



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 164**

51 Int. Cl.:  
**C07K 5/087** (2006.01)  
**C07K 7/64** (2006.01)  
**C07K 5/083** (2006.01)  
**C07K 5/097** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820951 .9**  
96 Fecha de presentación : **22.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1963357**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Compuestos para la inhibición de la apoptosis.**

30 Prioridad: **23.11.2005 ES 200502890**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2010**

73 Titular/es: **Laboratorios SALVAT, S.A.**  
**c/ Gall, 30-36**  
**08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, ES**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

72 Inventor/es: **Pérez Payá, Enrique;**  
**Vicent Docón, María, Jesús;**  
**Orzáez Calatayud, Mar;**  
**Mondragón Martínez, Laura;**  
**Messeguer Paypoch, Ángel;**  
**Moure Fernández, Alejandra;**  
**Sanclimens Pérez de Rozas, Gloria y**  
**Malet Engra, Gema**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 338 164 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para la inhibición de la apoptosis.

5 La presente invención se refiere a compuestos que actúan como inhibidores de la apoptosis, así como a procedimientos para su preparación, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en medicina.

## Técnica anterior

10 La apoptosis es un proceso biológico interesante debido a su importancia en una amplia variedad de sistemas biológicos, incluyendo el recambio celular normal, el sistema inmunitario y el desarrollo embrionario y su asociación con diferentes enfermedades. Una apoptosis inapropiada participa en muchas patologías humanas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, isquemia, trastornos autoinmunitarios y varias formas de cáncer (Reed J.C., Trends Mol. Med. 2001, 7: 314-319).

15 Diversos estímulos apoptóticos, incluyendo la activación de los receptores de muerte de la superficie celular, agentes anticancerígenos, irradiación, carencia de factores de supervivencia e isquemia (revisado en Strasser A. *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 2000, 69: 217-245) inducen cascadas de señalización que activan toda una familia de cisteína aspartil-proteasas denominadas caspasas. Estas proteasas ejecutan el proceso apoptótico.

20 Algunas señales apoptóticas activan la ruta intrínseca o mediada por mitocondrias que utiliza caspasa 9 como su iniciador. La formación del complejo macromolecular denominado apoptosoma es un acontecimiento clave en esta ruta.

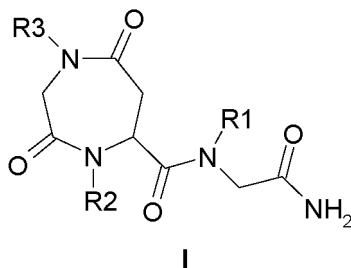
25 El apoptosoma es un complejo multiproteico de holoenzima formado por Apaf-1 (factor de activación de proteasas apoptóticas) activado por el citocromo c, dATP y procaspasa 9 (Li P. *et al.*, Cell 1997, 91: 479-489; Acehan D *et al.*, Mol. Cell 2002, 9: 423-432; Rodríguez J. *et al.*, Genes Dev. 1999, 13: 3179-3184; Srinivasula S.M. *et al.*, Mol. Cell 1998, 1: 949-957). En este complejo macromolecular, se activa la caspasa 9 asociada al apoptosoma y entonces, a su vez, se activan caspasas efectoras. Para identificar moléculas que podrían mejorar la apoptosis asociada a enfermedad, los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos han tenido como objetivo inicialmente la actividad caspasa, y por tanto, se buscaron inhibidores o activadores enzimáticos específicos (Scott C.W. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003, 304: 433-440; García-Calvo M, J. Biol. Chem. 1998, 273: 32608-32613), en lugar de moduladores en la ruta/cascada de activación superior.

35 No obstante, las interacciones proteína-proteína en un nivel superior a la activación de caspasas también pueden ser puntos de intervención relevantes para el desarrollo de moduladores de las rutas de apoptosis. En particular, datos recientes proponen la formación del apoptosoma como una diana interesante para el desarrollo de moduladores apoptóticos.

40 Por tanto, existe un interés por hallar moléculas que inhiben la activación de la apoptosis mediada por el apoptosoma.

## Descripción de la invención

45 Un aspecto de la presente invención se refiere a la provisión de nuevos compuestos de fórmula general I,



60 sus estereoisómeros y mezclas de los mismos, sus polimorfos y mezclas de los mismos y los solvatos y sales de adición farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que:

65 R1 representa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), alquenido (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-NHCO-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-CONRaRb, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Cic (3-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Hetcic (5-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-Hetar (5-10), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenilo)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenil)[Hetar (5-6)] o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH[Hetar (5-6)]<sub>2</sub>;

## ES 2 338 164 T3

R2 representa  $-(\text{CH}_2)_{0-3}\text{-Cic (3-6)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-3}\text{-Hetcic (5-6)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-fenilo}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-(1-naftilo)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-(2-naftilo)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-Hetar (5-10)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{-CH(fenilo)}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{-CH(fenil)[Hetar (5-6)]}$  o  $-(\text{CH}_2)_2\text{-CH[Hetar (5-6)]}_2$ ;

5 R3 representa  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-fenilo}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-(1-naftilo)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-(2-naftilo)}$ , o  $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-Hetar (5-6)}$ ;

alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) y -alqueniilo ( $\text{C}_2\text{-C}_5$ ) pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de -O-alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_2$ ), -S-alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_2$ ),  $-\text{NH}_2$ , -NH-alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_2$ ) y -N[alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_2$ )]<sub>2</sub>;

10 alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ ) puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

Ra y Rb representan independientemente -H o -alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ )

Cic (3-6) representa un radical de un anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros;

15 Hetcic (5-6) representa un radical con C o N de un anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 5 ó 6 miembros que contiene desde uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N;

20 Cic y Hetcic pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno,  $-\text{CF}_3$  y -OH;

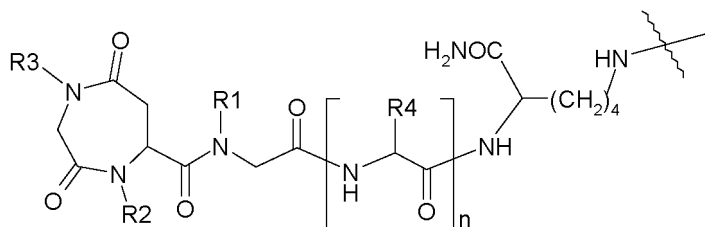
Hetar (5-6) y Hetar (5-10) representan un radical con C o N de un anillo de 5 ó 6 miembros y un anillo de 5 a 10 miembros aromáticos, respectivamente; que contiene desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N;

25 fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, Hetar (5-6) y Hetar (5-10) pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno,  $-\text{CF}_3$ , -OH, -O-alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ ), -CO-alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ ), -alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ )-NRaRb, -NRaRb y  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ;

30 con la condición de que R2 no representa 2-(4-fluorofenil)etilo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto que es un conjugado de fármaco que comprende un radical de fórmula II

35



45

### II

50 sus estereoisómeros y mezclas de los mismos y los solvatos y sales de adición farmacéuticamente aceptables del mismo, conjugado a un polímero de poli(ácido glutámico), en los que R1, R2 y R3 tiene los significados definidos para el compuesto de fórmula I, sin la condición de R2; cada R4 representa independientemente una cadena lateral de cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural, y n es 0,1, 2 ó 3.

55 Por tanto, los compuestos de fórmula II comprenden diferentes restos: un radical de fórmula I, que forma un enlace amida a una cadena peptídica de n L-aminoácidos y un derivado de amida de L-lisina, en el que el N de su cadena lateral está unido al polímero de poli(ácido glutámico).

60 En las definiciones previas, las expresiones alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ ) y alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) representan cadenas hidrocarbonadas saturadas lineales o ramificadas que contienen desde uno hasta tres y desde uno hasta cinco átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_3$ ) incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo. Los ejemplos de alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) incluyen adicionalmente y sin limitación butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo y 2,2-dimetilpropilo.

65 La expresión alqueniilo ( $\text{C}_2\text{-C}_5$ ) representa una cadena carbonada lineal o ramificada insaturada, que contiene desde dos hasta cinco átomos de carbono y uno o más dobles enlaces, por ejemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo y 1,3-butadienilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-2-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 3-metil-1-butenilo, 1,1-dimetil-2-propenilo y 1,2-dimetil-1-propenilo.

## ES 2 338 164 T3

Los grupos alquilo ( $C_1-C_3$ ), alquilo ( $C_1-C_5$ ) y alqueno ( $C_2-C_5$ ) pueden estar opcionalmente sustituidos según la descripción, siempre que sea apropiado desde un punto de vista químico.

5 La expresión Cic (3-6) representa un radical de un anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros. Tal como se mencionó anteriormente, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, que pueden situarse en cualquier posición disponible del anillo. Los ejemplos de Cic (3-6) incluyen, sin limitación, radicales de ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, 1-ciclobuteno, 2-ciclobuteno, 1-ciclopenteno, 2-ciclopenteno, 1-ciclohexeno, 2-ciclohexeno y 3-ciclohexeno.

10 La expresión Hetcic (5-6) representa un radical con C o N de un anillo carbocíclico de 5 a 6 miembros saturado o parcialmente insaturado que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N, que puede estar sustituido según la descripción en cualquier posición disponible del anillo. Los ejemplos de Hetcic (5-6) incluyen, sin limitación, radicales de dihidrofurano, pirrolina, pirazolina, imidazolidina, isotiazolidina, isoxazolidina, oxazolidina, pirazolidina, pirrolidina, tiazolidina, dioxano, morfolina, piperazina, piperidina, pirano, tetrahidropirano, 15 oxazina, oxazolina, pirrolina, tiazolina, pirazolina, imidazolina, isoxazolina e isotiazolina.

20 Las expresiones Hetar (5-6) y Hetar (5-10) representan un radical con C o N de un anillo de 5 ó 6 miembros y un anillo de 5 a 10 miembros aromáticos, respectivamente; que contiene desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N, que puede estar sustituido según la descripción en cualquier posición disponible del anillo. Los ejemplos de Hetar (5-6) incluyen, sin limitación, radicales de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, isoxazol, isotiazol, oxazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,2,4-tiadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,3,4-tiadiazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, piridina, pirimidina, piridazina y pirazina. Los ejemplos de Hetar (5-10) incluyen además, sin limitación, radicales de bencimidazol, benzofurano, benzotiazol, benzotiofeno, imidazopirazina, imidazopiridazina, imidazopiridina, imidazopirimidina, indazol, indol, isoindol, isoquinolina, pirazolopirazina, pirazolopiridina, pirazolopirimidina, purina, 25 quinazolina, quinolina y quinoxalina.

