



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 314 402**

(51) Int. Cl.:

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 5/065 (2006.01)

C07K 5/068 (2006.01)

C07K 5/072 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04736919 .4**

(96) Fecha de presentación : **16.06.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1648924**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

(54)

Título: **Inhibidores de transglutaminasa dipeptídica y métodos para usar los mismos.**

(30)

Prioridad: **19.06.2003 GB 0314262**

(73)

Titular/es: **Aston University**
Aston Triangle
Birmingham B4 7ET, GB

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(72)

Inventor/es: **Griffin, Martin;**
Coutts, Ian G. y
Saint, Robert E.

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(74)

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 314 402 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 de transglutaminasa dipeptídica y métodos para usar los mismos.

5 La presente invención proporciona compuestos y métodos para ser usados en medicina. En particular, la presente invención proporciona compuestos y métodos para inhibir las enfermedades y/o procesos humanos en los cuales ocurre la modificación de la proteína mediada por transglutaminasa, tales como la fibrosis, la cicatrización y el cáncer.

10 Las transglutaminasas (TGasas) son una clase importante de enzimas que entrecruzan proteínas que catalizan las reacciones de agregación de proteínas en la coagulación de la sangre (Greenberg, C.S., *et al.*, 1991, FASEB J. 5, 3071-3077), la maduración de la piel (Thacher, S. M. & Rice, R. H., 1985, Cell 40, 685-695) y la coagulación de secreciones seminales (Dubbink, H.J., *et al.*, 1999, Lab. Invest. 79, 141-150). El miembro más difundido de la familia es la forma celular de la enzima, la transglutaminasa tisular (tTGasa), la cual se expresa en cantidades variables en muchos tipos de células. Al igual que la bien caracterizada TGasa plasmática (factor de coagulación sanguíneo XIIIa (Greenberg, C.S., 15 *et al.*, 1991, FASEB J. 5, 3071-3077) y la TGasa de los queratinocitos (Thacher, S. M. & Rice, R. H., 1985, Cell 40, 685-695), las tTGasas son enzimas calciodependientes que catalizan la formación de proteínas entrecruzadas mediante enlaces isopéptidos $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})$ y la incorporación de poliaminas a ciertos residuos de glutamina (Greenberg, C.S., *et al.*, 1991, FASEB J. 5, 3071-3077). Sin embargo, la tTGasa es única en la familia de enzimas de transglutaminasa en el sentido de que es capaz de enlazar e hidrolizar GTP y ATP (Achyuthan, K. E. & Greenberg, C. S., 1987, J. Biol. Chem. 262, 1901-1906), y de enlazar con la fibronectina (Achyuthan, K. E., *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 180, 67-79).

20 La TGasa tisular se encuentra localizada predominantemente en el citosol, aunque también se ha informado que la tTGasa existe en el núcleo (Lesort, M., *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273, 11991-11994), en la superficie de la célula y en la matriz extracelular (Martinez, J., *et al.*, 1994, Biochemistry 33, 2538-2545). La enzima se expresa altamente en las células endoteliales (Greenberg, C. S., *et al.*, 1987, Blood 20, 702-709) y se piensa que su actividad en la superficie de tales células incrementa la estabilización de la base de la membrana, la diseminación celular y la adhesión celular (Martinez, J., *et al.*, 1994, Biochemistry 33, 2538-2545; Greenberg, C. S., *et al.*, 1987, Blood 20, 702-709; Kinsella, M. G. & Wight, T. N., 1990, J. Biol. Chem. 265, 17891-17896; Jones, R.A., *et al.*, 1997, J. Cell Sci. 110, 2461-2472; 30 Gaudry C. A., *et al.*, 1999, Exp. Cell Res. 252, 104-113). Sin embargo, el significado general de la gran cantidad de enzimas presente en este tipo de células y su función biológica se comprende poco.

35 La modificación de las proteínas mediadoras de las transglutaminasas tisulares ha estado implicada en la patología y etiología de numerosas enfermedades y procesos (ver revisión por Aeschlimann & Thomazy, 2000, Connective Tissue Research 41 (1):1-27). Por ejemplo, la modificación de la proteína mediada por tTGasa ha manifestado su ocurrencia en la fibrosis y la cicatrización (Jonson *et al.*, 1999, J. Am. Soc. Neph. 10:2146-2157), los tejidos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer (Citron *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 276:3295-3301), la enfermedad celíaca (Marzari *et al.*, 2001, J. Immunol. 166:4170-4176), la trombosis (Ariens *et al.*, 2002, Blood 100, 743-754), el cáncer (Van Groningen *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 60:383-387; Mehta, 40 1994, J. Cancer 58:400-406; Mehta *et al.*, 2002, J. Natl. Cancer Inst. 94:1652-1654), el SIDA (Amendola *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods 265:149-159), la soriasis y las enfermedades inflamatorias de las articulaciones (Johnson *et al.*, 2001, Am. J. Pathol. 159:149-163). La TGasa tisular también ha estado implicada en un número de enfermedades que comprenden la angiogénesis, tales como el desarrollo de tumores sólidos y de artritis reumatoide (Folkman, J., 1995, Nat. Med. 1, 27-31).

45 De ahí que, la tTGasa representa un objetivo potencial en el desarrollo de nuevos tratamientos de tales enfermedades y trastornos.

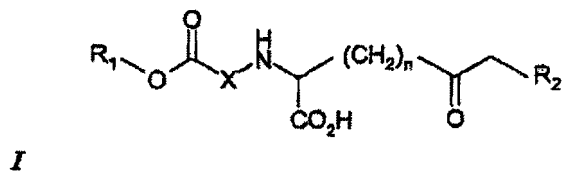
50 Se conocen en la técnica varias clases de compuestos inhibidores de transglutaminasa, incluyendo los inhibidores competidores de la amina, los inhibidores competidores de la glutamina y los inhibidores irreversibles. Los inhibidores competidores de la amina incluyen las dansilcadaverinas (Lorand *et al.*, 1966, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 629; Lorand *et al.*, 1968, Biochemistry 7, 1214) y *N*-fenil-*N'*-(ω -aminoalquil) tiureas (Lee *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260, 14689). Los inhibidores competidores de la glutamina incluyen las amidas alifáticas (Gross & Folk, 1973, J. Biol. Chem. 248, 1301), los dipéptidos (Gross & Folk, 1973, J. Biol. Chem. 248, 6534) y los polipéptidos (Gorman & Folk, 55 1984, J. Biol. Chem. 259, 9007). Los inhibidores irreversibles incluyen la yodoacetamida (Gross & Folk, 1973, J. Biol. Chem. 248, 6534; Folk & Cole, 1966, J. Biol. Chem. 241, 5518), las halometilcetonas contenedoras de fenol (Folk & Gross, 1971, J. Biol. Chem. 246, 6683), los alquiloisocianatos (Gross *et al.*, 1975 J. Biol. Chem. 250, 7693), los inhibidores de α -halometilcarbonilo (Reinhardt, 1980, Appl. Biochem. 2, 495), los dihidroisoxazoles (US 4,912,120), los azoles, las sales de azolio (US 4,968,713, tiadiazoles (Keillor, 2001, Biorg. Med. Chem. 9, 3231), y los epóxidos 60 (Keillor, 2002, Biorg. Med. Chem. 10, 355).

Más recientemente, Pluira *et al.* (1992) J. Enzyme. Inhibition 6, 181-94, reportaron la inhibición irreversible de las transglutaminasas por las metilcetonas de sulfonio (ver también US 4,912,120).

65 La presente invención pretende proporcionar compuestos noveles inhibidores de transglutaminasa adecuados para ser usados como agentes terapéuticos.

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula I:



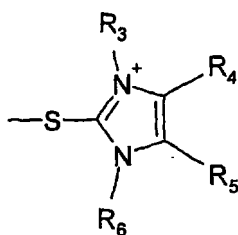
donde:

“X” representa un grupo α -aminoácido, en el cual el grupo α -amino del aminoácido está enlazado al grupo R_1 -O-CO- y el grupo carboxi del aminoácido está enlazado al grupo R_2 -CH₂-CO-(CH₂)_n-CH(CO₂H)-NH-;

“n” es un entero entre 1 y 4;

“R₁” representa bencilo, t-butilo ó 9-fluorenilmetil; y

“R₂” representa



donde R₃, R₄, R₅ y R₆ representan, cada uno de manera independiente un alquilo inferior

o -S+R₇R₈, donde R₇ y R₈ representan, cada uno de manera independiente un alquilo inferior

o un derivado de estos farmacéutica y/o veterinariamente aceptable.

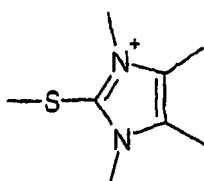
Ventajosamente, X es un grupo *L*-aminoácido.

Preferiblemente, X es seleccionado de un grupo que consta de fenilalanina, glutamina (incluyendo los derivados de estos N-sustituidos, tales como los derivados del piperidinilo N-sustituido y de los propilos), isoleucina, alanina, glicina, tirosina, prolina, serina, lisina y ácido glutámico. Por lo tanto, los compuestos de preferencia de la invención incluyen sales bromuro de *N*-benciloxycarbonil-*L*-glutamyl- γ -isopropilamida-6-dimetil-sulfonio-5-oxo-*L*-norleucina y sales bromuro de *N*-benciloxycarbonil-*L*-glutamyl- γ -piperidinamida-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina.

En una realización de preferencia del primer aspecto de la invención, “n” es 2.

Ventajosamente, “R₁” es un bencilo.

Convenientemente, “R₂” representa

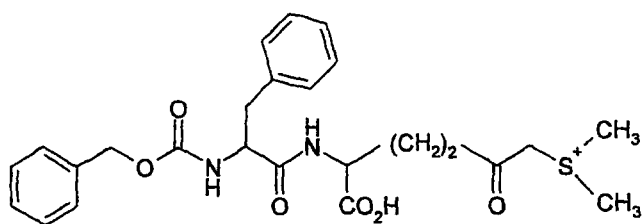


Preferiblemente, "R₂" representa -S+R₇R₈, donde R₇ y R₈ representan, cada uno de manera independiente un alquilo inferior.

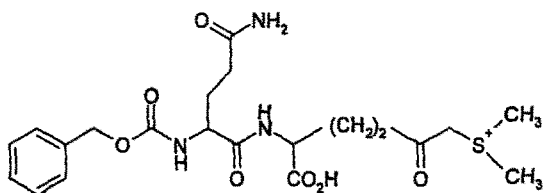
El término "alquilo inferior" quiere decir lineal o ramificado, cíclico o acíclico, alquilos C₁-C₅, el cual puede ser saturado o insaturado. Los grupos alquilos inferiores, los cuales pueden ser representados por R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y/o R₈, incluyen alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₃, alquilo C₁-C₂, alquilo C₂-C₅, alquilo C₃-C₅, alquilo C₁-C₅, alquilo C₂-C₄, alquilo C₂-C₃ y alquilo C₃-C₄. Los grupos alquilos inferiores de preferencia, los cuales pueden estar representados por R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y/o R₈, incluyen alquilos C₁, C₂, C₃, C₄ y C₅.

Preferentemente, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y/o R₈ son -CH₃ o -CHCH₂. Más preferentemente, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y/o R₈ son -CH₃.

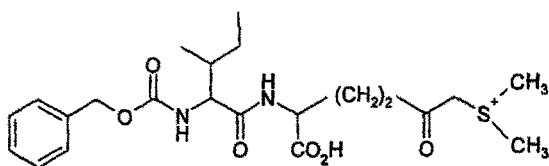
En una realización de preferencia del primer aspecto de la invención, el compuesto se selecciona del grupo que consta de:



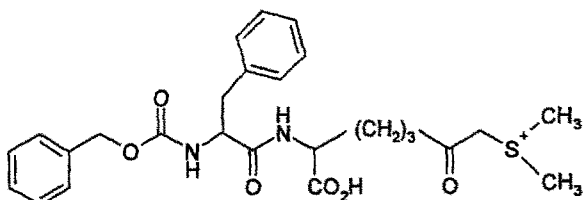
(a) *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 281")



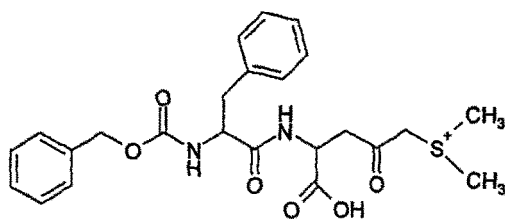
(b) *N*-Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 285")



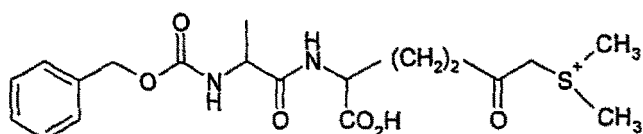
(c) *N*-Benciloxicarbonil-*L*-isoleucina-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 286")



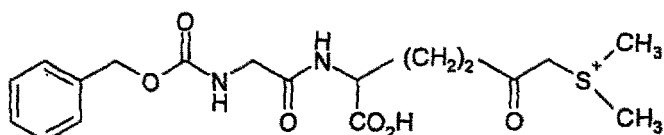
(d) ácido *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-7-dimetil-sulfonio-6-oxo-heptanoico ("Compuesto 288")



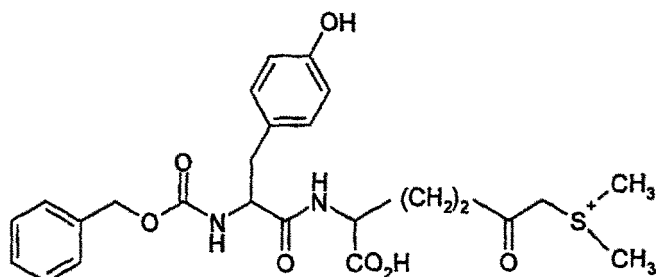
(e) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-5-dimetilsulfonio-4-oxo-norvalina ("Compuesto 289").



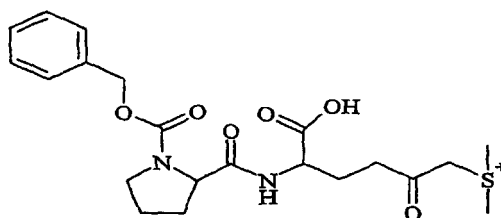
(f) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-alaninal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 291")



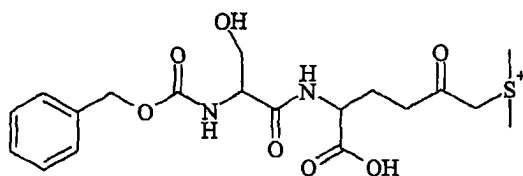
(g) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-glicina-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 292")



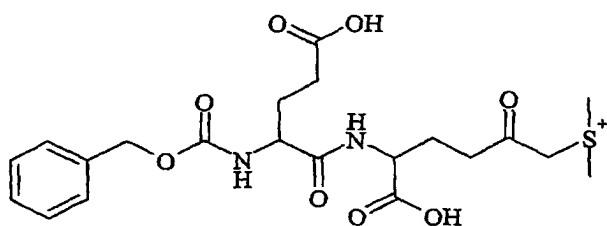
(h) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-tirosinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 293")



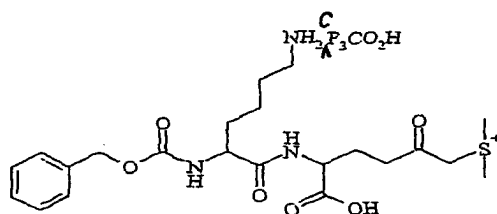
(i) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-prolinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 294")



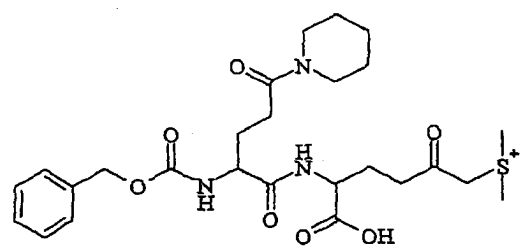
(j) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-serinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 295")



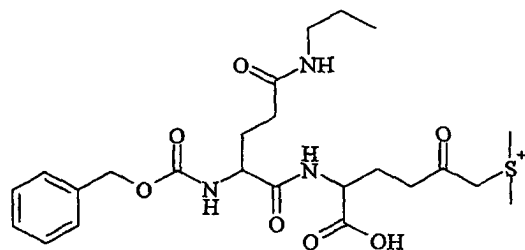
(k) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 296")



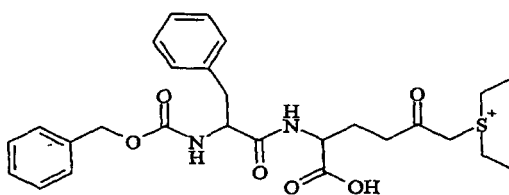
(l) *N*-α-Benciloxycarbonil-*N*-ε-trifluoroacetato-*L*-lisinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 297")



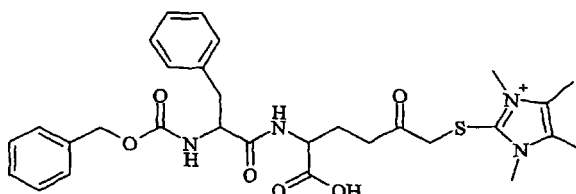
(m) *N*-α-Benciloxycarbonil-γ-piperidinil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 298")



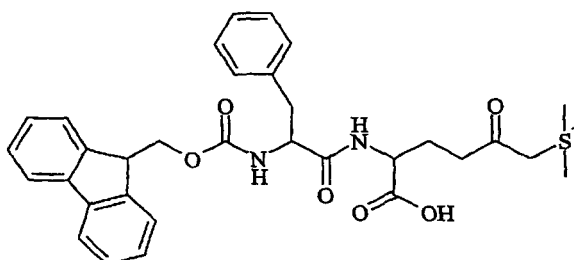
(n) *N*-α-Benciloxycarbonil-γ-propil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 299")



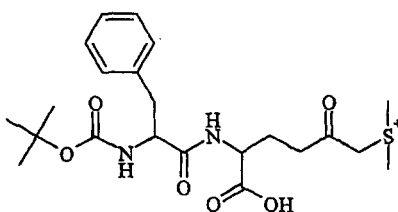
(o) *N*-Benciloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-dietilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 300")



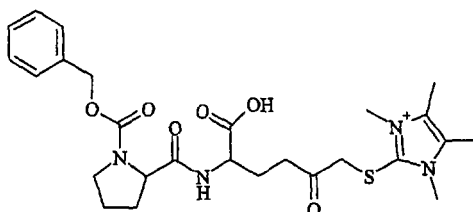
(p) *N*-α-Benciloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-tetra-metilmercapto-imidazol-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 301")



(q) *N*-9-Fluorenilmetiloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 302")



(r) *N*-α-tert-butiloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 303")



(s) *N*-α-Benciloxycarbonil-*L*-prolinil-6-tetra-metilmercapto-imidazol-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 304")

Los expertos en la técnica apreciarán que farmacéutica y/o veterinariamente, los derivados aceptables de los compuestos de la fórmula I, tales como las sales y los solvatos, también están incluidos dentro del alcance de la invención. Las sales que se pueden mencionar incluyen: ácidos de sales de adición; por ejemplo, sales formadas por ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, con ácidos carboxílicos o con ácidos organosulfónicos; sales metálicas de bases de adición, por ejemplo, sales de sodio y de potasio.

De esta forma, los compuestos de la fórmula I pueden ser balanceados por aniones de compensación. Los aniones de compensación ejemplares incluyen, pero no se limitan a los haluros (por ejemplo: fluoruro, cloruro y bromuro), sulfatos (por ejemplo: decilsulfato), nitratos, percloratos, sulfonatos (por ejemplo: metano-sulfonato) y trifluoroacetato. Otros aniones de compensación adecuados resultarán bien conocidos para los expertos en la técnica.

Preferiblemente, el compuesto es una sal de bromuro.

Será además apreciado por los expertos en la técnica que los compuestos de la fórmula I pueden mostrar tautomería. Todas las formas tautómeras y las mezclas de éstas están incluidas dentro del alcance de la invención.

Los compuestos de la fórmula I pueden también contener uno o más átomos de carbono asimétricos y pueden por lo tanto mostrar óptico y/o diastereoisomería. Los diastereoisómeros pueden ser separados usando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía o cristalización fraccional. Los diferentes estereoisómeros pueden ser aislados por separación de una mezcla racémica o de otro tipo de los compuestos usando técnicas convencionales, por ejemplo, la cristalización fraccional o HPLC. Alternativamente, los isómeros ópticos deseados pueden ser creados por reacción de materiales de productos iniciales adecuados ópticamente activos en condiciones en las que no causen racemización o epimerización, o por derivación, por ejemplo, con un ácido homoquiral seguido por la separación de los ésteres de diastereoisómeros por medios convencionales (por ejemplo: HPLC, cromatografía sobre sílica). Todos los estereoisómeros están incluidos en el alcance de la invención.

Preferiblemente, los compuestos del primer aspecto de la invención comprenden los grupos de *L*-aminoácidos.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene un compuesto según el primer aspecto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un excipiente o adyuvante sustancialmente no tóxico, libre de pirógeno.

