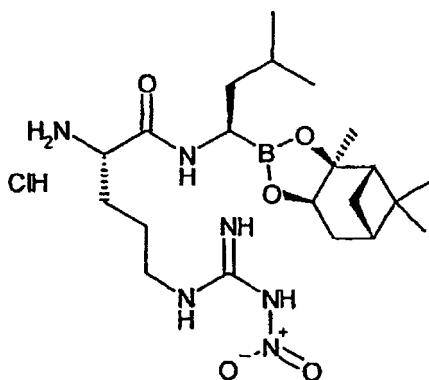
### Procedimiento B

#### IBCF

A una suspensión de BocNH(NO<sub>2</sub>)ArgOH (5,82 g, 18,2 mmol) en diclorometano anhidro (100 ml) se le añadió N-metilmorfolina (2,0 ml, 18,2 mmol). La mezcla se enfrió hasta -15°C, a continuación se añadió clorformato de isobutilo (2,37 ml, 18,2 mmol). La mezcla se agitó a -15°C durante 10 minutos, a continuación se añadió sal clorhidrato de (1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina obtenida como en el Ejemplo 1 (5,0 g, 16,6 mmol), seguida inmediatamente por más N-metilmorfolina (2,0 ml, 18,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas a -15°C, a continuación se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (150 ml), agua (150 ml) y ácido clorhídrico 0,1N (10 ml). La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo oleoso (9,25 g) se purificó por medio de cristalización desde acetato de etilo dando tres rendimientos de producto satisfactoriamente puro (5,03 g, rendimiento: 54%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,80 (1H, a); 8,50 (1H, a), 7,87 (2H, a); 7,01 (1H, d, J = 7,9), 4,07 (1H, dd, J = 7,9); 4,0 (1H, m); 3,12 (2H, m); 2,55 (1H, m); 2,2 (1H, m); 2,01 (1H, m); 1,83 (1H, t, J = 5,1); 1,78 (1H, m); 1,74-1,44 (7H, m); 1,38 (9H, s); 1,33 (1H, d, J = 10,3); 1,24 (5H, s); 1,22 (3H, s); 0,84 (6H, d, J = 6,6); 0,81 (3H, s).

### Ejemplo 3

Sal clorhidrato de N-[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil] (2S)-2-amino-5-[[imino(nitro-amino)metil]amino]pentanamida



### Procedimiento A

Se añadió una disolución de cloruro de hidrógeno 4 N en dioxano (15 ml) a una disolución de 1,1-dimetiletiléster del ácido N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-carbámico del Ejemplo 2, (4,04 g, 7,06 mmol) en una mezcla de dioxano (40 ml) y éter dietílico (7 ml), mientras se enfriaba a 0°C. Se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. El disolvente se eliminó por medio de evaporación rotativa, el residuo se trató con éter dietílico (50 ml) y la mezcla se agitó a t.a. durante tres días. El sólido resultante se recogió mediante filtración dando 3,18 g de producto puro (rendimiento: 90%).

### Procedimiento B

Se disolvió 1,1-dimetiletiléster del ácido N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-carbámico del Ejemplo 2, (3 g, 5,3 mmol) en Et<sub>2</sub>O (40 ml) y se añadió gota a gota una disolución de HCl aproximadamente al 10% en Et<sub>2</sub>O (20 ml) a 0°C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se dejó con agitación durante otras 5 horas.

## ES 2 322 470 T3

Se dejó decantar el disolvente y el residuo, lavado dos veces con Et<sub>2</sub>O (20 ml), se secó en vacío para dar el compuesto del título como un polvo blanco (2,43 g, rendimiento: 91%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,56 (2H, a); 8,22 (3H, a); 7,97 (2H, a); 4,28 (1H, dd, J = 8,6 Hz, 2,01); 3,77 (1H, m); 3,04 (1H, m); 2,28 (1H, m); 2,11 (2H, m), 1,92 (1H, t, J = 5,5); 1,83 (1H, m); 1,79-1,59 (4H, m); 1,59-1,37 (3H, m); 1,31 (4H, s); 1,24 (3H, s); 1,19 (1H, d, J = 10,4); 0,88 (3H, d, J = 6,0); 0,86 (3H, d, J = 6,0); 0,81 (3H, s).

### Ejemplo 4

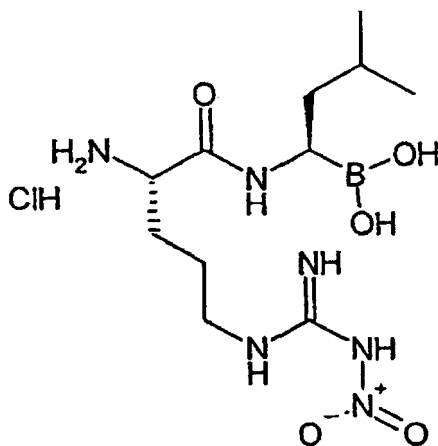
10 *Sal clorhidrato del ácido [(1R)-1-[[[(2S)-2-amino-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico*

15

20

25

30



35

40

Se disolvió cuidadosamente 1,1-dimetiletiléster del ácido N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-carbámico del Ejemplo 2, (3,1 g, 5,48 mmol), bajo nitrógeno a 0°C, en 20 ml de HCl al 37%; la mezcla resultante se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con Et<sub>2</sub>O hasta la eliminación completa del pinanediol; se concentró la disolución acuosa hasta sequedad y se secó en vacío para dar 1,82 gramos (4,93 mmol, rendimiento: 90%) del compuesto del título, usado sin otra purificación. RMN de <sup>1</sup>H: (DMSO + D<sub>2</sub>O + TFA): 3,78 (m, 1H); 3,19 (m, 2H); 3,09 (m, 1H); 1,71 (m, 2H); 1,70-1,48 (m, 3H); 1,49-1,23 (m, 2H); 0,89 (d, J = 5,8 Hz, 3H); 0,88 (d, J = 5,8 Hz, 3H).

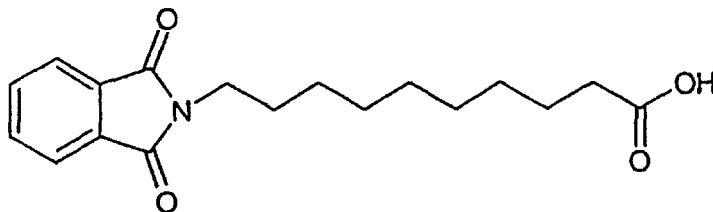
### Ejemplo 5

45

*Ácido 10-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-decanoico*

50

55



60

#### Etapa 1

*2-Undec-10-enil-1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol*

65

A una mezcla de 10-undecen-1-ol (4,23 g, 24,8 mmol), ftalimida (3,65 g, 24,8 mmol) y trifenilfosfina (6,51 g, 24,8 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (30 ml), se le añadió lentamente una disolución de DEAD (3,9 ml, 24,8 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 8-10°C. Tras 2 horas se añadió más DEAD (1,0 ml, 6,37 mmol) y trifenilfosfina (1,3 g, 4,96 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se trituró con éter dietílico (50 ml). El sólido se

## ES 2 322 470 T3

eliminó mediante filtración y se lavó con éter dietílico (2 x 50 ml). Los filtrados combinados se concentraron y el residuo se trituró con hexano (50 ml) a 40°C. El sólido resultante se eliminó mediante filtración y se lavó con hexano (2 x 50 ml). Los filtrados combinados se concentraron y el residuo se purificó por medio de cromatografía en columna eluyendo con mezcla de hexano:acetato de etilo 10:2. El producto se obtuvo como un sólido blanco de bajo punto de fusión (4,9 g, rendimiento: 66%).

P.f. 25-30°C. RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 7,83 (4H, m); 5,76 (1H, m); 4,96 (1H, dc, J = 17,2, 1,6 Hz); 4,90 (1H, ddt, J = 10,2, 2,2, 1,1); 3,54 (2H, t, J = 7,1), 1,97 (2H, c, J = 6,7); 1,56 (2H, m); 1,35-1,15 (14H, m).

10 Etapa 2

### *Ácido 10-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-decanoico*

15 Se añadió una disolución de 2-undec-10-enil-1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol (2 g, 6,68 mmol) de la Etapa 1 y Aliquat® 336 (0,2 g) en una mezcla de hexano (20 ml) y ácido acético (6 ml) gota a gota a una disolución de permanganato de potasio (2,76 g, 20 mmol) en agua (28 ml) mientras se enfriaba a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas, a continuación se añadió una disolución acuosa de bisulfito de sodio hasta que desapareció el color púrpura. A continuación se extrajo la mezcla con acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con mezcla de hexano:acetato de etilo 2:1. El producto se obtuvo como un sólido blanco (1,29 g, rendimiento: 61%). P.f. 58-60°C.

25 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 11,95 (1H, a); 7,85 (4H, m); 3,55 (2H, t, J = 7,2 Hz); 2,17 (2H, t, J = 7,2 Hz); 1,7-1,4 (4H, m); 1,22 (10H, m).

Ejemplo 6

### *Ácido 6-(etilsulfonilamino)hexanoico*

30 Se añadió una disolución de cloruro de etanosulfonilo (3,9 ml, 41,1 mmol) en dioxano (10 ml) a una disolución de ácido 6-aminohexanoico (2 g, 15,2 mmol) en NaOH 1N (56 ml) y dioxano (10 ml), mientras se agitaba a 0-5°C. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción hasta 8-9 añadiendo una disolución de hidróxido de sodio al 25%. Se dejó calentar la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Se añadió más disolución de NaOH al 25% para ajustar el pH hasta aproximadamente 11. Tras 3,5 horas se añadió ácido clorhídrico 1N (15 ml) y acetato de etilo (60 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se trituró con una mezcla de éter dietílico (5 ml) y hexano (15 ml). El sólido se recogió mediante filtración y se secó dando 1,3 g del compuesto del título (rendimiento: 40%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 11,9 (1H, s); 6,97 (1H, t, J = 5,7 Hz); 2,97 (2H, c, J = 7,1); 2,88 (2H, c, J = 6,6); 2,2 (2H, t, J = 7,3); 1,47 (4H, m); 1,29 (2H, m); 1,18 (3H, t, J = 7,3).

Ejemplo 7

### *Ácido 8-(etilsulfonilamino)octanoico*

45 Se añadió una disolución de cloruro de etanosulfonilo (1,5 ml, 15,7 mmol) en dioxano (5 ml) a una disolución de ácido 8-aminooctanoico (1 g, 6,28 mmol) en NaOH 1N (22 ml) y dioxano (5 ml), mientras se agitaba a 0-5°C. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3,5 minutos. Durante este periodo, en intervalos de 1 hora, se ajustó el pH hasta 7-8 añadiendo una disolución de NaOH al 25%. La mezcla de reacción se lavó con éter dietílico (30 ml). Se ajustó el pH hasta 1-2 mediante la adición de HCl 1N y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (70 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se trituró con una mezcla de éter dietílico. El sólido se recogió mediante filtración y se secó bajo vacío dando 600 mg del compuesto del título (rendimiento: 38%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 11,9 (1H, s); 6,96 (1H, t, J = 6 Hz); 2,96 (2H, c, J = 7,1); 2,88 (2H, c, J = 6,6); 2,2 (2H, t, J = 7,3); 1,45 (4H, m); 1,26 (6H, m); 1,18 (3H, t, J = 7,3).