La expresión “opcionalmente sustituido con uno o más” significa que un grupo puede estar o bien no sustituido o bien sustituido con uno o más, preferiblemente con 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes, siempre que este grupo tenga 1, 2, 3 ó 4 posiciones susceptibles de sustituirse.

30 En toda la descripción y las reivindicaciones, el término “comprenden” y variaciones del término, tales como “que comprenden”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, elementos o etapas.

35 Tal como se usa en ellas, la expresión “tratamiento” incluye tratamiento, prevención y control de tal estado. La expresión “farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento se refiere a aquellos compuestos, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una razón riesgo/beneficio razonable.

40 En una realización particular de la invención, R1 representa alquilo ( $C_1-C_5$ ),  $-(CH_2)_{1-3}-CONRaRb$ ,  $-(CH_2)_{0-3}-Cic$  (3-6);  $-(CH_2)_{0-3}-Hetcic$  (5-6);  $-(CH_2)_{1-3}-Hetar$  (5-10),  $-(CH_2)_{1-3}-fenilo$ ,  $-(CH_2)_{1-3}-(1-naftilo)$  o  $-(CH_2)_{1-3}-(2-naftilo)$ , todos ellos opcionalmente sustituidos.

45 En una realización particular de la invención, R1 representa  $-(CH_2)_{0-3}-Hetcic$  (5-6),  $-(CH_2)_{1-3}-Hetar$  (5-10),  $-(CH_2)_{1-3}-fenilo$ ,  $-(CH_2)_{1-3}-(1-naftilo)$  o  $-(CH_2)_{1-3}-(2-naftilo)$ , todos ellos opcionalmente sustituidos.

En otra realización, R1 representa  $-(CH_2)_2$ -fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno. En otra realización, R1 representa 2,4-diclorofenilo.

50 En otra realización, R2 representa  $-(CH_2)_{1-3}$ -arilo opcionalmente sustituido, o  $-(CH_2)_2-CH(Ph)_2$  opcionalmente sustituido, con la condición de que R2 no representa 2-(4-fluorofenil)etilo. En otra realización, R2 representa 3,3-difenilpropilo, con la condición de que R2 no representa 2-(4-fluorofenil)etilo.

55 En otra realización, R3 representa  $-(CH_2)_{1-3}-Hetar$  (5-6) o  $-(CH_2)_2$ -fenilo, ambos opcionalmente sustituidos. En otra realización, R3 representa  $-(CH_2)_2$ -fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno. En otra realización, R3 representa 2,4-diclorofenilo.

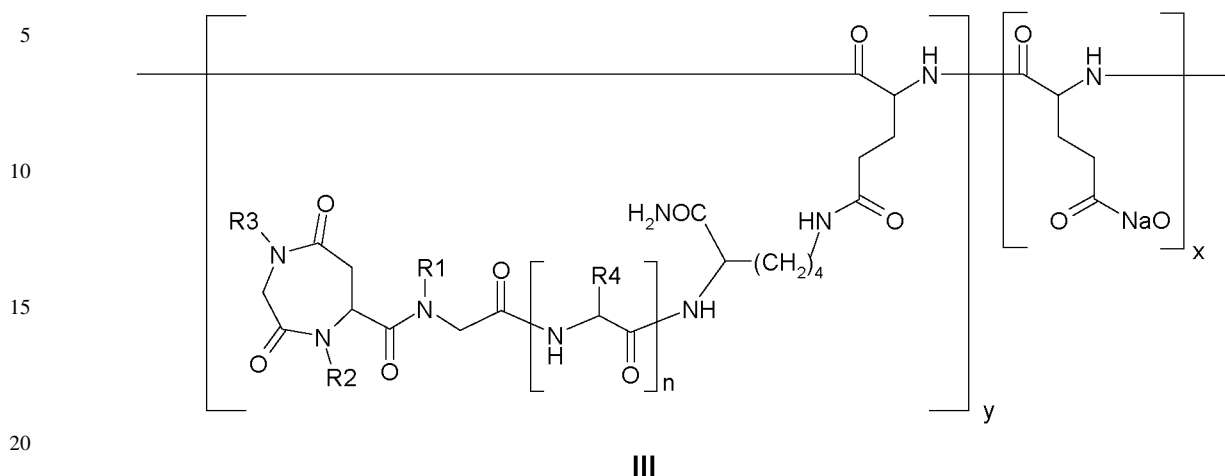
En otra realización, R2 representa 3,3-difenilpropilo y R1 y R3 representan ambos 2,4-diclorofenilo.

60 Otra realización de la presente invención, se refiere a un compuesto que es un conjugado de fármaco que comprende un compuesto de fórmula II conjugado a un polímero de poli(ácido glutámico) tal como se definió previamente, en el que dicho polímero tiene un peso molecular de desde 20 hasta 60 kDa.

65

## ES 2 338 164 T3

Otra realización, de la invención se refiere a un compuesto de fórmula III que es un conjugado de polímero-fármaco



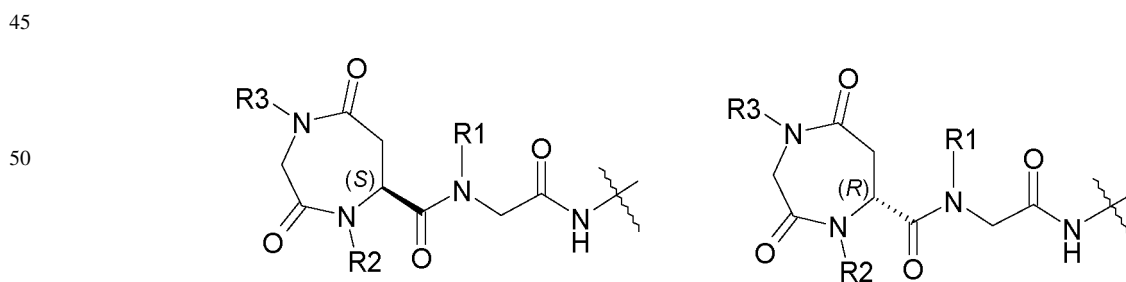
25 en la que R1, R2, R3 y R4 tiene los significados descritos en la fórmula general II y la proporción de y con respecto a x es del 25-30% al 75-70% en peso.

30 En otra realización, en un compuesto de fórmula III n representa 0. En otra realización, n representa 2 y R4 representa una cadena lateral de glicina. En otra realización, n representa 3 y R4 representa una cadena lateral de glicina, una cadena lateral de arginina y una cadena lateral de fenilalanina. En otra realización, n representa 3 y R4 representa una cadena lateral de valina, una cadena lateral de arginina y una cadena lateral de fenilalanina.

35 En el conjugado de polímero-fármaco, el poli(ácido glutámico) puede ser poli(ácido L-glutámico), poli(ácido D-glutámico) o poli(ácido DL-glutámico). En una realización de la invención, el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico).

Además, todas las posibles combinaciones de las realizaciones mencionadas anteriormente también forman parte de esta invención.

40 Los compuestos de fórmula I comprenden al menos un centro quiral. La presente invención incluye tanto los compuestos racémicos como los compuestos enantioméricos de fórmula I, es decir, compuestos en los que la configuración del carbono quiral unido a R1 es (S) y compuestos en los que la configuración del carbono quiral unido a R1 es (R) tal como se muestra a continuación.



60 Los compuestos de fórmula II comprenden al menos dos centros quirales. La presente invención también incluye tanto mezclas de estereoisómeros como los estereoisómeros aislados de fórmula II.

65 Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de nitrógeno básicos y, por tanto, pueden formar sales con ácidos, que también forman parte de esta invención. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sales de adición con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, perclórico, sulfúrico y fosfórico, así como sales de adición de ácidos orgánicos tales como ácido acético, metanosulfónico, trifluorometanosulfónico, etanosulfónico, benenosulfónico, p-toluenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, mandélico, oxálico, succínico, fumárico, tartárico y maleico. Asimismo, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más protones ácidos y, por tanto, pueden formar sales con bases, que también forman parte de esta invención. Los ejemplos de estas sales incluyen sales con cationes metálicos, tales como por

ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio; o puede coordinarse con una base orgánica o inorgánica. Una base orgánica aceptable incluye entre otros dietilamina y trietilamina. Una base inorgánica aceptable incluye hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio. Puede haber más de un catión o anión dependiendo del número de funciones con carga y de la valencia de los cationes y aniones.

Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que se producen de manera natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, *N,N*-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, *N*-etilmorfolina, etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares.

No existe limitación del tipo de sal que puede usarse, siempre que éstas sean farmacéuticamente aceptables cuando se usan para fines terapéuticos. Las sales pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto ácido o básico mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, pueden prepararse sales de este tipo haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, tal como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo o en una mezcla de ambos. Los compuestos de fórmula I o fórmula III y sus sales difieren en algunas propiedades físicas pero son equivalentes para los fines de la presente invención.

Algunos de los compuestos de fórmula I o fórmula III de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas tales como, por ejemplo, hidratos. La presente invención engloba todas las formas de este tipo mencionadas anteriormente que son farmacéuticamente activas.

Algunos de los compuestos de fórmula general I pueden presentar polimorfismo, englobando la presente invención todas las posibles formas polimórficas, y mezclas de las mismas. Pueden prepararse diversos polimorfos mediante cristalización en diferentes condiciones o calentando y fundiendo el compuesto seguido por enfriamiento gradual o rápido. Puede determinarse la presencia de polimorfos mediante espectroscopía de RMN de sólidos, espectroscopía IR, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X de polvo u otras técnicas de este tipo.

Los compuestos de fórmula I de la presente invención comprenden al menos un centro quiral. Adicionalmente, pueden tener centros quirales adicionales. La presente invención incluye cada uno de los posibles estereoisómeros y mezclas de los mismos, particularmente mezclas racémicas de los mismos. Puede prepararse un enantiómero individual mediante cualquiera de los procedimientos usados comúnmente, por ejemplo, mediante separación cromatográfica de la mezcla racémica con una fase quiral estacionaria, mediante resolución de la mezcla racémica mediante técnicas de cristalización fraccionada de las sales diastereoméricas de los mismos, mediante síntesis quiral, mediante resolución enzimática o mediante biotransformación. Esta resolución puede llevarse a cabo con cualquier producto intermedio sintético quiral o con productos de fórmula general I. Alternativamente, puede obtenerse cualquier enantiómero de un compuesto de la fórmula general I mediante síntesis enantioespecífica usando materiales de partida ópticamente puros o reactivos de configuración conocida.

