

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: **04/02/2009** (51) Int. Cl: **C07D401/12** (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **19/01/2009**
(21) Número de solicitud: **2009000672** **A61K 31/551** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D241/08 (2006.01)
C07D243/08 (2006.01)

(86) Número de solicitud PCT: **ES 07/00120**
(87) Número de publicación PCT: **WO 2008/009758 (24/01/2008)**

(30) Prioridad(es): **20/07/2006 ES P200601933**

(71) Solicitante:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS
Serrano 117 E-28006 Madrid ES**

(72) Inventor(es):
**GLORIA SANCLIMENS PEREZ DE ROZAS
Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Jordi
Girona, 18-26 Barcelona 08034 ES
TIMOTHY THOMSON OKATSU
JOHANNA SCHEPER SIGMUND
ÁNGEL MESSEGUER PEYPOCH
ANGEL RAMIREZ ORTIZ
DOMINGO GONZALEZ RUIZ
ANTONIO MORREALE DE LEON
ISABEL MASIP MASIP
ALEJANDRA MOURE FERNANDEZ**

(74) Representante:
**ALMA S. ALVAREZ Y DELUCIO
Av. Insurgentes Sur 826 2°. Piso Distrito Federal
03100 MX**

(54) Título: **COMPUESTOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LAS INTERACCIONES UBC13-UEV, COMPOSICIONES FARMACEUTICAS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS.**

(54) Title: **COMPOUND THAT CAN INHIBIT UBC13-UEV INTERACTIONS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THERAPEUTIC USES.**

(57) Resumen

El compuesto (I) en el que R es un radical heterocíclico; R1 y R2 son independientemente H o alquilo; R3 es H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alqueno, arilo, arilalquilo, heterocíclico o heterocicliilalquilo; R4 y R5 son independientemente H o alquilo; q es un número seleccionado entre 0 y 1; y sus sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros tienen actividad inhibidora de las interacciones UBC13-UEV y pueden ser utilizados en la elaboración de composiciones farmacéuticas dirigidas a la terapia antitumoral o al tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UB13, rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF-B, o rutas en las que intervienen PCNA o RDA6. R-(CR1R2)q-CO-N(R3)-C(R4R5)-CO-NH2.

(57) Abstract

The invention relates to a compound R-(CR 1 R 2)q-CO-N(R 3)-C(R 4 R 5)-CO-NH 2 (I), wherein: R is a heterocyclyl radical; R 1 and R 2 independently represent H or alkyl; R 3 is H, alkyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, alkenyl, aryl, arylalkyl, heterocyclyl or heterocyclylalkyl; R 4 and R 5 independently represent H or alkyl; q is a number between 0 and 1; and the salts, solvates, pro-drugs or stereoisomers thereof, which can inhibit UBC13-UEV interactions and be used in the production of pharmaceutical compositions intended for antitumour therapy or the treatment and/or prophylaxis of

diseases associated with metabolic routes involving the UBC13 enzyme, metabolic routes involving transcriptional factor NF- κ B or routes involving PCNA or RAD6.

**COMPUESTOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LAS INTERACCIONES
UBC13-UEV, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y APLICACIONES
TERAPÉUTICAS**

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está dentro del campo de la química médica, y más concretamente se relaciona con el desarrollo de compuestos terapéuticos con actividad inhibidora de las interacciones UBC13-UEV, y con la elaboración o el uso de
10 composiciones farmacéuticas dirigidas a la terapia antitumoral o dirigidas al tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13, rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B, o rutas en las
15 que intervienen PCNA o RAD6.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La modificación postraducciona1 de proteínas conocida como ubiquitilación consiste en la formación de enlaces
20 isopeptídicos entre una lisina de una proteína sustrato y la glicina carboxiterminal del péptido ubiquitina [1]. La molécula de ubiquitina (Ub) es un polipéptido de 76 amino ácidos, abundante en el citosol y el núcleo celulares. Una molécula de Ub forma un enlace tioéster con una enzima E1
25 (enzima de activación de Ub) que, en una reacción que requiere ATP, activa una molécula de Ub, de tal modo que ésta queda en un estado que facilita la formación de un enlace tioéster con la cisteína catalítica de una segunda clase de enzimas, llamada E2 o enzima de conjugación de

ubiquitinas. En humanos hay una sola enzima E1, mientras que existen cerca de 30 enzimas de tipo E2. Una enzima E2 puede transferir una molécula de Ub a una proteína sustrato, con la formación de un enlace isopeptídico entre la glicina carboxiterminal de la Ub y una lisina de la proteína sustrato. La modificación de una proteína sustrato mediante adición covalente de una unidad de ubiquitina se llama monoubiquitilación. La misma enzima E2 puede catalizar la transferencia de una molécula de Ub a otra molécula de Ub previamente unida a una proteína sustrato, con la formación de enlaces isopeptídicos entre ubiquitinas. Esta reacción se puede repetir numerosas veces, dando lugar a la formación de cadenas de poliubiquitina, siendo este proceso conocido como poliubiquitilación. Una molécula de ubiquitina tiene siete lisinas, cualquiera de las cuales puede ser utilizada para la formación de enlaces isopeptídicos entre ubiquitinas. Experimentos en que se determina la abundancia de cadenas de poliubiquitina de diferentes tipos indican que las lisinas de la molécula de ubiquitina más utilizadas en la formación de cadenas poliubiquitina son las que se encuentran en las posiciones 29, 48 y 63 de la ubiquitina [2, 3]. La formación, sobre proteínas sustrato, de cadenas de poliubiquitina de cuatro o más unidades de Ub a través de enlaces isopeptídicos con la lisina en posición 48 (K48) constituye una señal que es reconocida por subunidades de la partícula regulatoria del proteasoma [4], con lo que la proteína así modificada es procesada y degradada por el proteasoma. En cambio, cadenas de poliubiquitina que se

forman mediante enlaces isopeptídicos a través de la lisina en posición 63 (K63) de la ubiquitina no parecen ser reconocidas por el proteasoma [5], y por tanto este tipo de poliubiquitilación no constituye una señal para el procesamiento y degradación proteosomal de la proteína modificada. Se sabe muy poco de la función de las otras formas de poliubiquitilación, o de las consecuencias que dichas modificaciones tienen sobre las proteínas sustrato. La poliubiquitilación por lisina 48 (K48) de ubiquitina se llama "canónica", mientras que las poliubiquitilaciones que usan cualquiera de las otras lisinas se llaman "no canónicas" o "variantes" [6]. Muchas E2 pueden catalizar la transferencia de Ub para formar cadenas de poliubiquitina de tipo K48 o K29, mientras que la formación de cadenas poliubiquitina del tipo K63 parece requerir específicamente los heterodímero UBC13-UEV1 o UBC13-UEV2 [6]. La generación de cadenas poliubiquitina se contrarresta mediante la actividad de hidrolasas (isopeptidasas) específicas de tipo de enlace (K48 ó K63).

Dos de los procesos bioquímicos que requieren del heterodímero UBC13-UEV1 y su actividad para mediar poliubiquitilación del tipo K63 son la reparación de ADN mediada por PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [7] y la transmisión de señales iniciada por citoquinas como TNF α o IL-1 [8]. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el heterodímero Ubc13p-Mms2p (Mms2p es la proteína de *S. cerevisiae* ortóloga de UEV1 y UEV2) es esencial para la modificación por poliubiquitilación variante (tipo K63) de PCNA [7-11], participando en la ruta de reparación

translesional de ADN, dependiente de RAD6 (enzima de conjugación de ubiquitinas), conocida como "error-free" [12-16]. La proteína PCNA es modificada por sumoilación (unión covalente de una molécula de SUMO) al inicio de la
5 fase S, lo que le confiere estabilidad, permitiendo su actividad en la replicación del ADN durante esa fase del ciclo celular [7, 9]. Fuera de la fase S, PCNA es modificada por poliubiquitilación canónica por el enzima de conjugación Rad6p asociado a la ubiquitina ligasa Rad18p.
10 Sin embargo, en respuesta a daños genotóxicos, se produce una entrada nuclear del heterodímero Ubc13p-Mms2p, que, asociado a la ubiquitina ligasa Rad5p, cataliza la poliubiquitilación de tipo K63 de PCNA, en competencia con la modificación por poliubiquitilación canónica mediada por
15 Rad6p, impidiendo así la degradación de PCNA, que puede así ser utilizada en la reparación translesional de mellas en el ADN [7-11, 17]. En mamíferos, no se ha demostrado inequívocamente que PCNA sea modificada por poliubiquitilación variante mediada por UBC13-UEV1 (o
20 UBC13-UEV2), y por tanto, y a diferencia de la levadura *S. cerevisiae*, no está claro el papel de este tipo de modificación de sustratos en la reparación de DNA dependiente de PCNA.

En células de mamífero, se ha demostrado que la
25 actividad de poliubiquitilación catalizada por UBC13-UEV1 es imprescindible para la heterodimerización de la proteína adaptadora TRAF2 y TRAF6 que sigue a la unión de TNF α con su receptor [18-20], o la heterodimerización de TRAF6 inducida por IL-1 [21]. Esta heterodimerización estimula la

actividad ubiquitina ligasa de TRAF2 o TRAF6, que reclutan UBC13-UEV1 para una autopoliubiquitilación por cadenas de tipo K63. Estas cadenas de poliubiquitina K63 son reconocidas por las proteínas TAB2 o TAB3, que forman un complejo con la proteína quinasa TAK1, activándola [22], que a su vez fosforila y activa otra quinasa, IKK α , que inicia una cascada de señalización que lleva a la fosforilación y degradación de I κ B, el inhibidor citoplasmático de NF κ B, que puede así translocarse al núcleo y ejercer su acción de regulador transcripcional [18-22].

Por tanto, el heterodímero UBC13-UEV1 (o UBC13-UEV2) es un regulador esencial de dos procesos tan importantes como la inflamación mediada por citoquinas (TNF α) y, al menos en levaduras, la reparación postreplicativa en respuesta a daños genotóxicos. Hay otros procesos biológicos que requieren de poliubiquitilación de tipo K63 mediada por UBC13-UEV1 (o UBC13-UEV2), tales como motilidad [23], endocitosis dependiente de ligando [24], o activación antigénica de células T [25]. Por tanto, son muchos los procesos biológicos que pueden estar mediados por esta modificación postraducciona, y cuyo estudio representa un nuevo campo de investigación que apenas se ha iniciado.

La estructura del heterodímero formado por UBC13 y las proteínas UEV [26, 27] muestra una interfaz de interacción en que la característica más llamativa es la participación, en UBC13, de 2 bolsas hidrofóbicas muy delimitadas sobre la que encajan residuos también hidrofóbicos de la proteína UEV (Mms2p, UEV1 o UEV2), sobre todo la Fenilalanina en posición 8, la Prolina en posición 5 y la Isoleucina en

posición 36. Estas interacciones son estabilizadas por interacciones electrostáticas que implican residuos polares situados a uno y otro lado de las interacciones hidrofóbicas. Esta configuración es única entre enzimas de conjugación de ubiquitinas, y por tanto altamente específica de la interacción entre UBC13 y cualquiera de las proteínas UEV (Mms2p, UEV1 y UEV2) [26-28]. Este hecho, unido a lo delimitado de las bolsas hidrofóbicas en UBC13 que participan en la interacción con las proteínas UEV, convierte a esta interfaz en una interesante diana para el diseño de compuestos péptidomiméticos que interfieran con la misma. La inhibición de la formación de este heterodímero debería afectar su actividad catalítica y por tanto la poliubiquitilación de tipo K63 de sustratos relevantes, conllevando un bloqueo de los procesos en que participa esta modificación postraducciona. A este respecto, cabe indicar que se ha demostrado que la modificación postraducciona de UBC13 mediante unión covalente de la pequeña proteína ISG15 inhibe su actividad catalítica [29, 30]. Esta observación puede ser de gran interés para estudiar el efecto de la inhibición de UBC13 en diferentes sistemas biológicos, aunque hay que recalcar que las modificaciones por ISG15 afectan a muchas otras proteínas.

El diseño de moléculas dirigidas al reconocimiento de superficies proteicas y que posean la capacidad de modular interacciones proteína-proteína de relevancia biológica es considerado como uno de los mayores retos de la biotecnología en el punto de confluencia entre la Química y

la Biología y de un enorme potencial en la terapéutica. Sin embargo, y aunque se han desarrollado y descrito numerosos inhibidores del proteasoma [31, 32], o de actividades de enzimas específicos de implicados en ubiquitilación [33, 34], no se ha descrito hasta la fecha ningún inhibidor de la formación de cadenas de poliubiquitina del tipo K63, ni tampoco ningún inhibidor específico de la formación de otros tipos de cadenas de poliubiquitina (K48, K29, K6, etc.). Igualmente, tampoco se conocen otros inhibidores farmacológicos del enzima de conjugación de ubiquitinas UBC13.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con una nueva familia de compuestos de fórmula (I) que presentan actividad inhibidora de las interacciones UBC13-UEV o actividad inhibidora de la actividad enzimática de UBC13, por lo que son útiles en la terapia antitumoral o en el tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 o a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B.

En la presente invención la expresión "patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 o a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B" incluye aquellas enfermedades en los que UCB13 o NF- κ B no tienen un papel causal directo en la enfermedad/patología sino que intervienen de algún modo en el desarrollo de dicha

enfermedad/patología, motivo por el cual los compuestos de fórmula (I) de la presente invención son útiles en la terapia antitumoral o en el tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 o a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I), así como a sus sales, solvatos, profármacos y esteroisómeros de los mismos (compuestos de la invención) como se describen a continuación.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de dichos compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos y esteroisómeros.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos y esteroisómeros para uso médico.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos ó esteroisómeros farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), o una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento dirigido al

tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, o sus mezclas, para la elaboración de un medicamento dirigido a la terapia antitumoral, en donde dicho medicamento es un antagonista de, o inhibe, la ruta de tolerancia a daños genotóxicos mediada por PCNA y RAD6 produciendo efectos quimio- o radiosensibilizantes.

Asimismo, otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) en la elaboración de un medicamento para aumentar la sensibilidad de un mamífero al tratamiento con un agente antitumoral.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de los pasos y metodologías seguidos en la presente invención para el desarrollo de inhibidores de la interacción entre UBC13 y UEV1.

Figura 2. Resultados del escrutinio de las 52 mezclas de peptoides en cuanto a su capacidad de inhibir la interacción entre UBC13 y UEV1, determinada por ensayos de

doble híbrido en levaduras. Se incubaron células positivas para la interacción UBC13-UEV1 con 5 μ M de cada mezcla de peptoides. Las actividades de interacción se normalizaron con respecto a células sin peptoides, y con respecto a actividades β -galactosidasa del control positivo de interacción (T grande - p53) en presencia de las mismas mezclas de peptoides. Las barras rellenas en negro corresponden a las mezclas con mayor actividad inhibidora de la interacción.

10 **Figura 3.** Resultados de *docking*. Modelos estructurales del encaje molecular del compuesto Varubin o Ia sobre la superficie de UBC13. La ilustración corresponde a una representación de Connolly de la superficie de UBC13, junto a una representación del compuesto Varubin con el encaje
15 óptimo mediante CDOCK sobre la superficie de UBC13. Esta representación se ilustra a dos aumentos diferentes, para permitir apreciar mejor el encaje del compuesto Varubin sobre la bolsa hidrofóbica de la superficie de UBC13 normalmente utilizada para interaccionar con las proteínas
20 UEV (Mms2p, UEV1 y UEV2).

Figura 4. Resultados de *docking*. Modelos estructurales del encaje molecular del compuesto Ib sobre la superficie de UBC13. La ilustración corresponde a una representación de Connolly de la superficie de UBC13 normalmente utilizada
25 para interaccionar con UEV1, junto a una representación en forma de barras del compuesto Ib con el encaje óptimo mediante CDOCK sobre la superficie de UBC13. Esta representación se ilustra a dos aumentos diferentes, para permitir apreciar mejor el encaje del compuesto Ib sobre la

bolsa hidrofóbica de la superficie de UBC13 normalmente utilizada para interactuar con las proteínas UEV (Mms2p, UEV1 y UEV2).