La formulación, según un segundo aspecto de la invención, puede estar convenientemente presentada en forma de dosis unitaria y puede ser preparada según cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen el paso de lograr la unión del ingrediente activo (es decir, un compuesto según el primer aspecto de la invención) con el vehículo, lo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan uniéndose uniformemente y estrechamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o con vehículos sólidos divididos en porciones muy finas o ambos, y luego, si fuera necesario, se le da forma al producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral, según la presente invención, pueden ser presentadas en forma de unidades discretas, tales como cápsulas, cápsulas masticables o tabletas, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada de ingrediente activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de solución o de suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o en forma de emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo puede ser presentado como un bolo, electuario o pasta. Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos para la administración oral deben ser preferiblemente formulados de manera que estén protegidos en el intestino y de forma que permitan la bioadsorción.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección, acuosas y no acuosas las cuales pueden contener antioxidantes, búferes, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes en suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas selladas y frascos, y pueden ser almacenadas en condiciones de congelación seca (liofilizados) requiriendo solamente la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones para inyección y suspensiones preparadas en el momento pueden ser preparadas a partir de polvos, granulados y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Las soluciones para inyección extemporáneas y las suspensiones pueden prepararse de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo descrito anteriormente.

Las formulaciones de dosis unitarias de preferencia son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción adecuada de ésta, de un ingrediente activo.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método de preparar un compuesto según el primer aspecto de la invención que consta de los pasos siguientes:

- (a) hacer reaccionar un éster del aminoácido *N*- α -protegido (por ejemplo protegido con CBZ, Fmoc o BOC) y *N*-hidroxi-succinimida o *para*-nitrofenilo con 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina, y tratar el producto acoplado resultante con bromuro de hidrógeno; y
- (b) hacer reaccionar la bromometil-cetona producida en el paso (a) con sulfuro de dimetilo, sulfuro de dietilo o con 1,3,4,5-tetra-metilmercapto-imidazolina-2-tiona.

Los ésteres de aminoácidos *N*- α -protegidos y *N*-hidroxi-succinimida son comercialmente asequibles, por ejemplo de Novabiochem (Calbiochem), Laufelfingen, Suiza y Bachem (Reino Unido) Ltd, St Helens, Reino Unido.

El 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) (por sus siglas de la expresión inglesa 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine) también es comercialmente asequible (Sigma-Aldrich, Cat. No. D2141). Alternativamente, DON puede ser sintetizado, por ejemplo, según lo descrito en Coutts & Saint (1998) Tetrahedron Lett. 39:3243.

Preferiblemente, el paso (a) comprende el hacer reaccionar el éster del aminoácido *N*- α -protegido y de *N*-hidroxi-succinimida, o de para-nitrofenilo con 6-diazo-5-oxo-L-norleucina en presencia de tetrahidrofurano (THF) (por sus siglas de la expresión inglesa tetrahydrofuran), agua y trietilamina seguido por la reacción de productos de éstos con bromuro de hidrógeno en presencia de acetato de etilo.

Ventajosamente, el éster del aminoácido *N*- α -protegido y de *N*-hidroxi-succinimida, o de para-nitrofenilo es un éster del aminoácido *N*- α -CBZ protegido y de *N*-hidroxi-succinimida, o de para-nitrofenilo seleccionado entre un grupo que consta de éster de *N*- α -CBZ-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glutamina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glutamina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-isoleucina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-alanina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glicina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-prolina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-serina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-tirosina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de ácido *N*- α -CBZ-*L* glutámico y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L* lisina y de *N*-hidroxi-succinimida y éster de *N*- α -CBZ-*L*-tirosina y de para-nitrofenilo.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que necesite tratamiento con un inhibidor de transglutaminasa que consiste en administrarle a dicho sujeto un compuesto según el primer aspecto de la invención o una formulación farmacéutica según el segundo aspecto de la invención.

Preferiblemente, el compuesto según el primer aspecto de la invención o una formulación farmacéutica según el segundo aspecto de la invención, es administrado en una cantidad suficiente para inhibir, al menos en parte, la modificación de la proteína mediada por tTGasa (o sea, enlaces cruzados). Más preferiblemente, se administra el compuesto o formulación en una cantidad suficiente para inhibir el enlace cruzado de la proteína mediada por tTGasa al menos en un 10%, por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%. Aún más preferiblemente, el compuesto o formulación es administrado en una cantidad suficiente para inhibir completamente el enlace cruzado de la proteína mediada por tTGasa.

La modificación de la proteína mediada por tTGasa puede ser medida usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la detección de isodipéptidos s(y-glutamyl)lisina en los fluidos corporales puede ser usada como una medida indirecta de la frecuencia de entrecruzamiento en las enfermedades que comprenden el entrecruzamiento de esta proteína. De ahí que una reducción de los isodipéptidos en los fluidos corporales proporciona una medida indirecta de entrecruzamiento reducido de esta proteína (ver Nemes *et al.*, 2002, Minerva Biotechnology 14, 183).

Alternativamente, se puede tomar y analizarse una biopsia de un tejido, por ejemplo mediante el intercambio de iones o HPLC de fase revertida, después de la digestión proteolítica del material (Griffin & Wilson, 1984, Mol. Cell Biochem. 58:37-49), o mediante la tinción de secciones de biopsia y el análisis por inmunohistoquímica (Skill *et al.*, 2001, 81:705-716).

Más preferiblemente, el sujeto tiene una enfermedad/trastorno seleccionado de un grupo que consta de enfermedades de fibrosis, cicatrización y neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer), enfermedades autoinmunes (tales como la enfermedad celíaca), trombosis, trastornos proliferativos (o sea, cáncer), SIDA, soriasis e inflamación (tal como enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, de las articulaciones, que incluyen la artritis reumatoide y la osteoartritis).

Más preferiblemente, el cuarto aspecto de la invención proporciona un método para tratar la fibrosis y/o cicatrización renal en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de un compuesto según el primer aspecto de la invención o de una formulación farmacéutica según el segundo aspecto de la invención en una cantidad suficiente para inhibir la fibrosis y/o cicatrización renal.

Por "cicatrización renal" nos referimos a la pérdida de la arquitectura renal o depleción celular en los glomérulos y túbulos renales acompañado por un aumento en la acumulación y sedimentación de componentes extracelulares de la matriz, tales como el colágeno.

Los expertos en la técnica apreciarán que el tratamiento puede ser profiláctico y/o terapéutico. Por ejemplo, los compuestos y formulaciones de la invención pueden ser usados para ralentizar y/o prevenir la aparición de una enfermedad/trastorno en el sujeto que está siendo tratado. Alternativamente, o adicionalmente, los compuestos y formulaciones de la invención pueden ser usados para reducir o erradicar los síntomas de una enfermedad/trastorno en el sujeto que se está tratando.

Los expertos en la técnica también apreciarán que el compuesto o formulación del primer y segundo aspectos de la invención, respectivamente, puede ser administrado mediante cualquier vía conocida o desarrollada en la técnica. De esta forma, el compuesto o formulación puede ser administrado mediante inyección parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), mediante inhalación o administración nasal u oralmente.

Preferiblemente, el compuesto o formulación se administra sistemáticamente, por ejemplo intravenosamente. Alternativamente, el compuesto o formulación es administrado tópicamente, por ejemplo, en el área diana o cerca de ésta, donde la modificación de la proteína mediada por TGasa debe ser inhibida.

El tratamiento con un compuesto o formulación según la invención puede consistir en una dosis única o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo. Ventajosamente, el compuesto o formulación es administrado repetidamente.

Los compuestos o formulaciones de la invención también pueden ser administrados mediante un dispositivo implantado quirúrgicamente que libere el compuesto o formulación directamente en el área requerida, por ejemplo, en la vecindad de un tumor sólido.

Los expertos en la técnica apreciarán que el sujeto tratado usando el método según el cuarto aspecto de la invención puede ser un mamífero. Preferiblemente, el sujeto es un humano. Alternativamente, el sujeto es un perro, gato, caballo u otro animal mamífero doméstico o de granja.

En una realización de preferencia del método según el cuarto aspecto de la invención, el sujeto tiene cáncer. En realizaciones alternativas de preferencia, el método es usado para tratar la fibrosis y/o cicatrización del sujeto.

Un quinto aspecto de la invención proporciona el uso de un compuesto según el primer aspecto de la invención para su uso médico.

Un sexto aspecto de la invención proporciona el uso de un compuesto según el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para inhibir una transglutaminasa, por ejemplo la transglutaminasa tisular.

En una realización de preferencia, el medicamento es usado para tratar una enfermedad/trastorno seleccionado de un grupo que consta de fibrosis, cicatrización (por ejemplo, cicatrización renal o cicatrización hipertrófica de la piel), enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Huntingdon y la enfermedad de Alzheimer), enfermedades autoinmunes (tal como la enfermedad celíaca), trombosis, trastornos proliferativos (o sea, cáncer), SIDA, soriasis e inflamación (tal como las enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, de las articulaciones, incluyendo la artritis reumatoide y osteoartritis).

Ventajosamente, el medicamento es usado para tratar (incluyendo la inhibición y/o prevención) la fibrosis y/o cicatrización, y en particular, la cicatrización renal y la cicatrización hipertrófica de la piel.

Preferiblemente, el medicamento es para tratar un trastorno proliferativo, especialmente cáncer, que se manifiesta en forma de tumores sólidos.

Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método para prevenir o tratar el rechazo de un órgano transplantado, que incluye poner al órgano en contacto con un compuesto según el primer aspecto de la invención o una formulación según el segundo aspecto de la invención. De esta forma, la invención proporciona el uso de un compuesto según el primer aspecto de la invención, en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar el rechazo de un órgano transplantado.

Preferiblemente, el órgano es un corazón, pulmón, riñón o hígado.

Más preferiblemente, el órgano es un riñón. Los riñones que van a ser transplantados muestran a menudo alguna sobrerregulación de la transglutaminasa tisular y posiblemente, de otras transglutaminasas. Además, los riñones que son rechazados después del trasplante muestran a menudo una cicatrización excesiva y sobrerregulación de la actividad de la transglutaminasa y los enlaces cruzados (Abo-Zenah *et al.*, 2001, J. Am. Soc. Nephrol. 12, 4454A). Tal degeneración de tejidos y subsiguiente rechazo del órgano puede ser prevenido mediante el tratamiento del riñón (u otro órgano) con un inhibidor de transglutaminasa.

Se apreciará que el compuesto o formulación puede ser administrado antes, durante y/o después del trasplante del órgano. De ahí que, en una realización, el órgano es tratado antes del trasplante, por ejemplo, mediante la perfusión y/o lavado con una solución que contiene un compuesto según el primer aspecto de la invención.

En una realización alternativa, el órgano es tratado durante y/o después del trasplante al paciente. Ventajosamente, el compuesto o formulación es administrado en la zona del trasplante o cerca de ésta, por ejemplo, mediante administración local.

Ejemplos no limitantes preferidos que comprenden ciertos aspectos de la invención serán descritos a continuación, con referencia a las siguientes figuras, en las cuales:

La Figura 1 muestra una vía de síntesis para la producción de un compuesto ejemplar según el primer aspecto de la invención, o sea, sal bromuro de *N*-benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (Compuesto 281'). En el paso (i), se hace reaccionar el éster del aminoácido *N*- α -CBZ-*protegido* y de *N*-hidroxi-succinimida con 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina (DON) para producir *Z*-fenilalaninil bromometilcetona, la cual entonces se hace reaccionar con dimetilsulfuro para producir sales bromuro de *N*-benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio 5-oxo-*L*-norleucina.

Los reactantes y condiciones para cada paso son los siguientes:

(i) Trietilamina (TEA) (por sus siglas de la expresión inglesa *Triethylamina*), THF, H₂O;

(ii) HBr, acetato de etilo; y

(iii) Sulfuro de dimetilo.

Las Figuras de la 2 a la 21 muestran el efecto de concentraciones en aumento de compuestos ejemplares de la invención (y del compuesto de la técnica anterior, cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-) sobre la inhibición por transglutaminasa del hígado (tTG) de un conejillo de indias, según el ensayo por adsorción de enzima ligada (ELSA) (*por las siglas de la expresión inglesa: enzyme-linked sorbent assay*) (ver Ejemplo 2, más adelante). La concentración de la prueba del compuesto de prueba se da en μ M, a lo largo del eje X. Los compuestos probados son los siguientes:

Figura Compuesto probado

2 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 281")

3 Cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-("Compuesto 283")

4 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 285")

5 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-isoleucinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 286").

6 Sal bromuro de ácido *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-7-dimetil-sulfonio-6-oxo-heptanoico ("Compuesto 287")

7 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-5-dimetilsulfonio-4-oxo-norvalina ("Compuesto 289")

8 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-alaninal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 291")

9 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-glicinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 292")

10 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-tirosinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 293")

11 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-prolinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 294")

12 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-serinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 295")

13 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 296")

14 Sal bromuro de *N*- α -Benciloxicarbonil-*N*- ϵ -trifluoroacetato-*L*-lisinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 297")

15 Sal bromuro de *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -piperidinil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina ("Compuesto 298")

- 16 Sal bromuro de *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -propil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 299”)
- 17 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dietilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 300”)
- 18 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-tetra-metilmercaptoimidazol-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 301”)
- 19 Sal bromuro de *N*-9-Fluorenilmetiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 302”)
- 20 Sal bromuro de *N*- α -Pert-butiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 303”)
- 21 Sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-prolinil-6-tetra-metilmercaptoimidazol-5-oxo-*L*-norleucina (“Compuesto 304”)

La Figura 22 muestra los datos SDS-PAGE que demuestran la inhibición del enlace cruzado de la fibronectina mediada por la tTGasa posterior al tratamiento con compuestos ejemplares de la invención (ver Ejemplo 3). Código: “tTG” = transglutaminasa tisular, “fragmentos degr.” = fragmentos por degradación, “Fn” = fibronectina, “Polímeros” = polímeros de fibronectina de enlace cruzado, “281” = sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina, “285”/“Rob285” = sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetil-sulfonio-5-oxo-*L*-norleucina.

La Figura 23 muestra (a) secciones representativas teñidas de Tricromo de Masson con un aumento de 100 x y (b) secciones teñidas de colágeno III con un aumento de 200 x de los riñones de ratas tratadas durante 84 días con el inhibidor sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (designado “SNx + 281”) ó cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-(designado “SNx + 283”). SNx indica animales en los cuales se ha realizado una nefrectomía subtotal. A estos animales se les instiló en sus riñones el compuesto PBS (SNx) o el compuesto inhibidor de TGasa 281 ó 283 (SNx + 281 y SNx + 283, respectivamente). “Snc” se refiere a animales con operaciones simuladas y “SNx” se refiere a animales a los cuales se les instiló PBS en sus riñones. Se usaron cinco animales por grupo (ver Ejemplo 4).

La Figura 24 muestra un análisis cuantitativo de imagen de (a) tinción con Tricromo de Masson y (b) tinción de colágeno III en secciones del riñón de animales de 90 días posterior al tratamiento con el inhibidor sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (enlace cruzado de la fibronectina mediada por la tTGasa designados “SNx + 281”) y cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-(designado “SNx + 283”). “Snc” y “SNx” tienen el significado de la leyenda en la Figura 12 que aparece anteriormente. Se usaron cinco animales por grupo (ver Ejemplo 4).

La Figura 25 muestra la inhibición de la actividad de TGasa en los riñones de ratas tratadas con compuestos que tienen actividad inhibidora de TGasa. La Figura 25 (a) es un histograma que muestra un análisis semicuantitativo *in situ* de la actividad de TGasa en secciones criostáticas tomadas de los riñones de ratas tratadas con SNx durante 28 días con los inhibidores sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetil-sulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (designado “SNx + 281”) y cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-(designado “Sox + 283”). Los datos muestran la emisión del microscopio láser cofocal Leica del enlace de la TRITC-extraíndina con la biotincadaverina con TGasa incorporada. “Snc” se refiere a riñones control obtenidos de animales a los cuales se les realizó una operación simulada sin nefrectomía subtotal. “SNx” se refiere a la nefrectomía subtotal. Los inhibidores fueron administrados al riñón mediante minibombas (ver Ejemplo 5). La Figura 25 (b) es un histograma que muestra la actividad de TGasa medida por la incorporación de putrescina C¹⁴ a N,N'-dimetil caseína a los 84 días en los homogeneizados renales de ratas SNx tratadas con los inhibidores sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-di-metil-sulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (designado “SNx + 281”) y cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-(designado “SNx + 283”). Se usaron cinco animales por grupo (ver Ejemplo 4).

La Figura 26 muestra el efecto sobre la función renal en ratas con 84 días de tratamiento con los inhibidores sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (designado “SNx + 281”) y cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1-io-(designado “Sox + 283”), según se determinó usando mediciones de (a) proteinuria y (b) aclaración de creatinina. “Snc” se refiere a riñones control obtenidos de animales a los cuales se les realizó una operación simulada sin nefrectomía subtotal. “SNx” se refiere a la nefrectomía subtotal. Se usaron cinco animales por grupo (ver Ejemplo 4).

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Síntesis de inhibidores de TGasa ejemplares

Procedimientos generales

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de punto de fusión de Gallenkamp y no fueron corregidos. Los espectros IR fueron registrados en un instrumento FT-IR de serie Perkin-Elmer 1600. Los espectros ¹H fueron registrados en un instrumento JEOL E-270 a 270 mHz. Los espectros ¹³C fueron registrados en el mismo instrumento a 67,8 MHz. Todas las muestras de NMR fueron preparadas en deuteriocloroformo con excepción de las que se mencionan con otra forma de preparación. Los cambios químicos fueron informados como relacionados con el tetrametilsilano estándar interno y fueron dados como ppm. Los espectros de masa fueron registrados en una máquina ESI-MS de plataforma de micromasa.

Se realizó una destilación reciente de tetrahidrofurano (THF) a partir de cetil difenilcetona sódica. Se destiló éter a partir de hidruro de aluminio de litio y se pasó por sodio metálico. Se destilaron metanol y etanol y se pasaron por tamices moleculares 5 A. Se secaron cloroformo, diclorometano y acetona sobre cloruro de calcio granulado. Los solventes usados para la cromatografía en columna flash fueron destilados antes de usarse.

La cromatografía flash fue llevada a cabo usando gel de sílice 60 Fluka, con un tamaño de malla de 220-240. Se llevó a cabo una cromatografía de capa fina usando placas de vidrio recubiertas previamente con gel de sílice Whatman 60A F254.

25 Síntesis de 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina (DON)

La 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina (DON) intermedia, fue preparada según lo descrito previamente en Coutts & Saint (1998) Tetrahedron Lett. 39:3243.