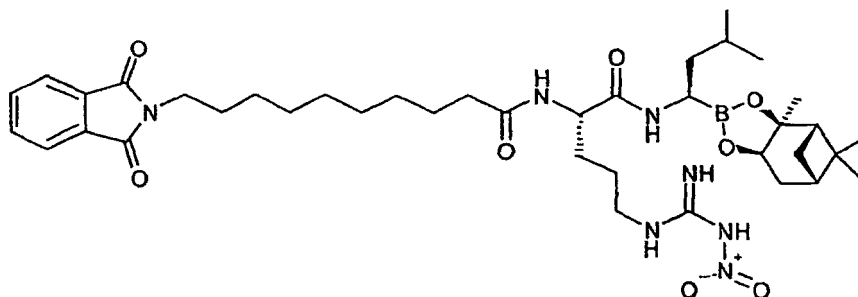
60

65

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo 10

*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-10-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-decanamida



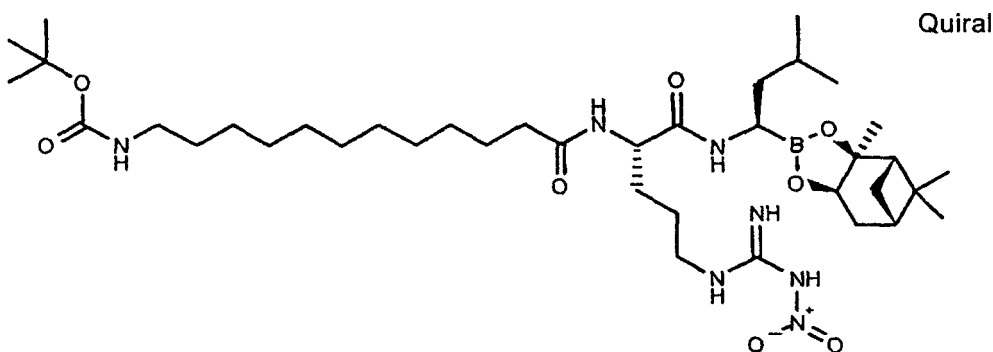
#### *Acoplamiento por el procedimiento de IBCF*

A una disolución de ácido 10-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-decanoico (353 mg, 1,11 mmol), preparada según el Ejemplo 5 en diclorometano anhidro (10 ml), se le añadió *N*-metilmorfolina (122  $\mu$ l, 1,11 mmol). La mezcla se enfrió hasta  $-15^{\circ}\text{C}$ , a continuación se añadió lentamente cloroformato de isobutilo (144  $\mu$ l, 1,11 mmol). Tras 15 minutos se añadió sal clorhidrato de *N*-[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil] (2*S*)-2-amino-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]pentanamida del Ejemplo 3 (508 mg, 1,01 mmol) y más *N*-metilmorfolina (122  $\mu$ l, 1,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a  $-15$ - $10^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, a continuación se concentró hasta un volumen pequeño y se repartió entre acetato de etilo (20 ml) y agua (10 ml). La fase acuosa se extrajo además con acetato de etilo (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se retomó con acetato de etilo (3 ml) y la disolución se añadió gota a gota al hexano (120 ml) mientras se agitaba a temperatura ambiente. El sólido se recogió por decantación y se secó bajo vacío (730 mg, rendimiento: 94%).

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 8,81 (1H, d,  $J = 2,7$  Hz); 8,52 (1H, a); 7,98 (1H, d,  $J = 8,05$ ); 7,88 (2H, a); 7,85 (4H, m); 4,34 (1H, m); 4,06 (1H, dd,  $J = 7,1$ ); 3,56 (2H, t,  $J = 7,14$ ); 3,14 (2H, m); 2,55 (1H, m); 2,19 (1H, m); 2,10 (2H, t,  $J = 7,14$ ); 2,0 (1H, m); 1,82 (1H, t,  $J = 5,7$ ); 1,78 (1H, m); 1,73-1,35 (10H, m); 1,31 (1H, d,  $J = 9,9$ ); 1,24 (19H, m); 0,84 (9H, m); 0,79 (3H, s).

### Ejemplo 11

*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]12-[(1,1-dimetiletoksi)carbonilamino]dodecanamida



El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 10 anterior a partir de ácido 12-terc-butoxicarbonilamino-dodecanoico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos:

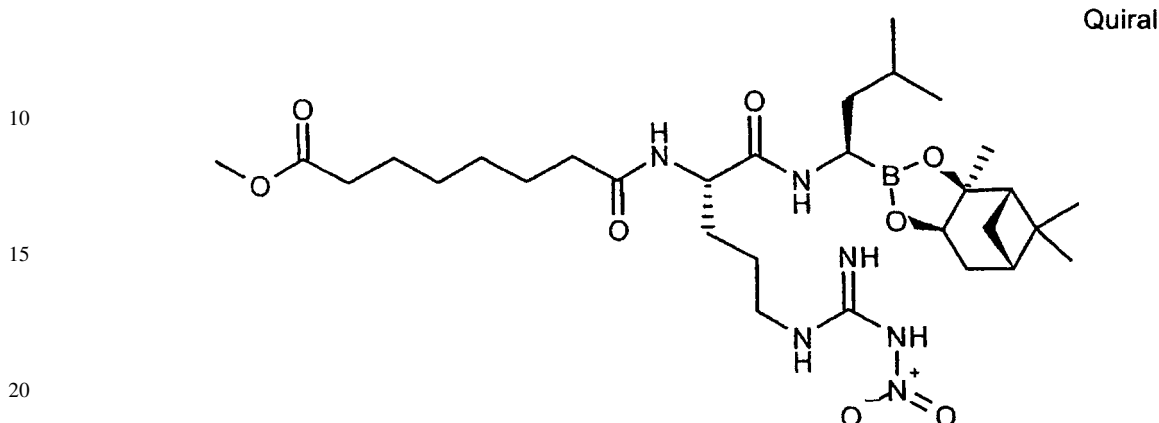
RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 8,81 (1H, d,  $J = 2,4$ ); 8,52 (1H, a); 7,98 (1H, d,  $J = 8,05$ ); 7,85 (2H, v. a); 6,73 (1H, t,  $J = 5,3$ ); 4,33 (1H, m); 4,07 (1H, d,  $J = 8,4$ ); 3,14 (2H, m); 2,88 (2H, c,  $J = 6,6$ ); 2,56 (1H, m); 2,19 (1H, m); 2,10 (2H, t,  $J = 7,1$ ); 2,01 (1H, m); 1,83 (1H, t,  $J = 5,7$ ); 1,78 (1H, m); 1,73-1,41 (8H, m); 1,36 (9H, s); 1,33-1,15 (25H, m); 0,84 (6H, d,  $J = 6,5$ ); 0,80 (3H, s).

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo 12

*N*-[*(1S)*-1-[[[(*1R*)-1-[(*3aS,4S,6S,7aR*)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitro-amino)metil]amino]butil]4-(metoxicarbonil)heptanamida

5

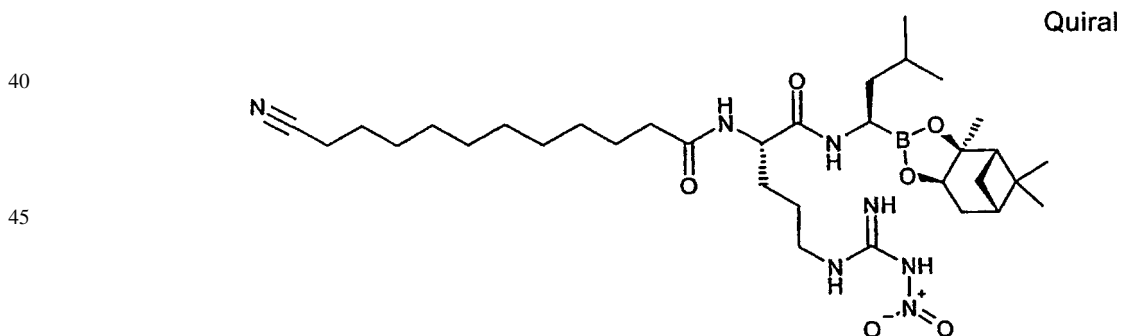


25 El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 10 anterior a partir de monometiléster del ácido octanodioico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos:

30 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,80 (1H, s a); 8,51 (1H, a); 7,98 (1H, d, J = 8,0 Hz); 8,3-7,5 (2H, a); 4,32 (1H, m); 4,06 (1H, d a, J = 8,4); 3,12 (2H, m); 2,55 (1H, m); 2,26 (2H, t, J = 7,3); 2,18 (1H, m); 2,09 (2H, t, J = 7,1); 2,01 (1H, m); 1,85-1,2 (19H, m); 1,23 (3H, s); 1,21 (3H, s); 0,83 (6H, d, J = 6,6); 0,79 (3H, s).

### Ejemplo 13

35 *N*-[*(1S)*-1-[[[(*1R*)-1-[(*3aS,4S,6S,7aR*)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]11-cianoundecanamida



55 Se añadió PS-carbodiimida (N-ciclohexilcarbodiimida-N'-propiloximetil poliestireno, 769 mg, 1 mmol, que carga 1,31 mmol/g) y HOAt (1-Hidroxí-7-azabenzotriazol, 115 mg, 0,85 mmol) a una disolución de ácido 11-cianoundecanoico (115 mg, 0,54 mmol) en diclorometano (DCM) (9 ml). Tras agitar durante 10 minutos se añadió sal clorhidrato de N-[(*1R*)-1-[(*3aS,4S,6S,7aR*)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil] (2S)-2-amino-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]pentanamida del Ejemplo 3 (251 mg, 0,50 mmol) y DIPEA (0,128 ml, 0,75 mmol). La suspensión se agitó durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se eliminó la PS-Carbodiimida por filtración y lavó varias veces con DCM (4 x 6 ml). Se hizo pasar la fase orgánica a través de un cartucho VARIAN CHEM ELUT para extracción de líquido-líquido previamente acondicionado con disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y finalmente se lavó con DCM (15 ml). El disolvente se evaporó y la reacción bruta se purificó con una columna ISOLUTE SPE-SI en fase normal (DCM 9, MeOH 1) para dar 200 mg del compuesto deseado (rendimiento: 61%).

65 RMN (CDCl<sub>3</sub>): 7,53 (s, a, 2H); 7,36 (d, a, J = 4,7 Hz, 1H); 6,88 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 4,46 (m, 1H); 4,15 (dd, J = 8,5, 1,9 Hz, 1H); 3,19 (m, 2H); 2,93 (m, 1H); 2,23 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 2,21 (m, 1H); 2,09 (t, J = 7,5, 2H); 2,04 (m, 1H); 1,88 (t, J = 5,4 Hz, 1H); 1,77 (m, 1H); 1,69 (m, 1H); 1,64-1,43 (m, 9H); 1,40-1,26 (m, 4H); 1,26 (s, 3H); 1,24-1,12 (m, 16H); 0,80 (d, J = 6,6, 3H); 0,79 (d, J = 6,6, 3H); 0,73 (s, 3H). CL-EM 659,7, MH+. EV.POS; AQA; vaporización 4 kV/cono de selección: 20V/sonda 250°C.

## Ejemplo 14

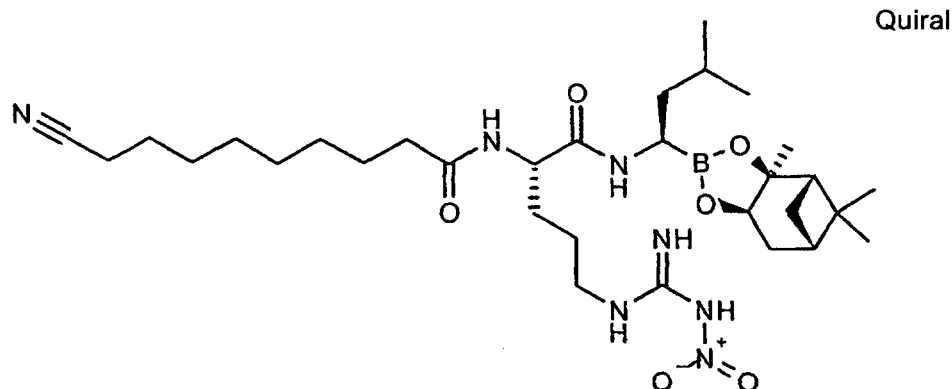
*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]9-cianononamida

5

10

15

20



25

El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 13 anterior a partir de ácido 9-ciano-nonanoico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: EM: MH+ 632,5.

## Ejemplo 15

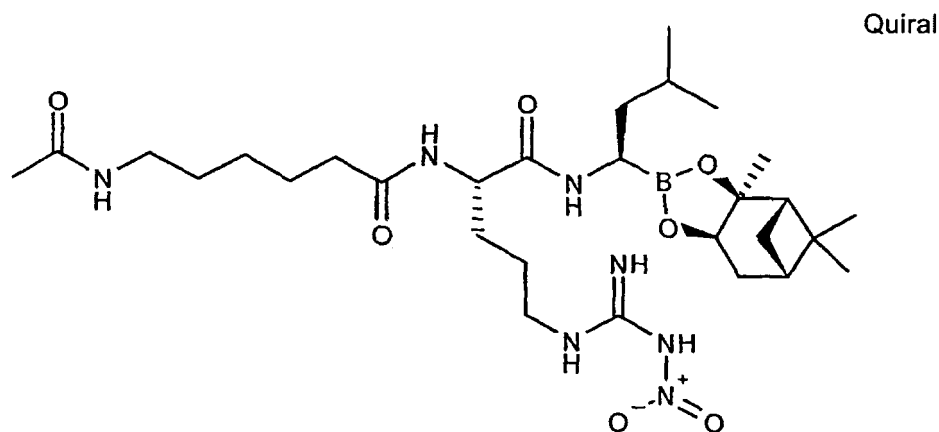
*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]6-(acetilamino)hexanamida

35

40

45

50



55

El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 13 anterior a partir de ácido 6-acetila-minohexanoico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: EM: [MH]+ 622,3.