Los compuestos de fórmula I o fórmula III pueden existir como varios diastereoisómeros, y pueden separarse mediante técnicas convencionales tales como cromatografía o cristalización fraccionada. Algunos compuestos de la presente invención pueden presentar isómeros *cis/trans*. La presente invención incluye cada uno de los isómeros geométricos y sus mezclas. La presente invención cubre todos los isómeros y mezclas de los mismos (por ejemplo, mezclas racémicas) ya se obtengan mediante síntesis y también mediante el mezclado físico de los mismos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de los compuestos novedosos citados anteriormente, sus formas tautoméricas, sus estereoisómeros, sus polimorfos o sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse usando los métodos descritos a continuación, así como mediante otros procedimientos conocidos en el campo de la síntesis orgánica. Los métodos preferidos incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos generales mostrados en los esquemas adjuntos. A menos que se establezca lo contrario, los grupos R1, R2, R3, R4, n, x e y tienen el significado descrito en fórmulas generales I, II y III.

Los compuestos de fórmula I pueden obtenerse usando el siguiente método:

Método A

5

10

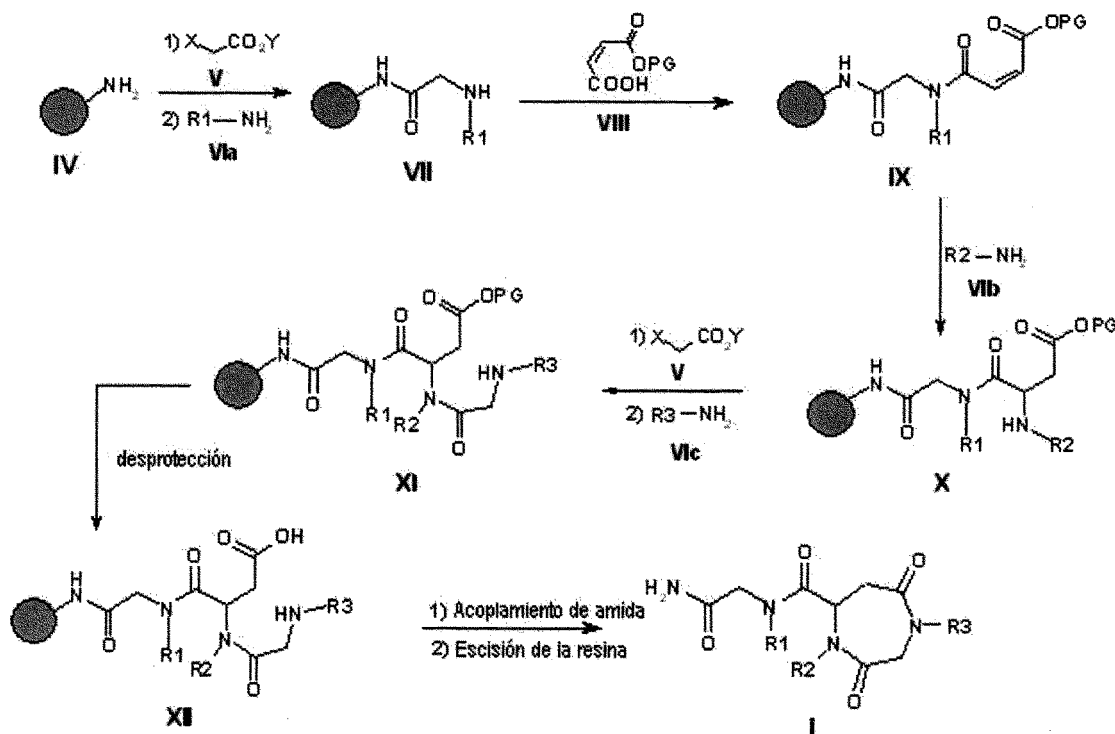
15

20

25

30

35



40

45

Según el método A, tras desprotección del grupo fluorenilmetoxicarbonilo, se acila la amina de soporte sólido IV con un agente acilante V, en el que X representa un grupo saliente, por ejemplo, halógeno e Y representa -OH o halógeno. Cuando Y representa halógeno, por ejemplo, cloruro de cloroacetilo, puede llevarse a cabo la reacción en presencia de una base terciaria como trietilamina. Cuando Y representa -OH, por ejemplo, ácido bromoacético, puede llevarse a cabo la reacción en presencia de un agente de acoplamiento adecuado, por ejemplo, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida. En ambos casos, puede realizarse la reacción en un disolvente inerte que puede hinchar correctamente la resina, tal como *N,N'*-dimetilformamida o diclorometano y a temperatura ambiente o usando irradiación de microondas, disminuyendo el tiempo de reacción. Entonces, se acopla una amina VIa usando una amina terciaria como base. Puede llevarse a cabo la reacción mediante calentamiento, por ejemplo, a 60°C, o mediante irradiación de MW.

50

55

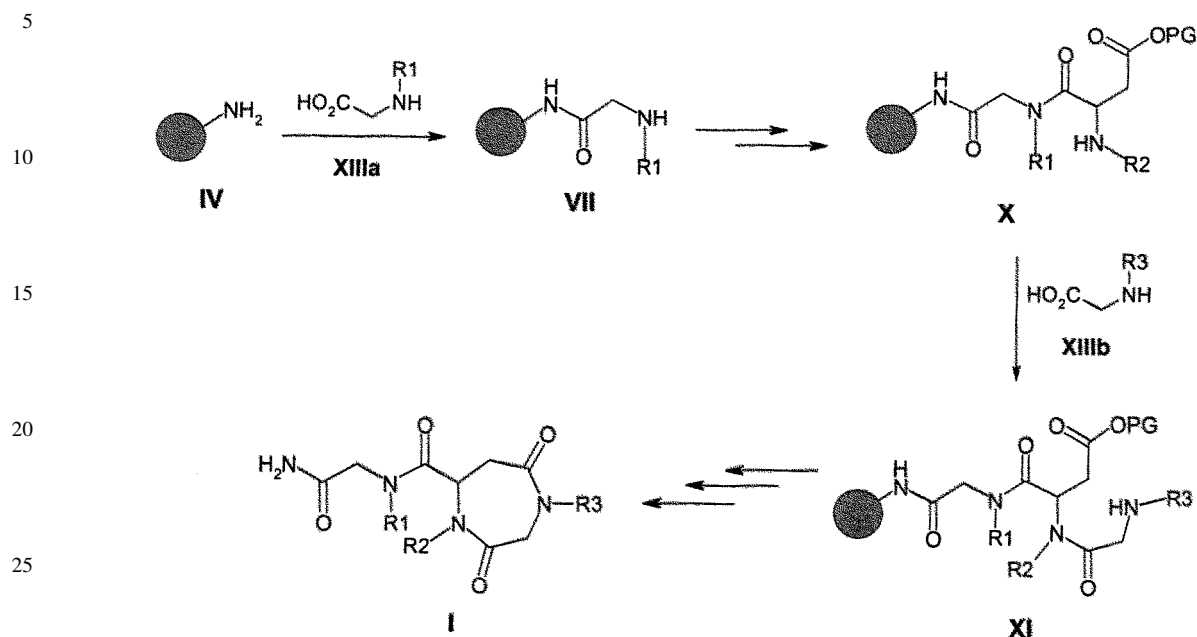
Se hace reaccionar un ácido carboxílico VIII, en el que PG representa un grupo protector, tal como alilo, con la amina VII para producir la amida IX usando un agente de acoplamiento, por ejemplo, la combinación de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol. Luego, se introduce una amina VIb mediante la reacción de Michael usando una base y un disolvente tal como *N,N'*-dimetilformamida o dimetilsulfóxido para obtener el producto intermedio X. Tras la repetición de la acilación y la aminación de la misma manera en que se describió para el producto intermedio VII, se obtiene XI. La desprotección llevada a cabo usando  $\text{PhSiH}_3$  y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  en diclorometano como disolvente (Tetrahedron Lett 1999, 40:2505-2508; Tetrahedron Lett 1997, 38:7275-7278) o con KOH acuoso en dioxano produce XII. Se fomenta la ciclación mediante la formación de la amida usando reactivos de acoplamiento habituales para procedimientos con enlaces peptídicos en fase sólida como la combinación de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidinofosfonio y 1-hidroxibenzotriazol en presencia de una base terciaria como *N,N'*-diisopropiletilamina. Puede liberarse el compuesto final I de la resina usando una mezcla de ácido trifluoroacético, diclorometano y agua.

60

65

## ES 2 338 164 T3

Una estrategia alternativa para obtener un compuesto de fórmula I supone la acilación de las aminas IV y X con aminoácidos de fórmulas XIIIa y XIIIb, respectivamente (método B).



### Método B

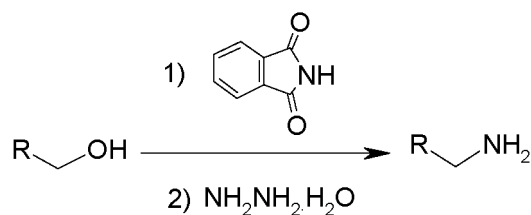
35 Tal como será obvio para un experto en la técnica, es posible combinar algunas etapas del método A con algunas etapas del método B para obtener un compuesto de fórmula I.

40 Las aminas primarias de partida VIa, VIb y VIc están disponibles comercialmente o pueden obtenerse mediante métodos conocidos (March, Advanced Organic Chemistry, 1991, Ed. John Wiley & Sons) o usando por ejemplo, el esquema descrito a continuación.

Esquema 1

45

50



55

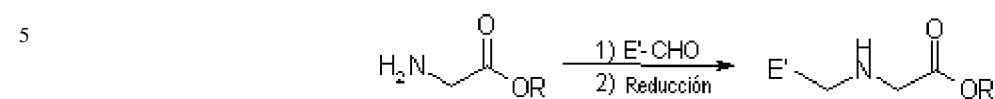
60 Puede obtenerse una amina mediante la reacción de Mitsunobu partiendo de un alcohol y ftalimida potásica en presencia de, por ejemplo, azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifetilfosfina en tetrahidrofurano como disolvente y escisión adicional con hidrato de hidrazina (Mitsunobu, J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 679-680).

65 Pueden sintetizarse glicinas N-sustituidas XIIIa y XIIIb mediante los métodos mostrados a continuación, o bien mediante aminación reductora de la correspondiente glicina con el aldehído adecuado (esquema 2) usando agentes reductores tales como NaBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>3</sub>CN o NaBH(AcO)<sub>3</sub>, o bien mediante sustitución nucleófila de un éster con la amina adecuada E-NH<sub>2</sub> (esquema 3).