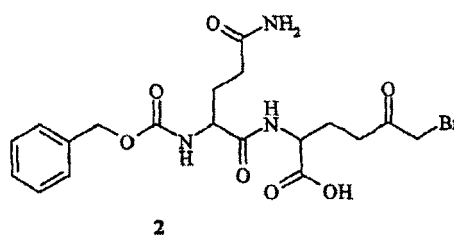
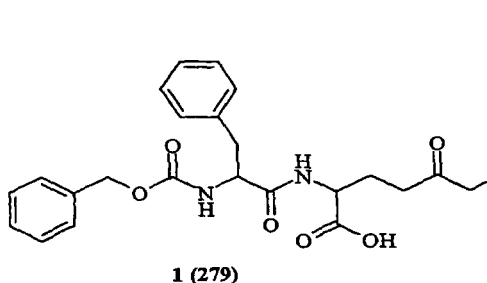
30 Síntesis de los derivados de 6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Los siguientes productos intermedios fueron sintetizados:

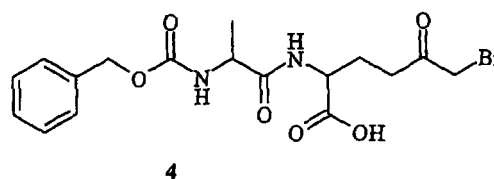
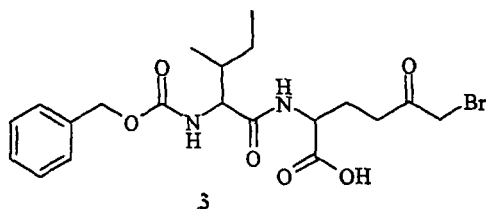
35

40

45

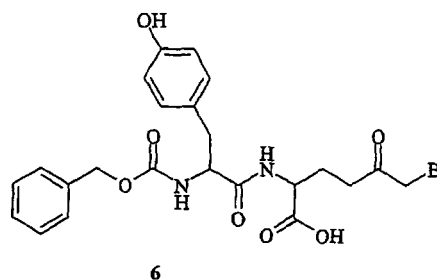
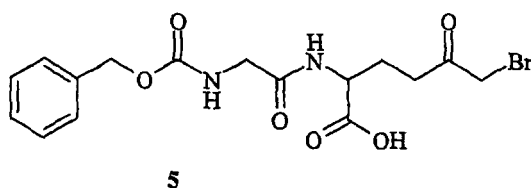


50

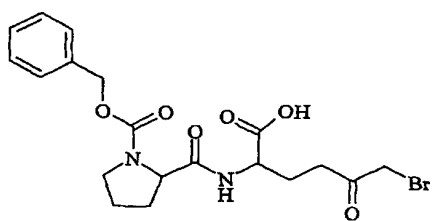


55

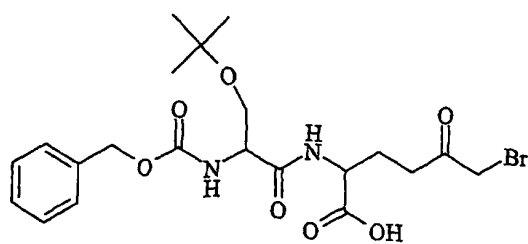
60



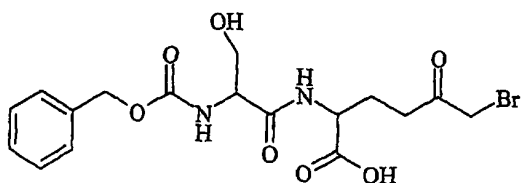
65



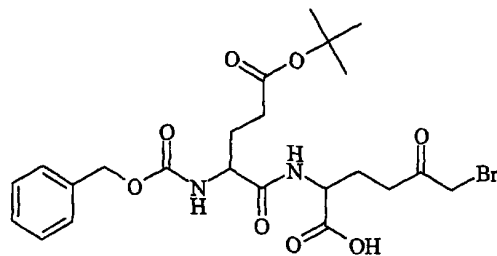
7



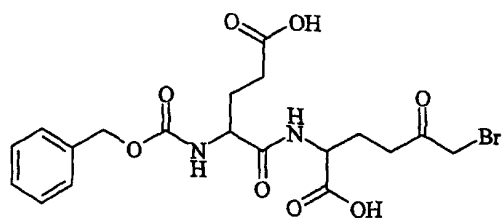
8



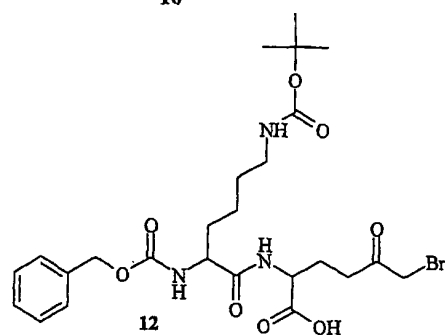
9



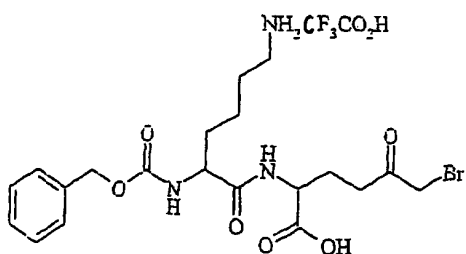
10



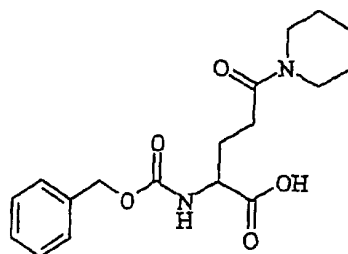
11



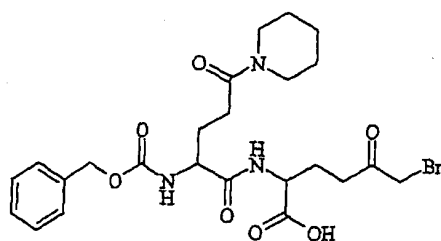
12



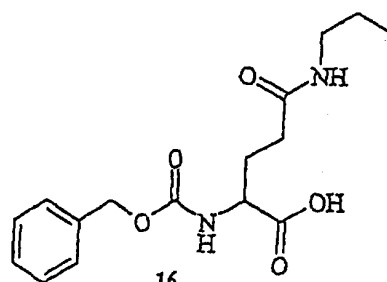
13



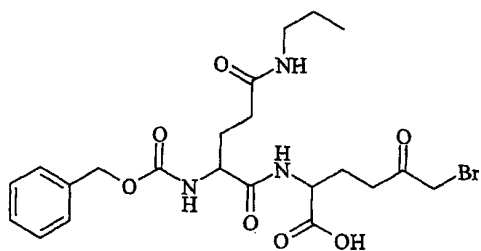
14



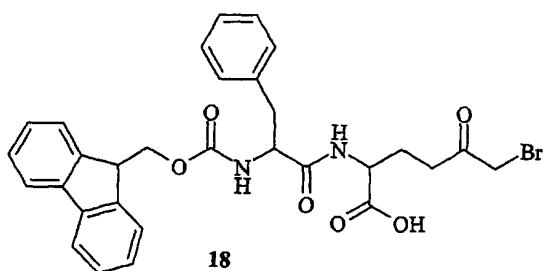
15



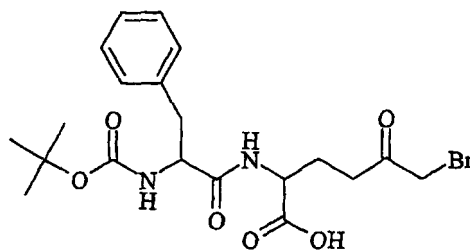
16



17



18



19

Se añadió trietilamina (1,5 eqv.) a una solución helada del éster del aminoácido apropiado *N*- α -protegido (CBZ, FMOC ó BOC) y de *N*-hidroxi-succinimida y DON (1 eqv.) en una mezcla 1:1 de THF/agua (0,5 M). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h. a 0°C y se extrajo el disolvente a un alto vacío, a temperatura ambiente. Se disolvió el residuo en acetato de etilo y se trató con una mezcla 1:1 de HBr y ácido acético, gota a gota hasta que cesó la emisión de gas. Se agitó la mezcla resultante durante otros 10 minutos y se añadió acetato de etilo y se lavó la capa inorgánica con agua (x 3), solución salina (x 1), secándose sobre MgSO₄. La extracción del disolvente *in vacuo* produjo un sólido incoloro el cual fue recrystalizado a partir de un disolvente apropiado para obtener un producto con un rendimiento típico del 70-80%.

(a) *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “1” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -CBZ-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0573) (ver Figura 1).

p.f. 132-133°C (acetato de etilo), (Resultado: C, 54,42; H, 5,14; N, 5,44. C₂₃H₂₅BrN₂O₆ requiere C, 54,66; H, 4,99; N, 5,54%).; $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3294, 1719, 1689, 1655; δ_{H} (d₆ acetona) 1,9, 2,2 y 2,7 (4 H, m), 2,9-3,2 (2 H, m), 4,2 (2 H, s), 4,5 (2 H, m), 5,0 (2 H, s), 6,6 (1 H, d), 7,3 (10 H, ArH), 7,6 (1 H, d); δ_{C} (d₆ acetona) 27,0, 36,0, 36,3, 38,6, 51,8, 57,2, 66,7, 127,3, 128,5, 128,6, 129,1, 129,2, 130,2, 137,9, 153,5, 172,4, 173,7, 201,0.

(b) *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “2” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -CBZ-*L*-glutamina y de *N*-hidroxi-succinimida (Bachem cat. no. C-1625).

p.f. 161-163°C (iso-propanol, dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3423, 3346, 1702, 1684, 1638; δ_{H} (d₄ metanol) 1,8, 1,9, 2,2 y 2,6 (8 H, m), 3,9 (2 H, s), 4,1 (1 H, m), 4,3 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH), 7,6 (1 H, d); δ_{C} (d₃ metanol) 26,8, 28,9, 32,5, 35,6, 36,5, 52,6, 55,9, 67,7, 128,8, 129,0, 129,5, 130,2, 136,9, 154,5, 171,9, 174,5, 202,6. MS: *m/z* Calc. para C₁₉H₂₄BrN₃O₇: 485 (M-Br = 406). Observado 406.

(c) *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-isoleucinil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-isoleucinil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “3” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -CBZ-*L*-isoleucina y de *N*-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. No. 04-12-0560).

p.f. 182-184°C (acetato de etilo, dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 1720, 1684, 1660; δ_{H} (d₃ metanol) 0,9, 1,2 y 1,5 (6 H, m), 1,9, 2,2 y 2,7 (4 H, m), 3,9 (1 H, d), 4,0 (2 H, s), 4,4 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 11,2, 15,9, 25,9, 26,8, 35,6, 36,4, 37,9, 52,3, 61,1, 67,6, 128,7, 129,0, 129,5, 138,1, 154,6, 174,4, 174,5, 202,8. MS: *m/z* Calc. para C₂₀H₂₇BrN₂O₆: 470 (M-Br = 391). Observado 473, 471, 391.

(d) *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-alaninil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-alaninil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “4” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -CBZ-*L*-alanina y de *N*-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. No. 04-12-0512).

p.f. 82-85°C (DCM/éter, dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3294, 1719, 1686, 1660; δ_{H} (d₆ acetona) 1,4 (3 H, d), 1,9, 2,2 y 2,6 (4 H, m), 4,1, (2 H s), 4,2 (2 H, m), 4,4 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ acetona) 26,3, 28,9, 34,5, 51,3, 51,9, 66,7, 68,6, 128,7, 129,0, 129,5, 138,1, 154,6, 173,2, 174,4, 202,6. MS: *m/z* Calc. para C₁₇H₂₁BrN₂O₆: 428 (M-Br = 349). Observada 429, 349.

(e) *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-glicinil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-glicinil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “5” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -CBZ-*L*-glicina y de *N*-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0511) y se utilizó sin más purificación.

(f) *N- α -Benciloxicarbonil-L-tirosinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-tirosinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “6” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N- α -CBZ-L-tirosina* y de 4-nitrofenil (Fluka cat. No 97300) y se utilizó sin más purificación.

(g) *N- α -Benciloxicarbonil-L-prolinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-prolinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “7” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N- α -CBZ-L-prolina* y de N-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0577).

p.f. 129-131°C, $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3241, 1725, 1690, 1664; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9, 2,2, 2,5 y 2,8 (8 H, m), 3,5 (2 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,3 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 21,0, 23,2, 27,6, 31,7, 32,6, 48,6, 57,9, 64,4, 124,9, 125,1, 125,4, 125,9, 134,3, 153,0, 170,9, 171,5, 199,2 MS: m/z Calc. para C₁₉H₂₃BrN₂O₆: 455 (M+Na = 477, M+H = 457). Observado 477, 457.

(h) *N- α -Benciloxicarbonil-L-serinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-serinil-(O-t-butilo)-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “8” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N- α -CBZ-L-serina* y de (O-t-butil) N-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0585).

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3240, 1719, 1664; δ_{H} (CDCl₃) 1,1 (9 H, s), 1,9, 2,3, y 2,7 (4 H, m), 3,4 (2 H, m), 3,9 (2 H, s), 4,3 (1 H, m), 4,6 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 26,4, 27,2, 34,2, 35,5, 51,4, 53,4, 61,5, 67,2, 74,3, 128,2, 128,5, 135,7, 156,3, 171,1, 175,4, 201,0. MS: m/z Calc. para C₂₁H₂₉BrN₂O₇: 501 (M+Na = 523, 525). Observado 523, 525.

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-serinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “9” que aparece anteriormente) mediante la extracción del grupo protector t-butilo usando ácido trifluoroacético y trietilsilano como reactivos, Mehta *et al.* (1992) Tetrahedron Lett., 33, 5441. El producto crudo obtenido fue usado sin más purificación.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3409, 3242, 1720, 1668; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9, 2,3, y 2,7 (4 H, m), 3,4 (2 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 26,4, 35,6, 36,4, 52,6, 57,7, 61,5, 67,8, 128,8, 129,0, 129,1, 129,4, 129,5, 138,1, 158,5, 173,0, 173,8, 202,9.

(i) *N- α -Benciloxicarbonil-L-glutaminil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-glutaminil-(O-t-butilo)-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “10” arriba) a partir de DON y del éster de ácido *N- α -CBZ-L glutámico* y de (O-t-butilo) N-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0551).

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3240, 1722, 1714, 1700, 1664; δ_{H} (CDCl₃) 1,3 (9 H, s), 1,9, 2,3, y 2,7 (8 H, m), 3,8 (2 H, m), 3,9 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 25,8, 27,9, 31,5, 34,4, 35,5, 51,4, 54,2, 61,5, 67,1, 81,3, 127,9, 128,0, 128,1, 128,5, 136,0, 156,4, 172,3, 173,0, 174,3, 201,3. MS: m/z Calc. para C₂₃H₃₁BrN₂O₈: 543 (M+Na = 565, 567). Observado 565, 567.

Se preparó sal de ácido trifluoroacético *N- α -Benciloxicarbonil-L-glutaminil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “11” arriba) mediante la extracción del grupo protector t-butilo usando ácido trifluoroacético y trietilsilano como reactivos, Mehta *et al.* (1992) Tetrahedron Lett., 33, 5441. Se usó el producto crudo obtenido sin más purificación.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3404, 3242, 1720, 1700, 1680; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9, 2,2, 2,3, 2,4, y 2,7 (8 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,1 (1 H, m), 4,4 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 26,7, 28,3, 31,1, 35,7, 36,4, 52,5, 55,7, 67,7, 128,7, 129,0, 129,5, 138,1, 158,4, 174,5, 174,6, 176,5, 202,8.

(j) *N- α -Benciloxicarbonil-L-lisinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó *N- α -Benciloxicarbonil-L-lisinil-(N-BOC)-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “12” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N- α -CBZ-L-lisina* (N'-BOC) y de N-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0526).

δ_{H} (CDCl₃) 1,4, 1,6 y 1,8 (6 H, s), 1,9, 2,1, y 2,7 (4 H, m), 2,9 (2 H, m), 3,8 (2 H, s), 4,1 (1 H, m), 4,4 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 17,9, 22,3, 25,7, 28,3, 31,5, 34,8, 35,6, 51,4, 53,4, 54,8, 58,1, 66,9, 79,4, 127,8, 127,9, 128,0, 128,4, 136,1, 156,5, 172,9, 174,0, 175,5, 201,5.

Se preparó sal de ácido trifluoroacético *N- α -Benciloxicarbonil-L-lisinil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina* (ver “13” que aparece anteriormente) mediante la extracción del grupo protector t-butilo usando ácido trifluoroacético y trietilsilano como reactivos, Mehta *et al.* (1992) Tetrahedron Lett., 33, 5441. Se usó el producto crudo obtenido sin más purificación.

(k) *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -piperidinil-*L*-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó ácido *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -piperidinil-*L*-glutámico (ver “14” que aparece anteriormente) usando los métodos de Molina, T.M., *et al* (1993) Tetrahedron 49, 3801-3808; Blas, J., *et al* (2000) Tetrahedron Lett. 41, 4567-4571 y; Antonjuk, D.J., *et al* (1984) J. Chem. Perkin Trans. 1 1989-2003.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3312, 2940, 1722, 1715, 1698, 1664; δ_{H} (CDCl₃) 1,5 (6 H, m), 2,0, 2,2, 2,4 y 2,6 (4 H, m), 3,3 (2 H, m), 3,5 (2 H, m), 4,3 (1 H, q), 5,1 (2 H, s), 6,0 (1 H, d), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 24,1, 25,3, 26,2, 28,3, 29,5, 43,2, 46,8, 53,5, 66,7, 127,8, 127,9, 128,4, 136,2, 156,1, 171,5, 174,0, 43,2, 46,8, 53,5, 66,7, 127,8, 127,9, 128,4, 136,2, 156,1, 171,5, 174,0.

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -piperidinil-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “15” que aparece anteriormente) a partir de DON y de ácido *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -piperidinil-*L*-glutámico usando la activación del éster de *N*-hidroxi-succinimida.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3325, 2938, 1719, 1689, 1664; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,4 y 1,5 (6 H, m), 1,8, 2,0, 2,3 y 2,6 (8 H, m), 3,3 (2 H, m), 3,4 (2 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,3 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 24,1, 25,3, 26,1, 28,8, 33,8, 35,4, 36,8, 41,9, 45,7, 47,6, 54,1, 65,4, 67,5, 127,7, 127,8, 128,3, 137,0, 155,9, 169,6, 173,1, 173,3, 200,9.

(l) *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -propil-*L*-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó ácido *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -propil-*L*-glutámico (ver “16” que aparece anteriormente) usando los métodos de M Molina, T.M., *et al* (1993) Tetrahedron 49, 3801-3808; Blas, J., *et al* (2000) Tetrahedron Lett. 41, 4567-4571 y Antonjuk, D.J., *et al* (1984) J. Chem. Perkin Trans. 1 1989-2003.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3328, 2965, 1706, 1702, 1698, 1653; δ_{H} (CDCl₃) 0,8 (3 H, t), 1,4 (2 H, m), 2,0 y 2,2 (4 H, m), 3,1 (2 H, m), 4,3 (1 H, q), 5,1 (2 H, s), 6,0 (1 H, d), 6,5 (1 H, m), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 11,2, 22,4, 28,6, 32,4, 41,6, 53,4, 67,1, 127,9, 128,1, 128,2, 128,5, 136,0, 156,6, 173,4, 173,9.

Se preparó *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -propil-glutaminil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “17” que aparece anteriormente) a partir de DON y de ácido *N*- α -Benciloxicarbonil- γ -propil-*L* glutámico usando la activación del éster de *N*-hidroxi-succinimida.

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3325, 2938, 1719, 1689, 1664; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,4 y 1,5 (6 H, m), 1,8, 2,0, 2,3 y 2,6 (8 H, m), 3,3 (2 H, m), 3,4 (2 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,3 (1 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 11,7, 23,5, 25,2, 26,0, 28,8, 33,0, 34,7, 38,1, 52,0, 56,0, 67,7, 128,7, 128,8, 129,3, 137,0, 155,9, 169,6, 174,7, 174,8, 200,8.

(m) *N*- α -9-Fluorenilmetiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó *N*- α -9-Fluorenilmetiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “18” arriba) a partir de DON y del éster de *N*- α -Fmoc-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida (Bachem cat. no. B-1415).

p.f. 142-143°C, $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3354, 1714, 1700, 1686; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,9, 2,2 y 2,7 (4 H, m), 2,9-3,1 (2 H, m), 4,2-4,4 (5 H, m), 7,3 (9 H, ArH), 7,6 (2 H, ArH), 7,8 (2 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 25,5, 35,5, 36,6, 37,4, 46,6, 50,9, 56,1, 64,4, 120,0, 124,8, 125,1, 127,2, 127,5, 127,6, 128,7, 129,3, 137,0, 140,7, 143,7, 155,9, 171,9, 173,1, 200,7

(n) *N*- α -tert-butiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina

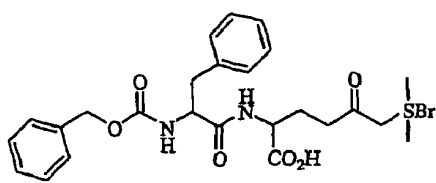
Se preparó *N*- α -tert-butiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina (ver “19” que aparece anteriormente) a partir de DON y del éster de *N*- α -BOC-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida (Novabiochem cat. no. 04-12-0074).

$\nu_{\max}$ (film)/cm⁻¹ 3380, 2930, 1722, 1699, 1684; δ_{H} (d₃ metanol) 1,2 (9 H, s), 1,8, 2,1 y 2,6 (4 H, m), 2,7-3,0 (2 H, m), 4,0 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,3 (2 H, m), 4,8 (2 H, s), 7,1 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 27,0, 28,7, 35,6, 36,4, 39,0, 52,4, 57,3, 80,6, 127,7, 129,4, 130,4, 138,2, 157,6, 174,4, 174,5, 202,7.

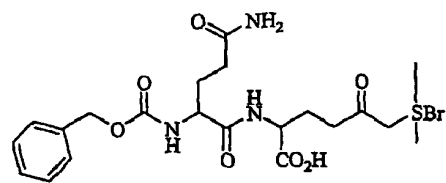
Preparación de aminoácidos derivados de los inhibidores de TGasa

Se prepararon las sales de sulfonio de los compuestos anteriores usando una modificación de los procedimientos informados previamente por Pliura *et al.* (1992) J. Enzyme Inhibition 6, 2768 and Shaw (1988) Biol. Chem., 263, 2768.

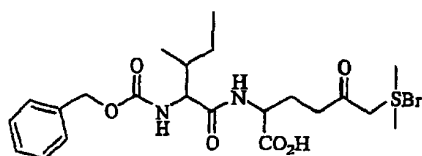
Se disolvió bromometilcetona en la cantidad mínima requerida de metanol seco para lograr la solución. Se añadió sulfuro de metilo (eqv. 2,5-7,5) y se dejó la solución en un matraz herméticamente cerrado de 24-48 h. hasta que se consideró completada la reacción mediante el TLC. La purificación se alcanzó disolviendo el residuo de agua desionizada y extrayendo las impurezas orgánicas solubles con acetato de etilo. El secado por congelamiento de la porción acuosa permitió obtener las sales del producto como sólidos incoloros con un rendimiento típico de 80-90%.