Figura 5. Inhibición por los compuestos Ia (Varubin) y Ib de la interacción entre las proteínas UBC13 y UEV1. **(A)** Ensayo de doble híbrido en levaduras. Se incubaron células positivas para la interacción UBC13-UEV1 con 100 μ M de compuesto Ia o Ib. Las actividades de interacción se normalizaron con respecto a células sin compuestos cíclicos, y con respecto a actividades β -galactosidasa del control positivo de interacción (T grande - p53) en presencia de las mismas concentraciones de los 2 compuestos. **(B)** Ensayo de interacción de proteínas recombinantes purificadas. Se preincubó GST-UBC13 recombinante con 100 μ M de compuesto Ia o Ib, y se determinó la capacidad de interacción de UEV1 sobre GST-UBC13 tras la unión del complejo sobre columnas de glutation-Sepharose. **E**, fracción eluída de la columna (no unida a GST-UBC13), **B** fracción remanente en la columna (unida a GST-UBC13, eluída con tampón que contiene glutation reducido).

Figura 6. Inhibición de la actividad catalítica de UBC13-UEV1, en ensayos de poliubiquitilación *in vitro*. **(A)** Acumulación a lo largo del tiempo de poliubiquitinas libres en reacciones control, o en presencia de 100 μ M de compuesto Ia. La ubiquitina utilizada en estas reacciones es la silvestre (con las 7 lisinas disponibles para formar enlaces isopeptídicos). Las formas monoubiquitiladas (Ub) y diubiquitiladas (Ub₂) están presentes a tiempo 0 y su

abundancia no varía significativamente a lo largo de toda la cinética. Las formas triubiquitiladas (Ub₃) y tetraubiquitiladas (Ub₄) se acumulan con cinéticas de tercer orden, tal como se muestra en (B). En (C) las reacciones se han llevado a cabo con ubiquitina K63 (de las 7 lisinas disponibles, solamente está disponible la de la posición 63; el resto de lisinas se han mutado a argininas y por tanto no están disponibles para formar enlaces isopeptídicos). Las reacciones se realizaron en las mismas condiciones que las ilustradas en (A), en presencia, o no (control) de 100 μ M de Ia.

Figura 7. Sensibilización por los compuestos Ia y Ib a radiación ultravioleta y tratamiento con metil-metano sulfonato en mutantes Δ rad6 de *S. cerevisiae*. Curvas dosis-respuesta. Cepas de *S. cerevisiae* carentes de RAD6 se sometieron a diferentes dosis de radiación ultravioleta (gráfico superior) o a distintos tiempos de exposición a MMS al 0'03% (gráfico inferior), sin (YPD) o con 100 μ M de compuesto Ia o compuesto Ib. La supervivencia se determinó en relación a células no sometidas a tratamiento.

Figura 8. Sensibilización por los compuestos Ia y Ib a radiación ultravioleta y tratamiento con metil-metano sulfonato en mutantes Δ rev3 de *S. cerevisiae*. Curvas dosis-respuesta. Cepas de *S. cerevisiae* carentes de REV3 se sometieron a diferentes dosis de radiación ultravioleta (gráfico superior) o a distintos tiempos de exposición a MMS al 0'03% (gráfico inferior), sin (YPD) o con 100 μ M de compuesto Ia o compuesto Ib. La supervivencia se determinó en relación a células no sometidas a tratamiento.

Figura 9. Inhibición por los compuestos Ia y Ib de la inducción por $\text{TNF}\alpha$ de la transactivación de NF- κ B. Curva dosis-respuesta. Células HeLa transfectadas con un plásmido indicador de actividad transcripcional NF- κ B (activación de luciferasa), y preincubadas o no con distintas concentraciones de compuesto Ia o compuesto Ib, fueron tratadas con 10 ng/mL de $\text{TNF}\alpha$ durante 2 h, cuantificándose la activación de NF- κ B. Las unidades de actividad luciferasa se han normalizado en relación a la actividad inducida por $\text{TNF}\alpha$ en ausencia de compuestos Ia o Ib.

Figura 10. Sensibilización por el compuesto Ia a los efectos citotóxicos de la doxorubicina en células PC-3 y a los efectos citotóxicos del etopósido en células HeLa. Curvas dosis-respuesta. Las células PC-3 y HeLa se preincubaron, o no, con 100 μ M de compuesto Ia, y fueron expuestas a distintas dosis de doxorubicina o etopósido, respectivamente. La cuantificación de las células supervivientes se realizó mediante CyQuant y se normalizó con respecto a las células no sometidas a tratamiento.

Figura 11. Representación gráfica de los tamaños relativos de los tumores (RLUs normalizados respecto al día 0 de cada tumor) de ratones control, tratados únicamente con doxorubicina (i. v., 5 mg/Kg, 1 vez a la semana), únicamente con Varubin (100 μ M, i.m., 2 veces a la semana), o tratados con ambos compuestos. Se representan las medias de entre 6 y 8 tumores de cada grupo, con sus correspondientes barras de desviación estándar.

Figura 12. Imágenes (transformadas desde pseudocolor a escala de grises) correspondientes a un ratón

representativo (el más cercano a la media) de cada grupo de tratamiento (control, doxorubicina sola, Varubin sola, o tratamiento combinado), con seguimiento secuencial a lo largo de 52 días de la luminosidad, captada en un instrumento de Hamamatsu Photonics (ver texto para la descripción del instrumento y el modelo concreto utilizado). Los tumores se localizan en los 2 muslos de cada animal. Dentro de cada tumor, las áreas de mayor claridad se correlacionan con las de mayor RLUs, y por tanto de mayor tamaño del tumor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El diseño de moléculas dirigidas al reconocimiento de superficies proteicas y que posean la capacidad de modular interacciones proteína-proteína de relevancia biológica es considerado como uno de los mayores retos de la biotecnología en el punto de confluencia entre la Química y la Biología y de un enorme potencial en la terapéutica.

En este sentido la enzima UBC13 constituye una prometedora diana terapéutica para el diseño de nuevos compuestos terapéuticos. En consecuencia, se diseñó un procedimiento que permite identificar pequeñas moléculas capaces de interferir competitivamente con la interacción entre UBC13 y UEV1, siendo la hipótesis de partida que la inhibición de esta interacción inhibiría la capacidad de UBC13 de formar cadenas de poliubiquitina del tipo K63. Las metodologías aplicadas para este desarrollo farmacológico priorizan, por un lado, la biodisponibilidad de los compuestos inhibidores (es decir, su capacidad de entrada y

localización intracelular), por otro lado la especificidad de interferencia con la interacción UBC13-UEV1, y, finalmente, el ajuste espacial y de cargas de estas pequeñas moléculas a la superficie que UBC13 emplea para interaccionar con UEV1. El procedimiento llevado a cabo en la presente invención combina de forma secuencial:

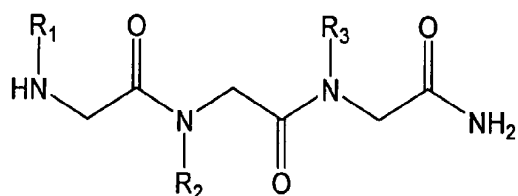
(1) Un cribaje experimental de una quimioteca combinatoria de *N*-alquilglicinas (peptoides) para seleccionar aquéllos con capacidad de inhibición específica de esta interacción, determinada por ensayos de doble híbrido en levaduras. El método de escrutinio empleado permite abordar y resolver simultáneamente tanto la biodisponibilidad de las pequeñas moléculas como la especificidad de la inhibición de la interacción entre UBC13 y UEV1, ya que se utilizan controles pertinentes de interacción proteína-proteína.

(2) Una optimización computacional para determinar el encaje molecular sobre la superficie de UBC13 de los peptoides seleccionados en el anterior paso.

(3) La síntesis de pequeñas moléculas medicinales con actividad inhibidora de la interacción UBC13-UEV1. Como guía para esta síntesis se han utilizado los datos de optimización virtual generados en el anterior paso.

(4) Una caracterización de los efectos funcionales, *in vitro* e *in vivo*, de los compuestos sintetizados en el anterior paso. Esta caracterización incluyó la determinación de la capacidad de estos compuestos para inhibir la actividad de conjugación de ubiquitinas de UBC13-UEV1, así como de interferir con varios de los

procesos celulares que se sabe que están regulados por esta enzima. En la Figura 1 se ilustran esquemáticamente los pasos y procedimientos seguidos para este desarrollo farmacológico. La estructura general (II) de la quimioteca modular combinatoria de peptoides empleados en nuestro 5 escrutinio se muestra a continuación:



(II)

10 donde R¹, R² y R³ representan respectivamente la diversidad química empleada en la construcción de la quimioteca [35].

De esta forma, los inventores de la invención han identificado una nueva familia de compuestos con la fórmula general I capaces de inhibir la interacción entre las 15 proteínas UBC13 y las proteínas UEV (Mms2p, UEV1 y UEV2, ver Ejemplo 4), capaces de inhibir competitivamente la actividad de poliubiquitilación de tipo K63 de esta enzima y que producen efectos biológicos a concentraciones farmacológicamente eficaces. Estos compuestos impiden 20 competitivamente la correcta interacción entre las proteínas UBC13 y la proteína UEV1, impidiendo así su actividad enzimática para formar cadenas de poliubiquitinas en la modalidad conocida como "poliubiquitilación de tipo K63", siendo éste el mecanismo por el que estos compuestos 25 ejercen su actividad (Ejemplo 5), modulando de esta manera a su vez todas aquellas rutas bioquímicas y procesos

biológicos modulados por esta poliubiquitilación del tipo K63.

Las actividades biológicas de los fármacos objeto de la presente invención reflejan las vías bioquímicas que normalmente están reguladas por poliubiquitilación variante mediada por UBC13-UEV1, UBC13-UEV2 y Ubc13p-Mms2p. En particular, la poliubiquitilación mediada por esta enzima heterodimérica regula, por un lado, la reparación de ADN por la ruta conocida como "libre de error", dependiente de RAD6 (Ejemplo 6), y, por otro, la activación del factor transcripcional NF- κ B inducida por citoquinas y otros estímulos. Como consecuencia de esta actividad, estos fármacos sensibilizan tanto a células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como a células de mamífero (HeLa y PC-3, derivadas de carcinoma de cérvix y de próstata, respectivamente) a la acción citotóxica de agentes físicos o químicos tales como luz ultravioleta, metilmetansulfonato o doxorubicina (Ejemplo 8). Otra de las consecuencias biológicas de la actividad de estos fármacos es la inhibición de la activación del factor transcripcional NF- κ B por citoquinas como el TNF α a concentraciones farmacológicamente eficaces (Ejemplo 7) y potencian los efectos citotóxicos de agentes antineoplásicos convencionales. Debido a estas actividades, los fármacos objeto de la presente invención tienen al menos dos clases de aplicaciones médicas:

(1) la sensibilización de células tumorales a agentes químicos o físicos con actividad citotóxica que dañan o modifican el ADN (agentes genotóxicos), lo que debe

permitir disminuir la dosis terapéutica efectiva de tales agentes genotóxicos, disminuyendo por tanto algunos de los efectos secundarios indeseables de tales agentes.

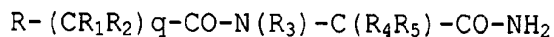
(2) efectos antiinflamatorios en patologías que cursan con activación de citoquinas y quimioquinas inflamatorias.

Además, estos nuevos fármacos constituyen herramientas para la investigación de la actividad de UBC13-UEV1 (UBC13-UEV2) y de otras actividades que regulan diversas formas de ubiquitilación y poliubiquitilación.

En resumen, estos compuestos representan, además, una nueva clase de fármacos, ya que no existen precedentes de inhibidores farmacológicos de esta enzima UBC13, que se constituye en una nueva diana terapéutica, y representan un abordaje farmacológico original y novedoso con aplicaciones antineoplásicas, antiinflamatorias, y en múltiples otros procesos patológicos asociados a rutas metabólicas en que intervienen la enzima UBC13 y la poliubiquitilación no canónica de tipo K63.

Compuestos de fórmula (I)

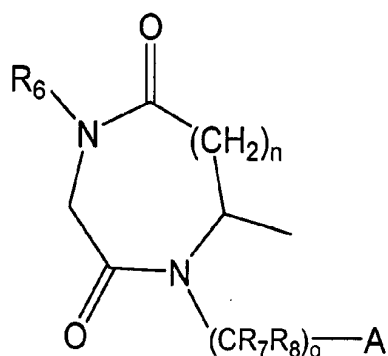
Un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

- R es el radical



donde:

- R_6 es un radical seleccionado entre: H, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heterociclilo sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir;
- A es un radical seleccionado entre arilo sustituido o sin sustituir y heterociclilo sustituido o sin sustituir;
- R_7 y R_8 se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, propilo e isopropilo,
- o es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 y 4,
- n es un número seleccionado entre 0 y 1,
- la línea — indica el lugar de enlace del radical R con el resto de la molécula de fórmula (I);
- R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, propilo e isopropilo;
- R_3 es un radical seleccionado entre: H, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin

sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir,
heterociclilo sustituido o sin sustituir,
heterociclilalquilo sustituido y sin sustituir;

- R_4 y R_5 se seleccionan independientemente de H, metilo,
5 etilo, propilo e isopropilo;

- q es un número seleccionado entre 0 y 1;

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

La invención también proporciona sales de los
compuestos de la invención. Por ejemplo, las sales
10 farmacéuticamente aceptables de los compuestos
proporcionados en el presente documento pueden ser sales de
adición de ácido, sales de adición de base o sales
metálicas, y se pueden sintetizar a partir de los
compuestos parentales que contengan un resto básico o ácido
15 mediante procedimientos químicos convencionales.
Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo,
haciendo reaccionar las formas ácido o base libres de estos
compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el
ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en
20 una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no
acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o
acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición ácida
incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como,
por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato,
25 sulfato, nitrato, fosfato, sales de adición de ácidos
orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, maleato,
fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato,
mandelato, metanosulfonato y *p*-toluensulfonato. Los
ejemplos de sales de adición de álcalis incluyen sales

inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de amonio y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glutamina y sales de aminoácidos básicos.

5 Los ejemplos de sales metálicas incluyen, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y litio.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son
10 fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administra a un humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable"
15 significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida de manera general para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

Para aquellos expertos en la materia será evidente que
20 el alcance de la presente invención también engloba sales que no sean farmacéuticamente aceptables como posibles medios para obtener sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se
25 pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la

elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, preferentemente alcoholatos C₁-C₆, por ejemplo, metanolato.

El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Para la persona experta será inmediatamente evidente que la presente invención engloba todos los posibles isómeros de los compuestos descritos en el presente documento. Así, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, los compuestos de la invención pueden incluir isómeros Z y E. También se incluyen isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Un esteroisómero se entiende, para la persona experta, como compuestos formados de los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces, pero con diferentes estructuras tridimensionales que no son intercambiables.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del

compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, a excepción de la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o por tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En las definiciones de los compuestos descritos en el presente documento los siguientes términos tienen el significado indicado:

"Alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada constituido por átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, con

uno a seis, preferentemente uno a cuatro átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, etc.

5 "Alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada constituido por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, con dos a seis, preferentemente dos a cuatro átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula
10 por un enlace sencillo.

"Cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico saturado que tiene entre tres y seis átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo adecuados incluyen, pero no están limitados a grupos cicloalquilo tales como ciclopropilo,
15 ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

"Cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo tal como ciclopentiletilo.

"Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de
20 cadena lineal o ramificada constituido por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, con dos a seis, preferentemente dos a cuatro átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, tales
25 como -CCH, -CH₂CCH, -CCCH₃, -CH₂CCCH₃.

"Arilo" se refiere a un radical hidrocarbonado aromático que tiene seis átomos de carbono como fenilo.

"Arilalquilo" se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo tal como bencilo

y fenetilo.

"Heterociclilo" se refiere a un anillo estable de 3 a 6 miembros que consta de átomos de carbono y entre uno y cuatro heteroátomos seleccionados del grupo constituido por 5 nitrógeno, oxígeno, y azufre, preferentemente un anillo de 4 a 6 miembros con uno, dos, tres o cuatro heteroátomos, más preferentemente un anillo de 5 ó 6 miembros con uno, dos, o tres heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, el heterociclo es un sistema anular monocíclico.