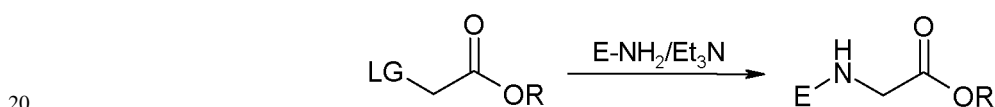


# ES 2 338 164 T3

Esquema 2

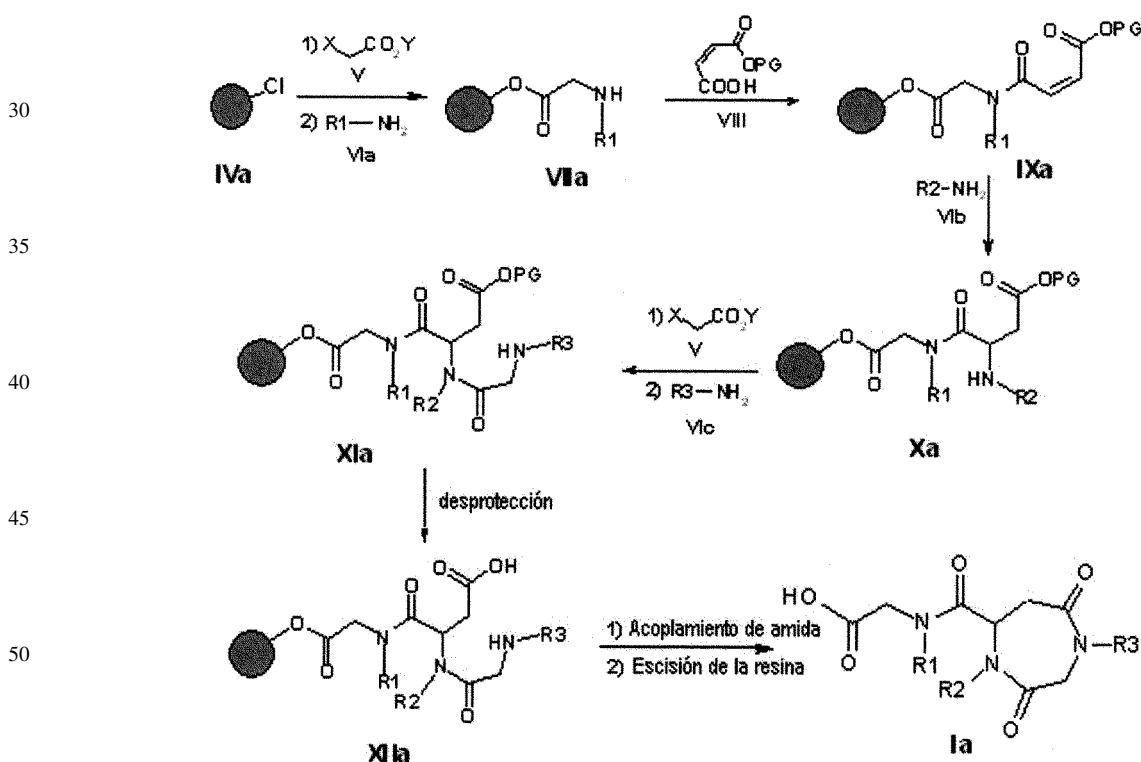


Esquema 3



Los compuestos de fórmula II pueden obtenerse usando reacciones análogas a las descritas anteriormente.

25

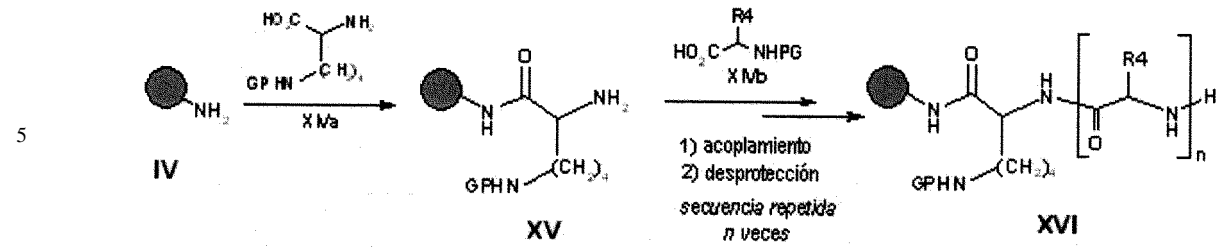


Por tanto, con el fin de obtener el correspondiente ácido carboxílico de fórmula I, es decir, un compuesto de fórmula Ia, se usa la misma secuencia para la síntesis de un compuesto de fórmula I (usando los métodos A y/o B), excepto porque el soporte sólido de partida (IVa) tiene átomos de halógeno reactivos en lugar de un grupo amino.

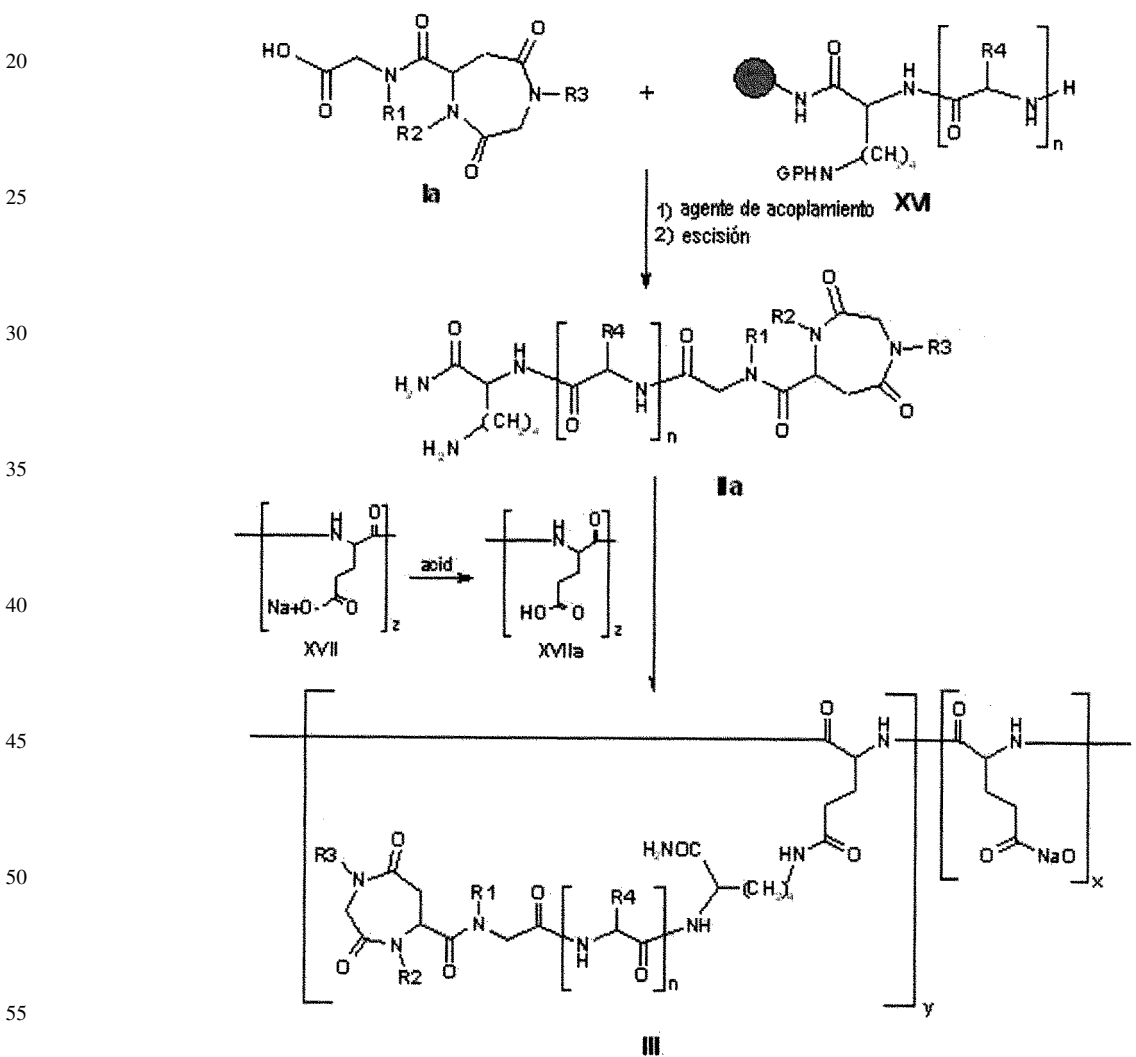
60

También se obtiene el péptido XVI que va a unirse al compuesto usando reacciones habituales para la síntesis de péptidos. Por tanto, se hace reaccionar en primer lugar la amina de soporte sólido IV con una lisina protegida (XIVa) y opcionalmente se hace reaccionar posteriormente con otro aminoácido protegido (XIVb). Tras el acoplamiento, se elimina el grupo protector. Puede repetirse esta secuencia hasta tres veces.

65



15 Entonces se hace reaccionar el ácido carboxílico Ia con la amina XVI y tras la desprotección, se obtiene el compuesto IIa. El acoplamiento de amida entre IIa y el poli(ácido glutámico) XVIIa (obtenido a partir de la correspondiente sal XVII) produce el conjugado de fármaco III.



60 Los compuestos de la presente invención son inhibidores de apaf-1. Por tanto, son útiles para el tratamiento o la prevención de un estado asociado con el exceso de apoptosis.

65 En los adultos, las células posmitóticas, tales como neuronas y células del músculo cardíaco rara vez se renuevan. Así, su pérdida puede producir trastornos neurológicos y cardíacos. Estas células experimentan muerte celular apoptótica en una variedad de enfermedades degenerativas agudas y crónicas. De manera similar, el choque séptico, la isquemia y la intoxicación pueden producir una apoptosis masiva en múltiples órganos. Las infecciones pueden

producir un elevado recambio apoptótico de tipos celulares específicos, por ejemplo, linfocitos en el SIDA o células de la mucosa gástrica en la infección por *Helicobacter pylori*. Los acontecimientos de apoptosis también son de gran importancia en procedimientos para la reperusión isquémica y de conservación en el trasplante de órganos. Por tanto, estas enfermedades son candidatos para la supresión terapéutica de la muerte celular.