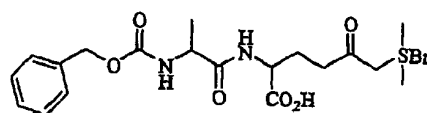
281



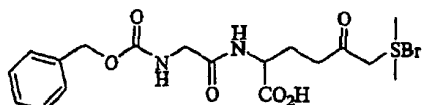
285



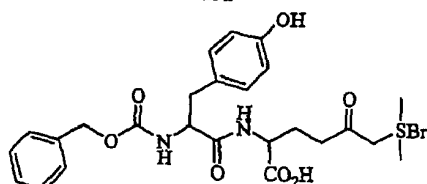
286



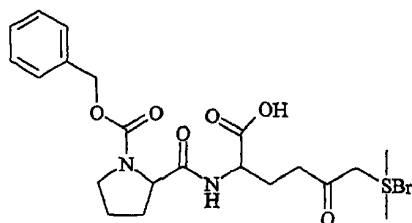
291



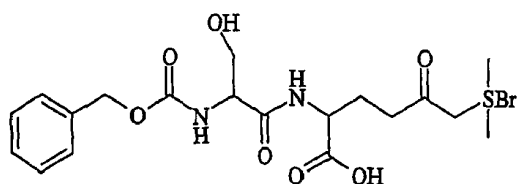
292



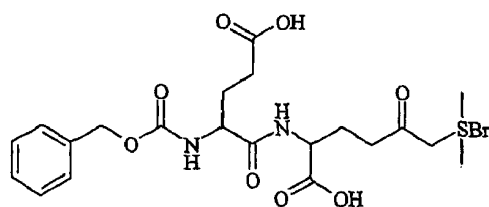
293



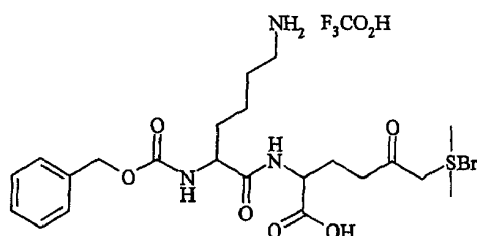
294



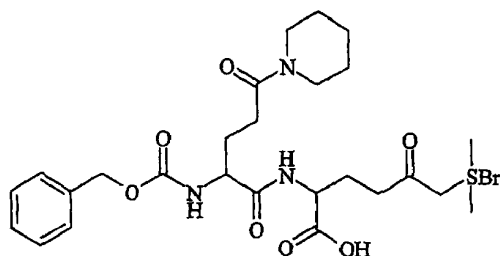
295



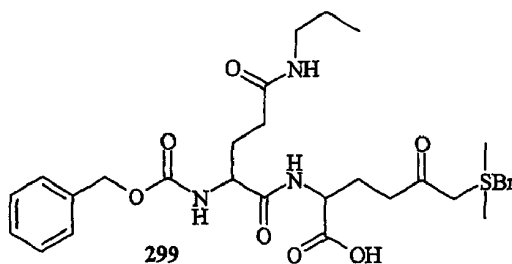
296



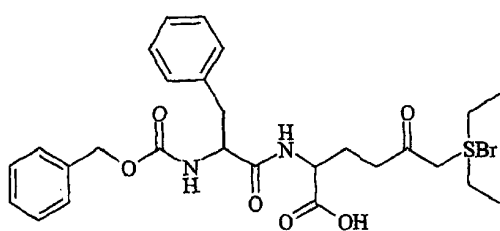
297



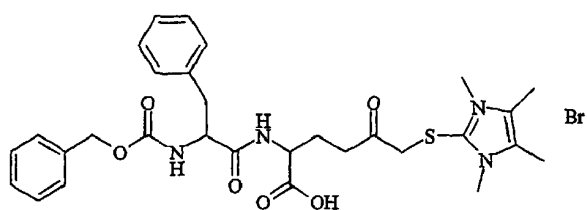
298



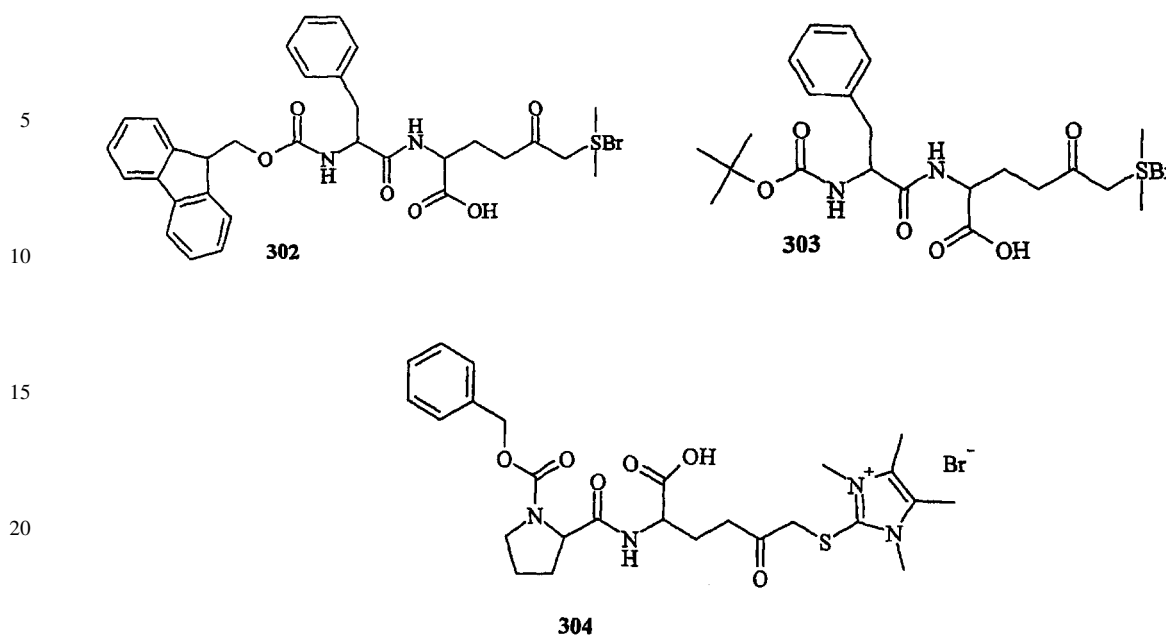
299



300



301



(a) Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “281” arriba)

p.f. 90-92°C, (Resultado: C, 52,89; H, 4,89; N, 5,05. C₂₅H₃₁BrN₂O₆S requiere C, 52,91; H, 5,51; N, 4,94%.); $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 1715, 1700, 1661; δ_{H} (d₆ acetona) 1,9, 2,2 y 2,7 (4 H, m), 2,9-3,1 (2 H, m), 3,2 (6 H, s), 4,6 (2H, m), 5,0 (2 H, s), 5,4 (1 H, d), 7,3 (10 H, ArH), 7,4 (1 H, d); δ_{C} (d₆ acetona) 25,2, 36,1, 38,5, 41,8, 51,9, 56,3, 60,6, 66,3, 128,4, 128,6, 129,0, 129,2, 130,3, 138,2, 138,6, 153,3, 168,7, 173,2, 202,0.

(b) Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “285” arriba)

p.f. 100°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3423, 3346, 1702, 1684, 1638; δ_{H} (DMSO-D₆) 1,7, 1,9, 2,1 y 2,6 (8 H, m), 2,8 (6 H, s), 3,3 (1 H, br), 3,9 (2 H, s), 4,2 (1 H, m), 4,7 (2 H, m), 5,0 (2 H, s), 6,7 (1 H, s), 7,3 (5 H, ArH), 7,4 (1 H, d), 8,2 (1 H, d); δ_{C} (DMSO-D₆) 24,5, 25,2, 27,7, 31,5, 37,5, 50,6, 53,5, 54,3, 65,4, 127,6, 127,8, 128,3, 128,4, 136,9, 155,9, 172,0, 172,9, 173,8, 201,4. MS: m/z Calc. para C₂₁H₃₀BrN₃O₇S: 547,09878 (M-Br = 468,18045). Observado 468,17769.

(c) Sal bromuro de Benciloxycarbonil-*L*-isoleucinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “286” arriba)

p.f. 111-114°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3424, 1717, 1700, 1664; δ_{H} (DMSO-D₆) 0,9, 1,2 y 1,5 (6 H, m), 1,9, 2,2 y 2,7 (4 H, m), 3,2 (6 H, s), 3,9 (1 H, d), 4,1 (2 H, s), 4,4 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (DMSO-D₆) 11,2, 15,9, 25,9, 26,8, 35,6, 36,4, 37,9, 52,3, 61,1, 67,6, 128,7, 129,0, 129,5, 138,1, 154,6, 174,4, 174,5, 202,8. MS: m/z Calc. para C₂₂H₃₃BrN₂O₆S: 532 (M-Br = 453). Observado 453.

(d) Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-alaninal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “291” arriba)

p.f. 100-102°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3426, 1716, 1698, 1660; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,2 (3 H, d), 1,8, 2,0 y 2,7 (4 H, m), 2,9 (6H, s), 4,0, (1 H, m), 4,2 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 24,5, 37,4, 49,8, 50,6, 52,0, 53,5, 65,3, 66,3, 27,7, 127,8, 128,3, 137,0, 155,7, 172,8, 172,9, 201,4. MS: m/z Calc. para C₁₉H₂₇BrN₂O₆S: 490 (M-Br = 411). Observado 411.

(e) Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-glicinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “292” arriba)

p.f. 96-99°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3424, 1714, 1701, 1663; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,8, 2,1 y 2,6 (4 H, m), 2,9 (6H, s), 3,6, (2 H, m), 4,3 (1 H, m), 4,7 (2 H, d), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 24,5, 37,4, 43,2, 50,6, 53,5, 65,4, 66,3, 127,6, 127,8, 128,3, 137,0, 156,5, 169,2, 172,9, 201,4. MS: m/z Calc. para C₁₈H₂₅BrN₂O₆S: 476 (M-Br = 397). Observado 397.

(f) Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-tirosinal-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver “293” arriba)

p.f. 111-113°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3426, 1716, 1700, 1666; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,9 y 2,1 (2 H, m), 2,6 (4 H, m), 2,9 (6H, s), 4,2, (2 H, s), 4,7 (2 H, d), 4,9 (2 H, d), 6,7 (2H, d, ArH), 7,1 (2 H, d, ArH), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₆ DMSO) 24,4, 24,8, 36,5, 37,5, 50,8, 53,5, 56,3, 65,2, 114,8, 127,3, 127,7, 128,0, 128,3, 130,1, 137,0, 155,7, 172,0, 172,9, 201,4. MS: m/z Calc. para C₂₅H₃₁BrN₂O₇S: 582 (M-Br = 503). Observado 503.

ES 2 314 402 T3

(g) *Sal bromuro de N-Benciloxicarbonil-L-prolinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “294” arriba)

p.f. 93-97°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3244, 2952, 1720, 1693, 1669; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9 (4 H, m), 2,2 (2 H, m), 2,7 (2 H, m), 2,8 (6 H, s), 3,6 (2 H, m), 4,3 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 25,3, 25,4, 26,3, 28,1, 31,1, 38,2, 52,1, 55,9, 67,6, 128,6, 129,1, 129,6, 138,2, 158,5, 174,4, 174,7, 201,8. MS: m/z Calc. para C₂₁H₂₉BrN₂O₆S: 517 (M-Br = 437). Observado 437.

(h) *Sal bromuro de N-Benciloxicarbonil-L-serinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “295” arriba)

p.f. 105°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3242, 2950, 1719, 1700, 1664; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9 (2 H, m), 2,3 (2 H, m), 2,9 (6 H, s), 3,8 (2 H, m), 4,2 (1 H, m), 4,4 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 24,6, 25,4, 26,3, 31,6, 32,5, 38,0, 48,3, 51,8, 61,6, 68,0, 128,4, 128,8, 129,1, 129,6, 138,2, 156,7, 174,3, 175,3, 201,8. MS: m/z Calc. para C₁₉H₂₇BrN₂O₇S: 507 (M-Br = 427). Observado 427.

(i) *Sal bromuro de N-Benciloxicarbonil-L-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “296” arriba)

p.f. 102-106°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3329, 2926, 1719, 1698, 1664; δ_{H} (d₃ metanol) 1,9, 2,1, 2,4 y 2,7 (8 H, m), 2,9 (6 H, s), 4,1 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 25,3, 25,4, 26,3, 28,1, 31,1, 38,2, 52,1, 55,9, 67,6, 128,6, 129,1, 129,6, 138,2, 158,5, 174,4, 174,7, 201,8. MS: m/z Calc. para C₂₁H₂₉BrN₂O₈S: 549 (M-Br = 469). Observado 469.

(j) *Sal bromuro de N-α-Benciloxicarbonil-N-ε-trifluoroacetato-L-lisinil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “297” arriba)

p.f. 110°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3334, 1722, 1688; δ_{H} (d₃ metanol) 1,4 y 1,7 (6 H, m), 1,9, 2,1 y 2,7 (6 H, m), 2,9 (6 H, s), 4,1 (1 H, m), 4,4 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH). MS: m/z Calc. para C₂₄H₃₅BrF₃N₃O₈S: 662 (M-Br-F₃C₂O₂H = 468). Observado 468.

(k) *Sal bromuro de N-α-Benciloxicarbonil-γ-piperidinil-L-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “298” arriba)

p.f. 92-94°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3415, 2933, 1719, 1700, 1664, 1618; δ_{H} (d₃ metanol) 1,5, 1,7 (6 H, m), 2,0, 2,3 y 2,7 (4 H, m), 2,9 (6 H, s), 3,4 y 3,5 (4 H, m), 4,1 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 22,3, 22,4, 23,2, 24,5, 25,4, 25,6, 27,1, 35,2, 38,2, 41,1, 44,8, 49,0, 53,0, 64,6, 125,7, 126,1, 126,6, 155,4, 169,5, 171,2, 171,8, 199,0. MS: m/z Calc. para C₂₆H₃₈BrN₃O₇S: 616 (M-Br+H = 537). Observado: 537.

(l) *Sal bromuro de N-α-Benciloxicarbonil-γ-propil-L-glutaminil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “299” arriba)

p.f. 82-85°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3414, 2927, 1720, 1698, 1668, 1636; δ_{H} (d₃ metanol) 0,9 (3 H, t), 1,5 (2 H, q), 1,9, 2,1 y 2,3 (4 H, m), 2,9 (6 H, s), 3,2 (2 H, t), 4,1 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,1 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 11,7, 23,5, 25,4, 26,0, 28,9, 33,0, 34,7, 38,1, 42,3, 52,0, 56,0, 67,7, 128,7, 128,8, 129,1, 129,6, 138,2, 158,4, 174,4, 174,6, 174,9, 201,8. MS: m/z Calc. para C₂₄H₃₆BrN₃O₇S: 590 (M-Br+H = 511). Observado 511.

(m) *Sal bromuro de N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “300” arriba)

p.f. 86-89°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 2932, 1716, 1700, 1661, 1636; δ_{H} (d₃ metanol) 1,4 (6 H, t), 1,9, 2,3 y 2,7 (4 H, m), 2,9-3,1 (2 H, m), 3,4 (4 H, q), 4,4 (1 H, m), 4,5 (1 H, m), 4,9 (2 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 9,4, 26,5, 34,9, 35,1, 38,2, 38,8, 52,0, 57,9, 67,5, 127,8, 128,5, 129,0, 129,4, 129,5, 130,3, 138,4, 158,3, 174,2, 174,4, 174,9, 201,6. MS: m/z Calc. y C₂₇H₃₅BrN₂O₆S: 594 (M-Br 515) observado 515.

(n) *Sal bromuro de N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-6-tetra-metilmercaptoimidazol-5-oxo-L-norleucina*

Se preparó sal bromuro de N-α-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-6-tetra-metilmercaptoimidazol-5-oxo-L-norleucina (ver “301” arriba) a partir de N-α-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-6-bromo-5-oxo-L-norleucina y 1, 3, 4, 5-tetrametilimidazol-2-ona, la cual se preparó por el método de Kuhn y Kratz (1993) Síntesis, 561, usando el método de Freund *et al.* (1994) Biochemistry, 33, 10109.

p.f. 116-118°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3414, 3237, 1720, 1657, 1638, 1617; δ_{H} (d₃ metanol) 1,7, 2,2 y 2,5 (4H, m), 2,3 (6 H, s), 2,9-3,1 (2 H, m), 3,9 (6 H, s), 4,3 (2 H, m), 4,8 (2 H, m), 5,0 (2 H, s), 7,2 (5 H, ArH), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 9,1, 26,9, 34,3, 38,7, 39,3, 46,5, 51,9, 58,0, 67,5, 127,8, 129,1, 129,5, 129,6, 130,3, 130,9, 138,9, 138,3, 138,4, 158,2, 174,2, 174,4, 201,8. MS: m/z Calc. para C₃₀H₃₇BrN₄O₆S: 661 (M-Br+H = 582). Observado 582.

(o) *Sal bromuro de N-9-Fluoronilmetiloxicarbonil-L-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina* (ver “302” arriba)

p.f. 95-98°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3415, 3310, 2926, 1720, 1648; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,8, 2,1 y 2,7 (4 H, m), 2,8 (6 H, s), 2,9-3,0 (2 H, m), 4,1-4,3 (5 H, m), 4,7 (2 H, m), 7,3 (9 H, ArH), 7,6 (2 H, ArH), 7,8 (2 H, ArH). MS: m/z Calc. para C₃₂H₃₅BrN₂O₆S: 654 (M-Br575) Observado 575.

ES 2 314 402 T3

(p) Sal bromuro de *N*- α -Pert-butiloxicarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina (ver "303" arriba)

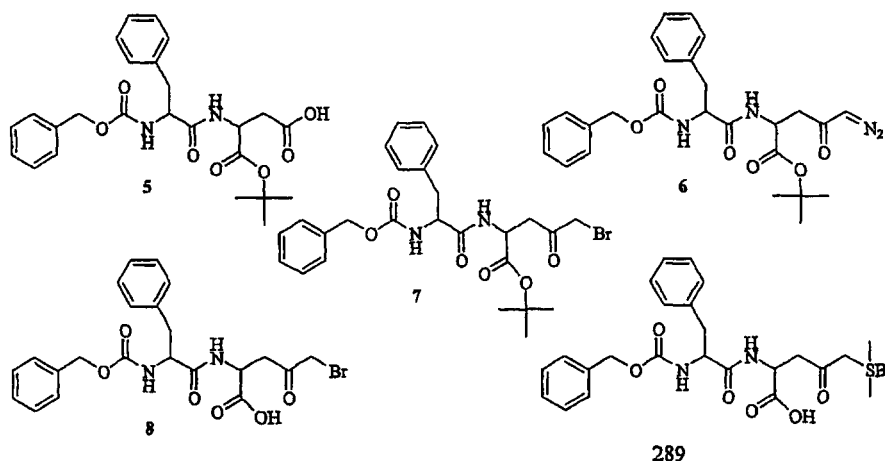
p.f. 105-109°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3413, 2930, 1720, 1663; δ_{H} (d₆ DMSO) 1,3 (9 H, s), 1,8, 2,1 y 2,7 (4 H, m), 2,8 (6 H, s), 2,9-3,0 (2 H, m), 4,2 (2 H, m), 4,7 (2 H, m), 7,3 (5 H, ArH). MS: m/z Calc. para C₂₂H₃₃BrN₂O₆S: 531 (M-Br 453) observado 453.

(q) Sal bromuro *N*-Benciloxicarbonil-*L*-prolinil-6-tetra-metilmercaptoimidazol-5-oxo-*L*-norleucina

Se preparó sal bromuro de *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-propinil-6-tetra-Metilmercaptoimidazol-5-oxo-*L*-norleucina (ver "304" que aparece anteriormente) a partir de *N*- α -Benciloxicarbonil-*L*-propinil-6-bromo-5-oxo-*L*-norleucina y 1, 3, 4, 5-tetrametilimidazol-2-ona, la cual fue preparada por el método de Kuhn y Kratz (1993) Synthesis, 561, usando el método de Freund *et al.* (1994) Biochemistry, 33, 10109.

p.f. 110°C (dec.), $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3426, 2927, 1700, 1630, 1638, 1617; δ_{H} (d₃ metanol) 1,7-2,1 (4 H, m), 2,2 (2H, m), 2,3 (6 H, s), 2,6 (2 H, m), 3,3 (2 H, m), 3,7 (6 H, s), 3,9 (2 H, m), 4,2 (1 H, m), 4,3 (1 H, m), 5,0 (2 H, m), 7,3 (5 H, ArH); δ_{C} (d₃ metanol) 8,7, 23,9, 25,2, 31,1, 33,7, 36,4, 40,4, 44,0, 46,6, 59,5, 65,8, 127,5, 127,8, 128,2, 128,9, 129,0, 136,9, 153,9, 172,1, 173,0, 202,9. MS: m/z Calc. para C₂₆H₃₅BrN₄O₆S: 610 (M-Br 531) observado 531.

Síntesis de sal bromuro de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-2-amino-5-dimetilsulfonio-4-oxo-norvalina (Compuesto "289")



El compuesto "5" se prepara mediante la reacción del éster de *N*- α -CBZ-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida, comercialmente disponible, (Novabiochem Cat. No. 04-12-5000) y del éster de ácido *L*-aspartico y de β -t-butilo en agua/THF (1:1), en presencia de 1,5 equivalentes de trietilamina.