10 Los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcial o completamente saturado o ser aromático. Los ejemplos de tales

15 heterociclos incluyen, pero no están limitados a, azepinas, bencimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, imidazol, indol, piperidina, piperacina, tiadiazol, tetrahidrofurano.

"Heterociclilalquilo" se refiere a un grupo heterociclo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo tal como

20 pirimidiniletilo.

A no ser que se indique lo contrario los radicales alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos

25 por uno, dos o tres sustituyentes tales como halo (fluor, cloro o bromo), alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, sulfoxi, O-Bencilo, O-Benzilo, carboxi, ciano, carbonilo, acilo, alcoxycarbonilo, sulfonilo, sulfonilamino, amino, imino y

nitro.

El término "alcoxicarbonilo" se refiere a compuestos con la fórmula $-C(=O)O-$, en la que el C-término está unido a la molécula y el O-término está unido a un átomo de carbono para formar una función éster. Dicho átomo de carbono puede ser parte de un grupo alquilo, alqueno, cicloalquilo, alquinilo, arilo, aralquilo o heterociclilo.

Según una forma de realización preferida de la invención, en los compuestos de fórmula (I) R_6 es un radical seleccionado entre H, arilalquilo sustituido o sin sustituir y heterociclalquilo sustituido o sin sustituir, y R_3 es un radical seleccionado entre H, arilalquilo sustituido o sin sustituir y heterociclalquilo sustituido o sin sustituir.

Según otra forma de realización más preferida, R_6 es un radical seleccionado entre fenilpropilo sustituido o sin sustituir, feniletilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, furilpropilo sustituido o sin sustituir, furiletilo sustituido o sin sustituir, furilmetilo sustituido o sin sustituir, imidazolilpropilo sustituido o sin sustituir, imidazoliletilo sustituido o sin sustituir, imidazolilmetilo sustituido o sin sustituir, piridinilpropilo sustituido o sin sustituir, piridiniletilo sustituido o sin sustituir, piridinilmetilo sustituido o sin sustituir, piperidinilpropilo sustituido o sin sustituir, piperidiniletilo sustituido o sin sustituir y piperidinilmetilo sustituido o sin sustituir; y R_3 es un radical seleccionado entre fenilpropilo sustituido o sin sustituir, feniletilo sustituido o sin sustituir, bencilo

sustituido o sin sustituir, furilpropilo sustituido o sin
 sustituir, furiletilo sustituido o sin sustituir,
 furilmetilo sustituido o sin sustituir, imidazolilpropilo
 sustituido o sin sustituir, imidazoliletilo sustituido o
 5 sin sustituir, imidazolilmetilo sustituido o sin sustituir,
 piridinilpropilo sustituido o sin sustituir, piridiniletilo
 sustituido o sin sustituir, piridinilmetilo sustituido o
 sin sustituir, piperidinilpropilo sustituido o sin
 sustituir, piperidiniletilo sustituido o sin sustituir, y
 10 piperidinilmetilo sustituido o sin sustituir.

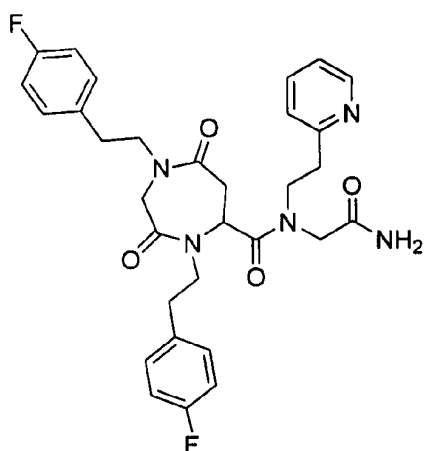
Según una forma aún más preferida, R_6 es un radical
 sustituido por uno o más radicales seleccionados entre
 fluor, cloro, bromo, trifluorometilo, hidroxilo, alcoxilo,
 alquilcarbonilo, alquilamino, sulfonamino, ciano, nitro,
 15 nitrito, nitrato, tionitrato y carboxamido.

Según otra realización adicional de la invención, R_3
 es un radical sustituido por uno o más radicales
 seleccionados entre fluor, cloro, bromo, trifluorometilo,
 hidroxilo, alcoxilo, alquilcarbonilo, alquilamino,
 20 sulfonamino, ciano, nitro, nitrito, nitrato, tionitrato y
 carboxamido y sales.

Según otras formas diferentes de realización de la
 invención: R_6 es el radical *p*-fluorofeniletilo o 2,4-
 diclorofeniletilo; el sustituyente A es un arilo sustituido
 25 o sin sustituir; el sustituyente A es un fenilo sustituido
 por cloro, fluor y/o bromo, y o es un número seleccionado
 entre 1, 2 y 3; R_7 y R_8 son ambos H, o es 2, y A es *p*-
 fluorofenilo; R_3 es 2-pirimidiniletilo, 2,4-

diclorofeniletilo o 4-metoxifeniletilo; n es 1; n es 0; q es 0; q es 1.

Una forma preferida de realización de la invención la constituye el compuesto de fórmula (Ia): (N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-1,4-bis[2'-(4''-fluoro-fenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida), denominado Varubin:

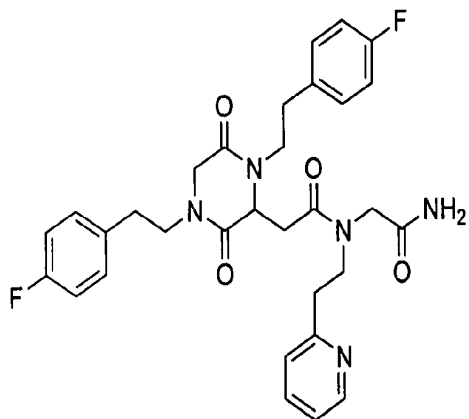


10

(Ia)

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

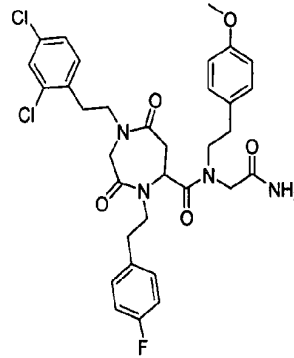
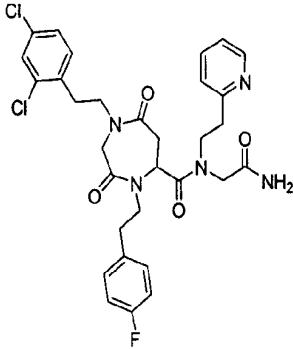
Otra forma preferida de realización de la invención la constituye el compuesto de fórmula (Ib): (1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbamilmetil-N-(2'-(2''-piridil)etil)-carbonilmetil] piperazina-3,6-diona):



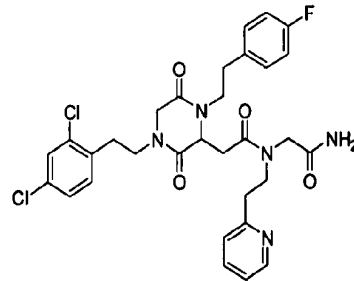
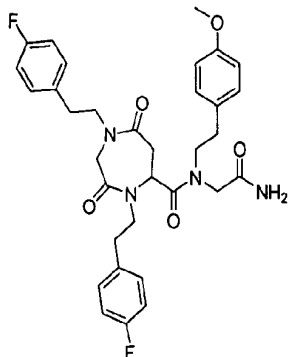
(Ib)

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

Otras formas preferidas de realización las constituyen los siguientes compuestos:

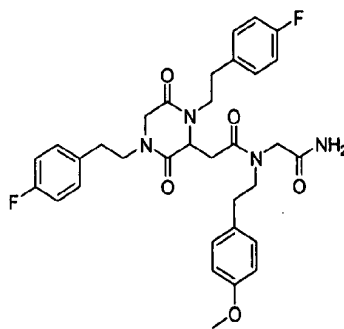
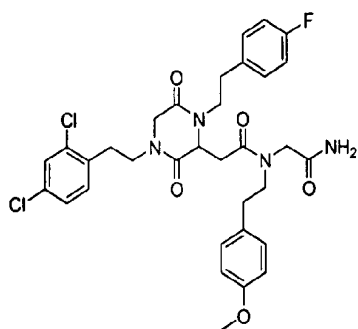


N-aminocarbamoilmetil-*N*-(2'-(4''-metoxifenil)etil)-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-1-[2'-(2'',4''-piridil)etil]-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida



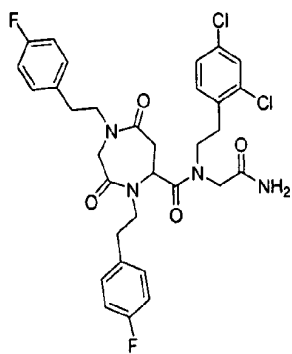
N-aminocarbamoilmetil-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[*N*-aminocarbamoilmetil-*N*-(2'-(2'',4''-piridil)etil)]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida

N-(2'-(4''-
 metoxifenil)etil)-
 1,4-bis[2'-(4''-
 fluorofenil)etil]-
 3,7-dioxo-
 [1,4]diazepan-5-
 carboxamida

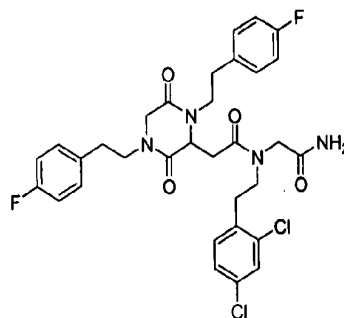


1-[2'-(2'',4''-
 diclorofenil)etil]-
 4-[2'-(4''-
 fluorofenil)etil]-2-
 [N-
 aminocarbonilmetil-
 N-(2'-(4''-
 metoxifenil)etil)
 carbonilmetil]
 piperazina-3,6-diona

1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-
 aminocarbonilmetil-N-(2'-(4''-
 metoxifenil)etil)carbonilmetil]piperazina-
 3,6-diona



N-aminocarbamoilmetil-N-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida



[1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2'',4''-diclorofenil)etil)carbonilmetil]piperazina-3,6-diona

En su segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de dichos compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos y esteroisómeros. Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen. En la presente solicitud se describe una vía sintética de los compuestos de la invención de fórmula I basada en una síntesis en fase sólida. A continuación se incluyen los esquemas de las síntesis en fase sólida de dos de los compuestos de la invención, aquellos de fórmula (Ia) y (Ib). Para aquellos expertos en la materia será evidente aplicar este tipo de

síntesis, ilustrada por los dos esquemas expuestos a continuación y por el Ejemplo 3), al resto de los compuestos englobados por la fórmula (I).



5

Esquema I: Síntesis del compuesto de fórmula Ia: (N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-1,4-bis[2'-(4''-fluoro-fenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-
10 carboxamida).

Esquema II: Síntesis del compuesto de fórmula Ib: (1,4-bis[2'-(4''-fluorofenfl)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-

(2'-(2''-piridil) etil)-carbonilmetil] piperazina-3,6-diona).



5

lb

Otro aspecto adicional de la invención lo constituye una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración a un paciente.

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto de fórmula (I) es el siguiente: N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-1,4-bis[2'-
 5 (4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida (Ia) o cualquiera de sus formas enantioméricas R, S y/o mezclas racémicas.

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en
 10 la que el compuesto de fórmula (I) es el siguiente: 1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)carbonil-metil]piperazina-3,6-diona (Ib), o cualquiera de sus formas enantioméricas R, S y/o mezclas racémicas.

15 Otra forma particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto (I) se selecciona entre:

N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-
 20 3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida;

N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(4''-metoxifenil)etil)-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-
 3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida;

N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(4''-metoxifenil)etil)-1,4-
 25 bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida;

1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil) carbonilmetil] piperazina-3,6-diona;

- 1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-
 fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-(2'-(4''-
 metoxifenil)etil) carbonilmetil] piperazina-3,6-diona;
 1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-
 5 N-(2'-(4''-metoxifenil)etil) carbonilmetil]piperazina-3,6-
 diona;
 N-aminocarbamoilmetil-N-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-
 1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-
 5-carboxamida; y
 10 [1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-
 N-(2'-(2'',4''-diclorofenil)etil) carbonilmetil]piperazina-
 3,6-diona.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente
 15 aceptables que pueden ser utilizados en dichas
 composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por
 los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la
 elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la
 20 expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a
 la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar
 inhibición de la enzima UBC13, calculada para producir el
 efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre
 otras causas, por las características propias de los
 25 compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la
 severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y
 frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición
 terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o

suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, en el "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin u en otros habituales o similares de la Farmacopeas Española y en Estados Unidos.

Generalmente, una cantidad administrada eficaz de un compuesto usado en la invención dependerá de la eficacia relativa del compuesto elegido, la gravedad del trastorno tratado, o la edad, peso o modo de administración. No obstante, normalmente los compuestos activos se administrarán una o más veces al día, por Ejemplo 1, 2, 3, ó 4 veces al día, con una dosis diaria total típica en el intervalo de 0,01 a 100 mg/kg/día.

Los compuestos usados en la presente invención también se pueden administrar con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden

formar parte de la misma composición, o se pueden suministrar en forma de composición separada para la administración al mismo tiempo o en un momento diferente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a 5 compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos o esteroisómeros, o sus mezclas, para uso médico.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos y esteroisómeros, o sus mezclas, en el 10 tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a alteraciones de las rutas metabólicas en que interviene la enzima UBC13.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, 15 profármacos ó esteroisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, o sus mezclas, para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13.

20 En una realización particular, las patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 son enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En una realización preferida, las patologías o enfermedades inflamatorias y autoinmunes pueden ser: 25 enfermedad inflamatoria intestinal, patologías articulares inflamatorias, dermatitis atópicas y otras patologías dermatológicas inflamatorias, neuritis, encefalitis, encefalomielitis y patologías inflamatorias que afectan al sistema nervioso central o periférico, miositis,

vasculitis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades infecciosas que cursan con inflamación, reacciones de rechazo de huésped contra injerto, conjuntivitis y oculopatías inflamatorias, otitis o mucositis.

5 En otra realización particular, las patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 son el cáncer o neoplasia, incluyendo pero no limitándose a cualquier tipo de neoplasia benigna o maligna de cualquier origen tisular,
10 entre ellos, pero no limitados a, cualquier tipo de carcinomas incluyendo los de próstata, mama, pulmón, páncreas, colorrectal, gástrico, esofágico, de laringe, de tiroides, hepático, de vejiga urinaria, renal, uterino, y de cérvix, cualquier tipo de sarcomas incluyendo
15 osteosarcomas, sarcomas de partes blandas y angiosarcomas, cualquier tipo de tumor hematopoyético incluyendo de leucemias y linfomas, cualquier tipo de tumor del sistema nervioso incluyendo neuroblastomas, glioblastomas y astrocitomas, cualquier cáncer dermatológico incluyendo
20 melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos ó esteroisómeros farmacéuticamente aceptables
25 del mismo, o sus mezclas, para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B. En una realización particular, las patologías o enfermedades son

procesos inflamatorios o neoplásicos.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), sus sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, o sus mezclas, para la elaboración de un medicamento dirigido a la terapia antitumoral, en donde dicho medicamento es un antagonista de, o inhibe, la ruta de tolerancia a daños genotóxicos mediada por PCNA y RAD6 produciendo efectos quimio- o radiosensibilizantes.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) en la elaboración de un medicamento para aumentar la sensibilidad de un mamífero al tratamiento con un agente antitumoral.

En la presente invención se entiende por "agente antitumoral" aquel compuesto o agente químico, físico o biológico con propiedades antiproliferativas, antioncogénicas y/o carcinostáticas que puede emplearse para inhibir el crecimiento, la proliferación y/o el desarrollo de tumores. Ejemplos de agentes antitumorales que pueden emplearse en la presente invención son (i) agentes alquilantes, tal como, sulfonatos de alquilo y derivados de etilenimina; (ii) antimetabolitos, tales como antifolatos y análogos de purina; (iii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos; (iv) hormonas y antagonista de las mismas, tales como andrógenos y corticosteroides; (v) agentes biológicos, como vectores virales; y (vi) agentes físicos como radiaciones ionizantes generadas por diferentes tipos de fuente de irradiación (agentes

radioterapéuticos). Una relación de compuestos que pueden emplearse como agentes antitumorales se describe en la solicitud de patente WO2005/112973.