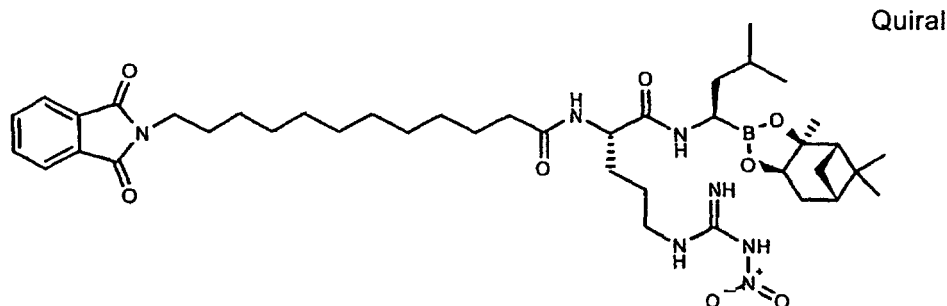
60

65

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo 16

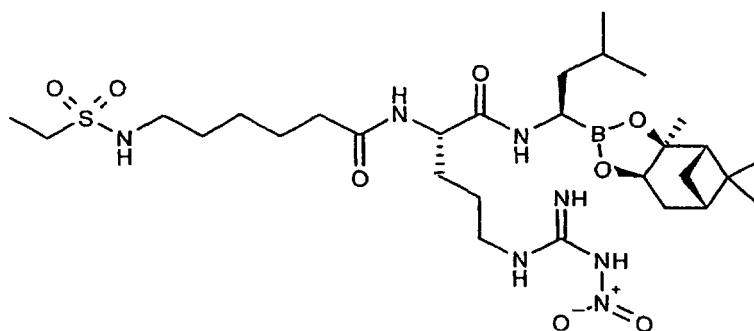
*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]12-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-dodecanamida



El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 13 anterior a partir de ácido 11-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-undecanoico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: EM: [MH]<sup>+</sup> 794,42.

### Ejemplo 17

*N*-[(1*S*)-1-[[[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]6-(etansulfonilamino)hexanamida

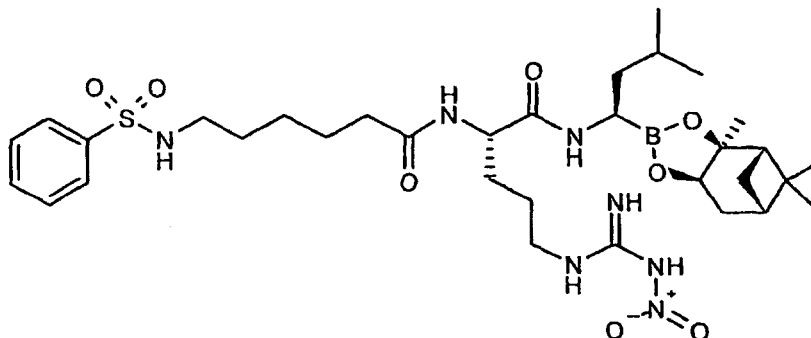


A una disolución de ácido 6-(etilsulfonilamino)hexanoico (90 mg, 0,40 mmol, 1,2 eq.), del Ejemplo 6, en DMF seco (10 ml) se le añadió TBTU (tetrafluoroborato de (N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio; 130 mg, 0,40 mmol, 1,2 eq.). La mezcla se enfrió hasta 0-5°C con un baño de hielo y se añadió NMM (0,12 ml, 1,08 mmol, 2,7 eq.). Tras pocos minutos se añadió sal clorhidrato de *N*-[(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil] (2*S*)-2-amino-5-[[imino(nitroamino)metil]-amino]pentanamida, (170 mg, 0,33 mmol, 1 eq.) del Ejemplo 3. La mezcla se agitó a t.a. durante 2 horas, se vertió en agua (150 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). La fase orgánica se lavó con una disolución de ácido cítrico al 2% (20 ml), bicarbonato de sodio al 2% (20 ml), y NaCl al 2% (20 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente acetato de etilo) para dar 30 mg de sólido amorfo (rendimiento: 13%).

Datos analíticos: RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,83 (1H, d, J = 2,7 Hz); 8,51 (1H, a); 8,00 (1H, d, J = 8,0 Hz); 8,3-7,5 (2H, a); 6,94 (1H, t, J = 5,8); 4,32 (1H, m); 4,06 (1H, dd, J = 1,8, 8,6); 3,13 (2H, m); 2,95 (2H, c, J = 7,3); 2,87 (2H, c, J = 6,7); 2,55 (1H, m); 2,19 (1H, m); 2,10 (2H, t, J = 7,5); 2,00 (1H, m); 1,85-1,1 (17H, m); 1,24 (3H, s); 1,21 (3H, s); 1,16 (3H, t, J = 7,5); 0,83 (6H, d, J = 6,6); 0,79 (3H, s).

## Ejemplo 18

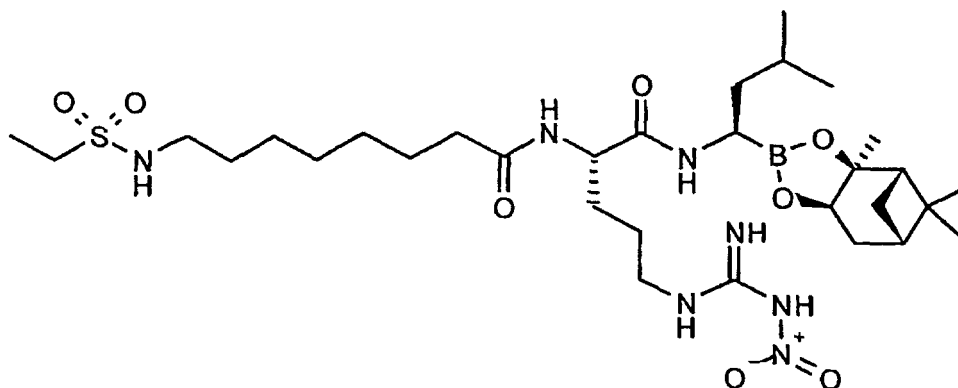
*N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]6-bencensulfonilamino]hexanamida*



El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 17 anterior a partir de ácido 8-fenilo-sulfonilaminohexanoico y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 8,83 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz); 8,51 (1H, a); 7,97 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz); 8,2-7,6 (2H, a); 7,77 (2H, m); 7,65-7,5 (4H, m); 4,31 (1H, m); 4,05 (1H, dd,  $J = 1,8, 8,6$ ); 3,12 (2H, m); 2,69 (2H, c,  $J = 7,0$ ); 2,54 (1H, m); 2,20 (1H, m); 2,05 (2H, t,  $J = 7,5$ ); 2,01 (1H, m); 1,85-1,1 (21H, m); 1,22 (3H, s); 1,21 (3H, s); 0,82 (6H, d,  $J = 6,6$ ); 0,79 (3H, s).

## Ejemplo 19

*N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil] 8-(etanosulfonilamino)octanamida*

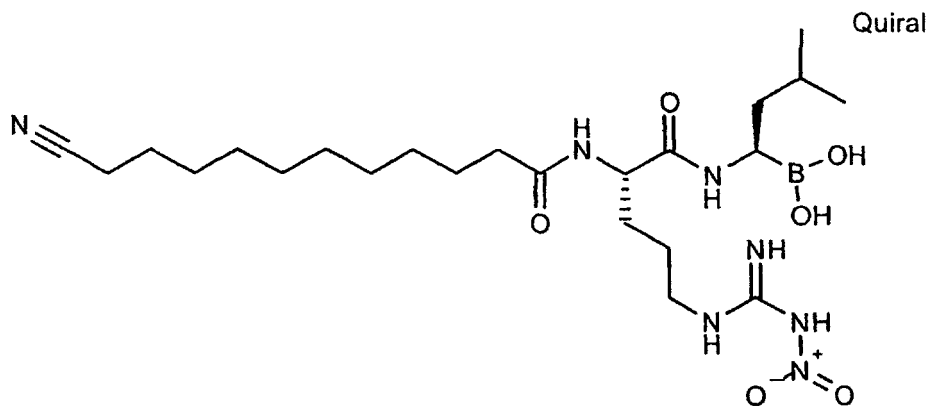


El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 17 anterior a partir de ácido 8-etanosulfonilamino-octanoico (Ejemplo 7) y el producto del Ejemplo 3, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 8,81 (1H, sa); 8,51 (1H, a); 7,98 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz); 8,3-7,5 (2H, a); 6,93 (1H, t,  $J = 5,7$ ); 4,32 (1H, m); 4,06 (1H, dd,  $J = 1,8, 8,6$ ); 3,13 (2H, m); 2,95 (2H, c,  $J = 7,3$ ); 2,87 (2H, c,  $J = 6,7$ ); 2,55 (1H, m); 2,19 (1H, m); 2,10 (2H, t,  $J = 7,0$ ); 2,00 (1H, m); 1,85-1,1 (17H, m); 1,23 (3H, s); 1,21 (3H, s); 1,16 (3H, t,  $J = 7,3$ ); 0,83 (6H, d,  $J = 6,6$ ); 0,79 (3H, s).

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo 20

Ácido [(1R)-1-[[[(2S)-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-2-[(11-cianoundeca-noil)amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico

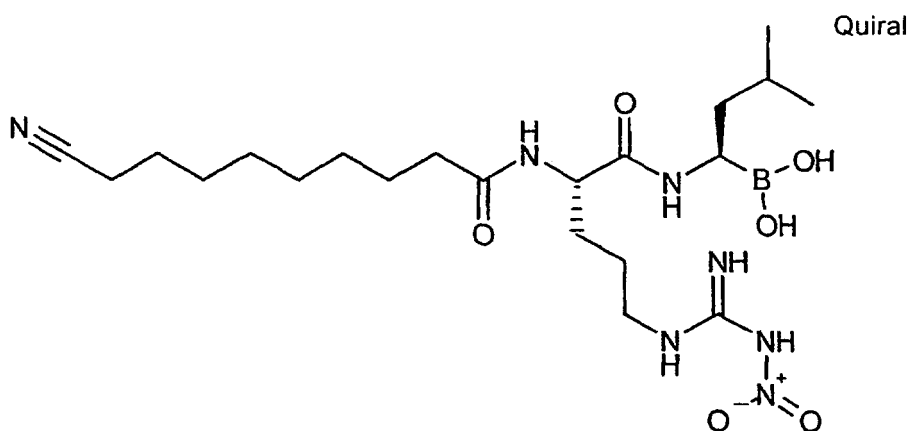


A una disolución de DMAP (4-Dimetilaminopiridina, 22,7 mg, 0,185 mmol) y ácido 11-cianoundecanoico (97,2 mg, 0,46 mmol) en diclorometano (5,2 ml), se le añadió PS-HOBT (1-hidroxibenzotriazol-6-sulfonamidometil poliestireno, 277 mg, 0,31 mmol, que carga 1,12 mmol/g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación se añadió una disolución de diisopropilcarbodiimida (0,218 ml, 1,39 mmol) en DCM (diclorometano, 0,6 ml). Se agitó la suspensión durante 4 horas a temperatura ambiente y a continuación la resina se filtró bajo nitrógeno y se lavó varias veces con DMF (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml), DMF (3 x 5 ml) y THF (3 x 5 ml). La resina bien seca se suspendió en una disolución de sal clorhidrato de ácido [(1R)-1-[[[(2S)-2-amino-5-[[imino(nitroamino)-metil]amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]-borónico del Ejemplo 4 (55,2 mg, 0,15 mmol) y DIPEA (N,N-diisopropiletilamina, 0,051 ml, 0,293 mmol) en DCM (4 ml) y DMF (0,6 ml). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La resina se filtró y lavó con DMF (10 ml) y DCM (2 ml) y el disolvente se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante elución en un cartucho ISOLUTE SPE-DIOL, usando mezclas de DCM/Metanol desde 95/5 hasta 50/50. Las fracciones conteniendo el producto se recogieron y se concentraron. La purificación final se realizó mediante elución en un cartucho ISOLUTE SPESI de 2 g en fase normal usando mezclas de DCM/Metanol desde 100/0 hasta 50/50 (25 mg, rendimiento: 35%).

Datos analíticos: EM: [M-18]H+ 508,5.

### Ejemplo 21

Ácido [(1R)-1-[[[(2S)-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-2-[(9-cianononanoil)amino]-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico



El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 20 anterior a partir de ácido 9-cianononanoico y el producto del Ejemplo 4, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: EM: [M-18]H+ 480,1.