(a) Éster de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-2-amino-5-diazo-oxo-norvalina y de tert-butilo (ver "6" arriba)

A una solución fría (-78°C) del éster de ácido *N*- α -benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-aspartico y de β -t-butilo (ver "5" que aparece anteriormente) (2,35 g, 5 mmol) en THF (100 ml), en una atmósfera de nitrógeno, se adicionó el éster de *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-2-amino-5-diazo-oxo-norvalina y de tert-butilo (ver "6" que aparece anteriormente), *N*-Metilmorfolina (0,63 ml, 5,75 mmol) seguido por cloroformato *n*-butilo (0,74 ml, 5,75 mmol). Se agitó la reacción durante 0,5 h y se añadió una solución etérea de diazometano, preparada a partir de *N*-metil-*N*-nitroso-4-toluensulfonamida (6,23 g, 29 mmol), la que se adicionó gota a gota, y se dejó que la reacción se calentara hasta alcanzar temperatura ambiente durante la noche. Se adicionó una solución saturada de cloruro de amonio (100 ml) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 5 min., separándose entonces las capas. Al retirarse el solvente *in vacuo* se obtuvo un residuo sólido el cual fue recrystalizado a partir de ciclohexano/DCM para obtener un producto en forma de sólido amarillo pálido (1,91 g, 77%).

p.f. 122-124°C, (Resultado: C, 62,88; H, 6,38; N, 11,01. C₂₆H₃₀N₄O₆ requiere C, 63,15; H, 6,11; N, 11,33%.); $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 2105, 1736, 1689, 1655; δ_{H} (CDCl₃) 1,4 (9 H, s), 2,8 y 3,2 (2 H, m), 3,6 (2 H, s), 4,4 (1 H, m), 4,6 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 5,2 (1 H, d), 6,9 (1 H, d), 7,3 (10H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 27,8, 36,2, 38,3, 49,6, 55,8, 67,2, 82,8, 127,3, 128,5, 128,6, 129,1, 129,2, 130,2, 136,0, 136,6, 153,5, 169,4, 170,7, 191,5.

(b) *Éster de N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-L-2-amino-5-bromo-4-oxo-norvalina y de tert-butilo* (ver “7” arriba)

A una solución fría (0°C) del éster de *N*-benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-2-amino-5-diazo-4-oxo-norvalina y de tert-butilo (ver “6” que aparece anteriormente) (1 g, 2 mmol) en acetato de etilo (40 ml), se le adicionó una solución 1:1 de HBr/ácido acético (2 ml) al 48%, gota a gota. La mezcla fue agitada durante otros 10 minutos y el material orgánico fue lavado con agua (10 ml x 3) y solución salina (10 ml) y secada sobre MgSO₄. La extracción del solvente *in vacuo* produjo un residuo sólido el cual fue recrystalizado a partir de ciclohexano para obtener un sólido blanco (0,915 g, 84%).

p.f. 126-127°C; $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3294, 1738, 1690, 1654; δ_{H} (CDCl₃) 1,4 (9 H, s), 2,8 y 3,2 (2 H, m), 3,6 (2 H, s), 3,8 (2 H, s), 4,4 (1 H, m), 4,6 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 5,6 (1 H, d), 6,9 (1 H, d), 7,3 (10H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 27,8, 33,7, 38,2, 41,4, 49,3, 55,9, 82,9, 127,3, 128,5, 128,6, 129,1, 129,2, 130,2, 136,0, 136,6, 153,5, 169,4, 170,7, 199,8.

(c) *N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-L-2-amino-5-bromo-4-oxo-norvalina* (ver “8” arriba)

A una solución del éster de *t*-butilo (ver “7” que aparece anteriormente) (0,55 g, 1 mmol) en DCM (10 ml), se le añadió ácido trifluoroacético (0,95 ml, 12,5 mmol) y trietilsilano (0,4 ml, 2,5 mmol). Se agitó la reacción durante 1,5 h. y se extrajeron las sustancias volátiles al vacío. Se trituró el residuo resultante con éter para obtener el producto en forma de un sólido incoloro (0,38 g 78%), p.f. 134-136°C, (Resultado: C, 53,57; H, 4,70; N, 5,65. C₂₂H₂₃BrN₂O₆ requiere C, 53,78; H, 4,72; N, 5,70%).; $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3295, 1718, 1689, 1654; δ_{H} (CDCl₃) 2,8 y 3,2 (2 H, m), 3,3 (2 H, m), 3,7 (2 H, s), 4,5 (1 H, m), 4,7 (1H, m), 5,1 (2 H, s), 5,8 (1 H, d), 5,9 (1 H, d), 6,8 (1 H, br), 7,3 (10H, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 33,7, 38,2, 41,4, 49,3, 55,9, 67,2, 127,0, 127,8, 128,1, 128,4, 129,3, 136,1, 136,6, 156,5, 171,4, 176,7, 200,1.

(d) *Sal bromuro N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil-L-2-amino-5-dimetilsulfonio-4-oxo-norvalina* (ver “289” arriba)

Se preparó la sal de sulfonio, *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-2-amino-5-dimetil-sulfonio-4-oxo-bromuro de norvalina, según lo descrito anteriormente, a partir de bromometilcetona (ver “8” que aparece anteriormente) (0,1 g, 0,2 mmol) y sulfuro de metilo (0,11 ml, 1,5 mmol). El secado por congelación permitió obtener el producto en forma de un sólido higroscópico incoloro (20 mg, 18%). p.f. 98°C (dec.); $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 1716, 1689, 1669; δ_{H} (d₄ metanol) 2,8 y 3,2 (2 H, m), 3,2 (6 H, s), 3,8 (2 H, s), 4,7 (1 H, m), 4,9 (1 H, m), 5,1 (2 H, s), 5,9 (1 H, d), 6,5 (1 H, d), 7,3 (10 H, ArH). δ_{C} (d₄ metanol) 25,4, 38,8, 43,9, 49,8, 57,8, 67,5, 68,1, 127,8, 128,5, 128,9, 129,5, 130,3, 136,1, 136,6, 158,3, 173,1, 174,1, 200,1. MS: m/z Calcd. para C₂₄H₂₉Br N₂O₆S 552 (M-Br = 473) Observado: 473.

Síntesis de un compuesto homólogo superior de sal bromuro N-Benciloxicarbonil-L-fenilalanil 6-dimetilsulfonio-5-oxo-L-norleucina (ver “Compuesto 287” que aparece anteriormente)

Se preparó el ácido a partir del éster de 6-diazo-*N*-(9-fluorenil-metiloxicarbonil)-5-oxo-*L*-norleucina y de etilo mediante el método de Coutts *et al.* El producto se obtuvo mediante cromatografía de columna flash (acetato de etilo 100%) 1,64 g, 66%.

(a) *Éster de ácido N-(-9-Fluorenilmetiloxicarbonil)-L-2-amino-7-diazo-6-oxo-heptanoico y de 1-etilo*

A una solución fría (0°C) del ácido (0,94 g, 2,3 mmol) en DCM (24 ml), se le añadió cloruro de oxalilo (1,725 ml de una solución 2M en DCM, 3 3,45 mmol) gota a gota. Se calentó la reacción hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitó continuamente durante otros 40 min. Se enfrió nuevamente la reacción hasta 0°C y se le añadió cloruro de oxalilo (1,725 ml de una solución 2M en DCM, 3,45 mmol), gota a gota. Se calentó la reacción obtenida hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitó continuamente durante otras 2 h. Se extrajeron las sustancias volátiles a presión reducida para obtener un sólido amarillo. Se disolvió el sólido en THF/acetonitrilo (1:124 ml) y se enfrió en un baño helado bajo un manto de nitrógeno. Se añadió trimetil-silildiazometano (4,6 ml de una solución 2M en hexano, 9,2 mmol) a la solución, gota a gota y se agitó la reacción a 0°C durante 1½ h. Se le añadió una solución saturada de cloruro de amonio a la mezcla y se separaron las fases. Se lavó el material orgánico con 10% Na₂CO₃ (5 ml, x 3), solución salina (5 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. La extracción del solvente *in vacuo* produjo un aceite anaranjado el cual fue purificado por cromatografía en columna flash (3:2 éter de petróleo/etil acetato) para obtener un producto en forma de sólido amarillo pálido (0,65 g, 65%).

p.f. 123-124°C (CCl₄, dec.) $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3354, 2103, 1739, 1686, 1635; δ_{H} (CDCl₃) 1,3 (3 H, t), 1,7, 1,9 y 2,3 (6H, m), 4,2 (3 H, m), 4,4 (3 H, m), 5,2 (1 H, s), 5,4 (1 H, d), 7,3 (4 H, m, ArH), 7,6 (2 H, ArH), 7,8 (2 H, m, ArH); δ_{C} (CDCl₃) 14,1, 20,6, 32,0, 40,1, 47,1, 53,5, 54,5, 61,6, 67,0, 120,0, 125,1, 127,0, 127,7, 141,2, 143,8, 155,9, 172,2, 192,4.

(b) *Ácido L-2-amino-7-diazo-6-oxo-heptanoico*

Se desprotegió la diazocetona (0,5 g, 1,15 mmol) con piperidina, según lo descrito previamente, para obtener el aminoácido como un sólido amarillo pálido (57,2 mg, 54%).

p.f. 122-124°C (Lit. p.f. 125-126°C) $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3436, 2108, 1630 (Weygand *et al.*, Chem. Ber. 91, 1037-40).

ES 2 314 402 T3

(c) Ácido *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-7-bromo-6-oxo-heptanoico

Se preparó el dipéptido usando el método descrito previamente para obtener un sólido incoloro (93 mg, 66%).

5 p.f. 108-110°C (acetato de etilo), $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 1715, 1700, 1661; δ_{H} (d₃ metanol) 1,6, 1,8 y 2,6 (6 H, m), 2,9-3,1 (2 H, m), 4,1 (2 H, s), 4,4 (2 H, m) 5,0 (2 H, s), 7,3 (10 H, ArH), 7,4 (1 H, d); δ_{C} (d₃ metanol) 21,0, 31,8, 39,7, 53,2, 57,7, 56,3, 67,5, 127,7, 128,6, 128,9, 129,4, 130,4, 138,1, 138,5, 158,2, 174,2, 174,8, 203,4. MS: m/z Calc. para C₂₄H₂₇BrN₂O₆: 518 (M-Br = 439). Observado 519, 439.

10 (d) Sal bromuro de ácido *N*-Benciloxicarbonil-*L*-fenilalanil-7-dimetilsulfonio-6-oxo-heptanoico (Compuesto "288")

Se preparó la sal de sulfonio según lo descrito previamente, para obtener un sólido higroscópico incoloro (48 mg, 57%).

15 p.f. 94-96°C (dec.), $v_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 3296, 1715, 1700, 1661; δ_{H} (d₆ acetona) 1,7, 1,9 y 2,7 (6 H, m), 2,8-3,1 (2 H,m), 2,9 (6 H, s), 4,4 (2 H, m), 4,9 (2 H, d), 5,0 (2 H, s), 7,3 (10 H, ArH); δ_{C} (d₆ acetona) 20,5, 25,3, 31,7, 39,0, 41,6, 53,1, 53,2, 57,7, 67,5, 127,7, 128,5, 128,9, 129,4, 129,5, 130,4, 138,2, 138,5, 158,2, 174,3, 174,7, 202,3. MS: m/z Calc. para C₂₆H₃₃BrN₂O₆S: 580 (M-Br = 501). Observado 501.

20

Ejemplo 2

Inhibición de la actividad de TGasa

25

Se verificó la eficacia de los compuestos ejemplares de la invención en la inhibición por transglutaminasa mediante el estudio del efecto de la dosis-dependencia sobre la actividad de la transglutaminasa hepática purificada de un conejillo de indias (gp1TGasa), usando un ensayo por adsorción de enzima ligada (ELSA) basado en la incorporación de biotincadaverina (BTC) a *N,N'*-dimetilcaseína (DMC).

30

Se realizaron los experimentos de la siguiente manera:

Se probó la inhibición de la TG (TGasa) del hígado de un conejillo de indias usando un ensayo por adsorción de enzima ligada (ELSA), basado en la incorporación de biotincadaverina (BTC) a *N,N'*-dimetilcaseína (DMC). Se recubrieron platos para el análisis por microtitulación (96-celdas) con 100 μ l de 10 mg/ml de DMC en 10 mM Tris pH 7,4, durante la noche, a 4°C. Al día siguiente, los platos fueron lavados dos veces con TBS-Tween, pH 7,4, y una vez con TBS, pH 7,4 y se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 mM de CaCl₂, 5 mM de DTT y 0,132 mM de BTC en 50 mM Tris, pH 7,4. Se preparó la mezcla de manera que se alcanzaran las concentraciones finales apropiadas al adicionar 10 μ l de 200 μ g/ml de TGasa a 990 μ l de la mezcla para iniciar la reacción. Inicialmente, los inhibidores de TGasa se prepararon como soluciones concentradas de 100 mM en H₂O y fueron diluidos hasta alcanzar la concentración final apropiada en la misma solución de reacción. Las muestras control negativas para la actividad de TGasa consistieron en mezclas que no contenían BTC y donde se sustituyeron 10 mM de EDTA por 5 mM de CaCl₂.

45 Tras añadir TGasa, se tomaron 100 μ l de la solución con pipetas y se depositaron en 8 contenedores réplica por muestra y se permitió que la reacción procediera por una hora a 37°C. Se detuvo la reacción mediante la extracción de la solución y la adición de 100 μ l a 10 mM EDTA en PBS, pH 7,4. Se lavaron los platos otra vez dos veces con TBS-Tween, pH 7,4 y una con TBS, pH 7,4 y se bloquearon mediante incubación con 100 μ l por contenedor de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas de la expresión inglesa: *bovine serum albumin*) al 3% p/v (w/v, por sus siglas de la expresión inglesa, *weight in volume*) en PBS, pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó la BTC incorporada mediante la incubación con 100 μ l por contenedor de una solución de Peroxidasa Extravidina (EXAP, por sus siglas de la expresión inglesa, *Extravidin peroxidase*), diluida 1 en 5000 en un buffer de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Los platos fueron lavados de la misma manera que se hizo anteriormente y, antes de que se iniciara el crecimiento, los platos fueron preincubados durante 5 minutos en un buffer de citrato de fosfato de 0,05 M, pH 5,0 que contenía 0,014% (v/v) H₂O₂. La solución fue extraída y reemplazada por 100 μ l por contenedor del mismo buffer que contenía 75 μ g/ml de tetrametilbenzidina (TMB, por sus siglas de la expresión inglesa: *tetramethylbenzidine*). Se permitió que el desarrollo de la reacción siguiera su curso a temperatura ambiente de 5-15 minutos y se detuvo mediante la adición de 50 μ l de H₂SO₄ a 1N. Se midió la absorbancia del color resultante en un lector de plato de microtitulación a 450 nm.

60

Los datos mostrados indican un experimento representativo usando 8 muestras repetidas. La absorbancia media se observa a 450 nm $\pm$ SD.

65 Las Figuras 2 a la 21 muestran el efecto de los compuestos ejemplares de la invención (y compuestos control) sobre la actividad de la transglutaminasa tisular *in vitro*.

ES 2 314 402 T3

Ejemplo 3

Inhibición del enlace cruzado de la proteína mediada por la TGasa

Método de Ensayo

1. Preactivar la TGasa en 3 mM DTT (en los casos en que proceda) en hielo durante 1 h.

2. Realizar un entrecruzamiento de TGasa con fibronectina en 40 mM de Tris/100 mM de NaCl a 50 $\mu\text{g/ml}$ a la concentración final de cada una, según la Tabla 1 que aparece a continuación. Incluir los controles de la TGasa no activada/la TGasa preactivada en presencia y en ausencia de los inhibidores para investigar la formación potencial del homodímero.

3. Incubar a 37°C durante 2 h. para permitir que tenga lugar la formación de enlaces cruzados.

4. Solubilizar el enlace cruzado en un buffer Laemmli x 2. Agitar intensamente en remolino y dejar sedimentar el material insoluble.

5. Cargar 20 μg de la proteína total (TGasa + Fn) sobre un gel de acrilamida al 7% para SDS PAGE. Pasar el gel a 100 mV hasta que el tinte escape del fondo del gel.

6. Teñir con azul brillante *coomassie* durante 1 h. a RT (por las siglas de la expresión inglesa *Room Temperature*, en español, *Temperatura Ambiente*).

7. Decolorar en metanol al 30%/ácido acético al 10% a RT.

TABLA I

Componente	Control 1 T-Gasa no activada	Control 2 T-Gasa preactivada	Control 3 T-Gasa preactivada +Compuesto 285	Control 4 Fibronectina	Control 5 T-Gasa +Fibronectina	T-Gasa +Fibronectina +Compuesto 281	T-Gasa +Fibronectina +Compuesto 283	T-Gasa +Fibronectina +Compuesto 285
Tris pH 7.4 (mM)	40	40	40	40	40	40	40	40
NaCl (mM)	100	100	100	100	100	100	100	100
TGasa ($\mu\text{g/ml}$)	50	50	50	50	50	50	50	50
Fibronectina ($\mu\text{g/ml}$)		50		50	50	50	50	50
Compuesto 281 (μM)						250		
Compuesto 283 (μM)							250	
Compuesto 285 (μM)			250					250

Compuesto 281 = Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-fenilalanil-6-dimetil -sulfonio-5-oxo-*L*-norleucina

Compuesto 283 = Cloruro de 1,3-dimetil-2-(2-oxopropilsulfanil)-3H-1,3-diazol-1 -io- (según lo mostrado en US 4,968,713)

Compuesto 285 = Sal bromuro de *N*-Benciloxycarbonil-*L*-glutaminil-6 -dimetilsulfonio-5-oxo-*L*-norleucina

La Figura 22 ilustra los datos SDS-PAGE que muestran el enlace cruzado de la fibronectina mediada por tTGasa después del tratamiento con compuestos ejemplares de la invención.

Ejemplo 4

*Inhibición de la fibrosis renal en ratas*5 *Método para la suministración de inhibidores usando minibombas osmóticas*

Se anestesió una rata masculina Wistar de aproximadamente 300 g de peso usando halotano al 5% y manteniéndolo al 3% durante el proceso quirúrgico. La rata fue sometida a una nefrectomía subtotal de 5/6to. (SNx) mediante la ligadura de la arteria y vena renal izquierdas seguido por una nefrectomía completa del riñón izquierdo. El riñón derecho tenía los dos polos, el superior y el inferior, ligados posterior a la escisión de ambos polos. Se selló una cánula de 9 cm (agujero de 0,32 mm) en uno de sus extremos y se perforó a una distancia de entre 3 y 12 mm del extremo sellado. Se insertó ésta entonces a través del parénquima (corte a corte/polo a polo) del riñón de manera que el extremo romo fuera exactamente visible a través de uno de los extremos cortados. Se selló entonces en esta posición usando papel engomado en ambos extremos del riñón de forma que el área perforada estuviera dentro del resto del riñón. Se pasó la cánula por la pared muscular, la cual fue entonces suturada usando suturas reabsorbibles. Se ató la cánula al regulador de una minibomba osmótica de 2 ml (Azlet osmotic minipump (2 ml14), Charles Rivers, UK) que fue cargada (cebada durante 15 h. a RT) ya fuera con PBS (SNx) o con los inhibidores de TGasa 281 ó 283 (SNx + 281 y SNx + 283, respectivamente) en una concentración de 50 mM (descarga de 1.5 µl por hora). Posteriormente, se posicionó la bomba subcutáneamente sobre el flanco superior derecho del animal y se suturó la piel. Luego se cambió al animal a oxígeno y se le permitió recuperar la consciencia parcialmente antes de ser retornado a la jaula. Se cambió la bomba cada 28 días bajo anestesia con halotano. Después de 83 días, el animal fue colocado en una jaula metabólica para colectar una muestra de orina en 24 horas. Se anestesió entonces al animal, se recuperó el resto del riñón y se colectó una muestra de sangre terminal.

25 Las muestras de tejido fueron seccionadas y luego se sometieron a la tinción con tricromo de Masson (Johnson *et al.*, 1997, 99:2950-2960) o tinción con colágeno III.

Para la tinción con colágeno III, se le quitó la cera a las secciones introducidas en parafina (4 µm) y se hidrataron siguiendo un protocolo estándar (xileno 10 min., etanol al 100% 5 min., etanol al 90% 5 min., etanol al 75% 5 min., etanol al 50% 5 min., agua 10 min.) se lavaron en PBS durante 10 min. y todos los peróxidos endógenos fueron eliminados mediante el tratamiento con H₂O₂ al 3% en etanol durante 10 minutos. Después de lavarse en PBS durante 10 minutos, las secciones fueron tratadas con el agente revelador de epítopes TUF (ID Labs Inc. Cat no BP1122) en un baño de agua a 92°C durante 10 min., permitiéndoles entonces que se enfriaran hasta la temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con PBS durante 10 min. y después con tripsina (Zymed Labs Cat No 00-3008) digerida (tripsina diluida 1:3) durante 10 min. a 37°C seguido por dos lavados en PBS durante 5 minutos cada uno. Se bloquearon entonces las secciones en suero de oveja (Vector Labs Cat No S1000) incubadas a 37°C durante 30 min. Se añadió entonces el anticuerpo primario del colágeno III (colágeno antihumano de oveja tipo III, Soutem Biotech Assocs, diluido 1 en 10 en albúmina sérica bovina [BSA] en PBS) y se incubó durante la noche a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con Nonidet al 0,1% en PBS durante 5 min., seguido por dos lavados en PBS durante 5 min. Se añade entonces el anticuerpo secundario (conejo anti oveja, el cual tiene biotina incorporada, a partir de DAKO Cat No E0466) diluido 1 en 400 en BSA/PBS al 1% y se incuban durante 30 min. a 37°C. Entonces las muestras se lavan dos veces en Nonidet al 0,1% en PBS y luego se incuban con el juego Complejo Enzima Avidina Biotina (ABC, por sus siglas de la expresión inglesa *Avidin Biotin Enzyme Complex*) (Vector Labs Cat No PK-6102) siguiendo las instrucciones de los productores durante 30 min. a una temperatura de 37°C. Se lavan entonces las muestras dos veces en PBS y se añade el sustrato del reactivo, 3-amino-9-etil carbozol (AEC [Vector Labs Cat No SK4200]) para permitir el desarrollo del color (aproximadamente de 5-30 min.). Después de lavadas dos veces con agua durante 5 min. y luego dos veces con PBS durante 5 min., las muestras son contrateñidas con hematoxilina (diluida 1 en 10 a partir de Termo Shandon, hematoxilina Gill-2 Cat No. 6765007) durante 5 min., lavadas dos veces con agua durante 5 min., lavadas con PBS una vez y posteriormente, las secciones son montadas usando glicergel antes de observarlas a través de un microscopio de luz.