En una realización particular de la invención, el agente antitumoral es doxorubicina o etopósido.

El compuesto de fórmula (I) tiene que administrarse a un mamífero en una cantidad tal que sea capaz de sensibilizar a dicho mamífero frente al tratamiento con un agente antitumoral. En la presente invención se define "cantidad efectiva sensibilizadora" a aquella cantidad de compuesto de fórmula (I) que, cuando se administra a un animal, preferiblemente, un mamífero, más preferiblemente un humano, es suficiente para sensibilizar al mamífero frente a un agente antitumoral o frente a cualquier otra terapia/tratamiento antitumoral. La concentración efectiva en el tejido tumoral de los compuestos de fórmula (I) que es necesaria para producir un efecto sensibilizador frente a un agente antitumoral varía desde 0'01 nanomolar hasta 100 micromolar, y la dosis de dichos compuestos que es necesario administrar al sujeto, por cualquier vía, se deberá ajustar para alcanzar dichas concentraciones intratumorales. El término "sensibilizar" a un mamífero incluye:

(i) incrementar la eficacia de un agente antitumoral o de una terapia/tratamiento antitumoral en un mamífero que no ha recibido previamente ningún agente antitumoral o tratamiento antitumoral ("sensibilización inicial"), y/o

(ii) incrementar la eficacia de un agente antitumoral

o de una terapia/tratamiento antitumoral en un mamífero que ya ha recibido un agente antitumoral o tratamiento antitumoral y frente al cual, ha podido previamente presentar o no resistencia.

5 Tratamientos antitumorales que pueden considerarse en la presente invención son, por ejemplo, el tratamiento con un compuesto de platino, tal como carboplatino o cisplatino, opcionalmente en combinación con gemcitabina o un taxano como docetaxel o paclitaxel. Más ejemplos de
10 tratamientos antitumorales se pueden encontrar en la solicitud de patente WO2005/112973.

 Cánceres que pueden tratarse de forma efectiva mediante el uso de los compuestos de fórmula (I) en la elaboración de un medicamento para aumentar la sensibilidad
15 de un mamífero al tratamiento con un agente antitumoral incluyen cánceres de mamíferos, especialmente, cáncer o neoplasia, incluyendo pero no limitándose a cualquier tipo de neoplasia benigna o maligna de cualquier origen tisular, entre ellos, pero no limitados a, cualquier tipo de
20 carcinomas incluyendo los de próstata, mama, pulmón, páncreas, colorrectal, gástrico, esofágico, de laringe, de tiroides, hepático, de vejiga urinaria, renal, uterino, y de cérvix, cualquier tipo de sarcomas incluyendo osteosarcomas, sarcomas de partes blandas y angiosarcomas,
25 cualquier tipo de tumor hematopoyético incluyendo de leucemias y linfomas, cualquier tipo de tumor del sistema nervioso incluyendo neuroblastomas, glioblastomas y astrocitomas, cualquier cáncer dermatológico incluyendo melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma de

células escamosas.

Finalmente, otro aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica caracterizada porque comprende los compuestos de fórmula (I), una sal, solvato, profármacos o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente, en una cantidad terapéuticamente efectiva, al menos, un segundo agente terapéutico el cuál, en otra realización todavía más particularde la invención, es un compuesto de fórmula (I), una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Cribado experimental para identificar peptoides (*N*-alquilglicinas) capaces de interferir con la interacción UBC13-UEV1.

20 La interacción entre UBC13 y UEV1 se detecta mediante ensayos de doble híbrido en levadura. Las formas proteicas de UBC13 y UEV1 utilizadas en los siguientes ejemplos son de *Homo sapiens*. La proteína UBC13, también denominada UBE2N (nomenclatura HUGO), presenta los siguientes
25 identificadores: NCBI-GI: 4507793, UniProt: P61088 y [EC:6.3.2.19]. La proteína UEV1, también denominada UBE2V1 (nomenclatura HUGO), presenta los siguientes identificadores: NCBI-GI: 73765546 y UniProt: Q13404. En este ensayo, UBC13 se expresa como una proteína de fusión

con el dominio de unión a DNA (DBD-UBC13) de Gal4 desde el plásmido pBD-UBC13, y UEV1 se expresa como una proteína de fusión con el dominio de activación transcripcional de Gal4 (AD-UEV1), desde el plásmido pACT2-UEV1). Ambos plásmidos se cotransfectan en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109, haciéndose crecer sobre placas de medio YPD sin Leucina ni Triptófano, seleccionando únicamente las colonias que expresan tRNA sintasa para estos dos aminoácidos, es decir, las que contienen los dos plásmidos co-transfectados. La cepa AH109 integra en su genoma dos loci artificiales: un locus contiene secuencias de reconocimiento para el DBD de Gal4 unido al promotor GAL1 delante del gen para la histidil tRNA sintasa; otro locus contiene el DBD de Gal4 ligado al promotor GAL2 ante el gen ADE2 y el tercer locus contiene secuencias de reconocimiento para el DBD de Gal4 unido al promotor MEL1 delante del gen lacZ para la enzima β -galactosidasa. La expresión en la cepa AH109 de factores transcripcionales que contengan, por un lado, un dominio Gal4DBD, y, por otro, un dominio de activación transcripcional, induce la expresión de His tRNA sintasa, permitiendo el crecimiento en medio carente de Histidina, y, al mismo tiempo, induce la expresión de β -galactosidasa, cuya actividad enzimática es detectable colorimétricamente usando sustratos adecuados. La expresión e interacción física de DBD-UBC13 y AD-UEV1 sitúa sobre los promotores de estos dos loci un factor transcripcional capaz de activar el promotor asociado a sitio de unión para Gal4. Por tanto, el crecimiento en medio carente de Histidina de células AH109

co-transfectadas con los plásmidos pBD-UBC13 y pACT2-UEV1 indica la existencia de interacción física entre las proteínas UBC13 y UEV1. Además, el grado de esta interacción puede deducirse con bastante aproximación mediante determinaciones colorimétricas de actividad β -galactosidasa, usando como sustrato la O-nitrofenil-p-galactopiranosido (ONPG), siendo los niveles de esta actividad enzimática directamente proporcionales a la intensidad de la interacción entre UBC13 y UEV1.

La síntesis de mezclas combinatorias y compuestos individuales basados en trialkilglicinas (peptoides) se llevó a cabo del siguiente modo: se procedió a sintetizar una quimioteca optimizada de 5120 peptoides en 52 mezclas controladas, mediante el formato de rastreo posicional sobre fase sólida [35]. La quimioteca consiste en 52 mezclas controladas y un total de 5120 compuestos. Las mezclas 1 a 20 (O_1XX) contenían como posición definida una de las 20 aminas primarias seleccionadas disponibles comercialmente, mientras que en las posiciones 'X' (posiciones de mezcla) se usó un conjunto de 16 aminas primarias. Las mezclas 21 a 36 (XO_2X) y 37 a 52 (XXO_3) contenían en la posición definida sólo el conjunto de 16 aminas [36]. De forma resumida, el procedimiento en ocho pasos sintéticos se inició con la liberación del grupo protector Fmoc de la resina de amida Rink (0.7 mEq/g, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania). A continuación, se procedió a una etapa de acilación con ácido cloroacético y diisopropilcarbodiimida, seguida de la correspondiente aminación del intermediario clorometilado con la amina

individual o la mezcla de aminos. Posteriormente, los productos se escindieron de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético/diclorometano/agua, se evaporaron los disolventes, y los residuos se liofilizaron y se
5 redisolviéron en dimetil sulfóxido al 10% a una concentración de 5 mg/mL. La preparación de peptoides individuales se llevó a cabo mediante síntesis independientes en fase sólida, aplicando la secuencia sintética descrita arriba. La pureza y la identidad de las
10 N-alkilglicinas individuales se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución, espectrometría de masas y RMN de ^1H y ^{13}C . La estructura general (II) representada en la memoria descriptiva muestra la estructura química general de las N-alkilglicinas
15 (peptoides) que componen la quimioteca combinatoria utilizada en esta invención.

A continuación se describe el procedimiento utilizado para el cribado de peptoides capaces de inhibir la interacción entre UBC13 y UEV1 en ensayos de doble híbrido
20 en levaduras. Los ADN complementarios correspondientes a UBC13 y UEV1 se generaron mediante retrotranscripción y PCR a partir de la línea celular HepG2. UBC13 fue subclonado en el vector pBD (Stratagene, La Jolla, California, EE. UU.), en pauta con el dominio de unión a ADN de Gal4, dando lugar
25 al plásmido pBD-UBC13. UEV1 se subclonó en el vector pACT2 (Clontech), en pauta con el dominio de transactivación de Gal4, generándose el plásmido pACT2-UEV1. Los plásmidos pBD-UBC13 y pACT2-UEV1 se co-transfectaron en la cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, células competentes

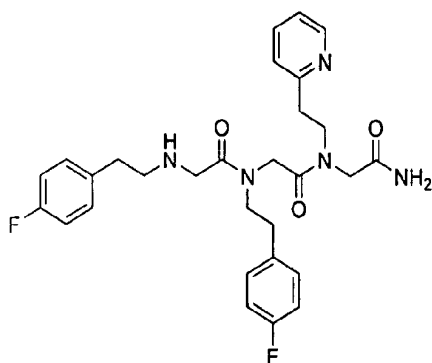
de levadura recién preparadas se mezclaron con el ADN de los plásmidos junto con ADN de testículo de arenque como portadora, en una solución de polietilenglicol-acetato de litio (PEG al 40%, acetato de litio 100 mM, Tris 10 mM, 5 EDTA 1mM), incubándose durante 30 min a 30 °C con agitación. A continuación se añadió dimetil sulfóxido al 7%, y se sometieron las células a choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 30 segundos, seguido inmediatamente de enfriamiento sobre hielo. Las células se centrifugaron a 10 1000 g y se resuspendieron en tampón TE (Tris-ClH 10 mM, pH 7.5 mM, EDTA 1 mM) y se sembraron en placas de medio mínimo para permitir la selección de células con expresión de los marcadores HIS3, ADE2 y *LacZ*. Tras 3 días de crecimiento, se seleccionaron colonias positivas para crecimiento (y por 15 tanto, positivas para la interacción UBC13-UEV1), y se hicieron crecer en 5 mL de medio mínimo durante una noche a 30°C, con agitación. A continuación, se cambió a medio de crecimiento nuevo conteniendo una de las 52 mezclas de peptoides, a una concentración de 0'1 mM de mezcla, 20 incubándose durante una noche a 30°C. Se determinó la absorbancia (densidad óptica, o D.O.) de los cultivos a 695 nm, y se prepararon nuevos cultivos con una D.O.₆₉₅ inicial de 0'2 en medio YPD con la misma mezcla de peptoides a 0'1 mM en agitación a 30 °C, permitiéndose el crecimiento 25 durante 3-4 h hasta alcanzar D.O.₆₉₅ de 0'8. En ese momento los cultivos se centrifugaron, los botones celulares se resuspendieron en tampón Z (Na₂HPO₄ 16 g/L, NaH₂PO₄ 5'50 g/L, KCl 0'75 g/L, MgSO₄ 0'246 g/L a pH 7'0) y se fragmentaron mediante ciclos de congelado-descongelado en

nitrógeno líquido (1 minuto) - 37 °C (1 minuto). Seguidamente se añadió 160 μ L del sustrato de β -galactosidasa, O-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG, a 4 mg/mL en tampón Z), incubándose a 30 °C hasta la formación
5 de sustrato visible (color amarillo). La reacción se detuvo mediante adición de 0.4 mL de Na₂CO₃ 1 M, incubándose durante 30 min, seguido de centrifugado. Los sobrenadantes se transfirieron a cubetas para su lectura espectrofotométrica a 420 nm. Se define aquí 1 unidad de
10 actividad β -galactosidasa como la cantidad capaz de hidrolizar 1 μ mol de ONPG a O-nitrofenol y D-galactosa por minuto por célula (Miller, 1972; Miller, 1992). Este ensayo colorimétrico proporciona una medida semicuantitativa de la intensidad de la interacción entre 2 proteínas en el
15 procedimiento de doble híbrido en levaduras.

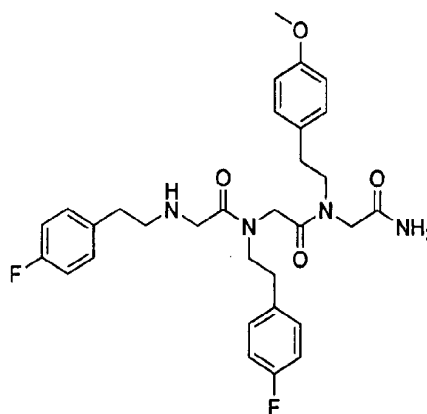
Cada una de las 52 mezclas de peptoides se analizó mediante este procedimiento por triplicado, en tres experimentos independientes. Como controles positivos de interacción en todos estos ensayos se utilizó la
20 interacción entre UBC13 y UEV1 en ausencia de peptoides, y la interacción entre p53 y la proteína T grande de SV40. Como control negativo se utilizaron las proteínas laminina y p53. Las actividades β -galactosidasa para la interacción UBC13-UEV1 se normalizaron con respecto a las actividades
25 β -galactosidasa de su correspondiente control positivo (p53-T grande). Las actividades β -galactosidasa normalizadas de ese modo se ilustran en la Figura 2. Este gráfico muestra que, de forma repetitiva, la mayor inhibición de la interacción UBC13-UEV1 se produjo con las

mezclas números 12, 16, 37, 42 y 46. Se confirmó la capacidad inhibitoria de estas mezclas sobre la interacción UBC13-UEV1 mediante nuevos ensayos colorimétricos por triplicado, utilizando únicamente estas 5 mezclas, 5 confirmándose que la mayor actividad inhibidora se encontraba en las mezclas números 12, 42 y 46.

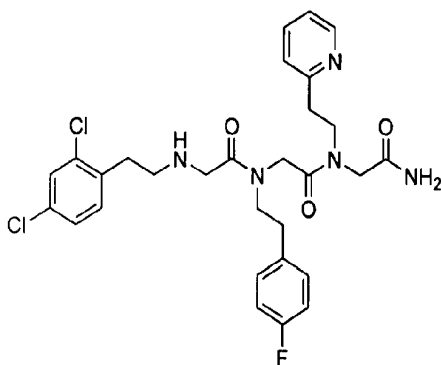
La naturaleza modular y combinatoria de la quimioteca [35, 36] permite deducir la diversidad preferente [es decir, las aminas primarias en las posiciones R^1 , R^2 y R^3 10 del oligómero de estructura (II)], de los peptoides responsables de esta actividad inhibidora. En este caso, los peptoides que inhiben la interacción UBC13-UEV1 deben corresponder a uno, o más, de los peptoides denominados N37-37-9C, N37-37-13C, N15-37-9C y N15-37-13C, cuyas 15 estructuras químicas se representan a continuación:



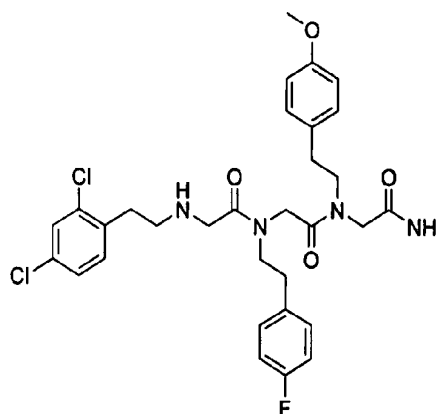
N37-37-9C



N37-37-13C



N15-37-9C



N15-37-13C

En la posición R¹ las aminas seleccionadas son 4'-fluorofeniletíl (peptoides N37-37-9C) o 2'-4'-diclorofeniletíl (peptoides N15-37-13C); en la posición R² la amina es 4'-fluorofeniletíl en todos los casos, y en la posición R³ se seleccionan las aminas 4'-metoxifeniletíl (peptoides N37-37-9C y N15-37-13C) y 2-(2'-piridil)etil (peptoides N37-37-9C y N15-37-9C). Por tanto, la nomenclatura IUPAC de los cuatro peptoides seleccionados es:

N37-37-9C: [N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(2'-piridin)etil)glicinamida

N37-37-13C: [N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifeniletil)glicinamida

N15-37-9C: [N-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(2'-piridin)etil)glicinamida

N15-37-13C: [N-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifeniletil)glicinamida

10

Ejemplo 2. Optimización computacional de encaje molecular (*docking*) sobre UBC13 de variantes conformacionales de compuesto cíclicos derivados de los peptoides seleccionados en el Ejemplo 1.