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo 22

Ácido [(1R)-1-[[[(2S)-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-2-[[7-(metoxicarbonil) heptanoil]amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico

5

10

15

20

25

30

35

40

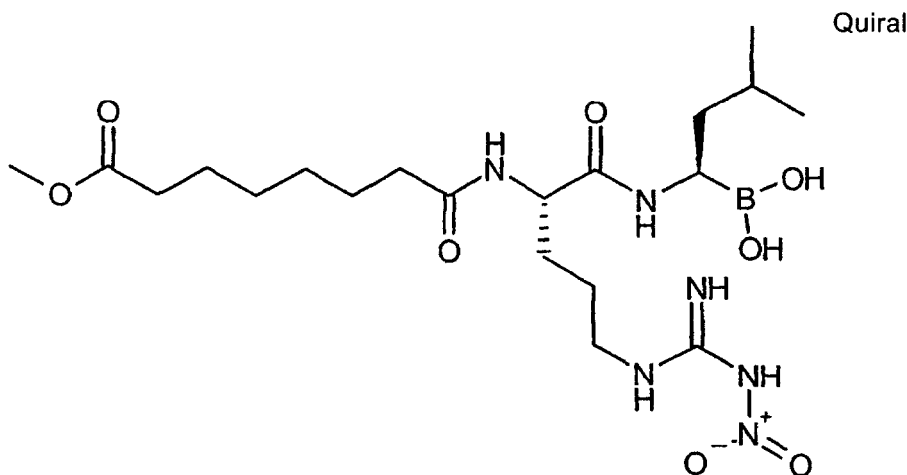
45

50

55

60

65



Se agitó una mezcla de N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]-4-(metoxicarbonil)heptanamida, preparada por medio del procedimiento del Ejemplo 12, (300 mg, 0,47 mmol), ácido 2-metilpropilborónico (96 mg, 0,94 mmol) y disolución de cloruro de hidrógeno 4N en dioxano (120  $\mu$ l) en una mezcla heterogénea 40:60 de metanol:hexano (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió hexano (5 ml), la mezcla se agitó durante un momento, a continuación se eliminó la fase de hexano. Se añadió hexano fresco (5 ml), disolución cloruro de hidrógeno 4N en dioxano (120  $\mu$ l) y ácido 2-metilpropilborónico (96 mg, 0,94 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó la fase de hexano y la fase de metanol se lavó con hexano (2 x 5 ml). El residuo obtenido tras la concentración de la fase de metanol se purificó por medio de cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con una mezcla de acetona:metanol:hexano 40:40:20. El producto se redisolvió en acetato de etilo (200 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 10 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se disolvió en la mínima cantidad de metanol, se filtró la disolución a través de un tapón de algodón y se concentró. El residuo se trituró con éter dietílico. El sólido se recogió mediante decantación, a continuación se trituró con acetato de etilo (15 ml). El sólido se recogió mediante decantación y se secó bajo vacío dando el producto como un sólido blanco (30 mg, rendimiento: 13%).

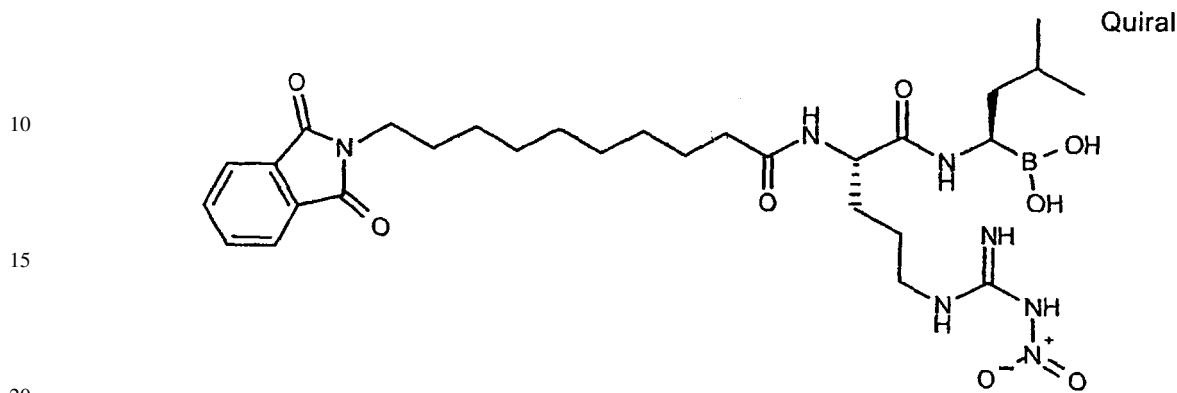
Datos analíticos: RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 8,60 (1H, d, J = 8,4 Hz); 8,50 (1H, a); 8,06 (1H, d, J = 7,9); 7,92 (2H, a); 4,36 (1H, m); 3,58 (3H, s); 3,13 (2H, m); 2,55 (1H, m); 2,28 (2H, t, J = 7,5); 2,12 (2H, m); 1,69 (1H, m); 1,49 (7H, m); 1,24 (7H, m); 0,81 (6H, m).

Análisis EV.	Calculado:	C 47,82%	H 7,83%	N 16,73%
	Hallado	C 48,13%	H 7,50%	N 16,34%

## Ejemplo 23

Ácido [(1R)-1-[[[(2S)-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-2-[(10-(1,3-dihidro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-il)-1-oxodecil]-)amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico

5



10

15

20

El compuesto del título se preparó según el procedimiento para el Ejemplo 22 anterior a partir del producto del Ejemplo 10, usando reactivos y condiciones de reacción adecuados. Datos analíticos: RMN de  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ ): 7,82 (4H, m); 4,52 (1H, m); 3,66 (2H, t, J = 7,3); 3,27 (2H, m); 2,75 (1H, m); 2,24 (2H, t, J = 7,3 Hz); 1,9-1,2 (20H, m); 0,91 (6H, d, J = 6,6).

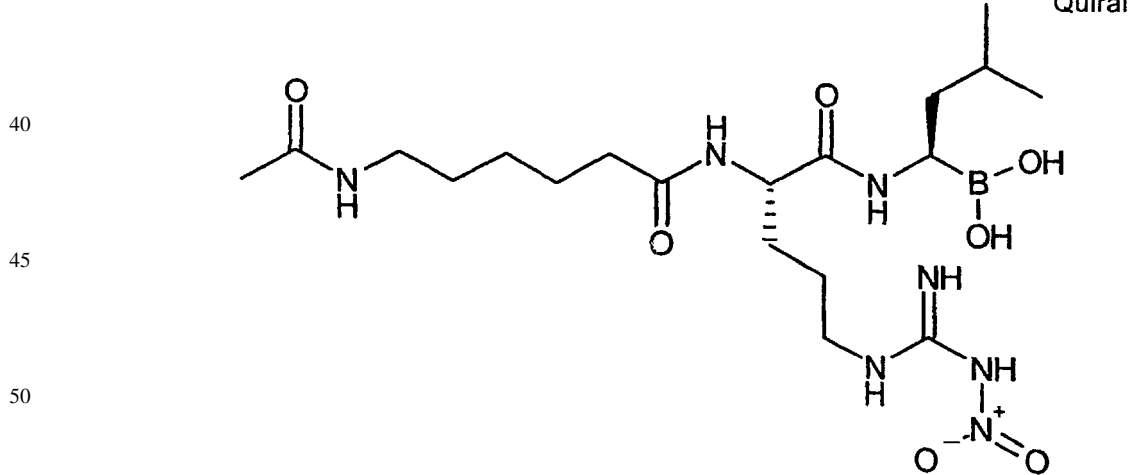
25

## Ejemplo 24

30

Ácido [(1R)-1-[[[(2S)-5-[[imino(nitroamino)metil]amino]-2-[[6-(acetilamino)hexanoil]amino]-1-oxopentil]amino]-3-metilbutil]borónico

35



40

45

50

55

Se disolvió N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(3aS,4S,6S,7aR)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutil]amino]-carbonil]-4-[[imino(nitroamino)metil]amino]butil]6-(acetilamino)hexanamida del Ejemplo 15 (48 mg, 0,077 mmol), en Et<sub>2</sub>O (2 ml) y se añadió cuidadosamente HCl al 37% (1 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se concentró hasta sequedad y el residuo se disolvió en MeOH (1 ml) y se eluyó a través de un cartucho ISOLUTE PSA con MeOH (10 ml). Se evaporó el disolvente y el producto bruto se purificó eluyendo a través de un cartucho ISOLUTE SPE-SI de 500 mg usando mezclas de DCM/Metanol desde 90/10 hasta 50/50 para dar el compuesto del título (19,4 mg, rendimiento: 52%).

60

Datos analíticos: EM: [M-18]H<sup>+</sup> 470,2.

65

*Utilidad**Actividad de los compuestos*

5 Los presentes compuestos pueden inhibir la actividad del proteasoma. La Tabla F-1 proporciona a continuación datos relacionados con varios compuestos de los ejemplos de la invención con respecto a, por ejemplo, la capacidad para inhibir la actividad del proteasoma.

*Procedimientos y Composiciones*

10 Los compuestos de la presente invención pueden inhibir la actividad del proteasoma llevando a la inhibición o al bloqueo de una diversidad de funciones intracelulares con las que el proteasoma está directamente o indirectamente asociado. Por ejemplo, los inhibidores del proteasoma pueden modular, tal como inducir, la apoptosis en una célula. En algunas formas de realización, los compuestos en este documento pueden matar las células tumorales por inducción de la apoptosis. Por consiguiente, los presentes compuestos pueden usarse para tratar el cáncer, tumores u otros trastornos proliferativos.

15 En otras formas de realización, la inhibición de la función del proteasoma por los compuestos de la invención puede inhibir la activación o el procesamiento del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Esta proteína desempeña una función en la regulación de los genes involucrados en las respuestas inmunes e inflamatorias así como en la viabilidad celular. La inhibición de la función del proteasoma también puede inhibir la ruta de ubiquitinación/proteolisis. Esta ruta cataliza, *inter alia*, la degradación selectiva de proteínas altamente anormales y proteínas reguladoras de vida corta. En algunas formas de realización, los compuestos de la invención pueden prevenir la degradación de p53 que es típicamente degradada por medio de la ruta dependiente de la ubiquitina. La ruta de ubiquitinación/proteolisis también está involucrada en el procesamiento de antígenos celulares o virales internalizados en péptidos antigénicos que se unen a las moléculas del MHC-I. Por consiguiente, los compuestos de la invención pueden usarse para reducir la actividad del sistema proteolítico citosólico dependiente de ATP-ubiquitina en una serie de tipos celulares.

20 Por consiguiente, la utilidad de tales compuestos puede incluir terapias, tales como el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos asociados con el proteasoma. Los procedimientos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o su composición, a un mamífero, tal como un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno asociado con el proteasoma. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para prevenir, aliviar o mejorar cualquier fenómeno, tal como una causa o un síntoma, que se sabe en la técnica que está asociado con la enfermedad o el trastorno.

25 Las enfermedades o trastornos que pueden tratarse (afecciones físicas anormales) pueden asociarse con actividades normales o anormales del proteasoma, tales como la regulación de la apoptosis. Se conocen numerosas enfermedades o trastornos que están asociados con el proteasoma, o que se tratan de manera deseable por inducción de la apoptosis, e incluyen, por ejemplo, diversos cánceres y tumores incluidos los asociados con la piel, próstata, el cáncer colorrectal, de páncreas, riñón, ovario, mama, hígado, lengua, pulmón y tejidos de músculo liso. Los tumores de preferencia que pueden tratarse con inhibidores de proteasomas incluyen, pero no se limitan a tumores hematológicos, tales como, por ejemplo, leucemias, linfomas, linfoma no Hodgkin, mieloma, mieloma múltiple, así como tumores sólidos tales como, por ejemplo, tumores colorrectales, mamarios, de próstata, pulmón y páncreas. Para provocar los efectos terapéuticos, los inhibidores del proteasoma pueden administrarse a los pacientes como agentes únicos o en combinación con uno o más agentes antitumorales o anticáncer y/o radioterapia. Los ejemplos de otros agentes antitumorales o anticáncer que pueden administrarse ventajosamente de manera concomitantemente con un inhibidor del proteasoma incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, daunomicina, metotrexato, vincristina, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, 5-FU, hexametilmelamina, carboplatino, cisplatino, idarubicina, paclitaxel, docetaxel, topotecan, irinotecan, gemcitabina, L-PAM, BCNU y VP-16. Los procedimientos para determinar la apoptosis *in vitro* son bien conocidos en la técnica y los kits están disponibles comercialmente. Véase por ejemplo el ensayo Apo-ONETM Homogeneous Caspase-3/7 de Promega Corporation, Madison WI, EEUU (Boletín Técnico N° 295, revisado 2/02, Promega Corporation).

30 Otras enfermedades o trastornos asociados con el proteasoma incluyen la proteolisis acelerada o potenciada que se presenta en la atrofia muscular, tal como está comúnmente asociada con la activación de un proceso no lisosómico que requiere ATP que involucra la ubiquitina. La proteolisis acelerada o potenciada puede ser el resultado de cualquiera de numerosas causas que incluyen sepsis, quemaduras, traumas, cáncer, infección, enfermedades neurodegenerativas tales como distrofia muscular, acidosis, heridas espinales/nerviosas, uso de corticoides, fiebre, estrés e inanición. Los compuestos de la invención pueden probarse para la inhibición de la consunción del músculo por diversos procedimientos conocidos en la técnica tales como la medición de la excreción urinaria del aminoácido 3-metilhistidina modificado (véase, por ejemplo, Young, y col., Federation Proc., 1978, 37, 229).