5 Otras enfermedades o estados relacionados con la apoptosis incluyen, sin limitación, accidente cerebrovascular, traumatismos, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, meningitis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, esclerosis múltiple, enfermedades relacionadas con priones, así como otras enfermedades cardiovasculares agudas o crónicas, patologías relacionadas con el alcohol y  
10 tratamiento de la alopecia.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de estos compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de las enfermedades o estados mencionados anteriormente.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I, sin la condición de R2, o un compuesto que es un conjugado de polímero-fármaco tal como se definió previamente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado asociado con la apoptosis.

También se describe un método para el tratamiento o la prevención de un estado asociado con la inhibición de  
20 la apoptosis que comprende administrar un compuesto de fórmula I, sin la condición de R2, o un compuesto que es un conjugado de polímero-fármaco tal como se definió previamente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

También se describe un método para el tratamiento o la prevención de accidente cerebrovascular, traumatismos,  
25 lesión cerebral, lesión de la médula espinal, meningitis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, esclerosis múltiple, enfermedades relacionadas con priones, isquemia miocárdica, así como otras enfermedades cardiovasculares agudas o crónicas, trasplante de órganos, patologías relacionadas con el alcohol y tratamiento de la alopecia, que comprende administrar un compuesto de fórmula I, sin la condición de R2, o un compuesto que es un conjugado de polímero-fármaco tal como se definió previamente y uno o  
30 más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I o un compuesto que es un conjugado de polímero-fármaco tal como se definió previamente, una sal o solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, o bien  
35 en dosis únicas o bien múltiples. Los ejemplos de los excipientes mencionados a continuación se facilitan únicamente a modo de ilustración y no han de considerarse como limitantes del alcance de la invención.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de cualquier formulación farmacéutica. La formulación farmacéutica dependerá de la naturaleza del compuesto activo y su vía de administración. Puede usarse cualquier vía de administración, por ejemplo, tal como administración oral, bucal, pulmonar, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), transdérmica, ocular (oftálmica), por inhalación, intranasal, ótica, transmucosa, con implante o rectal. Sin embargo, se prefieren la administración oral, tópica o parenteral.

Las composiciones sólidas para la administración oral incluyen entre otros comprimidos, granulados y cápsulas de  
45 gelatina dura, formuladas tanto como formulaciones de liberación inmediata como de liberación modificada.

Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en preparaciones líquidas orales tales como emulsiones, disoluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de cápsulas de gelatina blanda. Pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente, tales como agua purificada, etanol, sorbitol, glicerol,  
50 polietilenglicoles (macrogoles) y propilenglicol. Las composiciones auxiliares también pueden contener coadyuvantes tales como agentes humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, conservantes, tampones, agentes quelantes y antioxidantes.

Las preparaciones inyectables para la administración parenteral comprenden disoluciones, suspensiones o emul-  
55 siones estériles en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener coadyuvantes, tales como agentes de suspensión, estabilización o tonicidad o agentes dispersantes.

El compuesto también puede formularse para su aplicación tópica. Las formulaciones incluyen cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, preparaciones de champú, pasta oral, preparaciones de colutorio y parches, en los que se  
60 disuelve o dispersa el compuesto en excipientes adecuados.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica está en forma de nanoesferas, micropartículas y nanopartículas.

65 Puede variar la dosificación eficaz de principio activo dependiendo del compuesto particular administrado, la vía de administración, la naturaleza y gravedad de la enfermedad que va a tratarse, así como la edad, el estado general y el peso corporal del paciente, entre otros factores. Un ejemplo representativo de un intervalo de dosificación adecuado es desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, que pueden administrarse

## ES 2 338 164 T3

como una dosis única o dosis divididas. Sin embargo, la dosificación administrada se dejará generalmente a criterio del médico.

### *Toxicidad y recuperación célula a través del ensayo de MTT*

El ensayo de MTT mide la proliferación celular así como la reducción de la viabilidad celular cuando acontecimientos metabólicos conducen a apoptosis o necrosis. También puede usarse para evaluar la tasa de supervivencia de una línea celular dada cuando se incuba en presencia de compuestos xenobióticos. La reducción de sales de tetrazolio se acepta como una manera fiable de analizar la proliferación celular. El MTT de tetrazolio amarillo (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) se reduce por células metabólicamente activas y da como resultado la formación intracelular de formazán púrpura que puede medirse espectrofotométricamente tras la solubilización con DMSO.

Se usó el ensayo de MTT en esta invención para evaluar la toxicidad de los compuestos a diferentes concentraciones. Para analizar su posible alteración de la viabilidad celular, se añadieron los compuestos a las líneas celulares Saos-2 y U937 a diferentes concentraciones y se incubaron a diferentes tiempos. Se expresan los resultados mediante la viabilidad celular en porcentaje.

		% de viabilidad celular					
		24 h, $\mu$ M.			48 h, $\mu$ M.		
		10	5	1	10	5	1
Línea celular Saos-2	I.1	96	100	99	100	100	100
	I.10	91	100	76	100	100	100
	I.2	99	99	100	91	100	100
	I.11	82	98	100	74	91	100
	I.4	100	97	100	99	98	100
	I.9	82	96	100	66	76	97
	I.3	100	93	97	100	100	100
	I.7	98	99	95	100	100	100
Línea celular U937	I.1	95	98	100	99	97	100
	I.10	89	99	96	99	98	100
	I.2	97	100	100	83	99	100
	I.11	79	95	100	75	89	98
	I.4	87	99	100	95	94	99
	I.9	88	98	100	59	69	93
	I.3	95	95	100	98	100	100
	I.7	93	95	99	97	100	100
I.8	99	98	100	99	98	100	

	Tiempo (h)	% de viabilidad celular de I.1 ( $\mu$ M.)					% de viabilidad celular de IIa.2 ( $\mu$ M.)				
		50	25	10	5	1	50	25	10	5	1
Saos-2	24	19	63	100	100	99	10	25	77	100	98
	48	11	19	97	94	97	ND	11	98	97	100
	72	ND	8	80	88	89	ND	ND	ND	ND	ND
U937	24	27	59	87	90	100	ND	ND	ND	ND	ND
	48	ND	ND	83	94	100	ND	ND	ND	ND	ND
	72	ND	ND	67	89	98	ND	ND	ND	ND	ND

ES 2 338 164 T3

	Tiempo (h)	% de viabilidad celular de III.1 ( $\mu\text{M}$ eq. de fármaco)				
		500	250	100	50	20
Saos-2	24	35	75	93	99	96
	48	ND	ND	95	87	95
	72	ND	ND	68	63	86
U937	24	27	50	84	96	98
	48	ND	ND	ND	ND	ND
	72	ND	ND	ND	ND	ND

También se usó el ensayo de MTT para evaluar la recuperación celular mediante la adición de compuestos en líneas celulares con inducción de apoptosis. Para la línea celular Saos-2, se llevó a cabo la inducción de apoptosis mediante la adición de doxiciclina  $2 \mu\text{M}$ ; en el caso de U937, HeLa, U2-OS, se indujo apoptosis mediante doxorubicina  $0,25 \mu\text{M}$ ,  $1,5 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$ , respectivamente. Se expresan los resultados como el % de viabilidad celular considerando que la adición de doxiciclina y doxorubicina induce un 100% de muerte celular y un 0% de recuperación celular en Saos-2 y HeLa, U2-OS o U937, respectivamente.

Líneas celulares	Tiempo (h)	% de recuperación celular I.1		
		10 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
HeLa	24	30	31	29
	48	3	78	75
	72	2	33	34
U2-OS	24	72	0	0
	48	18	54	58
	72	3	25	1
U937	24	52	19	0
	48	3	19	14
	72	4	46	12
Saos-2	24	15	6	76
	48	8	25	23
	72	2	1	3

Líneas celulares	Tiempo (h)	% de recuperación celular															
		I.10		I.2		I.11		I.9		I.4		I.3		I.7		I.8	
		5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
Saos-2	24	57	0	10	41	0	22	16	36	9	34	12	18	41	64	23	57
	48	24	0	21	21	8	20	22	31	10	24	21	14	19	27	51	24

ND: No determinado

ES 2 338 164 T3

		% de recuperación celular III.1		
		100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M
<b>Saos-2</b>	<b>24</b>	25	28	15
	<b>48</b>	18	49	13
	<b>72</b>	15	31	14
<b>U937</b>	<b>24</b>	9	34	5
	<b>48</b>	20	9	1
	<b>72</b>	10	15	0

*Ensayo de inhibición de caspasa*

Se analizó la inhibición de caspasa dependiente del tiempo inducida por los compuestos descritos en esta invención. Se hicieron crecer líneas celulares en presencia o ausencia de los compuestos (50  $\mu$ M) a diferentes tiempos. Se sometió a ensayo la actividad caspasa usando extractos de células Saos-2 o U937 y Ac-DEVD-afc (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-afc (7-amino-4-trifluorometilcumarina)) como sustrato (20  $\mu$ M). Se monitorizó de manera continua la actividad caspasa mediante la liberación de afc fluorescente usando un fluorímetro Cytofluor 4000 (excitación a 400 nm; emisión a 508 nm) durante 1 hora. Se expresó el efecto de los compuestos sobre la actividad caspasa como el porcentaje de inhibición en la señal de fluorescencia de las células tratadas frente a las células no tratadas (control).

Líneas celulares	% de inhibición de caspasa										
		I.1		I.10	I.2	I.11	I.9	I.4	I.3	I.7	I.8
	Tiempo (h)	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>HeLa</b>	<b>24</b>	31	29	1	1	14	0	48	9	6	5
	<b>48</b>	78	75	6	46	0	0	14	21	7	3
	<b>72</b>	33	34	ND	59	62	41	35	29	11	6
<b>U2-OS</b>	<b>24</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	<b>48</b>	54	58	22	54	31	34	23	29	31	16
	<b>72</b>	25	1	64	27	50	61	54	22	33	24
<b>U937</b>	<b>24</b>	19	0	0	0	11	3	0	12	10	5
	<b>48</b>	19	14	5	3	0	4	12	16	8	15
	<b>72</b>	46	12	2	0	4	63	0	1	2	23
<b>Saos-2</b>	<b>24</b>	53	21	13	11	45	50	55	29	0	1
	<b>48</b>	19	17	4	0	7	2	9	16	24	0
	<b>72</b>	4	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No determinado

## ES 2 338 164 T3

	Tiempo (h)	% de inhibición de caspasa IIa.2 (5 $\mu$ M.)
Saos-2	24	41
	48	23
	72	1
U937	24	23
	48	11
	72	5

Líneas celulares	Tiempo (h)	III.1
		% de inh. de caspasa (50 $\mu$ M eq. de fármaco)
Saos-2	24	67
	48	72
	72	100
U937	24	74
	48	85
	72	100

### *Inhibición de la apoptosis inducida por Apaf-1*

Se evaluó la actividad de los compuestos con respecto a su diana específica dentro de la maquinaria apoptótica. La oligomerización de Apaf-1 es un acontecimiento molecular que conduce a la activación de la formación del apoptosoma, que termina en la inducción de apoptosis. Se realizaron estos experimentos en ensayos celulares y libres de células.