15 Se estimó que los peptoides que interfieren con la interacción UBC13-UEV1 en ensayos de doble híbrido en levaduras lo hacen mediante la unión competitiva sobre la superficie de UBC13 que interactúa con la primera hélice alifática de UEV1, desplazando por tanto esta última

20 proteína de la interacción heterodimérica con UBC13. La superficie de UBC13 que interacciona con UEV1 es un surco hidrofóbico en forma de estrella de 3 puntas con centro en una bolsa hidrofóbica donde encaja la Fenilalanina 8 de UEV1, con interacciones hidrofóbicas con las cadenas

25 laterales de los residuos E55, L56, Y57 y R70 de UBC13 [26, 27]. Para estudiar esta hipótesis, y como paso previo a la generación de compuestos medicinales con esta actividad, se llevó a cabo estudios de encaje molecular virtual (*docking*) sobre la superficie de interés en UBC13 de los

peptoides activos, así como, posteriormente, de compuestos cíclicos derivados de los mismos. Estos últimos compuestos corresponden a una optimización química para buscar las conformaciones más estables de entre las *N*-alquilglicinas identificadas. A partir de esta información, se diseñó una familia de ocho estructuras de análogos conformacionalmente restringidos de las *N*-alquilglicinas seleccionadas en el Ejemplo 1. Cada peptoide seleccionado se configuró virtualmente para presentar las estructuras correspondientes a las ocho estructuras cíclicas, y todas las formas se sometieron a un estudio de *docking* molecular con el modelo de la proteína UBC13.

Estos análisis se realizaron sobre la estructura atómica del complejo heterodimérico UBC13-UEV1 (número de acceso 1JAT del Brookhaven Protein Data Bank). Inicialmente, una inspección visual y cálculos básicos de accesibilidad sugirieron que la interacción que se produce entre los residuos descritos de la interficie del complejo debería servir como guía para el desarrollo de pequeños compuestos capaces de prevenir efectivamente la formación de este complejo binario.

Preparación de la proteína UBC13 (receptor). La estructura inicial de la proteína corresponde a la entrada 1JAT de la base de datos del PDB [26]. De la estructura heterodimérica presente en el complejo se separó la cadena A correspondiente a la proteína UBC13, sobre la que se llevaron a cabo los cálculos. La posición de los átomos de hidrógeno se obtuvo con la utilidad *protonate* del paquete de AMBER [38]. Seguidamente se asignaron cargas y radios

atómicos a todos los átomos de la proteína consistentes con el campo de fuerzas de AMBER en su versión *parm99*. A continuación se definió el *centro activo* de la proteína. Para ello, y tras una primera inspección visual, se
5 identificaron los residuos E55, L56, Y57 y R70 de la proteína UBC13 situados en la interfaz de separación entre las dos proteínas que constituyen el dímero. Estos residuos conforman un bolsillo en el que se introduce principalmente el residuo F8 de la proteína UEV1.

10 **Preparación de los compuestos cíclicos derivados de los tripeptoides seleccionados en el Ejemplo 1 (ligandos).**

La estructura tridimensional inicial de estos compuestos (8 diferentes familias estructurales de configuración cíclica para cada uno de los tripeptoides del Ejemplo 1) se obtuvo
15 a partir de sus estructuras 2D mediante el programa CORINA [39] y un programa propio (ALFA). A partir de este análisis se seleccionaron conformaciones representativas de la flexibilidad conformacional de ambos compuestos. A continuación, se asignaron cargas y radios a cada uno de
20 los átomos. Para los radios se usó el campo de fuerzas de AMBER en su versión *parm99*, mientras que las cargas se calcularon por ajuste del potencial electrostático (ESP) [40] calculado con el hamiltoniano semiempírico MNDO [41] implementado en el paquete MOPAC [42].

25 **Precálculo de las energías de interacción.** A partir de los residuos seleccionados anteriormente en la proteína, se definió una región del espacio, o caja, en la que acomodar los ligandos. Se midió entonces la energía de interacción de diversas sondas químicas, correspondientes a átomos

presentes en los ligandos, en un *grid* regular de 0'5 Å construido dentro de la caja predefinida. La función de energía empleada es una adaptación de la función de mecánica molecular empleada en el programa AMBER, y se encuentra descrita en detalle en [43].

Encaje de los ligandos en el sitio de unión del receptor. Las posiciones más probables de los ligandos dentro del centro activo se obtuvieron mediante la generación "exhaustiva" de todas las posibles orientaciones de cada ligando en cada uno de los puntos de la *grid* que forman el centro activo, usando un espacio traslacional de 0.5 Å y un espaciado rotacional de 30 grados; las orientaciones se ordenaron en función de su mejor energía de interacción, medida en el *grid* precalculado anteriormente, seleccionándose una lista de 20 orientaciones por ligando analizado. Estos cálculos se realizaron con un programa propio, CDOCK [43].

Selección final de los ligandos. Para esta lista de ligandos se llevaron a cabo correcciones a la energía de interacción previamente calculadas, con objeto de obtener una discriminación más fina entre las moléculas. Para ello se incorporó la contribución de solvatación. Así, la energía de unión ligando-centro activo viene determinada por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{unión} = E_{vdW} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{desolv}^L + \Delta G_{desolv}^R + \Delta G_{no-polar} + \Delta G_{CONF}$$

Las interacciones de Van der Waals (primer término del segundo miembro) proceden del programa CDOCK descrito anteriormente. El efecto del disolvente se obtuvo mediante

la solución numérica de la ecuación de Poisson a través del método de las diferencias finitas, como el implementado en el programa DelPhi, para la componente electrostática (componentes 2, 3 y 4 del segundo miembro de la ecuación),
5 y mediante un término proporcional a la superficie accesible para la componente no electrostática (componente 5 del segundo miembro), utilizando una constante de proporcionalidad de 0'00545. Para todos los cálculos electrostáticos se utilizaron *grids* cúbicos de 0'5 Å de
10 espaciado, y donde las dimensiones de la *grid* son tales que al menos hay 11 Å de separación entre cualquier átomo y los bordes de la caja. El interior de las moléculas, soluto, se caracterizó con una constante dieléctrica de 4, mientras que para el exterior se usó una de 80. El resto de los
15 parámetros empleados fueron los parámetros por defecto del programa.

Las mejores moléculas encontradas y sus energías de interacción, particionadas en contribuciones, se encuentran en las Tablas 1 a 6. Ejemplos de los modos de unión
20 obtenidos para los compuestos N37-37-9C, familia C (compuesto Ia) y N37-37-9C, familia D (compuesto Ib) con mayor afinidad teórica se encuentran en las Figuras 3 y 4.

**TABLA 1. Cálculos de energías para el compuesto N37-37-9C, familia C. Se muestran los resultados para las 20 mejores
25 conformaciones de cada uno de los dos enantiómeros.**

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Ce1_1 | -40,97 | 11,6 | 3,48 | 0,15 | -6,43 | -32,18 |
| Ce1_2 | -40,98 | 11,38 | 3 | 0,25 | -6,22 | -32,57 |
| Ce1_3 | -40,08 | 11,13 | 3,74 | 0 | -6,31 | -31,51 |
| Ce1_4 | -39,1 | 11,03 | 2,93 | 0,11 | -6,24 | -31,26 |
| Ce1_5 | -39,51 | 11,3 | 2,84 | 0,24 | -6,22 | -31,34 |
| Ce1_6 | -38,67 | 10,7 | 2,72 | -0,26 | -6,24 | -31,75 |
| Ce1_7 | -38,7 | 11,81 | 2,78 | -0,05 | -6,32 | -30,48 |
| Ce1_8 | -39,62 | 10,76 | 3,69 | -0,3 | -6,27 | -31,75 |
| Ce1_9 | -37,22 | 8,59 | 3,31 | -1,14 | -5,48 | -31,94 |
| Ce1_10 | -36,8 | 9,31 | 2,54 | -0,77 | -5,83 | -31,54 |
| Ce1_11 | -38,32 | 11,86 | 2,6 | -1,23 | -6,06 | -31,15 |
| Ce1_12 | -37,1 | 11,2 | 2,75 | -0,84 | -6,27 | -30,26 |
| Ce1_13 | -33,54 | 10,94 | 3,53 | -2,69 | -5,62 | -27,37 |
| Ce1_14 | -39,15 | 10,63 | 3,34 | 0,03 | -6,02 | -31,18 |
| Ce1_15 | -34,08 | 10,39 | 3,49 | -2,57 | -5,66 | -28,43 |
| Ce1_16 | -37,16 | 8,01 | 3,21 | -1,16 | -5,44 | -32,54 |
| Ce1_17 | -32,88 | 11,12 | 3,73 | -2,62 | -5,44 | -26,1 |
| Ce1_18 | -32,27 | 9,61 | 3,11 | -2,9 | -5,24 | -27,7 |
| Ce1_19 | -37,2 | 9 | 2,95 | -1,15 | -6,05 | -32,45 |
| Ce1_20 | -32,44 | 9,74 | 3,38 | -2,88 | -5,46 | -27,66 |

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Ce2_1 | -35,73 | 10,51 | 2,56 | -0,72 | -5,63 | -29,02 |
| Ce2_2 | -32,29 | 11,53 | 3,26 | -3,74 | -5,19 | -26,43 |
| Ce2_3 | -31,32 | 9,78 | 3,59 | -2,27 | -5,67 | -25,88 |
| Ce2_4 | -35,07 | 9,28 | 2,71 | -0,36 | -5,98 | -29,41 |
| Ce2_5 | -35,56 | 9,27 | 3,91 | -0,99 | -5,36 | -28,73 |
| Ce2_6 | -29,53 | 7,79 | 3,3 | -3,03 | -5,48 | -26,95 |
| Ce2_7 | -29,45 | 8,24 | 3,13 | -3,09 | -5,38 | -26,55 |
| Ce2_8 | -29,42 | 8,59 | 3,67 | -4,08 | -5,41 | -26,65 |
| Ce2_9 | -33,2 | 9,92 | 3,38 | -1,26 | -5,44 | -26,59 |
| Ce2_10 | -27,39 | 7,13 | 2,82 | -3,85 | -5,03 | -26,33 |
| Ce2_11 | -35,04 | 9,02 | 4,1 | -0,97 | -5,56 | -28,46 |
| Ce2_12 | -34,95 | 8,93 | 3,35 | -0,59 | -5,58 | -28,83 |
| Ce2_13 | -27,38 | 6,71 | 2,78 | -3,57 | -4,88 | -26,34 |
| Ce2_14 | -35,16 | 8,27 | 3,96 | -0,83 | -5,47 | -29,21 |
| Ce2_15 | -34,24 | 8,08 | 4,24 | -2,55 | -5,38 | -29,86 |
| Ce2_16 | -32,08 | 10,83 | 3,48 | -3,25 | -5,07 | -26,08 |
| Ce2_17 | -35,03 | 9,81 | 3,86 | 0 | -5,57 | -26,92 |
| Ce2_18 | -27,49 | 7,39 | 3,76 | -5,07 | -5,15 | -26,55 |
| Ce2_19 | -31,43 | 10,18 | 3,23 | -1,32 | -5,38 | -24,73 |
| Ce2_20 | -35,44 | 9,09 | 2,78 | 0,07 | -5,77 | -29,28 |

TABLA 2. Cálculos de energías para el compuesto N37-37-9C, familia D. Se muestran los resultados para las 20 mejores conformaciones de cada uno de los dos enantiómeros.

| | VDW | ELEC R | ELEC L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| De1_1 | -41,37 | 9,62 | 2,81 | -0,35 | -6,66 | -35,95 |
| De1_2 | -34,3 | 8,84 | 3,63 | -3,13 | -5,76 | -30,72 |
| De1_3 | -33,96 | 8,71 | 3,28 | -3,38 | -5,89 | -31,25 |
| De1_4 | -33,31 | 10,2 | 3,7 | -4,26 | -6,35 | -30,02 |
| De1_5 | -33,18 | 9,22 | 3,31 | -3,81 | -5,93 | -30,38 |
| De1_6 | -33,92 | 8,73 | 3,2 | -2,73 | -5,81 | -30,53 |
| De1_7 | -36,73 | 8,24 | 3,9 | -1,68 | -5,86 | -32,13 |
| De1_8 | -39,85 | 8,28 | 2,78 | -0,59 | -6,33 | -35,72 |
| De1_9 | -32,32 | 8,4 | 3,28 | -3,09 | -5,59 | -29,33 |
| De1_10 | -34,22 | 9,98 | 3,44 | -2,68 | -5,91 | -29,39 |
| De1_11 | -33,21 | 10,09 | 3,11 | -3,27 | -5,95 | -29,23 |
| De1_12 | -31,84 | 8,01 | 3,32 | -3,6 | -5,76 | -29,86 |
| De1_13 | -32,64 | 9,91 | 3,28 | -3,3 | -5,98 | -28,73 |
| De1_14 | -33,54 | 8,94 | 3,02 | -2,52 | -5,81 | -29,91 |
| De1_15 | -31,41 | 9,95 | 3,5 | -4,36 | -6,25 | -28,57 |
| De1_16 | -32,66 | 8,65 | 3,08 | -2,97 | -5,46 | -29,35 |
| De1_17 | -32,97 | 8,57 | 3,05 | -2,68 | -5,53 | -29,55 |
| De1_18 | -35,64 | 7,83 | 3,49 | -1,69 | -5,75 | -31,76 |
| De1_19 | -31,4 | 8,93 | 3,22 | -4,34 | -6,06 | -29,65 |
| De1_20 | -32,25 | 8,24 | 3,23 | -2,92 | -5,51 | -29,21 |

| | VDW | ELEC R | ELEC L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| De2_1 | -42,09 | 10,69 | 3,12 | 0,72 | -6,64 | -34,21 |
| De2_2 | -38,66 | 11,23 | 3,07 | -0,35 | -6,4 | -31,1 |
| De2_3 | -37,43 | 10,48 | 2,53 | 0,26 | -6,11 | -30,28 |
| De2_4 | -35,58 | 10,02 | 2,87 | -0,76 | -6,15 | -29,6 |
| De2_5 | -38,41 | 8,2 | 2,64 | 0,41 | -6,19 | -33,35 |
| De2_6 | -33,58 | 9,04 | 3,27 | -0,95 | -5,87 | -28,1 |
| De2_7 | -36,46 | 10,9 | 3,22 | -0,08 | -6,45 | -28,89 |
| De2_8 | -36,42 | 11,04 | 2,96 | 0,21 | -6,39 | -28,6 |
| De2_9 | -33,99 | 10,44 | 2,98 | -0,74 | -5,8 | -27,12 |
| De2_10 | -36,92 | 11,12 | 3,02 | 0,24 | -6,4 | -28,94 |
| De2_11 | -29,9 | 7,81 | 2,76 | -2,63 | -5,07 | -27,03 |
| De2_12 | -38,44 | 8,7 | 2,76 | 0,49 | -6,34 | -32,84 |
| De2_13 | -33,03 | 9,46 | 3,04 | -1,23 | -5,74 | -27,5 |
| De2_14 | -37,2 | 10,56 | 2,95 | -0,9 | -5,97 | -30,55 |
| De2_15 | -32,24 | 10,38 | 2,69 | -2,06 | -5,46 | -26,69 |
| De2_16 | -35,59 | 9,76 | 2,29 | 0,07 | -5,94 | -29,41 |
| De2_17 | -32,86 | 10,28 | 2,67 | -1,74 | -5,87 | -27,52 |
| De2_18 | -29,77 | 7,51 | 2,68 | -2,3 | -5,06 | -26,93 |
| De2_19 | -32,5 | 8,44 | 3,05 | -1,09 | -5,72 | -27,81 |
| De2_20 | -29,62 | 7,88 | 2,78 | -2,58 | -5,08 | -26,62 |

TABLA 3. Cálculos de energías para el compuesto N37-37-13C, familia C. Se muestran los resultados para las 20 mejores conformaciones de los dos enantiómeros.