35 Los compuestos de la presente invención pueden usarse además para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con la actividad del NF- $\kappa$ B incluidas por ejemplo, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y trastornos resultantes de, por ejemplo, rechazo de transplantes, artritis, infección, enfermedad intestinal inflamatoria, asma, osteoporosis, osteoartritis, psoriasis, reestenosis y enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, un procedimiento que previene la activación del NF- $\kappa$ B en pacientes que sufren una de tales enfermedades será terapéu-

## ES 2 322 470 T3

ticamente ventajoso. La inhibición de la actividad del NF-kB puede medirse usando un ensayo de unión de ADN tal como se describe en Palombella, y col., Cell, 1994, 78, 773.

5 Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente a los individuos propensos o que se sospecha que pueden sufrir tales enfermedades o trastornos usando técnicas de diagnóstico convencionales.

### Ejemplo A

#### *Ensayo para la actividad análoga a quimotripsina del proteasoma 20S de eritrocitos humanos (HEP)*

10

La actividad análoga a quimotripsina del proteasoma de los compuestos de la invención se ensayó según el siguiente procedimiento.

15 Se plaquéó proteasoma 20S de eritrocitos humanos (HEP), adquirido de Immatics Biotechnologies Inc., Tübingen, Alemania, en placas de microvaloración de 96 pocillos a 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (aproximadamente sitios catalíticos 0,6 nM) en tampón Tris 20 mM con SDS al 0,04%. Se añadió un sustrato fluorimétrico Suc-LLVY-AMC (succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina), adquirido de Sigma Inc., St. Louis, MO, EEUU hasta una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  de una disolución madre de 10 mM en dimetilsulfóxido. Los volúmenes de reacción eran de 100  $\mu\text{l}$  por pocillo. Tras la incubación durante diversos períodos de tiempo a 37°C, se determinó la concentración de AMC (aminometilcoumarina) libre en un lector de microplacas Perkin Elmer HTS 7000 Plus, excitación 370 nM y emisión 465 nM. La actividad del proteasoma se determinó bajo condiciones en las que la hidrólisis del sustrato aumentaba de manera lineal con el tiempo y el cambio en la señal de fluorescencia era proporcional a la concentración de AMC libre.

25

### Ejemplo B

#### *Ensayo para la actividad de $\alpha$ -quimotripsina*

30 Se plaquéó  $\alpha$ -quimotripsina bovina, adquirida de Sigma Inc., en placas de microvaloración de 96 pocillos a 10 ng/ml (aproximadamente sitios catalíticos 2 pM) en tampón Hepes 50 mM con NaCl 0,5 M. Se añadió un sustrato fluorimétrico Suc-AAPF-AMC (succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-metilcoumarina), adquirido de Sigma Inc., St. Louis, MO, EEUU hasta una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  de una disolución madre de 10 mM en dimetilsulfóxido. Los volúmenes de reacción eran de 100  $\mu\text{l}$  por pocillo. Tras la incubación durante diversos períodos de tiempo a temperatura ambiente, se determinó la concentración de AMC libre en un lector de microplacas Perkin Elmer HTS 7000 Plus, excitación 370 nM y emisión 465 nM. La actividad de  $\alpha$ -quimotripsina se determinó bajo condiciones en las que la hidrólisis del sustrato aumentaba de manera lineal con el tiempo y el cambio en la señal de fluorescencia era proporcional a la concentración de AMC libre.

40

### Ejemplo C

#### *Determinación de valores de $CI_{50}$ para inhibidores de HEP y $\alpha$ -quimotripsina*

45 Los valores de  $CI_{50}$  se definen típicamente como la concentración de un compuesto necesaria para producir el 50% de inhibición de la actividad de la enzima. Los valores de  $CI_{50}$  son indicadores útiles de la actividad de un compuesto para su uso designado. Los inhibidores del proteasoma de la invención pueden considerarse activos si tienen valores de  $CI_{50}$  inferiores a aproximadamente 1 micromolar para la inhibición del proteasoma de eritrocitos humanos (HEP). En algunas formas de realización, los inhibidores muestran alguna especificidad para HEP y la relación de la  $CI_{50}$  para la inhibición de  $\alpha$ -quimotripsina bovina versus la  $CI_{50}$  para la inhibición de HEP, es decir  $CI_{50}(\alpha\text{-quimotripsina})/CI_{50}(\text{HEP})$ , es mayor que aproximadamente 100.

55 La inhibición de la actividad análoga a quimotripsina de HEP y de la  $\alpha$ -quimotripsina bovina se determinó incubando la enzima con diversas concentraciones de inhibidores putativos durante 15 minutos a 37°C (o temperatura ambiente para  $\alpha$ -quimotripsina) previo a la adición del sustrato. Cada condición experimental se evaluó por triplicado y se realizaron experimentos duplicados para los inhibidores descritos en este documento.

60 Los compuestos de la presente invención se consideran activos en el ensayo identificado anteriormente si sus valores de  $CI_{50}$  para la inhibición de HEP son inferiores a 1000 nanoMolar. De preferencia, los compuestos de la presente invención tendrán valores de  $CI_{50}$  para la inhibición de HEP inferiores a 100 nanoMolar. De más preferencia, los compuestos de la presente invención tendrán valores de  $CI_{50}$  para la inhibición de HEP inferiores a 10 nanoMolar. Los compuestos de la presente invención han demostrado, en los ensayos identificados anteriormente, valores de  $CI_{50}$  para la inhibición de HEP inferiores a 1000 nanoMolar.

65

## ES 2 322 470 T3

### Ejemplo D

#### *Ensayo celular para la actividad análoga a quimotripsina del proteasoma en la línea celular Molt-4*

5 Se ensayó la actividad análoga a quimotripsina del proteasoma en células Molt-4 (leucemia humana) según el siguiente procedimiento. Una breve descripción del procedimiento se publicó previamente (Harding y col., J. Immunol., 1995, 155, 1767).

10 Se lavaron células Molt-4 y se resuspendieron en solución salina tamponada con HEPES (KCl 5,4 mM, NaCl 120 mM, Glucosa 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, piruvato de Na 1 mM, Hepes 20 mM) y se plaquearon en placas de microvaloración blancas de 96 pocillos hasta una concentración final de  $6 \times 10^6$  células/ml. A continuación se añadieron diversas 5X concentraciones del inhibidor del proteasoma (o DMSO diluido para controles), preparadas a partir de disoluciones de DMSO 250X diluyendo 50 veces usando solución salina tamponada con HEPES, a las placas hasta una concentración final 1X. Tras 15 minutos de incubación a 37°C, se añadió un sustrato fluorimétrico permeable a las  
15 células (MeOSuc-FLF-AFC) (metoxisuccinil-Phe-Leu-Phe-7-amido-4-trifluorometilcoumarina) adquirido de Enzyme Systems Products, número de catálogo AFC-88, a cada pocillo hasta una concentración final de 25  $\mu$ M de una disolución madre de 20 mM en DMSO. Los volúmenes de reacción eran de 100  $\mu$ l por pocillo.

20 La concentración de AFC libre se controló cada 1,5 minutos durante 30 minutos (22 ciclos) en un lector de microplacas Polastar Optima, BMG Labtechnologies, usando una longitud de onda de excitación de 390 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm. La actividad del proteasoma se determinó bajo condiciones en las que la hidrólisis del sustrato aumentaba de manera lineal con el tiempo y el cambio en la señal fluorescente era proporcional a la concentración de AFC libre.

### 25 Ejemplo E

#### *Determinación de los valores de CE<sub>50</sub> para inhibidores del proteasoma en la línea celular MOLT-4*

30 Los valores de CE<sub>50</sub> se definen típicamente como la concentración de un compuesto necesaria para producir una inhibición del 50% de la actividad de la enzima entre las respuestas mínima y máxima (0% y 85-90% respectivamente para este ensayo). Los valores de CE<sub>50</sub> son indicadores útiles de la actividad de un compuesto para su uso designado. Los compuestos de la invención pueden considerarse activos si tienen una CE<sub>50</sub> inferior a aproximadamente 10 micromolar.

35 La inhibición de la actividad análoga a quimotripsina del proteasoma en células Molt-4 se determinó incubando células con diversas concentraciones de inhibidores putativos durante 15 minutos a 37°C previo a la adición del sustrato. Cada condición experimental se evaluó por triplicado y se realizaron experimentos duplicados para los inhibidores descritos en este documento.

40 Los compuestos de la presente invención se consideran activos en el ensayo identificado anteriormente si sus valores de CE<sub>50</sub> para la inhibición del proteasoma en MOLT-4 son inferiores a 10 microMolar. De preferencia, los compuestos de la presente invención tendrán valores de CE<sub>50</sub> para la inhibición del proteasoma en MOLT-4 inferiores a 2 microMolar. De más preferencia, los compuestos de la presente invención tendrán valores de CE<sub>50</sub> para la inhibición del proteasoma en MOLT-4 inferiores a 200 nanomolar. Los compuestos de la presente invención demostraron, en el ensayo identificado anteriormente, valores de CE<sub>50</sub> para la inhibición del proteasoma en células MOLT-4 inferiores a 10 microMolar.

### 50 Ejemplo F

#### *Ensayo para la actividad análoga a la tripsina del proteasoma*

55 La actividad análoga a la tripsina del proteasoma humano puede ensayarse como se describió anteriormente con las siguientes modificaciones. Las reacciones pueden llevarse a cabo en tampón Tris-glicerol (pH 9,5) suplementado con 2-mercaptoetanol 1 mM, y el sustrato puede ser un sustrato fluorogénico tal como benciloxicarbonil-Phe-Arg-AMC (100  $\mu$ M).

60 Tras la incubación durante diversos períodos de tiempo a 37°C, puede determinarse la concentración de AMC libre en un espectrofluorímetro Fluoroskan II con un filtro de excitación de 390 nm y un filtro de emisión de 460 nm. La actividad de proteasa puede determinarse bajo condiciones en las que la hidrólisis aumenta de manera lineal con el tiempo y el cambio en la fluorescencia es proporcional a la concentración de AMC libre.

65

## Ejemplo G

*Inhibición in vivo de la degradación celular muscular*

5 El efecto de los inhibidores en la atrofia con pérdida de peso del músculo sóleo en ratas jóvenes puede determinarse, por ejemplo, por los procedimientos descritos en Tischler, Metabolism, 1990, 39, 756. Por ejemplo, pueden suspenderse ratas hembra jóvenes Sprague-Dawley (80-90 gramos) de la pata trasera con la cola escayolada según se describe en Jaspers, y col., J. Appl. Physiol., 1984, 57, 1472. Las patas traseras del animal pueden elevarse por encima del suelo de la jaula con cada animal alojado individualmente. Los animales pueden tener acceso libre a alimento y  
 10 agua y pueden pesarse en el momento de la suspensión y en la terminación del experimento. Durante el período de suspensión los animales pueden controlarse diariamente para asegurar que sus dedos no están tocando el suelo de la jaula y que no hay hinchazón de la cola por la escayola.

*Diseño experimental – Parte 1*

15 Cada experimento puede comenzar con la suspensión de 20 ratas que se dividen aleatoriamente en 4 grupos de 5 animales cada uno. El grupo A puede suspenderse durante 2 días, proporcionando los datos basales para aproximar el tamaño del músculo sóleo en otros animales suspendidos durante tiempos más prolongados. Los pesos corporales promedio para los grupos al comienzo del estudio pueden compararse y usarse como un factor de corrección para las diferencias de tamaño corporal. El grupo B puede ser un segundo grupo de control que tiene el sóleo de una  
 20 pata tratado con una disolución acuosa de mersalil tras dos días de pérdida de peso, para demostrar la capacidad de enlentecer la atrofia muscular durante la pérdida de peso, para cada grupo de animales. 2 días después del comienzo de la pérdida de peso, puede inyectarse una disolución acuosa de mersalil (200 nM; 4  $\mu$ l/100 g de peso corporal inicial) en uno de los sóleos. El músculo contralateral puede inyectarse con un volumen similar de solución salina al 0,9% (“Vehículo”). Los animales pueden mantenerse bajo tranquilización con Innovar-vet (10  $\mu$ l/100 g de peso corporal)  
 25 durante el procedimiento de inyección *in situ*. Tras las inyecciones, los animales pueden suspenderse durante otras 24 horas y puede extirparse el sóleo. Pueden usarse los grupos C y D para cada experimento para probar cada una de las dos formas de realización diferentes de los compuestos descritos. Los animales pueden tratarse como en el grupo B, excepto que puede inyectarse el inhibidor de proteasoma 1 mM, contenido en dimetilsulfóxido (DMSO), en el sóleo de una pata y DMSO solo en el sóleo contralateral. Por consiguiente, cada experimento está constituido por  
 30 dos grupos de control y la prueba de los inhibidores del proteasoma de la invención. La conclusión de cinco de tales experimentos con diferentes pares de inhibidores proporciona un valor “n” de 10 para probar cada inhibidor y cada uno puede probarse en dos diferentes lotes de animales.