Para los ensayos libres de células, se prepararon extractos citoplasmáticos de Hek-293 tal como se describió anteriormente (Malet *et al*, 2005) y se llevó a cabo una división de extracto de células completas. De manera concomitante, se purificó Apaf-1 recombinante según Malet *et al*, 2005. Se incubó la fracción FT (que contenía caspasa 3 y 9 pero que carecía de Apaf-1), con Apaf-1 recombinante en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos (véase la figura 1). Se analizó la actividad de los compuestos mediante la inhibición de la actividad caspasa (véase anteriormente).

Para los ensayos celulares, se trataron células Saos-2 y U937 con un activador del apoptosoma (Nguyen y Wells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100:7533-7538), que induce específicamente la oligomerización de Apaf-1. Después, se añadieron los compuestos a las células (50  $\mu$ M) y se incubaron durante 24 ó 48 horas. Se analizó la capacidad de los compuestos de inhibir la apoptosis inducida por Apaf-1 mediante la inhibición de la actividad caspasa (véase anteriormente).

Líneas celulares	Tiempo (h)	III.1
		% de inh. de actividad caspasa (50 $\mu$ M eq. de fármaco).
Saos-2	24	22
	48	54
U937	24	27
	48	95

### *Unión de IIa.1 al dominio CARD de Apaf-1: ensayo de polarización de fluorescencia*

Se realizaron mediciones de la polarización de fluorescencia en un contador Victor2V 1420 Multilabel HTS. Se valoró una disolución 60 nM de IIa.1 marcado con 5'-6'-carboxifluoresceína (denominado CF-IIA.1;  $\lambda_{exc}$ =480 nm;  $\lambda_{em}$ =535 nm) en tampón A (el volumen de reacción total era de 200  $\mu$ l) con disoluciones de proteínas concentradas. Se registraron los datos usando un software Wallac 1420 Workstation. Se calcularon los valores de Kd usando un modelo de dos estados (véase la figura 2).

## ES 2 338 164 T3

Para caracterizar inicialmente el sitio de unión de los peptoides al apoptosoma, se sintetizó un análogo fluorescente de IIa.1 (CF-IIa.1). CF-IIa.1 se unió al dominio CARD de Apaf-1, pero no al citocromo c y otras proteínas control (Malet *et al.*, 2005), con una constante de disociación (Kd) de 60 nM tal como se determinó en un ensayo de polarización de fluorescencia (figura 2). No obstante, se contrastó el valor de la constante de unión con la concentración de IIa.1 que se necesitaba para inhibir el 50% de la actividad caspasa en los ensayos ( $CI_{50} \approx 30 \mu M$ , figura 1). Una supuesta explicación para conciliar estos datos es que el lisado de reticulocitos usado para la traducción *in vitro* de la procaspasa 9 contenía componentes que disminuían la concentración eficaz de IIa.1.

### 10 Ejemplos

Se han usado las siguientes abreviaturas en los ejemplos:

15 Boc: terc-butoxicarbonilo

DCM: diclorometano

DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

20 DIPEA: diisopropiletilamina

DMF: *N,N'*-dimetilformamida

eq.: equivalente molar

25 EtOAc: acetato de etilo

Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo

30 Glicina: G

HATU: hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio

HOBT: 1-hidroxibenzotriazol

35 Lisina: K

PGA: poli(ácido L-glutámico)

40 Fenilalanina: F

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidinofosfonio

R: Arginina

45 tr: tiempo de retención

TFA: ácido trifluoroacético

50 Valina: V

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se facilitan únicamente a modo de ilustración y no han de interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

55 Se adquirió la resina de poliestireno AM RAM (0,75 mmol/g) de Rapp Polymere GmbH (Alemania). Se adquirió la resina de cloruro de 2-clorotritilo (1,4 mmol/g) de Novabiochem. Se llevó a cabo una RP-HPLC semipreparativa con un sistema Waters (Milford, MA, EE.UU.) usando una columna X-Terra  $C_{18}$  (19 × 25 cm, 5  $\mu m$ ); eluyente: A = TFA al 0,1% en agua; B = TFA al 0,1% en acetonitrilo, gradiente: 0 min. 20% de B - 20 min. 80% de B. Se registraron los espectros de masas de alta resolución (EMAR-FAB) en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela (España).

65 La nomenclatura usada en este documento está basada en AUTONOM (nomenclatura automática), un sistema informatizado del Instituto Beilstein para la generación de la nomenclatura sistemática de la IUPAC.



## ES 2 338 164 T3

### Producto intermedio VIII

#### VIII: *Éster monoalílico del ácido (Z)-but-2-enodioico*

5 A una disolución de 2 g de anhídrido maleico (20 mmol) en cloroformo, se añadieron 1,8 ml de alcohol alílico (26 mmol, 1,3 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 50 min. con irradiación de microondas. Se trató la disolución resultante con HCl 1 N y se extrajo con cloroformo. Se lavaron los extractos orgánicos con salmuera y luego se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtraron. Se eliminó por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía en columna para obtener el producto intermedio  
10 VIII como un aceite (95% de pureza, 85% de rendimiento).

### Compuestos de fórmula I

15 I.1: *Carbamoilmetil-[2-(2,4-diclorofenil)-etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo [1,4]-diazepan-5-carboxílico*

Se trató la resina Rink-amida con 3 ml de piperidina al 20% en DMF y se agitó la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min. a 60°C. Se filtró la resina y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Se trató la resina con una disolución de ácido bromoacético (V, 275 mg, 5 eq.) y DIC (306 µl, 5 eq.) en DMF (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 min. a 60°C en un reactor de microondas. Se escurrió la resina y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Se añadió a la resina una disolución de 2,4-diclorofenetilamina (VIa, diclorofenetilamina (VIa, 300 µl, 5 eq.) y trietilamina (275 µl, 5 eq.) en 3 ml de DMF y se agitó la suspensión durante 2 min. a 90°C con activación de microondas. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con una disolución de éster monoalílico del ácido (Z)-but-2-enodioico (VIII, 310 mg, 5 eq.), HOBT (267 mg, 5 eq.) y DIC (306 µl, 5 eq.) en DCM:DMF (2:1, 3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min., se filtró y se repitió la reacción en las mismas condiciones. Se escurrió la resina y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Después, se añadió a la resina una disolución de 3,3-difenilpropilamina (VIb, 418 mg, 5 eq.) y trietilamina (275 µl, 5 eq.) en 3 ml de DMF y se agitó la suspensión durante 3 h a temperatura ambiente. Se repitió la reacción durante la noche a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con una disolución de ácido bromoacético (V, 275 mg, 5 eq.) y DIC (306 µl, 5 eq.) en DMF (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 min. a 60°C en un reactor de microondas. Se escurrió la resina y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Se añadió a la resina una disolución de 2,4-diclorofenetilamina (VIc, 200 µl, 5 eq.) y trietilamina (210 µl, 5 eq.) en 3 ml de DMF y se agitó la suspensión durante 2 min. a 90°C con activación de microondas. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con tetrakis(trifenilfosfina) paladio(0) (46 mg, 0,1 eq.) y fenilsilano (490 µl, 10 eq.) en DCM anhidro durante 15 min. a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Se repitió tres veces este procedimiento. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Se fomentó la ciclación mediante tratamiento con PyBOP (308 mg, 1,5 eq.), HOBT (80 mg, 1,5 eq.) y DIPEA (203 µl, 3 eq.) en DMF (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h y se filtró. Se escurrió la resina y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de TFA/DCM/agua 60:40:2 liberó una mezcla de reacción bruta que contenía el compuesto del título I.1, que se filtró. Se eliminaron los disolventes del filtrado mediante evaporación a presión reducida seguido por liofilización. Se purificó el residuo obtenido mediante una RP-HPLC semipreparativa usando un gradiente de acetonitrilo acuoso (42% de acetonitrilo → 80% de acetonitrilo, 35 min.) para dar 91 mg del producto deseado (30% de rendimiento, pureza ≥ 98%).

50 EMAR (M + H)<sup>+</sup>: Calc. para C<sub>39</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, 767,1647; hallado, 767,1720.

55

60

65

## ES 2 338 164 T3

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito para el ejemplo I.1, pero usando diferentes aminas, se obtuvieron los siguientes productos:

Ejemplo	Nombre del compuesto	EMAR (M + H) <sup>†</sup> :	
		Calculado	Hallado
I.2	Carbamoilmetilciclopropilamida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>34</sub> H <sub>36</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 635,2114	635,2186
I.3	(2-Acetilaminoetil)carbamoilmetilamida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>35</sub> H <sub>39</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> 680,2328	680,2401
I.4	Carbamoilmetil(tetrahidrofuran-2-ilmetil)amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 679,2376	679,2449
I.5	Carbamoilmetil-[2-(4-metoxifenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>40</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 729,2532	729,2605
I.6	Carbamoilmetilciclohexilamida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>37</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 677,2583	677,2656
I.7	Carbamoilmetil-[2-(2-metoxifenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>40</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 729,2532	729,2605
I.8	Carbamoilmetil[2-(4-clorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>39</sub> H <sub>39</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 733,2037	733,2110
I.9	Carbamoilmetil[2-(2-fluorofenil)-etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>39</sub> H <sub>39</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 717,2332	717,2405
I.10	Carbamoilmetil[2-(4-fluorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>39</sub> H <sub>39</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 717,2332	717,2405
I.11	Butil-carbamoilmetilamida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 651,2427	651,2499

Producto intermedio Ia

Ia: *Ácido* {[2-(2,4-diclorofenil)etil]-[1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-di-fenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carbonil]amino}acético

Se trató la resina de cloruro de 2-clorotritilo (IVa, 700 mg, 0,98 mmol) con una disolución de ácido cloroacético (V, 463 mg, 5 eq.) y DIPEA (840  $\mu$ l, 5 eq.) en DCM (4 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se extinguió la reacción con metanol (550  $\mu$ l) y se prolongó la agitación durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Se añadió una disolución de 2,4-diclorofenetilamina (VIa, 740  $\mu$ l, 5 eq.) y DIPEA (840  $\mu$ l, 5 eq.) en 4 ml de DMF a la resina y se agitó la suspensión durante 3 h a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con una disolución de éster monoalílico del ácido (Z)-but-2-enodioico (VIII) (765 mg, 5 eq.), HOBT (662 mg, 5 eq.) y DIC (760  $\mu$ l, 5 eq.) en DCM:DMF 2:1 (4 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min. a temperatura ambiente, se filtró y se repitió en las mismas condiciones. Después, se añadió a la resina una disolución de 3,3-difenilpropilamina (VIb, 1,0 g, 5 eq.) y DIPEA (840  $\mu$ l, 5 eq.) en 4 ml de DMF y se agitó la suspensión durante 3 h a temperatura ambiente. Se repitió la reacción, se prolongó la agitación hasta 16 h a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con una disolución de ácido cloroacético (V, 463 mg, 5 eq.) y DIC (760  $\mu$ l, 5 eq.) en DCM:DMF 2:1 (4 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min. a temperatura ambiente. Se escurrió la resina y se lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Se añadió a la resina una disolución de 2,4-diclorofenetilamina (VIc, 740  $\mu$ l, 5 eq.) y DIPEA (840  $\mu$ l, 5 eq.) en 4 ml de DMF y se agitó la suspensión durante 3 h a temperatura ambiente.