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Cel_1 | -41,95 | 12,56 | 3,13 | -0,24 | -6,68 | -33,18 |
| Cel_2 | -41,66 | 12,14 | 3,64 | -0,02 | -6,58 | -32,48 |
| Cel_3 | -41,41 | 13,3 | 3,45 | 0,25 | -6,66 | -31,07 |
| Cel_4 | -39,61 | 12,77 | 2,93 | -0,52 | -6,64 | -31,07 |
| Cel_5 | -35,39 | 12,67 | 3,62 | -2,78 | -6,13 | -28,01 |
| Cel_6 | -36,95 | 12,15 | 3,3 | -0,92 | -6,43 | -28,85 |
| Cel_7 | -38,58 | 10,45 | 2,89 | -0,77 | -6,4 | -32,41 |
| Cel_8 | -39,5 | 12,03 | 3,62 | 0,14 | -6,63 | -30,34 |
| Cel_9 | -33,66 | 10,58 | 3,48 | -2,56 | -5,58 | -27,74 |
| Cel_10 | -37,71 | 11,62 | 2,66 | 0,08 | -6,4 | -29,74 |
| Cel_11 | -36,01 | 11,3 | 4,58 | -1,98 | -5,89 | -28 |
| Cel_12 | -33,26 | 10,05 | 3,42 | -2,65 | -5,57 | -28,01 |
| Cel_13 | -32,01 | 10,41 | 3,43 | -3,29 | -5,47 | -26,92 |
| Cel_14 | -34,88 | 11,03 | 3,99 | -2,25 | -5,74 | -27,85 |
| Cel_15 | -37,7 | 12,66 | 3,62 | -0,67 | -6,38 | -28,48 |
| Cel_16 | -35,48 | 9,93 | 3,37 | -2,09 | -5,88 | -30,16 |
| Cel_17 | -38,68 | 8,73 | 3,53 | 0,24 | -6,01 | -32,19 |
| Cel_18 | -38,8 | 11,07 | 3,72 | 0,81 | -5,76 | -28,96 |
| Cel_19 | -34,96 | 10,53 | 3,28 | -2,39 | -5,88 | -29,43 |
| Cel_20 | -32,6 | 9,93 | 3,36 | -2,62 | -5,3 | -27,23 |

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Ce2_1 | -31,24 | 8,39 | 4,19 | -5,05 | -5,57 | -29,28 |
| Ce2_2 | -30,38 | 9,92 | 3,93 | -5,22 | -5,05 | -26,8 |
| Ce2_3 | -30,43 | 10,58 | 4,04 | -5,38 | -5,07 | -26,26 |
| Ce2_4 | -33,2 | 11,65 | 3,65 | -4,16 | -5,25 | -27,31 |
| Ce2_5 | -31,67 | 9,66 | 3,43 | -2,34 | -5,7 | -26,61 |
| Ce2_6 | -36,76 | 9,4 | 2,75 | 0,06 | -6,12 | -30,66 |
| Ce2_7 | -36,08 | 9,29 | 4,39 | -1,97 | -5,78 | -30,15 |
| Ce2_8 | -30,89 | 12,01 | 3,31 | -4,24 | -5,17 | -24,97 |
| Ce2_9 | -29,94 | 10,48 | 3,99 | -4,95 | -5,05 | -25,47 |
| Ce2_10 | -30,75 | 8,81 | 3,62 | -3,38 | -5,62 | -27,32 |
| Ce2_11 | -30,09 | 8,26 | 2,96 | -3,01 | -5,52 | -27,4 |
| Ce2_12 | -28,5 | 6,85 | 3,23 | -3,6 | -5,03 | -27,05 |
| Ce2_13 | -28,27 | 6,83 | 3,2 | -3,63 | -5,08 | -26,96 |
| Ce2_14 | -31,54 | 9,02 | 2,97 | -1,79 | -5,16 | -26,5 |
| Ce2_15 | -33,54 | 9,52 | 3,23 | -1,15 | -5,62 | -27,56 |
| Ce2_16 | -34,83 | 8,64 | 3,32 | -0,01 | -5,56 | -28,45 |
| Ce2_17 | -35,47 | 10,23 | 4,33 | -0,37 | -5,78 | -27,07 |
| Ce2_18 | -27,24 | 8,4 | 3,57 | -4,07 | -4,98 | -24,32 |
| Ce2_19 | -27,11 | 8,57 | 3,59 | -4,86 | -4,86 | -24,66 |
| Ce2_20 | -31,42 | 10,43 | 3,2 | -1,08 | -5,54 | -24,41 |

TABLA 4. Cálculos de energías para el compuesto N37-37-13C, familia D. Se muestran los resultados para las 20 mejores conformaciones de cada uno de los dos enantiómeros.

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| De1_1 | -39,45 | 12,94 | 3,61 | 0,39 | -6,35 | -28,86 |
| De1_2 | -31,46 | 9,74 | 3,47 | -0,84 | -5,54 | -24,63 |
| De1_3 | -28,2 | 8,93 | 4,04 | -8,78 | -5,04 | -29,05 |
| De1_4 | -31,74 | 10,73 | 3 | -3,96 | -5,52 | -27,49 |
| De1_5 | -35,25 | 9,74 | 3,04 | -1,95 | -6,21 | -30,64 |
| De1_6 | -38,48 | 11,72 | 3,55 | 2,99 | -6,17 | -26,4 |
| De1_7 | -35,91 | 7,91 | 1,94 | -0,97 | -5,84 | -32,87 |
| De1_8 | -35,21 | 8,89 | 4,32 | -3,63 | -5,74 | -31,37 |
| De1_9 | -29,2 | 8,87 | 3,28 | -7,21 | -5,12 | -29,37 |
| De1_10 | -29,97 | 8,71 | 2,77 | -1,68 | -5,15 | -25,32 |
| De1_11 | -34,61 | 11,05 | 2,78 | -0,53 | -6,04 | -27,35 |
| De1_12 | -33,64 | 9,4 | 2,79 | -1,56 | -5,91 | -28,92 |
| De1_13 | -31,17 | 8,04 | 2,09 | -4,61 | -5,65 | -31,3 |
| De1_14 | -34,66 | 8,8 | 4,23 | -4,79 | -5,69 | -32,11 |
| De1_15 | -27,96 | 9,86 | 3,75 | -8,85 | -5,43 | -28,64 |
| De1_16 | -35,92 | 11,23 | 3,22 | 1,08 | -6,23 | -26,61 |
| De1_17 | -33,37 | 10,11 | 2,68 | -0,97 | -6,1 | -27,66 |
| De1_18 | -27,59 | 7,96 | 4,31 | -4,16 | -4,76 | -24,25 |
| De1_19 | -31,31 | 11,26 | 2,46 | -5,96 | -5,79 | -29,33 |
| De1_20 | -31,5 | 9,95 | 2,79 | -2,73 | -5,5 | -26,99 |

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| De2_1 | -35,82 | 10,14 | 3,32 | -2,99 | -5,72 | -31,06 |
| De2_2 | -36,01 | 10,46 | 3,38 | -3,63 | -5,73 | -31,53 |
| De2_3 | -36,46 | 11,73 | 3 | -2,58 | -5,94 | -30,25 |
| De2_4 | -33,72 | 9,83 | 3,14 | -2,68 | -5,56 | -28,99 |
| De2_5 | -36,29 | 9,13 | 3,65 | -0,69 | -5,95 | -30,16 |
| De2_6 | -36,75 | 10,37 | 3,73 | -0,23 | -5,83 | -28,72 |
| De2_7 | -35,63 | 11,09 | 3,08 | -2,55 | -5,78 | -29,79 |
| De2_8 | -34,93 | 8,88 | 3,85 | -0,71 | -5,83 | -28,74 |
| De2_9 | -35,49 | 10,78 | 2,26 | -0,55 | -6 | -29 |
| De2_10 | -33,78 | 10,05 | 3,86 | -1,21 | -5,67 | -26,75 |
| De2_11 | -34,71 | 11,81 | 3,17 | -3,51 | -5,95 | -29,19 |
| De2_12 | -32,79 | 9,27 | 3,12 | -1,14 | -5,85 | -27,38 |
| De2_13 | -32,4 | 8,2 | 3,12 | -3,11 | -5,51 | -29,7 |
| De2_14 | -33,29 | 8,08 | 2,82 | -1,72 | -5,58 | -29,68 |
| De2_15 | -34,31 | 9,63 | 3,16 | -2,98 | -5,68 | -30,17 |
| De2_16 | -33,11 | 10,39 | 1,89 | -2,29 | -5,47 | -28,59 |
| De2_17 | -30,32 | 10,9 | 2,56 | -6,61 | -5,63 | -29,1 |
| De2_18 | -31,11 | 8,34 | 2,91 | -1,68 | -5,47 | -27,01 |
| De2_19 | -34,16 | 7,98 | 2,75 | -2,48 | -5,79 | -31,69 |
| De2_20 | -35,93 | 10,73 | 2,98 | -1,54 | -5,91 | -29,68 |

TABLA 5. Cálculos de energías para el compuesto N15-37-9C, familia C. Se muestran los resultados para las 20 mejores conformaciones para cada uno de los dos enantiómeros.

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Cel_1 | -31,42 | 8,05 | 4,08 | -4,95 | -5,54 | -29,78 |
| Cel_2 | -31,11 | 7,82 | 3,48 | -3,81 | -5,39 | -29 |
| Cel_3 | -30,13 | 7,91 | 3,31 | -3,85 | -5,44 | -28,19 |
| Cel_4 | -38,79 | 10,59 | 3,82 | -0,65 | -5,85 | -30,88 |
| Cel_5 | -37,94 | 10,38 | 3,47 | -0,46 | -5,78 | -30,32 |
| Cel_6 | -37,34 | 10,67 | 3,56 | -0,34 | -5,79 | -29,24 |
| Cel_7 | -38,21 | 10,8 | 3,63 | -0,08 | -5,76 | -29,61 |
| Cel_8 | -36,86 | 10,32 | 3,45 | -0,53 | -5,75 | -29,36 |
| Cel_9 | -36,25 | 10,83 | 3,61 | -0,47 | -5,67 | -27,96 |
| Cel_10 | -34,88 | 9,03 | 3,54 | -1,2 | -5,41 | -28,92 |
| Cel_11 | -35,8 | 10,03 | 3,82 | -0,88 | -5,35 | -28,18 |
| Cel_12 | -34,5 | 9,59 | 2,78 | -0,3 | -6,38 | -28,81 |
| Cel_13 | -35,59 | 9,96 | 3,49 | -1,06 | -5,51 | -28,71 |
| Cel_14 | -33,22 | 9,38 | 3,61 | -1,48 | -5,26 | -26,97 |
| Cel_15 | -37,01 | 10,62 | 3,23 | -0,15 | -5,82 | -29,12 |
| Cel_16 | -26,4 | 8,54 | 3,36 | -5,13 | -5,36 | -24,98 |
| Cel_17 | -35,9 | 10,07 | 3,62 | -0,68 | -5,58 | -28,47 |
| Cel_18 | -36,01 | 10,43 | 3,42 | -0,34 | -5,63 | -28,13 |
| Cel_19 | -34,5 | 7,8 | 2,38 | -0,4 | -6,05 | -30,78 |
| Cel_20 | -36,53 | 10,47 | 3,42 | -0,6 | -5,69 | -28,93 |

| | VDW | ELEC_R | ELEC_L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Ce2_1 | -40,01 | 11,13 | 3,29 | -0,74 | -6,28 | -32,6 |
| Ce2_2 | -39,34 | 12,72 | 3,74 | -0,6 | -6,44 | -29,93 |
| Ce2_3 | -38,76 | 11,42 | 3,12 | -0,52 | -6,07 | -30,8 |
| Ce2_4 | -31 | 8,07 | 3,41 | -3,25 | -5,52 | -28,3 |
| Ce2_5 | -33,15 | 9,04 | 3,4 | -2,22 | -5,73 | -28,65 |
| Ce2_6 | -33,64 | 10,08 | 3,85 | -2,01 | -5,9 | -27,62 |
| Ce2_7 | -34,55 | 9,97 | 3,63 | -1,99 | -5,88 | -28,82 |
| Ce2_8 | -38,48 | 10,68 | 3,14 | -0,78 | -6,14 | -31,58 |
| Ce2_9 | -32,78 | 10,17 | 4,19 | -3,07 | -5,84 | -27,34 |
| Ce2_10 | -32,21 | 9,35 | 3,28 | -3,06 | -5,57 | -28,21 |
| Ce2_11 | -30,89 | 8,89 | 3,54 | -2,59 | -5,44 | -26,49 |
| Ce2_12 | -30,53 | 9,26 | 3,31 | -3,37 | -5,26 | -26,59 |
| Ce2_13 | -39,07 | 8,69 | 3,82 | -0,45 | -5,82 | -32,83 |
| Ce2_14 | -34,08 | 8,8 | 3,51 | -2,56 | -5,81 | -30,13 |
| Ce2_15 | -29,76 | 7,84 | 3,54 | -3,48 | -5,5 | -27,36 |
| Ce2_16 | -36,76 | 10,33 | 3,18 | -1,11 | -6,19 | -30,55 |
| Ce2_17 | -30,98 | 10,41 | 3,48 | -3,58 | -5,29 | -25,97 |
| Ce2_18 | -29,82 | 7,68 | 3,21 | -3,43 | -5,28 | -27,64 |
| Ce2_19 | -30,41 | 7,91 | 3,47 | -3,14 | -5,26 | -27,43 |
| Ce2_20 | -29,05 | 7,57 | 3,1 | -3,54 | -5,19 | -27,11 |

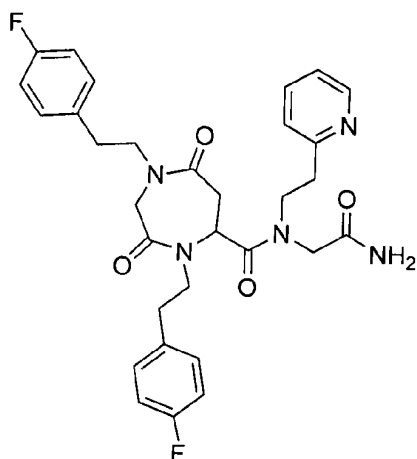
TABLE 6. Cálculos de energías para el compuesto N15-37-9C, familia D. Se muestran los resultados para las 20 mejores conformaciones para cada uno de los dos enantiómeros.