*Procesamiento del músculo sóleo – Parte 1*

35 Tras sacrificar el animal, puede extirparse el sóleo, quitarse la grasa y el tejido conectivo y puede pesarse cuidadosamente. A continuación puede homogeneizarse en músculo en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y la proteína precipitada puede sedimentarse por centrifugación. A continuación puede lavarse el sedimento una vez con TCA al 10% y una vez con etanol:éter (1:1). El sedimento final puede disolverse en 4 ml de hidróxido de sodio 1N. Posteriormente puede analizarse la muestra para determinar el contenido de proteínas por medio de un procedimiento de biuret, usando albúmina como patrón.

*Análisis de los datos – Parte 1*

45 El efecto de los inhibidores en el contenido total de proteína en el músculo puede examinarse principalmente por medio de comparación pareada con el músculo contralateral sin tratar. Puede calcularse la relación de contenidos y puede analizarse estadísticamente por análisis de varianza (“ANOVA”). La pata izquierda puede ser siempre la pata tratada de manera que también pueden compararse las relaciones de contenido de proteína con los animales control  
 50 no tratados. De esta manera, puede mostrarse una diferencia significativa comparando el contenido de proteína de las dos patas, así como la eficacia relativa de los inhibidores probados. También puede llevarse a cabo una prueba de student pareada para el efecto de cada tratamiento separado. Los datos de control no tratado también proporcionan una estimación del contenido de proteína del día 2. Esto permite la aproximación de los cambios de proteína durante las 24 horas de tratamiento para cada uno de los Grupos B, C y D.

55

*Diseño experimental – Parte 2*

Cada experimento puede estar constituido por 10 animales con grupos de 5 animales probados con uno de los inhibidores para su efecto en la síntesis de proteínas. No se necesitan animales de control para este aspecto del estudio ya que el músculo contralateral tratado con DMSO sirve como control pareado para el músculo tratado con el inhibidor.  
 60 Puede inyectarse cada grupo como se describió para los grupos C y D en la parte 1. Veinticuatro horas tras el tratamiento *in situ* puede analizarse la tasa fraccional de síntesis de proteínas en ambos músculos sóleos. Puede inyectarse cada músculo con una solución salina al 0,9% (3,5  $\mu$ l/100 g del peso corporal final) conteniendo <sup>3</sup>H-fenilalanina (50 mM; 1  $\mu$  Ci/ml). Quince minutos más tarde pueden extirparse los dos tercios medios del músculo y puede procesarse  
 65 el músculo como se describió anteriormente.

## ES 2 322 470 T3

### *Procesamiento del músculo sóleo – Parte 2*

El músculo puede lavarse primero durante 10 minutos con solución salina al 0,84% conteniendo cicloheximida 0,5 mM, para terminar la síntesis de proteínas, y cicloleucina 20 mM, para atrapar la fenilalanina en la célula. A continuación puede homogeneizarse el músculo en 2,5 ml de ácido perclórico al 2% helado. La proteína precipitada puede sedimentarse por centrifugación. Puede tomarse una alícuota del sobrenadante para realizar el conteo de centelleo y otra alícuota puede procesarse para conversión de fenilalanina a fenetilamina para determinar la concentración de fenilalanina soluble por medio de fluorometría. Véase, por ejemplo, Garlick, y col., Biochem. J., 1980, 192, 719. Estos valores pueden proporcionar la actividad intracelular específica. Puede determinarse la actividad específica de fenilalanina en la proteína del músculo tras hidrolizar la proteína calentando en HCl 6N. Los aminoácidos liberados pueden disolverse en tampón. Puede tomarse una alícuota para realizar el conteo de centelleo y otra para análisis de fenilalanina como para la fracción del sobrenadante. La tasa fraccional de síntesis de proteínas puede calcularse como: actividad específica de proteína/actividad específica intracelular. tiempos. tiempo.

### 15 *Análisis de los datos – Parte 2*

El análisis de síntesis de proteínas puede ser de a pares para cada inhibidor. Las comparaciones por prueba t de student pareada de los músculos contralaterales pueden determinar si hay algún efecto del inhibidor en la síntesis de proteínas. Puede calcularse la degradación de proteínas aproximadamente como la tasa fraccional de síntesis de proteínas (de la parte 2) más la tasa fraccional de crecimiento proteico (de la parte 1), donde la pérdida de proteínas da un valor negativo para el crecimiento proteico.

Cuantitativamente, la capacidad de los inhibidores para enlentecer la pérdida de proteínas sin afectar la síntesis de proteínas indica un enlentecimiento de la degradación proteica.

25

### Ejemplo H

#### *Investigación de actividad antitumoral in vivo*

30

#### *Materiales*

Los inhibidores del proteasoma usados para estudios *in vivo* pueden formularse en un medio adecuado para administración intravenosa (iv) u oral (po). Por ejemplo, para la administración iv, los compuestos pueden administrarse disueltos en NaCl al 0,9%, o en mezclas de NaCl al 0,9%, solutol HS15 y dimetilsulfóxido, por ejemplo en la proporción 87:10:3 (v:v:v), respectivamente.

35

#### *Líneas celulares*

Pueden usarse las siguientes líneas celulares tumorales humanas y murinas de diferentes orígenes histológicos para probar la actividad antitumoral de los compuestos de la invención: H460 (humana, pulmón), A2780 (humana, ovario), PC-3 (humana, próstata), LoVo (humana, colon), HCT116 (humana, colon), BXPC3 (humana, pancreática), PANC-1 (humana, pancreática), MX-1 (humana, mamaria), MOLT (humana, leucemia), mieloma múltiple (humana, mieloma), YC8 (murina, linfoma), L1210 (murina, leucemia), 3LL (murina, pulmón).

45

#### *Especies animales*

Se adquieren ratones inmunosuprimidos o inmunocompetentes de 5-6 semanas de fuentes comerciales, por ejemplo de Harlan (Correzzana, Mi Italia). Los ratones CD1 nu/nu se mantienen bajo condiciones estériles; se usan jaulas, camas y alimentos esterilizados y agua acidificada.

50

#### *Implantación de células tumorales y crecimiento*

Pueden transplantarse modelos de tumores sólidos de diferentes histotipos (pulmón, ovario, próstata, pancreático, de colon) por vía subcutánea (sc.) en la región axilar de ratones inmunocompetentes (modelos murinos) o en ratones inmunosuprimidos (modelos humanos). Las líneas celulares tumorales, originalmente obtenidas de ATCC, pueden adaptarse para crecer “*in vivo*” como tumor sólido de “cultivo *in vitro*”.

55

Pueden transplantarse modelos de tumores hematológicos murinos o humanos en diferentes sitios (iv, ip, ic o sc) en ratones inmunocompetentes (tumores murinos) o en ratones inmunosuprimidos (modelos de leucemia, linfoma y mieloma humanos), según su mayor implantación del tumor.

60

#### *Tratamiento con fármacos*

Se aleatorizan ratones que portan tumores sólidos (estadificados) o hematológicos en grupos experimentales (10 ratones/grupo). Para los tumores sólidos, se considera un peso tumoral promedio de 80-100 mg para cada grupo para comenzar el tratamiento; se descartaron los ratones con los tumores más grandes y más pequeños.

65

## ES 2 322 470 T3

Los grupos experimentales se asignan aleatoriamente al tratamiento con fármaco y al grupo de control. Los animales pueden tratarse por vía iv u oral, según la biodisponibilidad oral con los compuestos siguiendo diferentes programas de tratamiento: iv semanalmente o dos veces por semana, o por administración oral diaria.

5 En modelos de tumores sólidos, el tratamiento con fármacos puede comenzar cuando el tamaño del tumor varía entre 80 y 100 mg tras el trasplante del tumor (Día 0).

Los compuestos pueden administrarse en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal/ratón en el disolvente adecuado.

10 *Parámetros de actividad antitumoral*

Para la evaluación de la actividad antitumoral pueden valorarse los siguientes parámetros:

15 crecimiento del tumor sólido primario; en cada ratón se controla por medición con un calibre dos veces por semana;

tiempo de supervivencia de los ratones tratados comparado con los ratones de control;

evaluación dos veces por semana del peso corporal de los ratones individuales.

20 La inhibición del crecimiento tumoral, TWI% (porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor primario en comparación con los grupos de control tratados con vehículo) o la inhibición Relativa del crecimiento tumoral, RTWI% en caso de tumores estadificados, se evalúa una semana después del último tratamiento con fármacos y el peso del Tumor (TW) puede calcularse de la siguiente manera:

25

$$TW = 1/2 ab^2$$

donde a y b son los diámetros mayor y menor de la masa tumoral en mm.

30

La actividad antitumoral puede determinarse como la inhibición del peso tumoral (TWI%), que se calcula según la fórmula:

35

$$TWI\% = 100 - \frac{TW \text{ medio tratados}}{TW \text{ medio controles}} \times 100$$

40

El RTWI% (porcentaje relativo de inhibición de crecimiento del tumor primario en comparación con los grupos de control tratados con vehículo) se evalúa una semana después del último tratamiento con el fármaco, según la siguiente fórmula:

45

$$RTWI\% = 100 - \frac{RV \text{ medio de ratones tratados}}{RV \text{ medio de ratones de control}} \times 100$$

donde

50

$$RV = \frac{V_t \text{ (peso del tumor en el día T)}}{V_o \text{ (peso inicial del tumor al comienzo del tratamiento)}}$$

55

El Porcentaje de Regresión del Tumor puede calcularse como regresiones en términos de peso relativo del tumor, determinado como peso del tumor en un día dado dividido por el peso inicial del tumor al comienzo del experimento.

60

En modelos de tumores hematológicos, la actividad antitumoral puede determinarse como porcentaje de aumento de la mediana del tiempo de sobrevida expresada como la relación (T/C%) de la mediana del tiempo de sobrevida del grupo tratado (T) al del grupo de control (C). Los animales libres de tumor al final del experimento (60 días tras el trasplante) se excluyen del cálculo y se consideran supervivientes de largo plazo (LTS).

*Evaluación de toxicidad en ratones que portan tumores*

65

La toxicidad puede evaluarse diariamente en base a los hallazgos brutos de la autopsia y la pérdida de peso. Se considera que los ratones murieron por toxicidad cuando la muerte se produce antes de la muerte de los animales de control tratados con vehículo, o cuando se observa pérdida significativa de peso corporal (> 20%), y/o reducción del tamaño del bazo y del hígado.

## ES 2 322 470 T3

El BWC% (cambio del peso corporal %) se evalúa de la siguiente manera:  $100 - (\text{peso corporal medio de los ratones en un día dado/peso corporal medio al comienzo del tratamiento}) \times 100$ . Este valor se determina una semana después del último tratamiento con el compuesto de prueba.

### 5 Ejemplo K

#### *Viabilidad de las células in vitro*

10 Los valores de CI<sub>50</sub> que miden la viabilidad celular *in vitro* en presencia de los compuestos de prueba pueden determinarse según el siguiente procedimiento. Pueden sembrarse células en placas de 96 pocillos en densidades variables y a continuación se ensayan usando el ensayo de viabilidad de Calceína-AM tras 24 horas para determinar la densidad final óptima para cada tipo de célula. Las células pueden sembrarse en placas de 96 pocillos en una densidad determinada en 100  $\mu\text{l}$  de un medio celular adecuado conocido por los expertos en la técnica.

15 Pueden realizarse diluciones en serie de los compuestos de prueba para que las concentraciones sean dos veces la concentración deseada a evaluar. Cuando se añaden a continuación 100  $\mu\text{l}$  de la dilución a las células plaqueadas en 100  $\mu\text{l}$  de medio, puede obtenerse una concentración final de, por ejemplo, 0, 11,7, 46,9, 187,5, 375 y 750 nM. Los compuestos pueden añadirse a las placas tres a cuatro horas después de sembrar las células, posteriormente se incuban las placas a 37°C durante el tiempo deseado (por ejemplo, uno, dos o tres días).

20 Los ensayos de viabilidad Calceína-AM pueden realizarse en los puntos temporales deseados de la siguiente manera. Puede aspirarse medio usando un colector y una placa metálica para dejar aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. Los pocillos pueden lavarse tres veces con 200  $\mu\text{l}$  de DPBS, aspirando cada vez con el colector para dejar 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. Puede prepararse una disolución 8  $\mu\text{M}$  de Calceína-AM en DPBS y pueden añadirse 150  $\mu\text{l}$  a cada pocillo. Las placas pueden incubarse a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación, puede aspirarse la calceína con el colector y las células pueden lavarse con 200  $\mu\text{l}$  de DPBS como anteriormente. Tras la aspiración final, puede medirse la fluorescencia usando un lector de placas de fluorescencia Cytofluor 2300. Los controles negativos pueden contener medio y no contener células, y los experimentos pueden realizarse por triplicado.