## ES 2 338 164 T3

Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Después, se trató la resina con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (114 mg, 0,1 eq.) y fenilsilano (1,2 ml, 10 eq.) en DCM anhidro durante 15 min. a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Esta etapa sintética se llevó a cabo por triplicado. Se eliminó el sobrenadante y se escurrió el residuo y lavó con DCM (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DMF (3 x 3 ml). Se fomentó la ciclación mediante tratamiento con PyBOP (765 mg, 1,5 eq.), HOBT (199 mg, 1,5 eq.) y DIPEA (505  $\mu$ l, 3 eq.) en DMF (4 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 h y se filtró. Se escurrió la resina y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de TFA/DCM 5:95 liberó una mezcla de reacción bruta que se filtró. Se eliminaron los disolventes del filtrado a presión reducida seguido por liofilización para dar el compuesto Ia (460 mg, 61% de rendimiento, pureza  $\geq$  55%) como un sólido incoloro.

### Productos intermedios IIa

Se desprotegió la resina Rink-amida (IV, 505 mg, 0,4 mmol) con 3 ml de piperidina al 20% en DMF. Se agitó la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min. a 60°C. Se filtró la resina y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Se unió Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (XIVa, 2 eq) a la resina usando HOBT (108 mg, 2 eq.) y DIC (125  $\mu$ l, 2 eq.). Se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Se escurrió la resina y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). Tras la eliminación del grupo Fmoc con 3 ml de piperidina al 20% en DMF (30 min.), se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). En caso necesario, se acoplaron los otros aminoácidos (XIVb) en las mismas condiciones tal como se describió anteriormente para producir el producto intermedio XVI.

Al producto intermedio XVI hinchado con DMF, se le añadió el ácido Ia (460 mg, 1,5 eq.) en presencia de HATU (228 mg, 1,5 eq.) y DIPEA (205  $\mu$ l, 3 eq.) en DMF (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h y se filtró. Se escurrió la resina y se lavó con DMF (3 x 3 ml), alcohol isopropílico (3 x 3 ml) y DCM (3 x 3 ml). El tratamiento de la resina con una mezcla de TFA/DCM/agua/trisopropilsilano 80:20:2,5:2,5 permitió la liberación de una mezcla de reacción bruta que contenía el compuesto IIa, que se filtró. Se eliminaron los disolventes del filtrado a presión reducida, seguido por liofilización. Se purificó el residuo obtenido mediante RP-HPLC semipreparativa usando una mezcla en gradiente de acetonitrilo acuoso.

Ejemplo	Nombre del compuesto	HPLC-MS	
		tr	m/z
Ila.1 (KGG- Ia.1)	{[({(5-Amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)metil]-carbamoyl}metil)carbamoyl]metil]-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	17,0	1011,506
Ila.2 (K-Ia.1)	[{(5-Amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)metil]-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	17,6	895
Ila.3 (KRFG- Ia.1)	{[({1-[1-(5-Amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)-4-guanidinobutilcarbamoyl]-2-feniletilcarbamoyl}metil)carbamoyl]metil]-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	13,6	1257,629
Ila.4 (KRFV- Ia.1)	[{1-[1-[1-(5-Amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)-4-guanidinobutilcarbamoyl]-2-feniletilcarbamoyl]-2-metilpropilcarbamoyl]metil]-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida del ácido 1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenilpropil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	17,4	1299,650

### 60 Compuestos de fórmula III

#### III.1: PGA-IIa.1

A una disolución de sal de sodio de PGA (XVII, 0,1 g, 0,5 mmol) con un intervalo de peso molecular ( $M_w$ ) de 17000-43000 Da en agua, se le añadió HCl 0,2 M, hasta que se ajustó el pH de la reacción hasta 2,0. Se recogió el precipitado, se dializó frente a agua y se liofilizó. Después se disolvió el PGA en su forma protonada (XVIIa) en DMF seca (7,5 ml) y se añadieron DIC (3 eq.) y HOBT (3 eq.) y se dejaron agitando durante 15 min. Después, se

## ES 2 338 164 T3

añadió el producto intermedio IIa.1 (0,052 mmol (12% molar) 1 eq.) y se ajustó el pH hasta 8 con DIPEA (1,5 ml). Se dejó avanzar la reacción a temperatura ambiente durante 36 h. La cromatografía en capa fina (CCF, sílice) mostró una conversión completa de IIa.1 ( $R_f = 0,5$ ) en el conjugado de polímero ( $R_f = 0$ , MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH = 85:10:5). Para detener la reacción, se vertió la mezcla en CHCl<sub>3</sub>. Se recogió el precipitado resultante y se secó a vacío. Se obtuvo la sal de sodio del conjugado de PGA-peptido III.1 disolviendo el producto en NaHCO<sub>3</sub> 1,0 M. Esta disolución acuosa se dializó frente a agua destilada ( $M_w$ CO de 6.000-8000 Da). La liofilización del dializado proporcionó el producto como un polvo blanco. El contenido de peptido total en el polímero tal como se determinó mediante UV ( $\lambda = 282$  nm) estaba en el intervalo del 25-30% (p/p) (funcionalización del 10-12%), contenido de fármaco libre < 1% en peso de fármaco total.

Se analizaron el peso molecular promedio ( $M_w$ ), la polidispersidad ( $M_w/M_n$ ) y el comportamiento de III.1 y el control XVII en la disolución mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y ultracentrifugación analítica (AUC). Ambas técnicas mostraron a III.1 como una estructura conformacional más compacta con un menor volumen hidrodinámico y un mayor coeficiente de sedimentación (S) que XVII ( $tr = 12,5$  min. y  $S = 3,5 \pm 0,4$  s frente a  $tr = 11,6$  min. y  $S = 1,9 \pm 0,1$  s para III.1 y XVII, respectivamente). Se determinó el  $M_w$  mediante equilibrio de sedimentación como de 26700 Da para XVII y 58600 Da para III.1, sin embargo se determinaron  $M_w$  de 36000 Da ( $M_w/M_n = 1,8$ ) y 38000 Da ( $M_w/M_n = 1,5$ ) para XVII y III.1, respectivamente, mediante CPG usando patrones de PEG.

### Determinación del contenido total en fármaco mediante espectroscopía UV

Se preparó una disolución madre de IIa en MeOH (1 mg/ml). Para obtener una curva de calibrado, se diluyeron muestras usando MeOH para proporcionar un intervalo de concentración de 0-1 mg/ml. Se determinó la carga de fármaco total de los conjugados midiendo la densidad óptica a 272 nm y 281 nm en H<sub>2</sub>O. Se usó PGA en H<sub>2</sub>O como blanco, en el mismo intervalo de concentración (0-5 mg/ml) que el conjugado III analizado. El coeficiente de extinción hallado para IIa a 281 nm en MeOH a TA fue  $\epsilon = 713$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### Determinación del contenido en fármaco libre mediante HPLC

Se prepararon disoluciones acuosas de III.1 (1 mg/ml) y se añadió una alícuota (100  $\mu$ l) a un tubo de polipropileno y se enrasó hasta 1 ml con agua. Se ajustó el pH de las muestras hasta 8 con tampón formiato de amonio (100  $\mu$ l, 1 M, pH 8,5) y después se añadió CHCl<sub>3</sub> (5 ml). Se extrajeron después las muestras meticulosamente mediante agitación con vórtex (3 x 10 s). Se eliminó cuidadosamente la fase acuosa superior y se evaporó el disolvente bajo N<sub>2</sub>. Se disolvió el residuo seco en 200  $\mu$ l de acetonitrilo de calidad para HPLC. Se llevó a cabo el mismo procedimiento en paralelo para el compuesto original IIa.1 (usando 200  $\mu$ l de una disolución madre acuosa de 1 mg/ml). La adición de 1 ml de acetonitrilo para redissolver el producto dio una disolución madre de 200  $\mu$ g/ml a partir de la que se preparó un intervalo de concentraciones (de 2 a 100  $\mu$ g/ml). Se determinó la cantidad libre de fármaco en los conjugados mediante HPLC usando una columna Lichrospher<sup>®</sup> C18 (150 x 3,9 mm). La velocidad de flujo era de 1 ml/min usando un gradiente de acetonitrilo en TFA al 0,1% acuoso (desde un 20 hasta un 100% de acetonitrilo en 20 min). El tiempo de retención fue  $tr = 14,3$  min. para IIa.1 ( $\lambda = 220$  nm).

Siguiendo este procedimiento como para III.1, se obtuvieron los siguientes ejemplos:

Ejemplo	Nombre del compuesto	SEC <sup>a</sup>	
		tr	Mw
III.1: PGA-IIa.1 conjugado	Conjugado de poli(ácido L-glutámico)-{[({(5-amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)metil]-carbamoyl}metil)carbamoyl]metil}-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida] del ácido [1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	12,5	36000
III.2: PGA-IIa.2 conjugado	Conjugado de poli(ácido L-glutámico)-[({(5-amino-1-carbamoylpentilcarbamoyl)metil]-[2-(2,4-diclorofenil)etil]amida] del ácido [1-[2-(2,4-diclorofenil)etil]-4-(3,3-difenil-propil)-3,7-dioxo[1,4]diazepan-5-carboxílico	13,3	34000

<sup>a</sup> Determinado mediante cromatografía por exclusión de tamaños (SEC)

**Descripción de los dibujos**

Figura 1: Ensayo de inhibición de caspasa libre de células usando la fracción citoplasmática FT de Hek-293 incubada con Apaf-1 recombinante en presencia de diferentes concentraciones del compuesto IIa.1.