| | VDW | ELEC R | ELEC L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| D_1_1 | -34,68 | 9,24 | 2,9 | -3,31 | -6,09 | -31,94 |
| D_1_2 | -32,55 | 9,33 | 2,71 | -3,49 | -5,92 | -29,93 |
| D_1_3 | -31,8 | 9,65 | 2,94 | -3,91 | -5,99 | -29,11 |
| D_1_4 | -31,82 | 9,87 | 2,99 | -3,5 | -6,02 | -28,48 |
| D_1_5 | -32,24 | 9,17 | 2,96 | -3,09 | -5,85 | -29,04 |
| D_1_6 | -30,55 | 8,38 | 2,91 | -3,59 | -5,96 | -28,61 |
| D_1_7 | -32,45 | 9,35 | 2,89 | -2,7 | -5,95 | -28,85 |
| D_1_8 | -30,82 | 8,8 | 2,85 | -3,29 | -5,8 | -28,25 |
| D_1_9 | -34,65 | 11,15 | 3,33 | -1,78 | -5,85 | -27,8 |
| D_1_10 | -33,07 | 9,56 | 2,78 | -1,95 | -6,17 | -28,85 |
| D_1_11 | -34,8 | 10,71 | 2,32 | -2,65 | -6,03 | -30,45 |
| D_1_12 | -37,51 | 11,5 | 3,34 | 0,18 | -6,55 | -29,03 |
| D_1_13 | -34,19 | 10,84 | 2,6 | -2,88 | -6 | -29,61 |
| D_1_14 | -36,24 | 10,97 | 2,31 | -0,24 | -6,08 | -29,28 |
| D_1_15 | -29,39 | 9,1 | 3,01 | -3,97 | -6,08 | -27,33 |
| D_1_16 | -32,13 | 8,83 | 2,66 | -2,11 | -5,87 | -28,63 |
| D_1_17 | -30,16 | 9,61 | 2,58 | -3,09 | -5,52 | -26,58 |
| D_1_18 | -29,86 | 8,87 | 2,63 | -3,15 | -5,75 | -27,26 |
| D_1_19 | -37,1 | 8,52 | 2,3 | -0,38 | -6,37 | -33,03 |
| D_1_20 | -30,85 | 8,89 | 2,8 | -2,71 | -5,86 | -27,74 |

| | VDW | ELEC R | ELEC L | COULOMB | APOLAR | TOTAL |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| D_2_1 | -39,67 | 10,87 | 2,76 | 0,29 | -6,35 | -32,11 |
| D_2_2 | -38,76 | 10,86 | 2,94 | -0,45 | -6,5 | -31,9 |
| D_2_3 | -32,13 | 9,2 | 3,03 | -2,01 | -5,88 | -27,79 |
| D_2_4 | -35,8 | 9,4 | 3,29 | -0,48 | -6,26 | -29,84 |
| D_2_5 | -34,36 | 9,33 | 3,15 | -1,33 | -5,97 | -28,98 |
| D_2_6 | -32,14 | 9,5 | 2,31 | -1,64 | -5,64 | -27,61 |
| D_2_7 | -31,83 | 9,52 | 2,49 | -1,91 | -5,63 | -27,36 |
| D_2_8 | -34,02 | 10,09 | 3,04 | -1,27 | -6,06 | -28,21 |
| D_2_9 | -34,52 | 10,66 | 2,82 | -0,98 | -5,85 | -27,87 |
| D_2_10 | -30,44 | 9,09 | 2,28 | -2,01 | -5,65 | -26,74 |
| D_2_11 | -37,62 | 8,62 | 2,66 | 0,27 | -6,32 | -32,39 |
| D_2_12 | -38,48 | 8,4 | 2,69 | 0,28 | -6,37 | -33,49 |
| D_2_13 | -37,27 | 10,44 | 2,87 | 0,09 | -6,48 | -30,34 |
| D_2_14 | -37,5 | 10,01 | 3,53 | 0,35 | -6,29 | -29,92 |
| D_2_15 | -31,9 | 9,62 | 2,36 | -1,53 | -5,6 | -27,05 |
| D_2_16 | -33,12 | 10,04 | 3,38 | -1,01 | -5,49 | -26,2 |
| D_2_17 | -33,26 | 9,26 | 2,98 | -0,64 | -5,72 | -27,39 |
| D_2_18 | -35,45 | 10,42 | 2,26 | -0,05 | -6,2 | -29,02 |
| D_2_19 | -31,57 | 10,18 | 2,24 | -1,36 | -5,73 | -26,24 |
| D_2_20 | -31,96 | 7,6 | 2,37 | -1,48 | -5,42 | -28,88 |

Ejemplo 3. Síntesis de los compuestos cíclicos con mejor encaje teórico (*docking*) sobre la superficie de UBC13 que interacciona con UEV1. Compuestos Ia y Ib.

3.1.- Compuesto Ia (Varubin): *N*-aminocarbamoilmetil-*N*-(2'-
5 (2''piridil)etil)-1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-
dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida



10 La síntesis del compuesto Ia se ilustra en esta
solicitud de patente. La resina de amida Rink (400 mg, 0.3
mmol) se trató con 3 mL de piperidina al 20% en
dimetilformamida y la mezcla se agitó en un reactor de
microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtró y
15 lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico
(3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trató
con una solución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y
N,N'-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en
dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó
20 durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La
resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL),
alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3
mL). Se añadió a la resina una disolución de *N*-[2-2'-

(piridin-2-il)etilamina (180 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con una solución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (obtenido con un rendimiento del 85% a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min por duplicado.

La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Posteriormente, se añadió a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se repitió durante 16 h a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL),

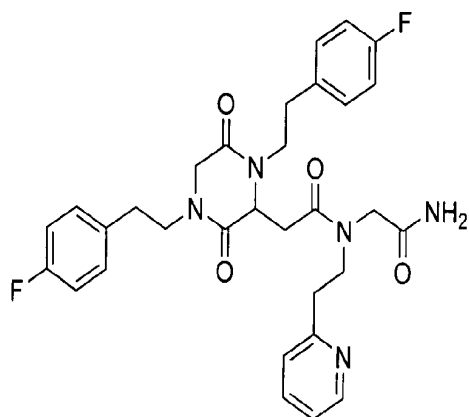
alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añadió a la resina una solución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se
5 agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se descartó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (35 mg,
10 0.1 eq.) y fenilsilano (370 µL, 10 eq.) en diclorometano anhidro durante 15 min a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argon. Este procedimiento se repitió tres veces. Se descartó el sobrenadante y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico
15 (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La ciclación se llevó a cabo mediante tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (235 mg, 1.5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (61 mg, 1.5 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (154 µL, 3 eq.) en dimetilformamida (3
20 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua
25 (60:40:2) liberó una mezcla de reacción que contenía el compuesto Ia. Esta mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron mediante evaporación bajo presión reducida seguida de liofilización. El residuo se purificó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de

acetonitrilo-agua (acetonitrilo 20% → acetonitrilo 80%, 30 min), proporcionando 52 mg del producto deseado (rendimiento 30%, ≥ 98% pureza).

HRMS-FAB: C₃₁H₃₃F₂N₅O₄ calcd [M+H⁺] 578.257886; observado
5 578.257844.

3.2.- Compuesto Ib: [1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)carbonilmetil]piperazina-3,6-diona

10



La síntesis del compuesto Ib se muestra en el esquema II. Todas las reacciones en fase sólida se llevaron a cabo
15 por duplicado. La resina amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trató con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida, agitándose la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min a 60°C. La resina se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y
20 diclorometano (3 x 3 mL). Se trató la resina con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min a 60

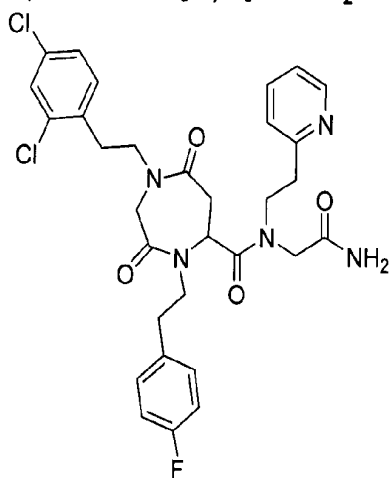
°C en un reactor de microondas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Seguidamente, se añadió a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina
5 (200 µL, 5 eq.), y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3
10 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trató con una disolución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (preparado con un rendimiento del 85% de rendimiento a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234
15 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtró y la resina se lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol
20 isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). A continuación, se añadió a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se
25 agitó durante 16 h a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante, el residuo se filtró y se lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Finalmente, la resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético /

diclorometano /agua (60:40:2) durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de hidrólisis se filtró, los filtrados se agruparon y los disolventes se eliminaron mediante evaporación a baja presión. La posterior ciclación se
5 consiguió mediante tratamiento del anterior residuo con 4 mL de dioxano durante 30 min en condiciones de reflujo (controlado por HPLC). A continuación, se añadió una solución de hidróxido sódico 4 N y alcohol alílico (1:2, 1.5 mL), agitándose la mezcla durante 30 min con reflujo
10 (controlado por HPLC). La mezcla de reacción se acidificó con ácido clorhídrico 1 N y se evaporó el disolvente. El residuo resultante se extrajo con 2 x 10 mL de acetat de etilo, secándose sobre sulfato magnésico anhidro y concentrado al vacío. El disolvente se eliminó por
15 concentración al vacío, produciéndose el intermediario dicetopiperacina (90 mg, 72%) en forma de un sólido incoloro. Este material se utilizó en el siguiente paso sin ulterior purificación.

La resina que contiene el fragmento *N*-alquilglicina
20 fue sintetizada siguiendo un procedimiento similar al descrito arriba. De forma resumida, este fragmento se obtuvo mediante tratamiento de la resina (290 mg, 0.22 mmol) con piperidina al 20% en dimetilformamida, seguido de acilación con ácido bromoacético (153 mg, 5 eq.) y *N,N'*-
25 diisopropilcarbodiimida (175 μ L, 5 eq.), y acoplamiento de la amina con *N*-[2-2'-(piridin-2-il)etilamina (135 μ L, 5 eq.) en presencia de trietilamina (155 μ L, 5 eq.). A continuación, el intermediario dicetopiperazínico (90.0 mg, 1 eq.) se acopló a la resina en presencia de 1-

hidroxibenzotriazol (45 mg, 1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (55 μ L, 1.5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La resina seca se lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de 60:40:2 ácido trifluoroacético / diclorometano / agua produjo una mezcla de reacción que contenía el compuesto Ib. Este se filtró y los disolventes se eliminaron mediante evaporación a baja presión, seguido de liofilización. El residuo obtenido se purificó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo-agua (acetonitrilo al 30% \rightarrow acetonitrilo al 45%, 30 min) para proporcionar 57 mg del producto deseado (rendimiento 33 %, \geq 98% pureza). HRMS-FAB: $C_{31}H_{33}F_2N_5O_4$ calcd $[M+H^+]$ 578.2501; observado 578.2573.

Ejemplo 3.3. Compuesto *N*-aminocarbamoilmetil-*N*-(2'-(2''-piridil)etil)-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida.

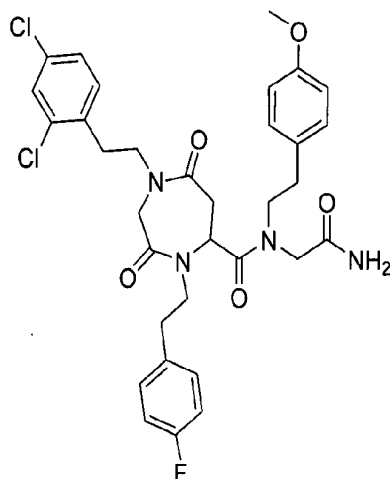


La resina de amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida y la mezcla se agita en un reactor de microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una solución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una disolución de *N*-[2-2'-(piridin-2-il)etilamina (180 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con una solución de ácido (*Z*)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (obtenido con un rendimiento del 85% a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min por duplicado. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Posteriormente, se añade a la resina una disolución de

2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se repite durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una solución de 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (240 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se descarta el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (35 mg, 0.1 eq.) y fenilsilano (370 μ L, 10 eq.) en diclorometano anhidro durante 15 min a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argon. Este procedimiento se repite tres veces. Se descarta el sobrenadante y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La ciclación se lleva a cabo mediante tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (235 mg, 1.5

eq.), 1-hidroxibenzotriazol (61 mg, 1.5 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (154 μ L, 3 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua (60:40:2) libera una mezcla de reacción que contiene el compuesto deseado. Esta mezcla se filtra y los disolventes se elimina mediante evaporación bajo presión reducida seguida de liofilización. El residuo se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetronitrilo-agua.

15 **Ejemplo 3.4. Compuesto *N*-aminocarbamoilmetil-*N*-(2'-(4''-metoxifenil)etil)-1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida.**



20 La resina de amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida y la mezcla se agita en un reactor de microondas durante 2 min a

60 °C. La resina se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una solución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una disolución de 2-(4'-metoxifenil)etilamina (235 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con una solución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (obtenido con un rendimiento del 85% a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min por duplicado. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Posteriormente, se añade a la resina una disolución de *N*-2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente.

La reacción se repite durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina

5 se trata con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL),

10 alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una solución de 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (240 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas.

15 Se descarta el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (35 mg, 0.1 eq.) y fenilsilano (370 µL, 10 eq.) en diclorometano

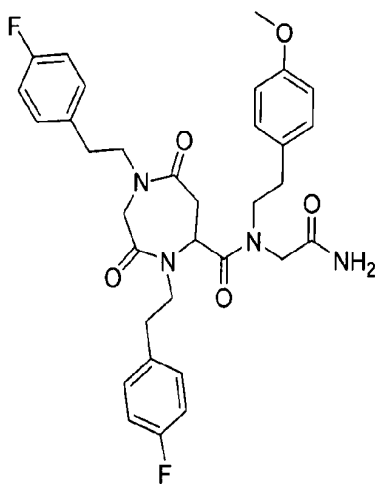
20 anhidro durante 15 min a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argon. Este procedimiento se repite tres veces. Se descarta el sobrenadante y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La ciclación se

25 lleva a cabo mediante tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (235 mg, 1.5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (61 mg, 1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropiletetilamina (154 µL, 3 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente

durante 3 h. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético /
 5 diclorometano /agua (60:40:2) libera una mezcla de reacción que contiene el compuesto deseado. Esta mezcla se filtra y los disolventes se elimina mediante evaporación bajo presión reducida seguida de liofilización. El residuo se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa
 10 aplicando un gradiente de acetronitrilo-agua.

Ejemplo 3.5. Compuesto *N*-aminocarbamoilmetil- *N*-(2'-(4'-metoxifenil)etil)-1,4-bis[2'-(4'-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida.

15



La resina de amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida y la mezcla se agita en un reactor de microondas durante 2 min a
 20 60 °C. La resina se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una solución de ácido

bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una disolución de 2-(4'-metoxifenil)etilamina (235 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas.

10 Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con una solución de ácido (*Z*)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (obtenido con un rendimiento del 85% a partir de

15 anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se

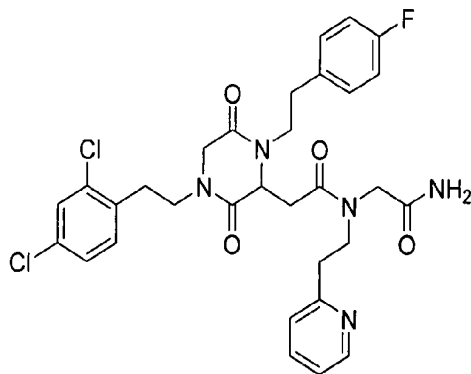
20 agita a temperatura ambiente durante 30 min por duplicado. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Posteriormente, se añade a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μ L, 5 eq.) y trietilamina

25 (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se repite durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3

mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trata con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita 5 durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añade a la resina una solución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 10 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se descarta el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina 15 se trata con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (35 mg, 0.1 eq.) y fenilsilano (370 µL, 10 eq.) en diclorometano anhidro durante 15 min a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argón. Este procedimiento se repite tres veces. Se descarta el sobrenadante y el residuo se filtra y 20 lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La ciclación se lleva a cabo mediante tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (235 mg, 1.5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (61 mg, 1.5 eq.) y *N,N*-diisopropiletetilamina (154 µL, 3 eq.) en dimetilformamida (3 25 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de

la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético /
 diclorometano /agua (60:40:2) libera una mezcla de reacción
 que contiene el compuesto deseado. Esta mezcla se filtra y
 los disolventes se elimina mediante evaporación bajo
 5 presión reducida seguida de liofilización. El residuo se
 purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa
 aplicando un gradiente de acetronitrilo-agua.

Ejemplo 3.6. Compuesto 1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-
 10 **[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-(2'-**
(2''piridil)etil) carbonilmetil] piperazina-3,6-diona.



Todas las reacciones en fase sólida se llevan a cabo
 15 por duplicado. La resina amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se
 trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida,
 agitándose la mezcla en un reactor de microondas durante 2
 min a 60 °C. La resina se filtra y lava con
 dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3
 20 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Se trata la resina con una
 disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-
 diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida
 (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60
 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava

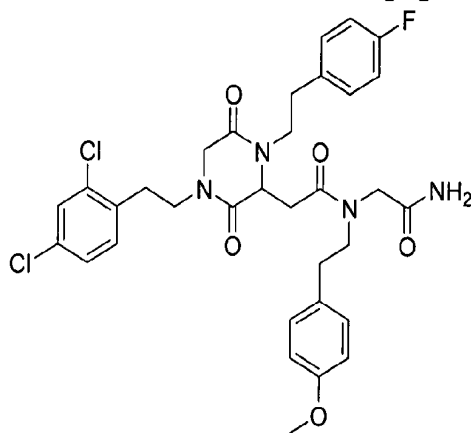
con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Seguidamente, se añade a la resina una disolución de 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (240 µL, 5 eq.), y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de
5 dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una
10 disolución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (preparado con un rendimiento del 85% de rendimiento a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y N,N'-
15 diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtra y la resina se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). A
20 continuación, se añade a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se agita durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el
25 sobrenadante, el residuo se filtra y se lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Finalmente, la resina se trata con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano /agua (60:40:2) durante 30 min a temperatura

ambiente. La mezcla de hidrólisis se filtra, los filtrados se agrupan y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión. La posterior ciclación se consigue mediante tratamiento del anterior residuo con 4 mL
5 de dioxano durante 30 min en condiciones de reflujo (controlado por HPLC). A continuación, se añade una solución de hidróxido sódico 4 N y alcohol alílico (1:2, 1.5 mL), agitándose la mezcla durante 30 min con reflujo (controlado por HPLC). La mezcla de reacción se acidifica
10 con ácido clorhídrico 1 N y se evapora el disolvente. El residuo resultante se extrae con 2 x 10 mL de acetato de etilo, secándose sobre sulfato magnésico anhidro y concentrado al vacío. El disolvente se elimina por concentración al vacío, produciéndose el intermediario
15 dicetopiperacina. Este material se utiliza en el siguiente paso sin posterior purificación.