### 30 Ejemplo L

#### *Experimentos cinéticos in vitro*

35 Los compuestos de la invención pueden probarse para la actividad inhibidora del proteasoma usando un protocolo descrito en Rock, y col., Cell, 1994, 78, 761. Según este procedimiento, las constantes de disociación ( $K_i$ ) para el equilibrio se establecen cuando el proteasoma y el compuesto de prueba interactúan para formar un complejo. Las reacciones pueden llevarse a cabo usando proteasoma 20S de músculo de conejo activado con SDS, y el sustrato del proteasoma puede ser Suc-LLVY-AMC.

### Ejemplo M

#### 45 *Inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B*

Los compuestos de la invención pueden probarse para inhibir la actividad del NF- $\kappa$ B llevando a cabo el ensayo descrito en Palombella, y col., Cell, 1994, 78, 773). Por ejemplo, pueden estimularse células de osteocarcinoma MG63 por medio de tratamiento con TNF- $\alpha$  durante tiempos designados. Pueden prepararse extractos celulares totales y analizarse por ensayos de cambio de movilidad electroforética usando la sonda PRDII del promotor del gen de IFN- $\beta$  humano.

### 55 Ejemplo N

#### *Actividad del compuesto*

Usando los ensayos del Ejemplo C y Ejemplo E anteriores la siguiente Tabla F-1 demuestra la utilidad de los compuestos de la invención para la inhibición del proteasoma. En las siguientes Tablas, para la inhibición de HEP, Ejemplo C, los compuestos de la presente invención con un “+” son inferiores a 1000 nanoMolar; los compuestos de la presente invención con un “++” son inferiores a 100 nanoMolar; y los compuestos de la presente invención con un “+++” son inferiores a 10 nanoMolar en la CI<sub>50</sub> para inhibición de HEP. En las siguientes Tablas, para la inhibición de MOLT4, Ejemplo E, los compuestos de la presente invención con un “+” son inferiores a 10000 nanoMolar; los compuestos de la presente invención con un “++” son inferiores a 2000 nanoMolar; y los compuestos de la presente invención con un “+++” son inferiores a 200 nanoMolar en la CE<sub>50</sub> para la inhibición de HEP. Donde se presenta “>+” la actividad fue mayor que los límites del ensayo. Donde no hay valor de CI<sub>50</sub> o el valor de CE<sub>50</sub> está representado, los datos aún tienen que determinarse.

# ES 2 322 470 T3

TABLA F-1

Ejemplo #	HEP (IC <sub>50</sub> )	MOLT4 (CE <sub>50</sub> )
10	+++	+++
11	+++	+++
12	+++	++
13	+++	+++
14	+++	+++
15	++	
16	+++	+++
17	++	>+
18	+++	++
19	+++	+++
20	+++	+
21	+++	>+
22	+++	>+
23	+++	+++
24	+++	>+

## *Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación*

Cuando se utilizan como compuestos farmacéuticos, los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse en la forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden administrarse por medio de una diversidad de vías incluidas la vía oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, e intranasal, y pueden prepararse de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como componente activo, uno o más de los compuestos de Fórmula (I) anterior en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En la fabricación de las composiciones de la invención, el componente activo se mezcla típicamente con un excipiente, se diluye por medio de un excipiente o se incluye dentro de tal vehículo en la forma de, por ejemplo, una cápsula, un saco, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como un diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como un portador, vehículo o medio para el componente activo. Por consiguiente, las composiciones pueden estar en la forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sacos, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta el 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

En la preparación de una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula adecuado antes de combinarlo con los otros componentes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula menor que tamiz 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula puede ajustarse moliendo para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo de aproximadamente tamiz 40.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir además: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsivos y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar liberación rápida, sostenida o retrasada del componente activo tras la administración al paciente utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

## ES 2 322 470 T3

Las composiciones pueden formularse en una forma de monodosis, conteniendo cada dosis desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 mg, más usualmente aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 mg, del componente activo. El término “formas de monodosis” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosis y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto administrado realmente será determinada usualmente por un médico, según las circunstancias relevantes, incluidas la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, se mezcla el principal componente activo con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo está típicamente disperso de manera uniforme en toda la composición de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de monodosis igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. La preformulación sólida se subdivide a continuación en formas de monodosis del tipo descrito anteriormente conteniendo desde, por ejemplo, 0,1 hasta aproximadamente 500 mg del componente activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden estar recubiertos o de otra manera pueden formarse compuestos para proporcionar una forma de dosificación que permita la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando el último en la forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir a la disgregación en el estómago y para permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que pueda retrasarse su liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para tales recubrimientos o capas entéricas, tales materiales incluyen una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones de la presente invención pueden incorporarse para la administración oral o por inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes aromatizados de manera adecuada, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflado incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como los descritos supra. En algunas formas de realización, las composiciones se administran por la ruta oral o respiratoria nasal para lograr un efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse por medio del uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde un dispositivo nebulizador o pueden estar unidas a una mascarilla o a una máquina de respiración de presión positiva intermitente. La disolución, suspensión o las composiciones en polvo pueden administrarse por vía oral o nasal desde dispositivos que administran la formulación de una manera adecuada.

La cantidad de compuesto o composición administrados a un paciente variará dependiendo de qué se esté administrando, el objeto de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la forma de administración, y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya sufre una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos parar parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se denomina “cantidad terapéuticamente eficaz”. Las dosis eficaces dependerán de la afección de la enfermedad tratada así como por el criterio del médico clínico tratante según factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y la condición general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en la forma de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización, o pueden filtrarse de manera estéril. Las disoluciones acuosas pueden envasarse para uso como tales, o pueden liofilizarse, combinando la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones del compuesto típicamente estará entre 3 y 11, de más preferencia desde 5 hasta 9 y de mayor preferencia desde 7 hasta 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los anteriores excipientes, vehículos, o estabilizadores dará como resultado la formación de sales farmacéuticas.

La dosis terapéutica de los compuestos de la presente invención puede variar según, por ejemplo, el uso particular para el que se hace el tratamiento, la forma de administración del compuesto, la salud y condición del paciente, y el criterio del médico que los prescribe. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de una serie de factores incluidos la dosis, las características químicas (por ejemplo, característica hidrófoba) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en una disolución acuosa de tampón fisiológico conteniendo aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son desde

## ES 2 322 470 T3

aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 1  $\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal por día. En algunas formas de realización, el intervalo de dosis es desde aproximadamente 0,01  $\text{mg}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 100  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal por día. La dosis depende probablemente de variables tales como el tipo y extensión de la progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente, y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse desde las curvas de dosis-respuesta obtenidas de los sistemas de prueba en modelos animales o *in vitro*.

La presente invención también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias, que comprenden uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I). Tales kits además pueden incluir, si se desea, uno o más de diversos componentes de kits farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También pueden estar incluidas en el kit las instrucciones, como insertos o como etiquetas, que indican cantidades de los componentes a administrar, pautas para la administración, y/o pautas para mezclar los componentes.

20

25

30

35

40

45

50

55

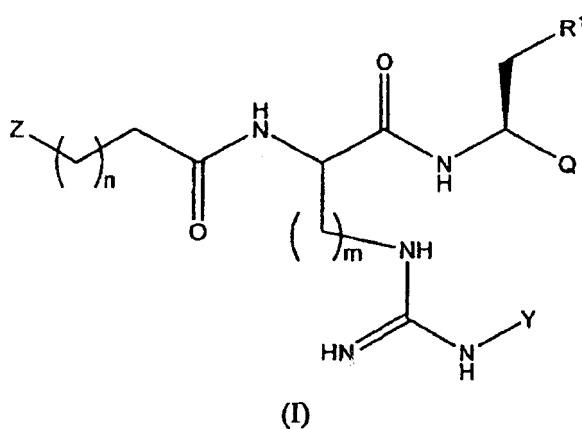
60

65



## ES 2 322 470 T3

3. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que R<sup>1</sup> es 2-propilo.
4. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que Q es éster pinanediol borónico.
5. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que Q es éster biciclohexil-1,1'-diol borónico.
6. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que Q es B(OH)<sub>2</sub>.
7. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que Z es ftalimido, NHR<sup>4</sup> o CN.
8. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que n es 8, 9, 10 u 11.
9. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que m es 3.
10. El compuesto de la Reivindicación 1 en el que n es 8, 9, 10 u 11; y m es 3.
11. Un compuesto de la Reivindicación 1 que tiene Fórmula (I):



o una de sus sales, forma estereoisomérica o tautomérica farmacéuticamente aceptable, en la que:

R<sup>1</sup> es 2-propilo;

Y es -NO<sub>2</sub>;

Z es -CN, -C(=O)OR<sup>5</sup>, ftalimido, -NHSO<sub>2</sub>R<sup>6</sup> o -NHR<sup>4</sup>;

R<sup>4</sup> se selecciona del grupo arilo-SO<sub>2</sub>-, alquilo-SO<sub>2</sub>-, arilo-C(=O)-, aralquilo-C(=O)-, alquilo-C(=O)-, arilo-OC(=O)-, aralquilo-OC(=O)-, alquilo-OC(=O)-, arilo-NHC(=O)-, y alquilo-NHC(=O)-; en el que dicho arilo o aralquilo está opcionalmente sustituido por uno o más grupos metilo o metoxi;

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que dicho alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más halo, arilo o heteroarilo;

R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que dicho alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más halo, arilo o heteroarilo;

Q se selecciona de B(OR<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, éster pinanediol borónico, éster pinacol borónico,

éster 1,2-etanodiol borónico, éster 1,3-propanodiol borónico,

éster 1,2-propanodiol borónico, éster 2,3-butanodiol borónico,

éster 1,1,2,2-tetrametiletanodiol borónico,

éster 1,2-diisopropiletanodiol borónico, éster 5,6-decanodiol borónico,

éster 1,2-diciclohexiletanodiol borónico, éster biciclohexil-1,1'-diol borónico, y

éster 1,2-difenil-1,2-etanodiol borónico;

## ES 2 322 470 T3

R<sup>9</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

m es 3; y

5 n es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

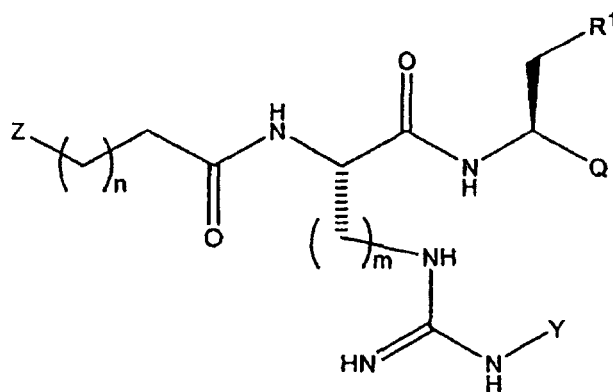
12. Un compuesto de la Reivindicación 1 de Fórmula (I-s):

10

15

20

25



(I-s)

30

o una de sus sales, forma estereoisomérica o tautomérica farmacéuticamente aceptable, en la que:

R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

35

Y es CN o NO<sub>2</sub>;

Z es -CN, -C(=O)OR<sup>5</sup>, ftalimido, -NHSO<sub>2</sub>R<sup>6</sup> o -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>;

R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

40

R<sup>4</sup> se selecciona del grupo arilo-SO<sub>2</sub>-, alquilo-SO<sub>2</sub>-, arilo-C(=O)-, aralquilo-C(=O)-, alquilo-C(=O)-, arilo-OC(=O)-, aralquilo-OC(=O)-, alquilo-OC(=O)-, arilo-NHC(=O)- y alquilo-NHC(=O)-; en el que dicho arilo o aralquilo está opcionalmente sustituido por uno o más grupos metilo o metoxi;

45

R<sup>5</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, en la que R<sup>5</sup> está sustituido opcionalmente por uno o más halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo o heteroarilo;

R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, en la que R<sup>6</sup> está sustituido opcionalmente por uno o más halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo o heteroarilo;

50

Q se selecciona de B(OR<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, éster pinanediol borónico, éster 1,2-diciclohexiletanodiol borónico y éster biciclohexil-1,1'-diol borónico;