La Figura 23 muestra (a) secciones representativas teñidas con Tricromo de Masson y (b) secciones teñidas de colágeno III tomadas de riñones de animales a los cuales se les instiló el compuesto inhibidor (designado "SNx + 281") y el compuesto 283 (designado "SNx + 283") (ver Johnson *et al.*, 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10:2146-2157 para el método usado para inducir la nefrectomía subtotal).

La Figura 24 muestra un análisis de imagen cuantitativo de (a) una tinción con Tricromo de Masson y (b) una tinción de colágeno III en secciones de riñón tomadas de animales de 90 días después del tratamiento con los compuestos inhibidores 281 (designado "SNx + 281") y 283 (designado "SNx + 283"). Nos referimos a Snc y SNx de la misma forma en que aparecen anteriormente. Para la tinción con Tricromo de Masson se realizó el análisis mediante la adquisición sistemática de los campos corticales superpuestos adyacentes a 100 X de aumento de forma que 5 campos abarcaran más del 80% de la corteza. Cada campo fue luego sometido a un análisis de 3 fases usando un análisis de imagen y el área en azul (colágeno), roja (citoplasma) y blanca (lumen) determinó el asegurar una cobertura de más del 95%. El índice de cicatrización fue determinado expresando la fase azul como una fracción citoplasmática. Se usaron cinco animales por grupo y los datos expresaron valores medios +/-, por S.E.M. El diagrama compuesto que muestra la tinción en la Figura 12(a) muestra 1 campo de cada animal. Para la tinción con colágeno III, las cantidades relativas de colágeno III presentes (teñidas de carmelita) fueron determinadas por la adquisición sistemática de datos tomados de 10 campos corticales superpuestos con un aumento de 200 X y expresados como Valores Medios ±, por SEM.

Las secciones criostáticas de riñón en la actividad de TGasa in situ

Los riñones de las ratas tratadas *in vivo* con inhibidores de TGasa fueron sometidos a congelamiento rápido en nitrógeno líquido y se cortaron secciones de 14 μm usando un criostato y se dejaron secar al aire. Las secciones fueron rehidratadas durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución de suero de conejo al 5% (w/v), a 10 mM EDTA, 0,01% (v/v) Triton X-100 a 50 mM Tris pH 7,4, que contenía EXAP (diluido 1 en 200) para bloquear la biotina endógena. Después de la rehidratación, los portaobjetos fueron lavados dos veces en PBS pH 7,4 y se incubaron las secciones durante 1 hora a 37°C con una mezcla de reacción que contenía 5 mM de CaCl_2 , 5 mM de DTT y 0,5 mM de BTC en 50 mM de Tris pH 7,4. Los controles negativos consistieron en mezclas que no contenían BTC y donde 10 mM de EDTA fueron sustituidos por 5 mM de CaCl_2 . Se incluyó también un control positivo que contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ de TGasa. Posterior a la incubación, se lavaron los portaobjetos una vez en PBS pH 7,4 que contenía 10 mM de EDTA, se fijaron en acetona helada durante 5 minutos y se dejaron secar al aire. Se bloquearon las secciones secadas en 3% (w/v) de BSA en PBS pH 7,4 durante la noche a 4°C y se reveló el BTC incorporado mediante la incubación con Streptavidina-Cy5, diluida 1 en 100 en el mismo buffer durante 2 horas a 37°C. Los portaobjetos fueron observados en un microscopio confocal Leica CSNT equipado con filtros de excitación y emisión para Cy5 y se cuantificó la fluorescencia emitida usando el software suministrado por el productor. La Figura 25a muestra un análisis semicuantitativo de la emisión desde un microscopio de láser confocal Leica del enlace TRITC-extravidina con biotincadaverina incorporada a la TGasa en secciones criostáticas tomadas de riñones de ratas SNx tratadas durante 28 días con los inhibidores 281 y 283. SNc se refiere a riñones control obtenidos de animales sometidos a una operación simulada con nefrectomía subtotal. SNx se refiere a la nefrectomía subtotal. Se suministraron los inhibidores al riñón mediante minibombas según lo descrito anteriormente. Los datos son valores medios $\pm$ SE, SEM tomados de 5 riñones diferentes.

Análisis de la incorporación de putrescina C^{14}

Un segundo método de ensayar la actividad de TGasa, la incorporación de putrescina C^{14} en N,N'-dimetilcaseína usando homogeneizados tisulares de riñones de ratas SNx tratadas con los inhibidores durante 84 días, confirmó el efecto del tratamiento con los compuestos 281 y 283 sobre la actividad de TGasa (ver la Figura 25b).

Se llevaron a cabo experimentos sobre la incorporación de putrescina según lo descrito en Skill *et al.*, 2001, Lab. Invest 81:705-716 y Lorand *et al.*, 1972, Anal Biochem 50:623-631.

Análisis de proteinuria, aclaramiento de creatinina, creatinina sérica, creatinina en orina y urea en orina

La Tabla 3 muestra niveles de proteinuria, aclaramiento de creatinina, creatinina sérica, creatinina en orina y urea en orina en ratas SNx de 90 días a las cuales se les instilaron en los riñones los compuestos inhibidores 283 y 281.

TABLA 3

Grupo Experimental	Proteinuria (mg/24h)		Aclaramiento de creatinina (ml/min.)		Creatinina sérica (mM/L)	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE
Control (SNc)	129	14	1,72	0,18	46	0,6
SNx	672	140	0,44	0,2	224	36
SNx + 283	835	93	0,86	0,05	114	16
SNx + 281	503	63	0,94	0,09	208	106
Grupo Experimental	Creatinina en orina (mM/L)		Urea sérica (mM/L)		Urea en orina (mM/L)	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE
Control (SNc)	12399	2538	6,22	1,1	1160	226
SNx	2551	695	31,4	4,6	244	20
SNx + 283	3138	185	16,3	2,2	272	20
SNx + 281	3999	560	22,32	4,5	372	50

Se llevaron a cabo análisis de proteinuria, aclaramiento de creatinina, creatinina sérica, creatinina en orina y urea en orina a través de técnicas químicas clínicas estándar (Jonson *et al.*, 1997, J. Clin. Invest. 99:2950-2960). La creatinina y la urea se midieron con la técnica estándar en autoanalizador y la proteinuria mediante el método Biuret (Jonson *et al.*, *supra*). Los datos representan valores medios $\pm$ SE, tomados de 5 animales por grupo.

Los datos de aclaramiento de proteinuria y creatinina se muestran en forma de histograma en la Figura 26 (a) y (b), respectivamente.

ES 2 314 402 T3

Ejemplo 5

Formulaciones farmacéuticas ejemplares

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran formulaciones farmacéuticas según la invención en las cuales el ingrediente activo es un compuesto de la invención.

Ejemplo A

10 *Tableta*

	Ingrediente Activo	100 mg
	Lactosa	200 mg
15	Almidón	50 mg
	Polivinilpirrolidona	5 mg
	Estearato de magnesio	4 mg
20		359 mg

Las tabletas se preparan a partir de los ingredientes anteriores mediante granulación húmeda seguida por compresión.

25 Ejemplo B

Solución oftálmica

30	Ingrediente activo	0,5 g
	Cloruro de sodio, grado analítico	0,9 g
	Tiomersal	0,001 g
	Agua purificada hasta	100 ml
35	pH ajustado a	7,5

Ejemplo C

40 *Formulación de tabletas*

Las Sigüientes formulaciones A y B se preparan mediante granulación húmeda de los ingredientes con una solución de povidona, seguida por la adición de estearato de magnesio y compresión.

45	<u>Formulación A</u>	mg/tableta	mg/tableta
	Ingrediente activo	250	250
	Lactosa B.P	210	26
	Povidona B.P	15	9
50	Glicolato de almidón sódico	20	12
	Estearato de magnesio	5	3
		500	300
55			
	<u>Formulación B</u>	mg/tableta	mg/tableta
	Ingrediente activo	250	250
	Lactosa	210	-
60	Avicel PH 101®	60	26
	Povidona B.P	15	9
	Glicolato de almidón sódico	20	12
65	Estearato de magnesio	5	3
		500	300

ES 2 314 402 T3

Formulación C

	mg/tableta
Ingrediente activo	100
Lactosa	200
Almidón	50
Povidona	5
Estearato de magnesio	4

359

Las siguientes formulaciones, D y E, se preparan por compresión directa de los ingredientes mezclados. La lactosa usada en la formulación E es del tipo de compresión directa.

Formulación D

	mg/tableta
Ingrediente activo	250
Almidón pregelatinizado NF15	150

400

Formulación E

	mg/tableta
Ingrediente activo	250
Lactosa	150
Avicel®	100

500

Formulación F (Formulación de liberación controlada)

La formulación se prepara mediante granulación húmeda de los ingredientes (que aparece a continuación) con una solución de povidona seguido por la adición de estearato de magnesio y compresión.

	mg/tableta
Ingrediente activo	500
Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel K4M Premium)®	112
Lactosa B.P	53
Povidona B.P.C.	28
Estearato de magnesio	7

700

La liberación del medicamento tiene lugar en un período de tiempo aproximado de 6-8 horas y se completa después de 12 horas.

Ejemplo D

Formulaciones de cápsulas

Formulación A

Se prepara una formulación de cápsula mediante la mezcla de los ingredientes de la formulación D en el ejemplo C que aparece anteriormente y la introducción de los mismos en una cápsula de gelatina dura de dos partes. La formulación B (*infra*) se prepara de manera similar.

ES 2 314 402 T3

Formulación B

	mg/cápsula
(a) Ingrediente activo	250
(b) Lactosa B.P.	143
(c) Glicolato de almidón sódico	25
(d) Estearato de magnesio	2

420

Formulación C

	mg/cápsula
(a) Ingrediente activo	250
(b) Macrogel 4000 BP	350

600

La cápsulas se preparan derritiendo el Macrogel 4000 BP, dispersando el ingrediente activo en el gel derretido e introduciéndolo en una cápsula de gelatina dura de dos partes.

Formulación D

	mg/cápsula
Ingrediente activo	250
Lecitina	100
Aceite de cacahuete	100

450

Las cápsulas se preparan mediante la dispersión del ingrediente activo en la lecitina y el aceite de cacahuete e introduciendo la dispersión en cápsulas de gelatina elástica.

Formulación E (Cápsulas de liberación controlada)

La formulación siguiente de cápsulas de liberación controlada se prepara mediante la extrusión de los ingredientes a, b y c usando un extrusor, seguido por formación de esferas del material extrudido y el secado del mismo. Los pellets secos fueron entonces cubiertos con una membrana controladora de liberación (d) e introducidos en una cápsula de gelatina dura de dos partes.

	mg/cápsula
(a) Ingrediente activo	250
(b) Celulosa microcristalina	125
(c) Lactosa BP	125
(d) Celulosa de Etilo	13
	513

Ejemplo E

Formulación inyectable

Ingrediente activo 0,200 g
Buffer fosfato libre de pirógenos, estéril (pH 7,0) hasta 10 ml

Se disuelve el ingrediente activo en la mayor parte del buffer fosfato (35-40°C), posteriormente se enrasa su volumen para filtrarlo a través de un filtro estéril de microporos hacia un envase de cristal ámbar de 10 ml (tipo 1) y se sella con cierres estériles y sobresellos.

ES 2 314 402 T3

Ejemplo F

Inyección intramuscular

5	Ingrediente activo	0,20 g
	Alcohol bencilo	0,10 g
	Glucofurool 75[®]	1,45 g
10	Agua para inyección q. s hasta 3,00ml	

Se disuelve el ingrediente activo en glicofurool. Se adiciona, entonces el alcohol bencilo y se disuelve y se adiciona agua hasta 3 ml. Entonces se filtra la mezcla a través de un filtro estéril de microporos y se sella en frascos estériles de 3 ml (tipo 1).

Ejemplo G

Suspensión en jarabe

	Ingrediente activo	0,2500 g
	Solución de sorbitol	1,5000 g
25	Glicerol	2,0000 g
	Celulosa dispersable	0,0750 g
	Benzoato de sodio	0,0050 g
	Sabor, durazno 17,42,3169	0,0125 g
30	Agua purificada q.s hasta	5,0000 g

Se disuelve el benzoato de sodio en una porción del agua purificada y se adiciona la solución de sorbitol. Se adiciona el ingrediente activo y se dispersa. El espesante (celulosa dispersable) se dispersa en el glicerol. Se mezclan las dos dispersiones y se preparan con el agua purificada hasta alcanzar el volumen requerido. Se logra el espesor requerido mediante la reducción de la suspensión.

Ejemplo H

Supositorio

		mg/supositorio
45	Ingrediente activo (63 µm)	250
	Grasa dura, BP (Witepsol H15-Dynamit Nobel)	1770
		2020

Un quinto del Witepsol H15 se derrite en una cacerola a vapor tapada a una temperatura máxima de 45°C. Se pasa el ingrediente activo a través de un tamiz de 200 µm y se adiciona a la base derretida mezclando con un mezclador Silverson provisto de una cabeza cortante, hasta que se logre una dispersión uniforme. Manteniendo la mezcla a 45°C, se adiciona el resto de Witepsol H15 a la suspensión y se agita para asegurar una mezcla homogénea. Se pasa el total de la suspensión a través de una malla de acero inoxidable, agitándola continuamente y se deja enfriar hasta 40°C. A una temperatura de 38°C a 40°C, se vacían 2,02 g de la mezcla en moldes plásticos apropiados. Los supositorios se dejan enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.

Ejemplo 1

Pesarios

5		mg/pesario
	Ingrediente activo	250
	Dextrosa Anhidrato	380
	Almidón de patata	363
10	Estearato de magnesio	7
		1000

15 Los ingredientes anteriores se mezclan directamente y los pesarios se preparan mediante la compresión directa de la mezcla resultante.

Referencias citadas en la descripción

20 *Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

25 Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4912120 A
- US 4968713 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

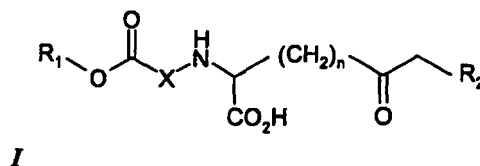
- 30
- GREENBERG, C.S. *et al. FASEB J.*, 1991, vol. 5, 3071-3077
 - THACHER, S. M.; RICE, R. H. *Cell*, 1985, vol. 40, 685-695
 - 35 • DUBBINK, H.J. *et al. Lab. Invest.*, 1999, vol. 79, 141-150
 - ACHYUTHAN, K. E.; GREENBERG, C. S. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 1901-1906
 - ACHYUTHAN, K. E. *et al. J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 180, 67-79
 - 40 • LESORT, M. *et al. J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 11991-11994
 - MARTINEZ, J. *et al. Biochemistry*, 1994, vol. 33, 2538-2545
 - 45 • GREENBERG, C. S. *et al. Blood*, 1987, vol. 20, 702-709
 - KINSELLA, M. G.; WIGHT, T. N. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 17891-17896
 - JONES, R.A. *et al. J. Cell Sci.*, 1999, vol. 110, 2461-2472
 - 50 • GAUDRY C. A. *et al. Exp. Cell Res.*, 1999, vol. 252, 104-113
 - AESCHLIMANN; THOMAZY. *Connective Tissue Research*, 2000, vol. 41 (1), 1-27
 - 55 • JOHNSON *et al. J. Am. Soc. Neph.*, 1999, vol. 10, 2146-2157
 - CITRON *et al. J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 276, 3295-3301
 - MARZARI *et al. J. Immunol.*, 2001, vol. 166, 4170-4176
 - 60 • ARIENS *et al. Blood*, 2002, vol. 100, 743-754
 - VAN GRONINGEN *et al. Int. J. Cancer*, 1995, vol. 60, 383-387
 - 65 • MEHTA. *J. Cancer*, 1994, vol. 58, 400-406
 - MEHTA *et al. J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, vol. 94, 1652-1654

ES 2 314 402 T3

- **AMENDOLA** *et al. J. Immunol. Methods*, 2002, vol. 265, 149-159
- **JOHNSON** *et al. Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 159, 149-163
- 5 • **FOLKMAN**, *J. Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 27-31
- **LORAND** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, vol. 25, 629
- **LORAND** *et al. Biochemistry*, 1968, vol. 7, 1214
- 10 • **LEE** *et al. J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 14689
- **GROSS; FOLK**. *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, 1301
- 15 • **GROSS; FOLK**. *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, 6534
- **GORMAN; FOLK**. *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 9007
- **FOLK; COLE**. *J. Biol. Chem.*, 1966, vol. 241, 5518
- 20 • **FOLK; GROSS**. *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246, 6683
- **GROSS** *et al. J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, 7693
- 25 • **REINHARDT**. *Appl. Biochem.*, 1980, vol. 2, 495
- **KEILLOR**. *Biorg. Med. Chem.*, 2001, vol. 9, 3231
- **KEILLOR**. *Biorg. Med. Chem.*, 2002, vol. 10, 355
- 30 • **PLUIRA** *et al. J. Enzyme. Inhibition*, 1992, vol. 6, 181-94
- **COUTTS; SAINT**. *Tetrahedron Lett.*, 1998, vol. 39, 3243
- 35 • **NEMES** *et al. Minerva Biotechnology*, 2002, vol. 14, 183
- **GRIFFIN; WILSON**. *Mol. Cell Biochem.*, 1984, vol. 58, 37-49
- 40 • **ABO-ZENAH** *et al. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, vol. 12, 4454A
- **MEHTA** *et al. Tetrahedron Lett*, 1992, vol. 33, 5441
- **MOLINA, T.M.** *et al. Tetrahedron*, 1993, vol. 49, 3801-3808
- 45 • **BLAS, J.** *et al. Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, 4567-4571
- **ANTONJUK, D.J.** *et al. J. Chem. Perkin Trans.*, 1984, vol. 1, 1989-2003
- **PLIURA** *et al. J. Enzyme Inhibition*, 1992, vol. 6, 2768
- 50 • **SHAW**. *Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 2768
- **KUHN; KRATZ**. *Synthesis*, 1993, 561
- 55 • **FREUND** *et al. Biochemistry*, 1994, vol. 33, 10109
- **WEYGAND** *et al. Chem. Ber.*, vol. 91, 1037-40
- **JOHNSON** *et al. J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, vol. 10, 2146-2157
- 60 • **SKILL** *et al. Lab. Invest*, 2001, vol. 81, 705-716
- **LORAND** *et al. Anal Biochem*, 1972, vol. 50, 623-631
- 65 • **JOHNSON** *et al. J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 2950-2960

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que presenta la fórmula I siguiente:



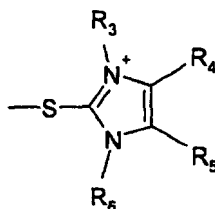
donde:

“X” representa un grupo α -aminoácido donde el grupo α -amino del aminoácido está enlazado al grupo $\text{R}_1\text{-O-CO-}$ y el grupo carboxilo del aminoácido está enlazado al grupo $\text{R}_2\text{-CH}_2\text{-CO-(CH}_2)_n\text{-CH(CO}_2\text{H)-NH-}$;

“n” es un entero entre 1 y 4;

“ R_1 ” representa bencilo, t-butilo o 9-fluorenilmetilo; y

“ R_2 ” representa



donde R_3 , R_4 , R_5 y R_6 , representan cada uno de manera independiente, un alquilo inferior

o $\text{-S}^+\text{R}_7\text{R}_8$, donde R_7 y R_8 , representan cada uno de manera independiente, un alquilo inferior

o un derivado del mismo farmacéutica y/o veterinariamente aceptable

donde el alquilo inferior representa un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, lineal o ramificado, cíclico o acíclico, el cual puede ser saturado o insaturado.

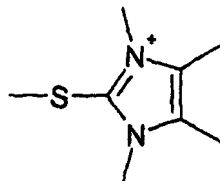
2. Un compuesto según la Reivindicación 1 donde X es un grupo L-aminoácido.

3. Un compuesto según las Reivindicaciones 1 ó 2 donde X es seleccionado entre el grupo que consta de fenilalanina, glutamina (o un derivado N-sustituido de los mismos), isoleucina, alanina, glicina, tirosina, prolina, serina, lisina y ácido glutámico.

4. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde “n” es 2.

5. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde R_1 es bencilo.

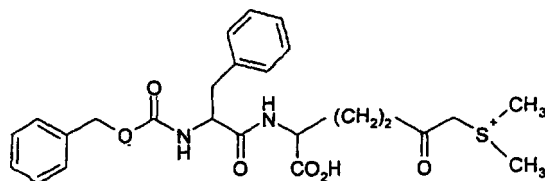
6. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde R_2 representa.