5

Figura 2: Análisis de la interacción CARD/IIa.1. Se valoró una disolución 240 nM de CF-IIa.1 en tampón PBS con concentraciones crecientes de CARD-Apaf y se midió la polarización de fluorescencia a 30°C. Se registraron los datos (media, d.e.; n=3) en unidades de milipolarización (mP).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

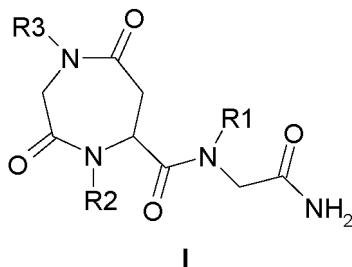
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general I,



sus estereoisómeros y mezclas de los mismos, sus polimorfos y mezclas de los mismos y los solvatos y sales de adición farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que:

R1 representa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-NHCO-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-CONRaRb, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Cic (3-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Hetcic (5-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-Hetar (5-10), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenilo)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenil)[Hetar (5-6)] o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH[Hetar (5-6)]<sub>2</sub>;

R2 representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Cic (3-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Hetcic (5-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-Hetar (5-10), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenilo)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenil)[Hetar (5-6)] o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH[Hetar (5-6)]<sub>2</sub>;

R3 representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo), o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-Hetar (5-6);

alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) y -alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), -S-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), -NH<sub>2</sub>, -NH-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) y -N[alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)]<sub>2</sub>;

alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

Ra y Rb representan independientemente -H o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)

Cic (3-6) representa un radical de un anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros;

Hetcic (5-6) representa un radical con C o N de un anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 5 ó 6 miembros que contiene desde uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N;

Cic y Hetcic pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, -CF<sub>3</sub> y -OH;

Hetar (5-6) y Hetar (5-10) representan un radical con C o N de un anillo de 5 ó 6 miembros y un anillo de 5 a 10 miembros aromáticos, respectivamente; que contiene desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N;

fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, Hetar (5-6) y Hetar (5-10) pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -OH, -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), -CO-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)-NRaRb, -NRaRb y -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;

con la condición de que R2 no representa 2-(4-fluorofenil)etilo.

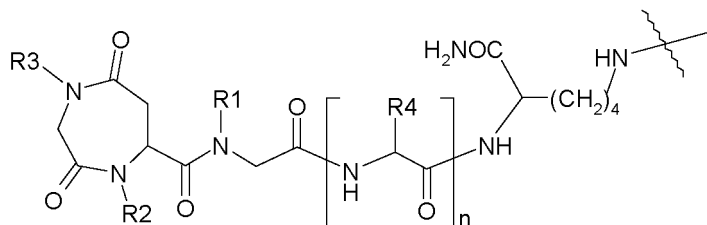
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R1 representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>-Hetcic (5-6), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-Hetar (5-10), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo) o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo), todos ellos opcionalmente sustituidos.

3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R2 representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-fenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(1-naftilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-(2-naftilo) o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(fenilo)<sub>2</sub>, todos ellos opcionalmente sustituidos, con la condición de que R2 no representa 2-(4-fluorofenil)etilo.

## ES 2 338 164 T3

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R3 representa  $-(CH_2)_{1-3}$ -Hetar (5-6) o  $-(CH_2)_2$ -fenilo, ambos opcionalmente sustituidos.

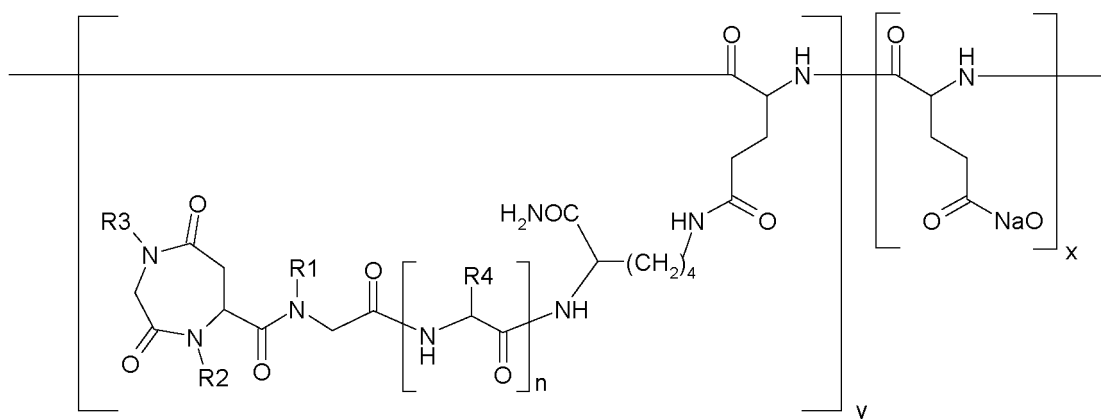
5. Compuesto que es un conjugado de fármaco que comprende un radical de fórmula II



II

sus estereoisómeros y mezclas de los mismos y los solvatos y sales de adición farmacéuticamente aceptables del mismo, conjugado a un polímero de poli(ácido glutámico), en el que R1, R2 y R3 tiene los significados según se definen en la reivindicación 1, sin la condición de R2; cada R4 representa independientemente una cadena lateral de cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural y n es 0,1, 2 ó 3.

6. Compuesto de fórmula III que es un conjugado de fármaco según la reivindicación 2,



III

en el que la proporción de y con respecto a x es del 25-30% al 75-70% en peso.

7. Compuesto según la reivindicación 5 ó 6, en el que el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico); n representa 2 y R4 representa una cadena lateral de glicina.

8. Uso de compuesto de fórmula I según la reivindicación 1, sin la condición de R2, o un compuesto según la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un estado asociado con la inhibición de la apoptosis.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que el estado se selecciona de accidente cerebrovascular, traumatismos, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, meningitis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, esclerosis múltiple, enfermedades relacionadas con priones, isquemia miocárdica, así como otras enfermedades cardiovasculares agudas o crónicas, trasplante de órganos, patologías relacionadas con el alcohol o tratamiento de la alopecia.

## ES 2 338 164 T3

10. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 o un compuesto según la reivindicación 5, una sal o solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, en forma de nanoesferas, micropartículas y nanopartículas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



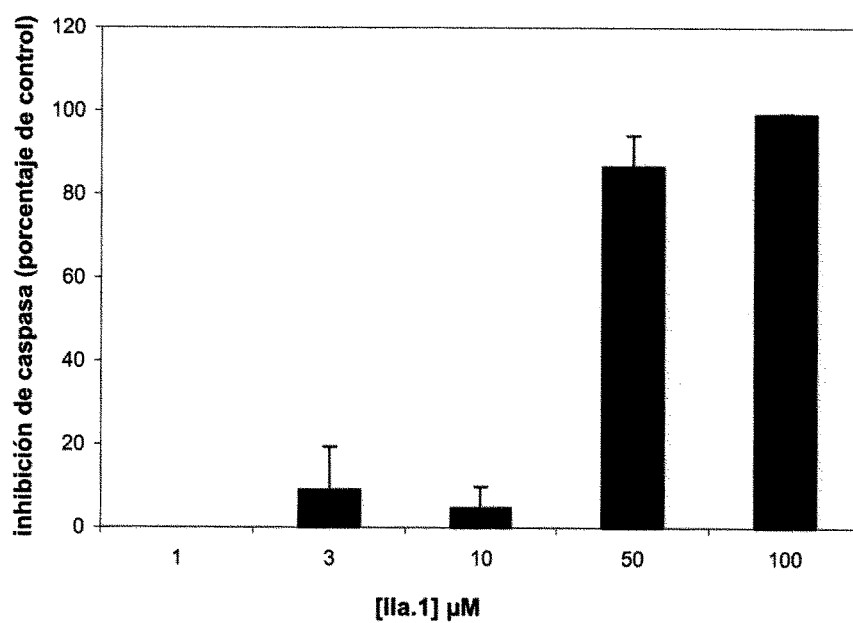


FIGURA 1

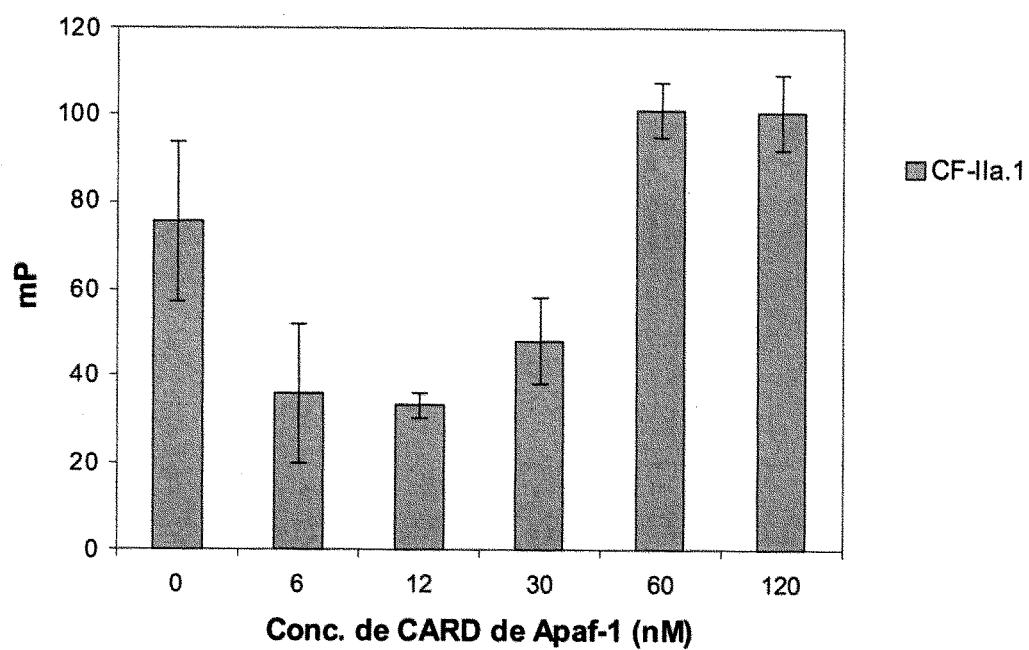


FIGURA 2