R<sup>9</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

55

m es 2, 3 ó 4; y

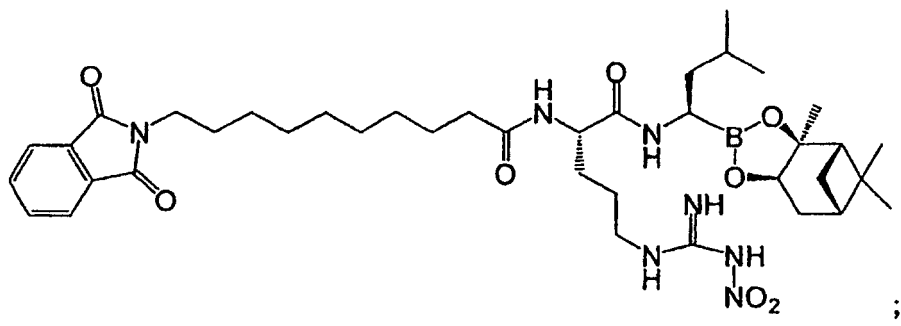
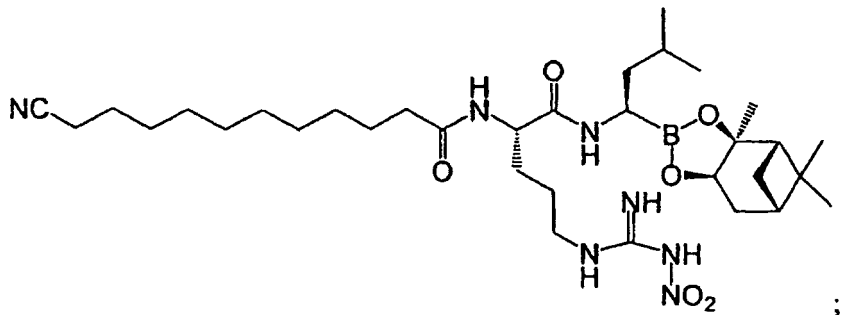
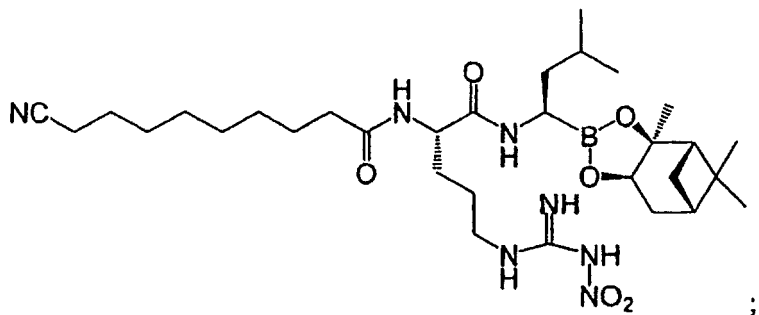
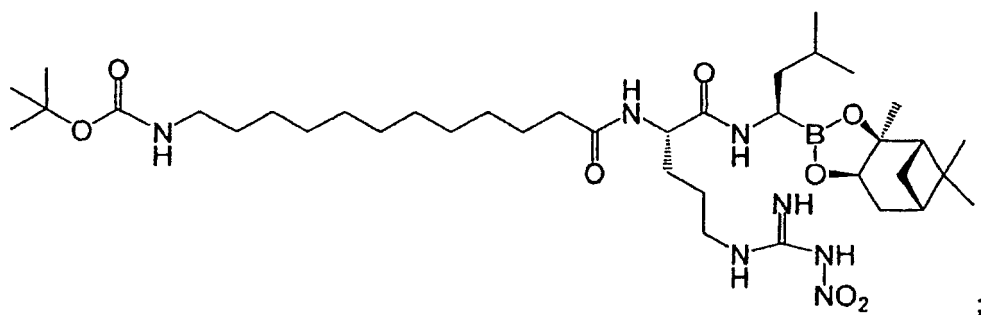
n es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14.

60

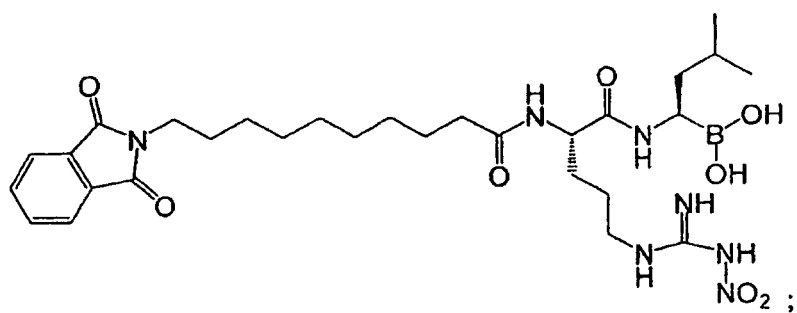
65

13. Un compuesto de la Reivindicación 1 que tiene la fórmula:

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

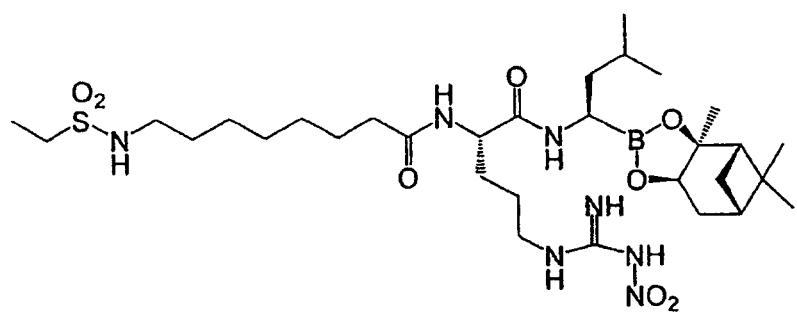


5



10

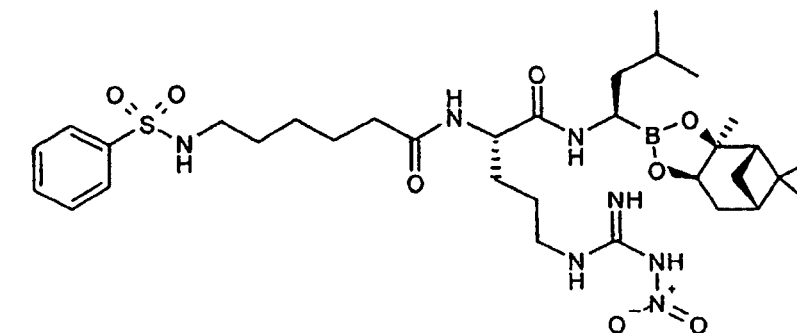
15



20

25

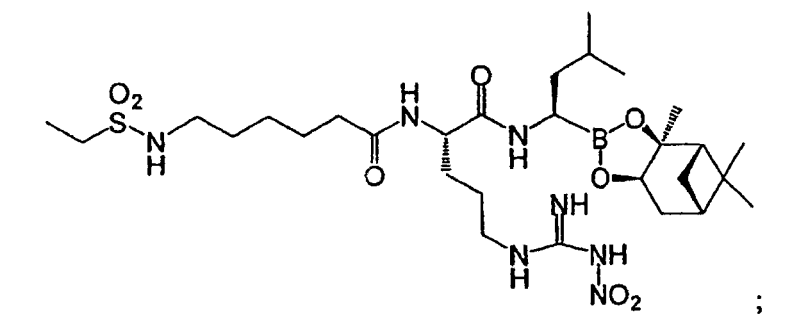
30



35

40

45



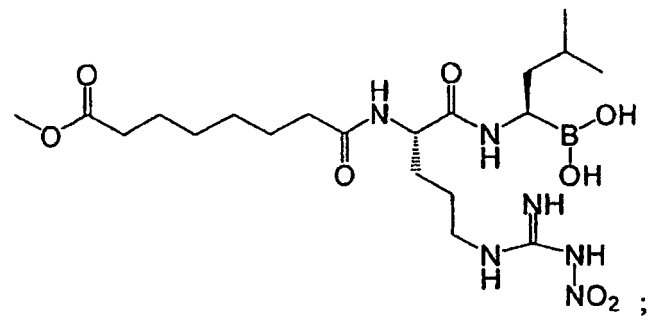
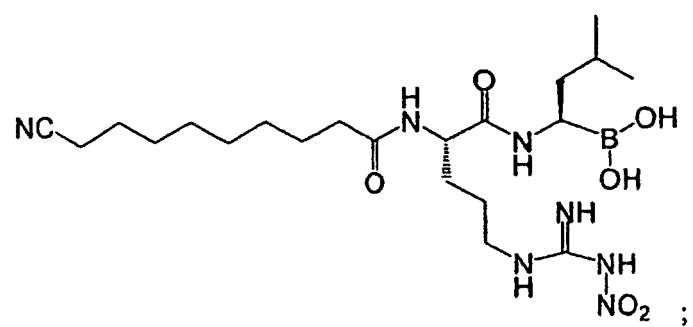
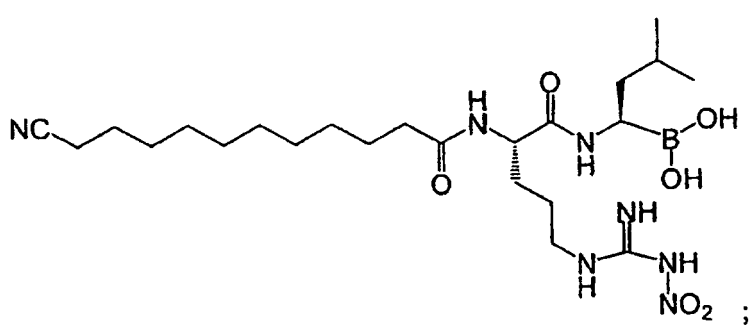
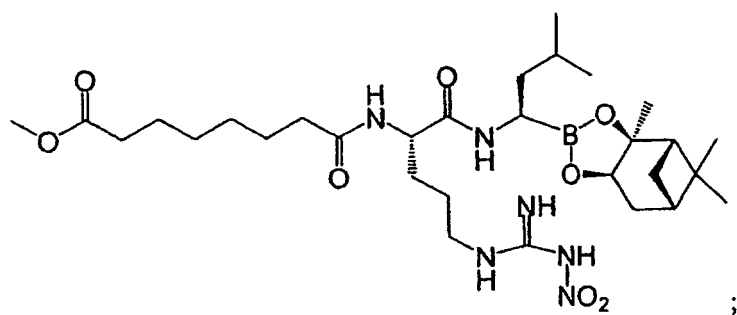
50

55

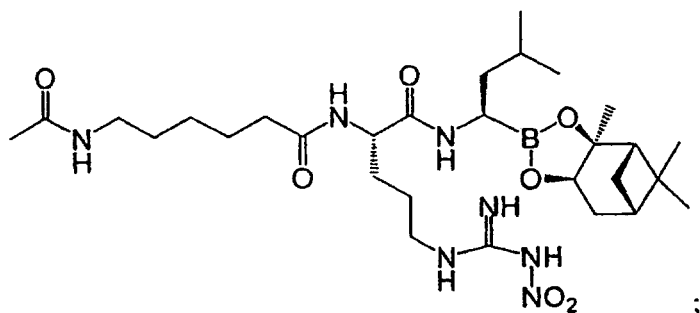
60

65

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



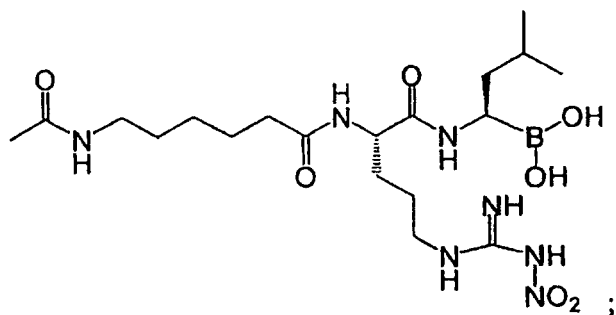
5



10

15

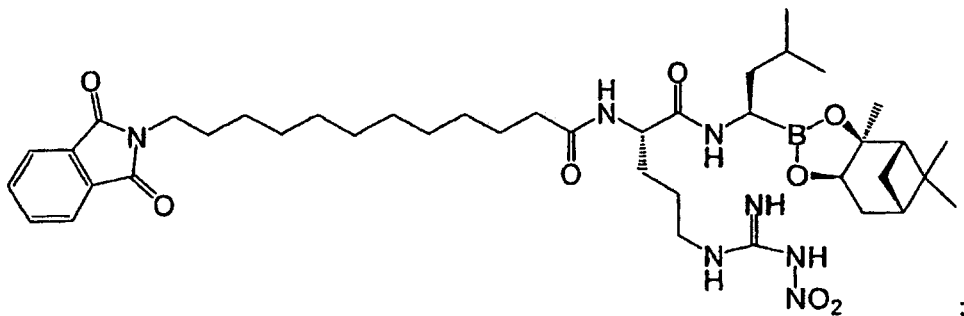
20



25

30

35



45

o una de sus formas de sal o base libre farmacéuticamente aceptable.

50

14. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55

15. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para uso en terapia.

60

16. El uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

17. El uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero que tiene o está predispuesto a dicho cáncer en combinación con uno o más agentes antitumorales o anticáncer y/o radioterapia.

65

18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17 en el que el cáncer se selecciona de cáncer de piel, próstata, colorrectal, de páncreas, riñón, ovario, mamario, de hígado, lengua, pulmón, tejido muscular liso.

19. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17 en el que el cáncer se selecciona de leucemia, linfoma, linfoma no Hodgkin, mieloma y mieloma múltiple.

## ES 2 322 470 T3

20. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el proteasoma que comprende poner un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en contacto con dicho proteasoma.

5 21. El uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

22. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la actividad del NF- $\kappa$ B que comprende poner I $\kappa$ B, el inhibidor de NF- $\kappa$ B, en contacto con un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65