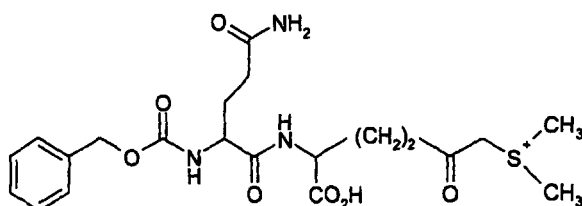
7. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde R_2 representa $\text{-S}^+\text{R}_7\text{R}_8$, donde R_7 y R_8 , cada uno independientemente, representan un alquilo inferior.

8. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y/o R_8 son -CH_3 ó -CHCH_2 .

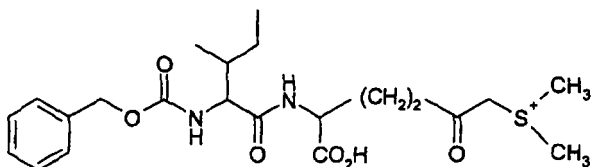
9. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



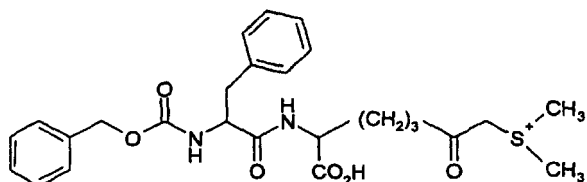
10. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



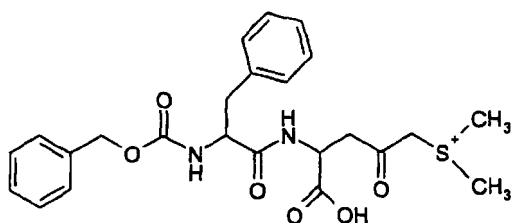
11. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



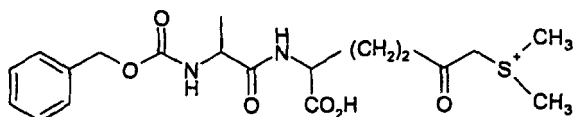
12. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



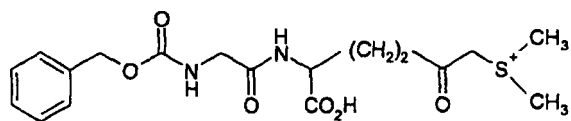
13. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



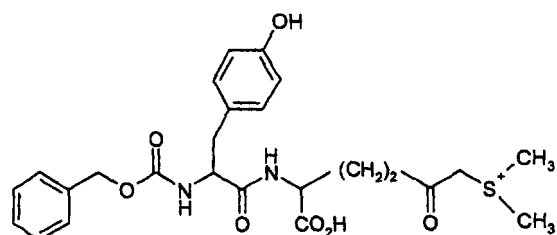
14. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



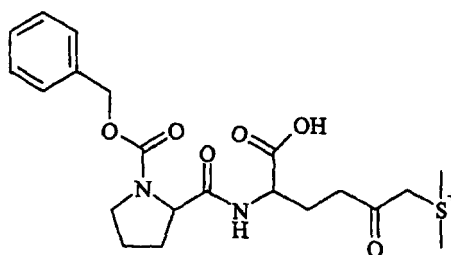
15. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



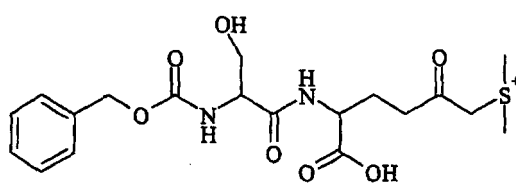
16. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



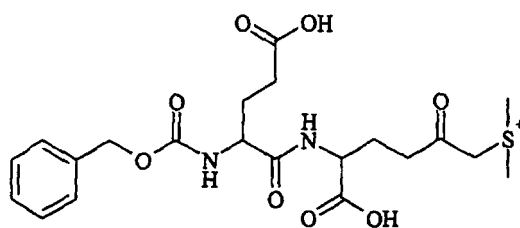
17. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



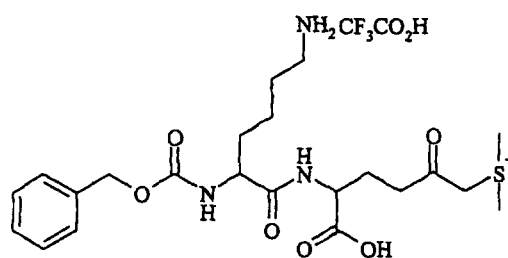
18. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



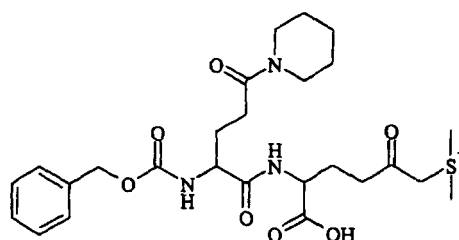
19. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



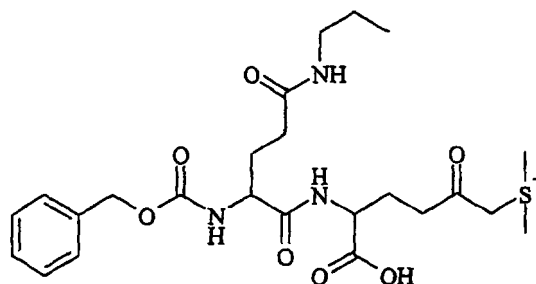
20. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



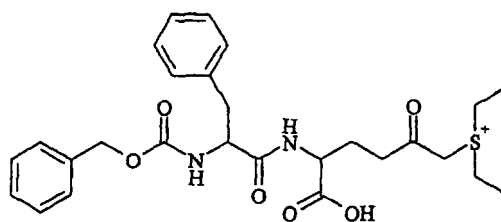
21. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



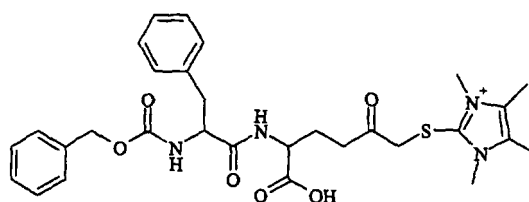
22. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



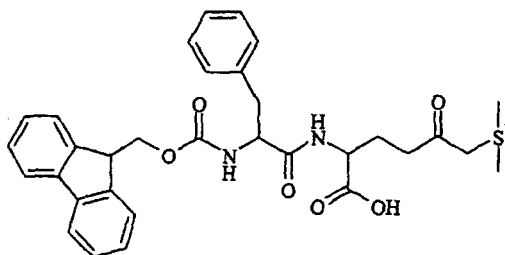
23. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



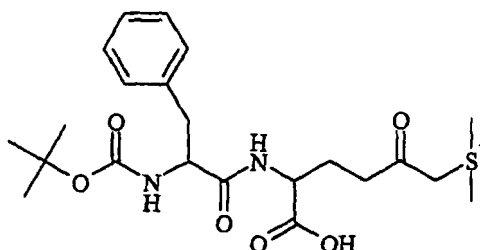
24. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



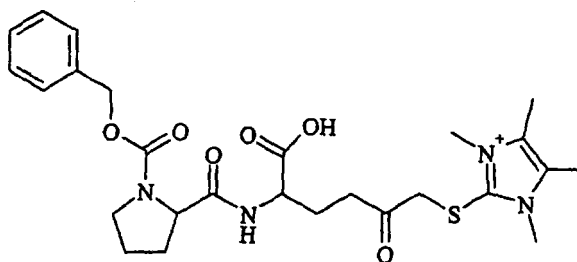
25. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



26. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



27. Un compuesto según la Reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



28. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 27 en forma de una sal de bromuro.

29. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 28 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Un método para preparar un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 28 que comprende los siguientes pasos:

a. hacer reaccionar un éster de *N*-hidroxi-succinimida o *para*-nitrofenilo y de aminoácido *N*- α -protegido (ejemplo protegido con CBZ, FMOC o BOC) con 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina y tratar el producto acoplado resultante con bromuro de hidrógeno; y

b. hacer reaccionar la bromo-metilcetona producida en el paso (a) con sulfuro de dimetilo, sulfuro de dietilo o con 1, 3, 4, 5-tetra-metilmercapto-imidazolina-2-tiona.

31. Un método según la Reivindicación 30 donde el éster del aminoácido *N*- α -protegido y de *N*-hidroxi-succinimida está protegido con CBZ, FMOC o BOC.

32. Un método según las Reivindicaciones 30 ó 31 donde el paso (a) comprende hacer reaccionar un éster de *N*-hidroxi-succinimida o *para*-nitrofenilo y de aminoácido *N*- α -protegido con 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina en presencia de tetrahidrofurano (THF), agua y trietilamina seguido por la reacción de los productos de los mismos con bromuro de hidrógeno en presencia de acetato de etilo.

33. Un método según las Reivindicaciones 31 ó 32 donde el éster del aminoácido *N*- α -CBZ-protegido y de *N*-hidroxi-succinimida se selecciona del grupo que consta de éster de *N*- α -CBZ-*L*-fenilalanina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glutamina y de *N*-hidroxi-succinimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-isoleucina y de *N*-hidroxi-

ES 2 314 402 T3

succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-alanina y de *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glicina y de *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-prolina y de *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-serina y de *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-tirosina y de ácido *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-glutámico y de *N*-hidroxi-succininimida, éster de *N*- α -CBZ-*L*-lisina y de *N*-hidroxi-succininimida y éster de *N*- α -CBZ-*L*-tirosina y de *para*-nitrofenilo.

34. Un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 28 para su uso médico.

35. El uso de un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 28 en la preparación de un medicamento para inhibir una transglutaminasa.

36. El uso según la Reivindicación 35 donde la transglutaminasa es una transglutaminasa tisular.

37. El uso según las Reivindicaciones 35 ó 36 donde el medicamento es para tratar una enfermedad/trastorno seleccionada entre el grupo que consta de fibrosis, cicatrización, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, trombosis, desórdenes proliferativos, SIDA, soriasis e inflamaciones (tales como enfermedades inflamatorias crónicas).

38. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 35 a la 37 donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer.

39. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 35 a la 37 donde el medicamento es para el tratamiento de la fibrosis y/o cicatrización.

40. El uso según la Reivindicación 39 donde el medicamento es para el tratamiento de la cicatrización renal.

41. Uso de un compuesto según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 28 en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar el rechazo a un órgano transplantado.

42. Un uso según la Reivindicación 41 donde el órgano es un corazón, pulmón, riñón o hígado.

43. El uso según las Reivindicaciones 41 ó 42 donde el órgano es tratado antes del trasplante.

44. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones de la 41 a la 43 donde el órgano es tratado durante y/o después de ser transplantado a un paciente.

FIGURA 1

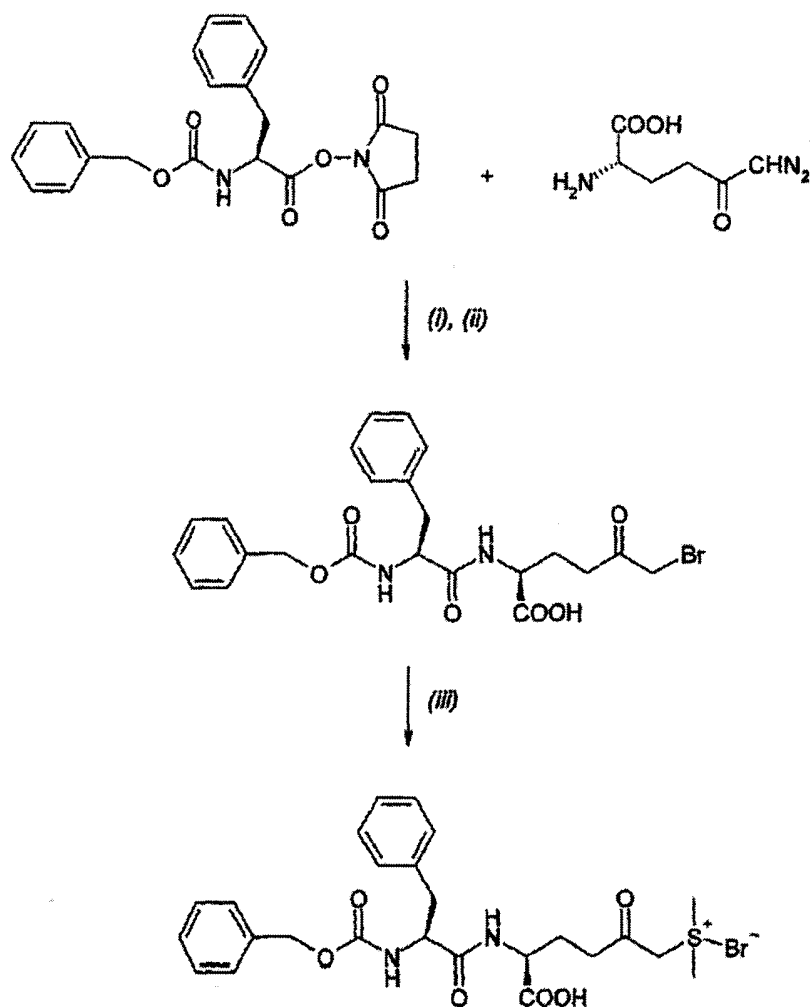


FIGURA 2

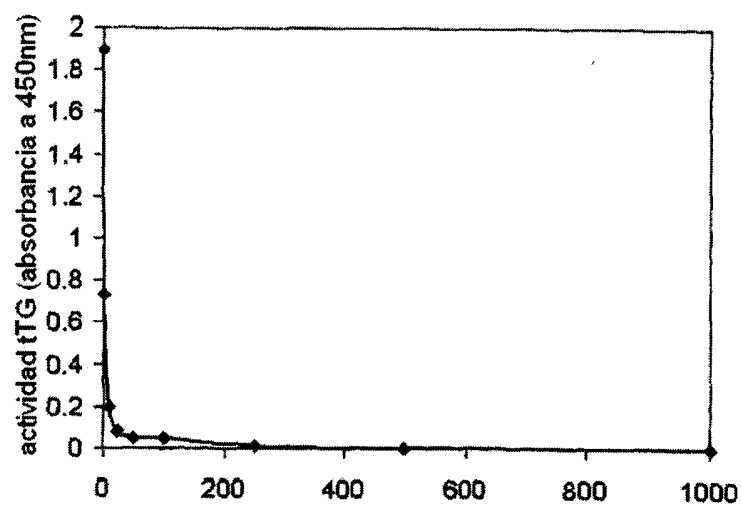


FIGURA 3

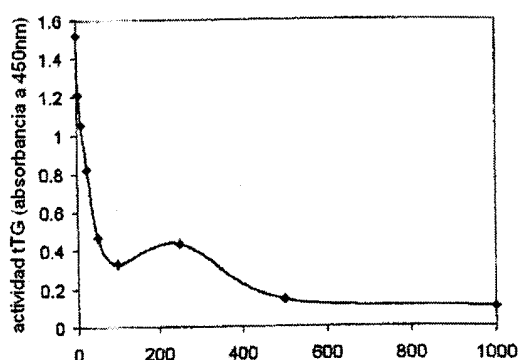


FIGURA 4

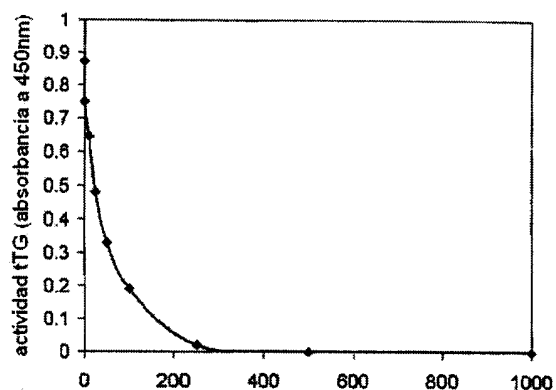


FIGURA 5

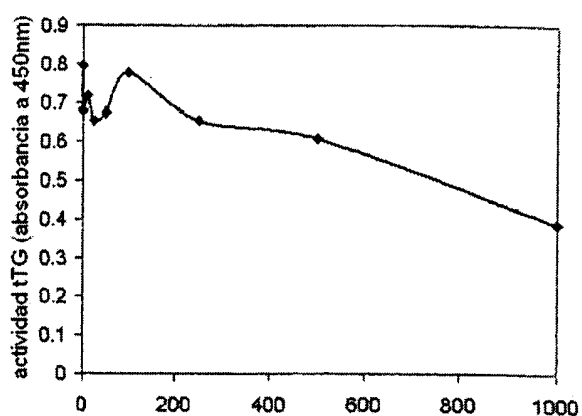


FIGURA 6

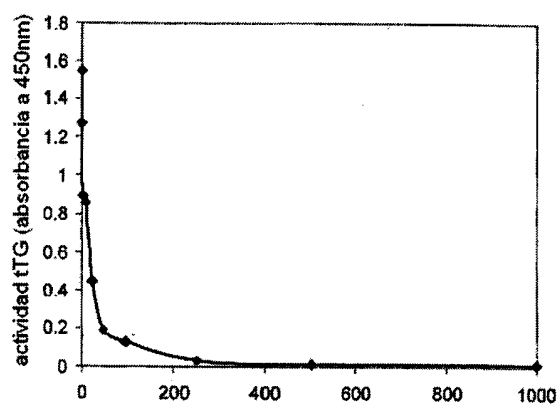


FIGURA 7

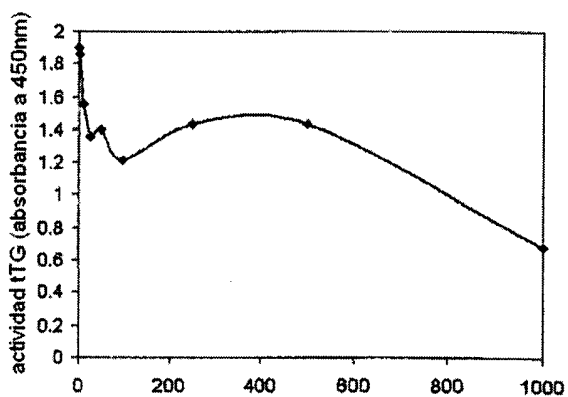


FIGURA 8

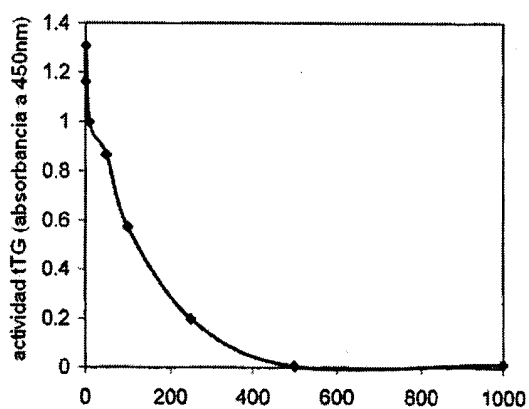


FIGURA 9

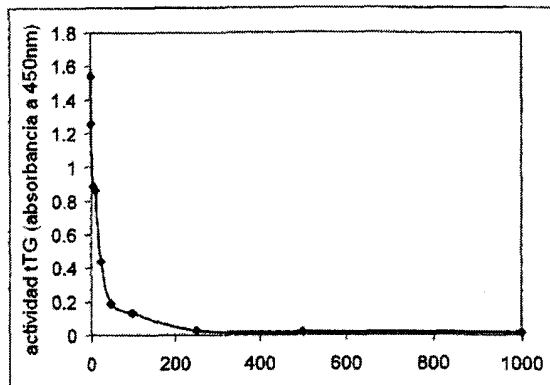


FIGURA 10

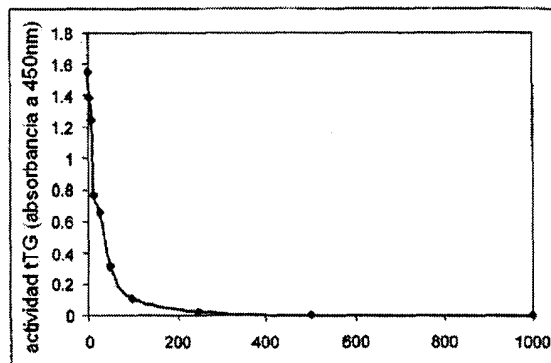


FIGURA 12

FIGURA 11

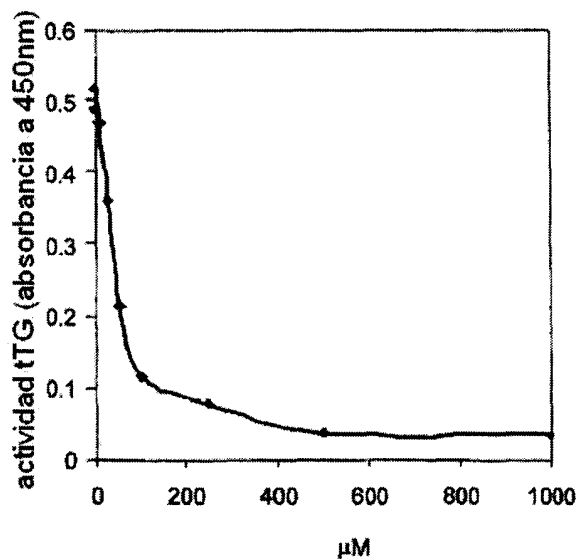
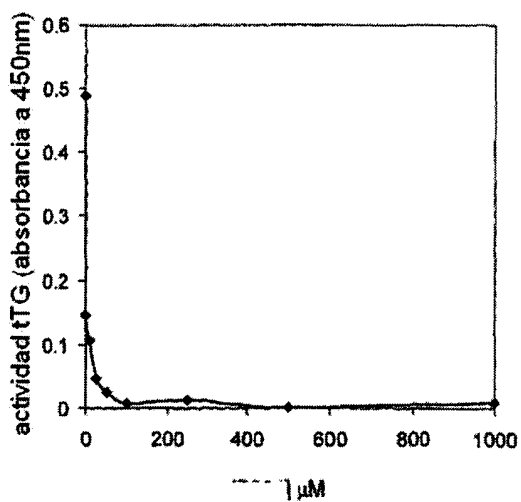


FIGURA 13

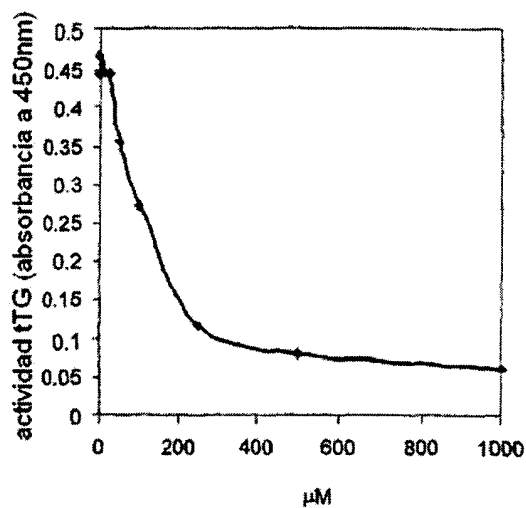


FIGURA 14

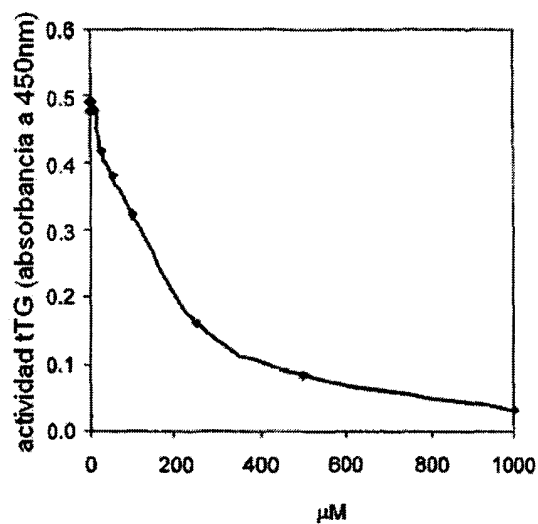


FIGURA 15

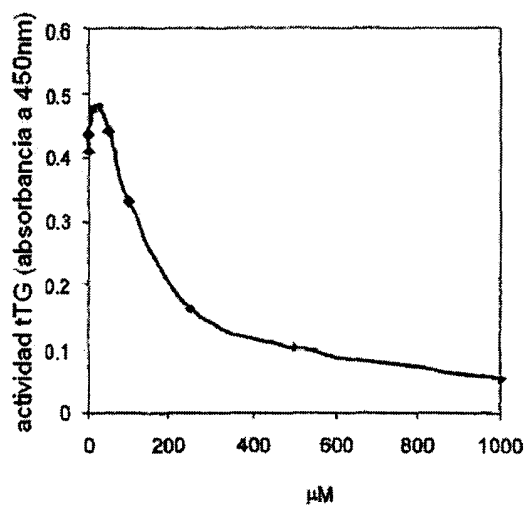


FIGURA 16

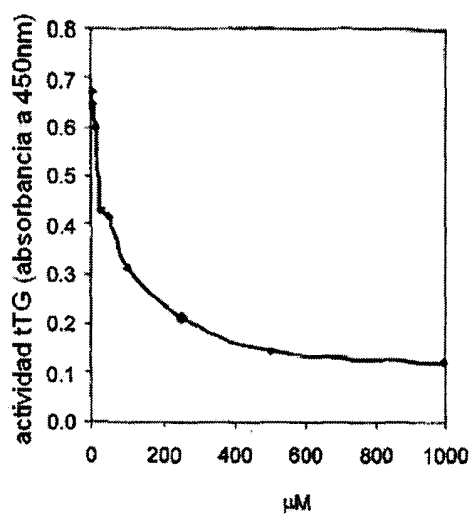


FIGURA 17

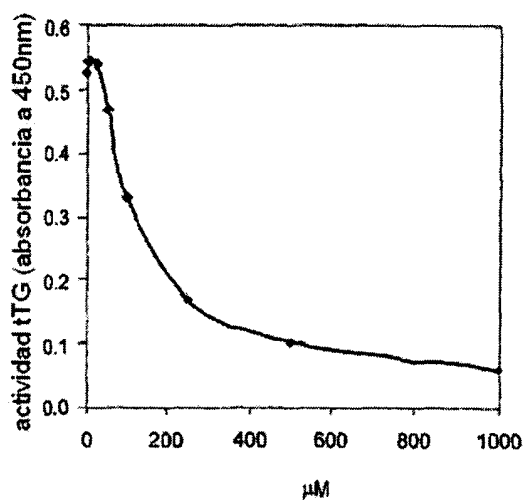


FIGURA 18

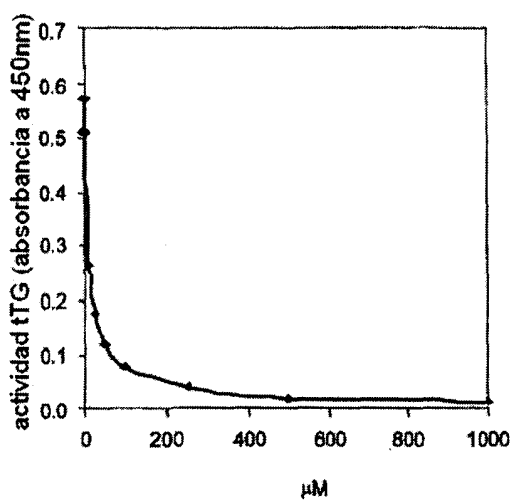


FIGURA 19

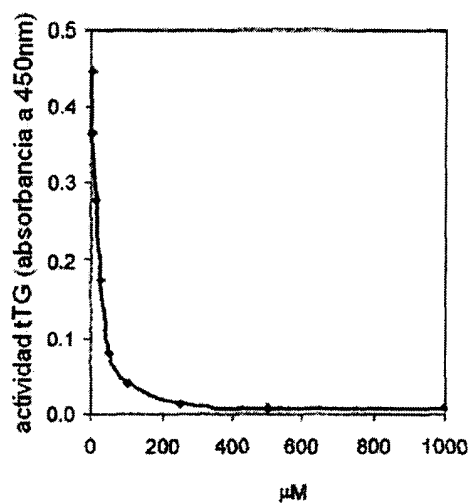


FIGURA 20

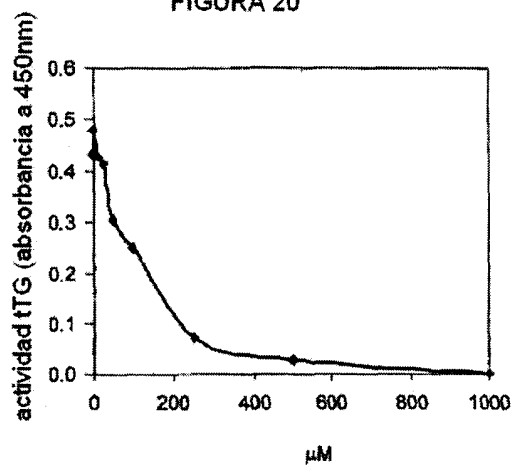


FIGURA 21

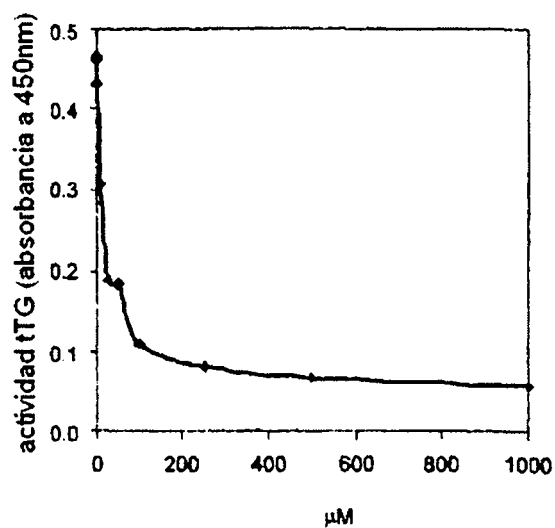


FIGURA 22

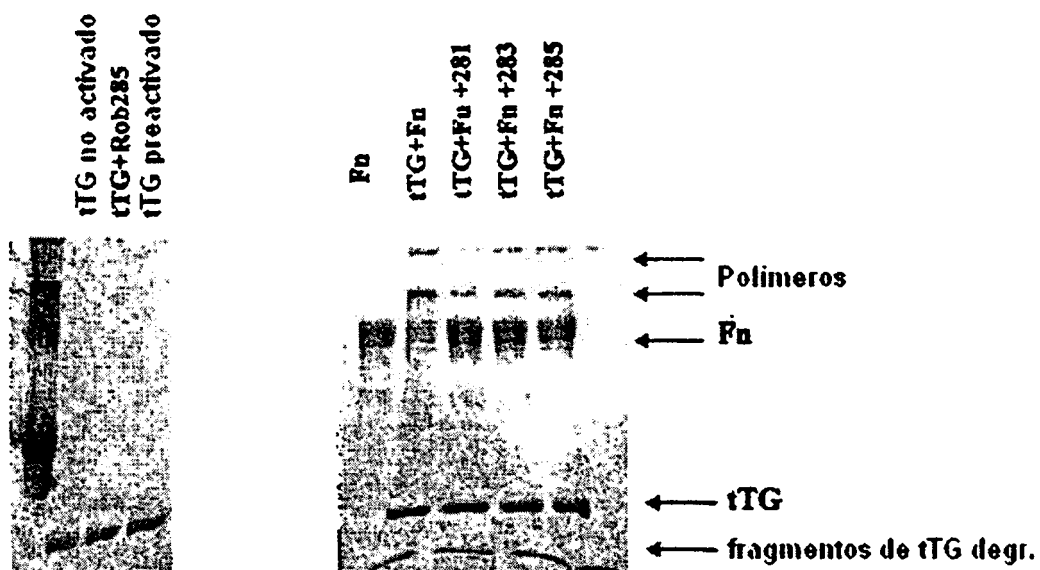


FIGURA 23 (A)

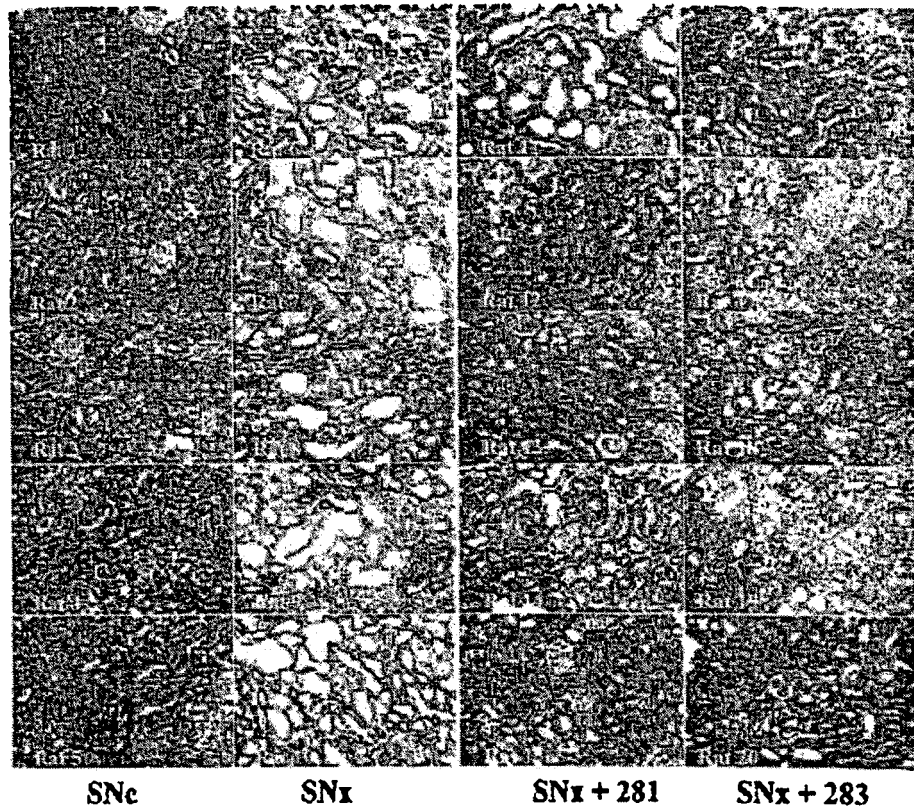


FIGURA 23(B)

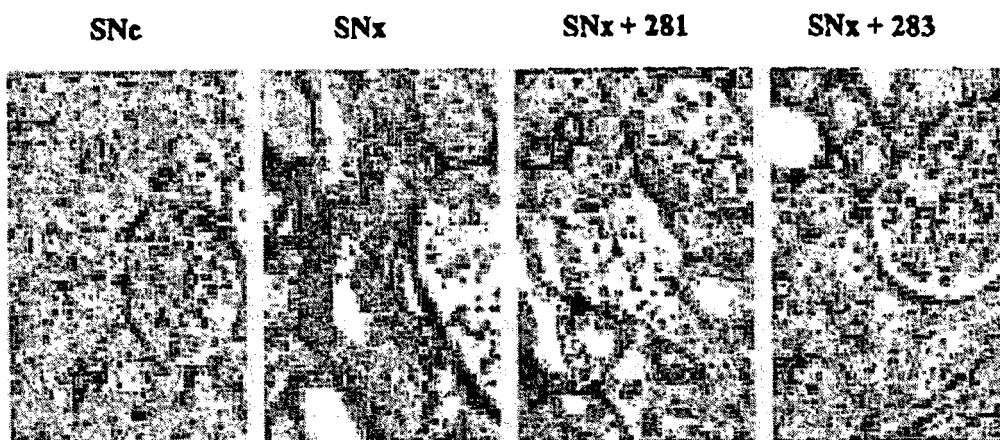


FIGURA 24(A)

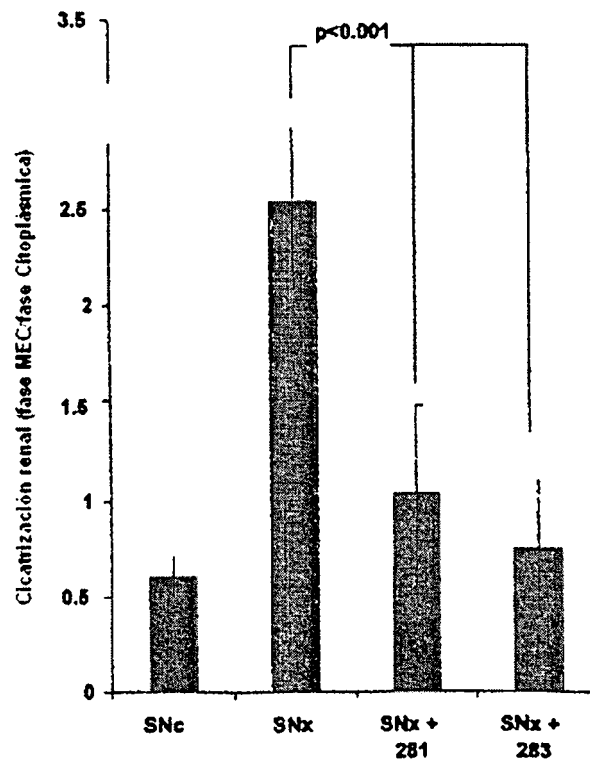


FIGURA 24(B)

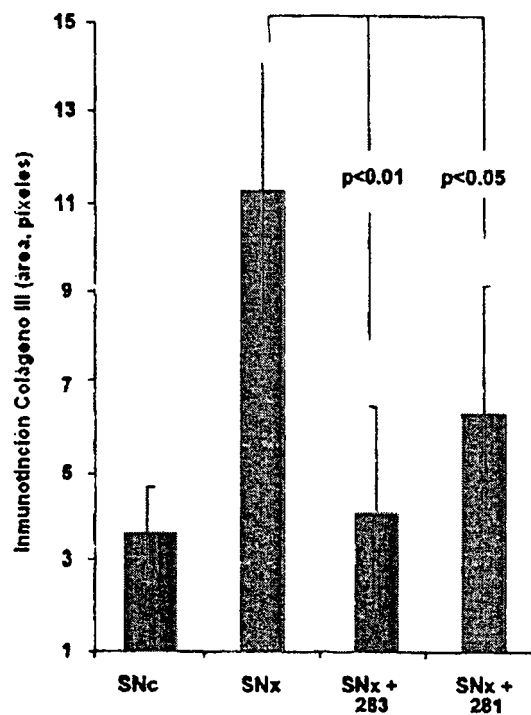


FIGURA 25(A)

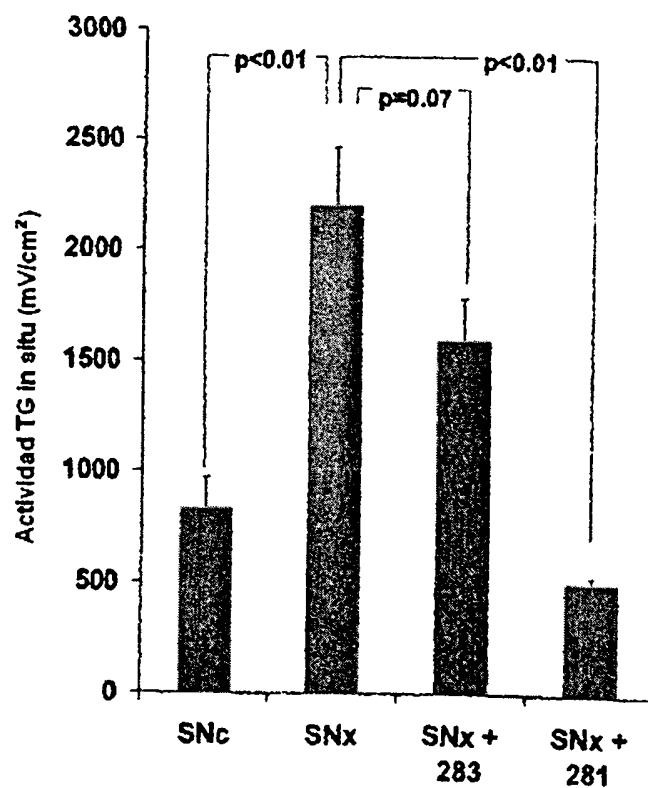


FIGURA 25(B)

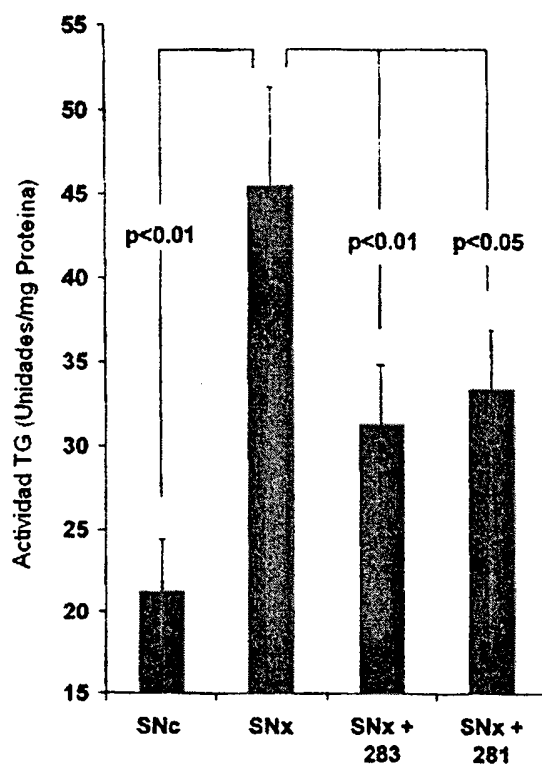


FIGURA 26(A)

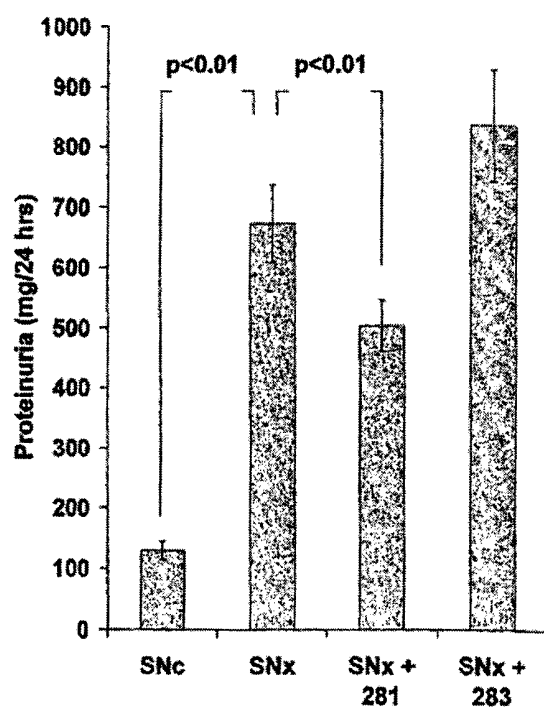


FIGURA 26(B)