La resina que contiene el fragmento *N*-alquilglicina se sintetiza siguiendo un procedimiento similar al descrito arriba. De forma resumida, este fragmento se obtiene
20 mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en dimetilformamida, seguido de acilación con ácido bromoacético (5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (5 eq.), y acoplamiento de la amina con *N*-[2-2'-(piridin-2-il)etilamina (5 eq.) en presencia de trietilamina (5 eq.).
25 A continuación, el intermediario dicetopiperazínico (1 eq.) se acopla a la resina en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (1.5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La

resina seca se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de 60:40:2 ácido trifluoroacético / diclorometano / agua produce una mezcla de reacción que contiene el compuesto deseado. Este se filtra y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión, seguido de liofilización. El residuo obtenido se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo-agua.

Ejemplo 3.7. Compuesto 1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-(2'-(4''-metoxifenil)etil) carbonilmetil] piperazina-3,6-diona.



15

Todas las reacciones en fase sólida se llevan a cabo por duplicado. La resina amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida, agitándose la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Se trata la resina con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-

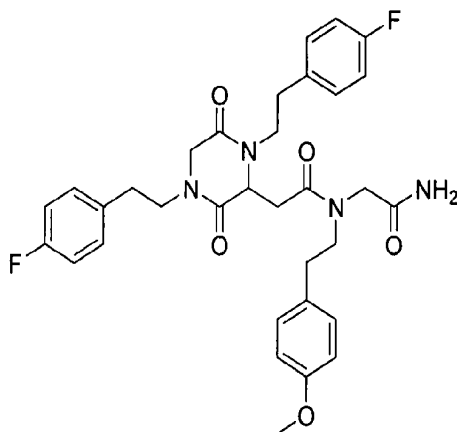
diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Seguidamente, se añade a la resina una disolución de 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (240 μ L, 5 eq.), y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una disolución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (preparado con un rendimiento del 85% de rendimiento a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μ L, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtra y la resina se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). A continuación, se añade a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μ L, 5 eq.) y trietilamina (210 μ L, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se agita durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el sobrenadante, el residuo se filtra y se lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3

mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Finalmente, la resina se trata con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua (60:40:2) durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de hidrólisis se filtra, los filtrados
5 se agrupan y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión. La posterior ciclación se consigue mediante tratamiento del anterior residuo con 4 mL de dioxano durante 30 min en condiciones de reflujo (controlado por HPLC). A continuación, se añade una
10 solución de hidróxido sódico 4 N y alcohol alílico (1:2, 1.5 mL), agitándose la mezcla durante 30 min con reflujo (controlado por HPLC). La mezcla de reacción se acidifica con ácido clorhídrico 1 N y se evapora el disolvente. El residuo resultante se extrae con 2 x 10 mL de acetato de
15 etilo, secándose sobre sulfato magnésico anhidro y concentrado al vacío. El disolvente se elimina por concentración al vacío, produciéndose el intermediario dicetopiperacina. Este material se utiliza en el siguiente paso sin posterior purificación.

20 La resina que contiene el fragmento *N*-alquilglicina se sintetiza siguiendo un procedimiento similar al descrito arriba. De forma resumida, este fragmento se obtiene mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en dimetilformamida, seguido de acilación con ácido
25 bromoacético (5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (5 eq.), y acoplamiento de la amina con 2-(4'-metoxifenil)etilamina (5 eq.) en presencia de trietilamina (5 eq.). A continuación, el intermediario dicetopiperazínico (1 eq.) se acopla a la resina en

presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (1.5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La resina seca se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de 60:40:2 ácido trifluoroacético / diclorometano / agua produce una mezcla de reacción que contiene el compuesto deseado. Este se filtra y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión, seguido de liofilización. El residuo obtenido se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo-agua.

Ejemplo 3.8. Compuesto 1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[*N*-aminocarbonilmetil-*N*-(2'-(4''-metoxifenil)etil)carbonilmetil]piperazina-3,6-diona.



Todas las reacciones en fase sólida se llevan a cabo por duplicado. La resina amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trata con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida, agitándose la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtra y lava con

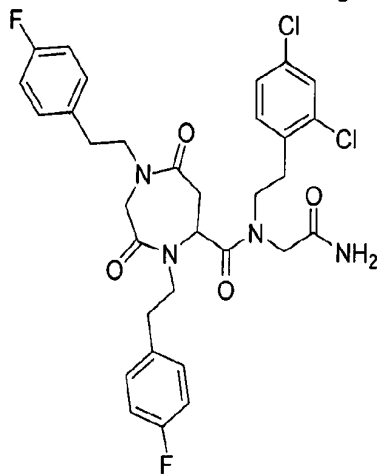
dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Se trata la resina con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtra y lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Seguidamente, se añade a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.), y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se elimina el sobrenadante, y el residuo se filtra y lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trata con una disolución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (preparado con un rendimiento del 85% de rendimiento a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtra y la resina se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). A continuación, se añade a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agita durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se

agita durante 16 h a la misma temperatura. Se elimina el sobrenadante, el residuo se filtra y se lava con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Finalmente, la resina se
5 trata con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua (60:40:2) durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de hidrólisis se filtra, los filtrados se agrupan y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión. La posterior ciclación se
10 consigue mediante tratamiento del anterior residuo con 4 mL de dioxano durante 30 min en condiciones de reflujo (controlado por HPLC). A continuación, se añade una solución de hidróxido sódico 4 N y alcohol alílico (1:2, 1.5 mL), agitándose la mezcla durante 30 min con reflujo
15 (controlado por HPLC). La mezcla de reacción se acidifica con ácido clorhídrico 1 N y se evapora el disolvente. El residuo resultante se extrae con 2 x 10 mL de acetato de etilo, secándose sobre sulfato magnésico anhidro y concentrado al vacío. El disolvente se elimina por
20 concentración al vacío, produciéndose el intermediario dicetopiperacina. Este material se utiliza en el siguiente paso sin posterior purificación.

La resina que contiene el fragmento *N*-alquilglicina se sintetiza siguiendo un procedimiento similar al descrito
25 arriba. De forma resumida, este fragmento se obtiene mediante tratamiento de la resina (290 mg, 0.22 mmol) con piperidina al 20% en dimetilformamida, seguido de acilación con ácido bromoacético (153 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (175 µL, 5 eq.), y acoplamiento de

la amina con 2-(4'-metoxifenil)etilamina (235 μ L, 5 eq.) en presencia de trietilamina (155 μ L, 5 eq.). A continuación, el intermediario dicetopiperazínico (90.0 mg, 1 eq.) se acopla a la resina en presencia de 1-hidroxibenzotriazol
5 (45 mg, 1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (55 μ L, 1.5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La resina seca se lava con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3
10 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de 60:40:2 ácido trifluoroacético / diclorometano / agua produce una mezcla de reacción que contiene el compuesto deseado. Este se filtra y los disolventes se eliminan mediante evaporación a baja presión, seguido de
15 liofilización. El residuo obtenido se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo-agua.

**Ejemplo 3.9. Compuesto *N*-aminocarbamoilmetil-*N*-[2'-
20 (2'',4''-diclorofenil)etil]-1,4-bis[2'-(4''-
fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida.**



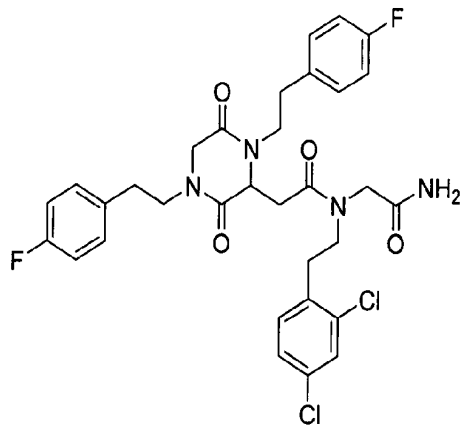
La resina de amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trató con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida y la mezcla se agitó en un reactor de microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trató con una solución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añadió a la resina una disolución de 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (240 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con una solución de ácido (Z)-3-(aliloxicarbonil) acrílico (obtenido con un rendimiento del 85% a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min por duplicado. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Posteriormente, se añadió a la

resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μL , 5 eq.) y trietilamina (210 μL , 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se repitió durante 16 h a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 μL , 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Se añadió a la resina una solución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 μL , 5 eq.) y trietilamina (210 μL , 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se descartó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). A continuación, la resina se trató con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (35 mg, 0.1 eq.) y fenilsilano (370 μL , 10 eq.) en diclorometano anhidro durante 15 min a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argon. Este procedimiento se repitió tres veces. Se descartó el sobrenadante y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La ciclación se llevó a cabo mediante tratamiento con hexafluorofosfato de

benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (235 mg, 1.5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (61 mg, 1.5 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (154 μ L, 3 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua (60:40:2) liberó una mezcla de reacción que contenía el compuesto deseado. Esta mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron mediante evaporación bajo presión reducida seguida de liofilización. El residuo se purificó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetronitrilo-agua (acetronitrilo 20% \rightarrow acetronitrilo 50%, 30 min) proporcionando 77.3 mg del producto deseado (rendimiento 38%, \geq 98% pureza).

ESI-MS: $C_{32}H_{32}Cl_2F_2N_4O_4$ calcd. $[M+H^+]$ 645.2; found: $[M+H^+]$ 645.2.

20 **Ejemplo 3.10. Compuesto [1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[*N*-aminocarbonilmetil-*N*-(2'-(2'',4''-diclorofenil)etil)carbonilmetil]piperazina-3,6-diona.**



Todas las reacciones en fase sólida se llevaron a cabo por duplicado. La resina amida Rink (400 mg, 0.3 mmol) se trató con 3 mL de piperidina al 20% en dimetilformamida, agitándose la mezcla en un reactor de microondas durante 2 min a 60 °C. La resina se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Se trató la resina con una disolución de ácido bromoacético (208 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en dimetilformamida (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min a 60 °C en un reactor de microondas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Seguidamente, se añadió a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.), y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 2 min a 90 °C con activación por microondas. Se eliminó el sobrenadante, y el residuo se filtró y lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). La resina se trató con una disolución de ácido (*Z*)-3-(aliloxicarbonil)acrílico (preparado con un rendimiento del 85% de rendimiento a partir de anhídrido maleico y alcohol alílico en cloroformo durante 50 min a 60 °C con activación por microondas) (234 mg, 5 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (203 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (235 µL, 5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtró y la resina se lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol

isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). A continuación, se añadió a la resina una disolución de 2-(4'-fluorofenil)etilamina (200 µL, 5 eq.) y trietilamina (210 µL, 5 eq.) en 3 mL de dimetilformamida y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 16 h a la misma temperatura. Se eliminó el sobrenadante, el residuo se filtró y se lavó con dimetilformamida (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y diclorometano (3 x 3 mL). Finalmente, la resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético / diclorometano / agua (60:40:2) durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de hidrólisis se filtró, los filtrados se agruparon y los disolventes se eliminaron mediante evaporación a baja presión. La posterior ciclación se consiguió mediante tratamiento del anterior residuo con 4 mL de dioxano durante 30 min en condiciones de reflujo (controlado por HPLC). A continuación, se añadió una solución de hidróxido sódico 4 N y alcohol alílico (1:2, 1.5 mL), agitándose la mezcla durante 30 min con reflujo (controlado por HPLC). La mezcla de reacción se acidificó con ácido clorhídrico 1 N y se evaporó el disolvente. El residuo resultante se extrajo con 2 x 10 mL de acetat de etilo, secándose sobre sulfato magnésico anhidro y concentrado al vacío. El disolvente se eliminó por concentración al vacío, produciéndose el intermediario dicetopiperacina (90 mg, 72%) en forma de un sólido incoloro. Este material se utilizó en el siguiente paso sin ulterior purificación.

La resina que contiene el fragmento *N*-alquilglicina fue sintetizada siguiendo un procedimiento similar al descrito arriba. De forma resumida, este fragmento se obtuvo mediante tratamiento de la resina (290 mg, 0.22 mmol) con
5 piperidina al 20% en dimetilformamida, seguido de acilación con ácido bromoacético (153 mg, 5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (175 μ L, 5 eq.), y acoplamiento de la amina con 2-(2',4'-diclorofenil)etilamina (170 μ L, 5 eq.) en presencia de trietilamina (155 μ L, 5 eq.). A
10 continuación, el intermediario dicetopiperazínico (90.0 mg, 1 eq.) se acopló a la resina en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (45 mg, 1.5 eq.) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (55 μ L, 1.5 eq.) en diclorometano: dimetilformamida (2:1, 3 mL). La mezcla de reacción se
15 agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La resina seca se lavó con diclorometano (3 x 3 mL), alcohol isopropílico (3 x 3 mL) y dimetilformamida (3 x 3 mL). Finalmente, el tratamiento de la resina con una mezcla de 60:40:2 ácido trifluoroacético / diclorometano / agua produjo una mezcla
20 de reacción que contenía el compuesto deseado. Este se filtró y los disolventes se eliminaron mediante evaporación a baja presión, seguido de liofilización. El residuo obtenido se purificó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo-agua
25 (acetonitrilo al 30% \rightarrow acetonitrilo al 45%, 30 min) para proporcionar 71.7 mg del producto deseado (rendimiento 35 %, \geq 99% pureza). ESI-MS: $C_{32}H_{32}Cl_2F_2N_4O_4$ calcd. $[M+H^+]$ 645.2; found: $[M+H^+]$ 645.1.

Ejemplo 4. Efectos de los compuestos Ia y Ib sobre la interacción entre UBC13 y UEV1.

El análisis computacional descrito en el Ejemplo 2 apoya la hipótesis de que los compuestos Ia y Ib encajan con una buena afinidad en el surco hidrofóbico de la superficie de UBC13 utilizado normalmente para su interacción específica con la primera hélice alifática de las proteínas UEV (Mms2p, UEV1 y UEV2). Esto sugiere que dichos compuestos pueden interferir competitivamente con la interacción entre UBC13 y UEV1 (o Mms2p y UEV2). Para demostrarlo experimentalmente, se analizó la capacidad de los compuestos Ia y Ib para inhibir la interacción UBC13-UEV1, utilizando dos tipos de ensayos:

(1) doble híbrido en levaduras para la interacción UBC13-UEV1, aplicando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1; y

(2) interacción entre las proteínas UBC13 y UEV1 en sistemas acelulares, usando proteínas recombinantes producidas en *Escherichia coli*.

El efecto de los compuestos Ia y Ib sobre la interacción UBC13-UEV1 en ensayos de doble híbrido en levaduras se llevó a cabo incubando células de la cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*, crecidas en medio selectivo, con 100 μ M de uno u otro compuesto. Como control positivo de interacción, se usó la de las proteínas p53 y T grande de SV40. La intensidad de las interacciones se determinó colorimétricamente mediante la detección de actividad β -galactosidasa, usando como sustrato *O*-nitrofenil-*p*-galactopiranosido (ONPG), realizándose cada

determinación por triplicado. En estas condiciones, se ilustra en la Figura 5(A) que el compuesto Ia, a una concentración de 100 μ M, inhibe en cerca de un 60% la interacción entre UBC13 y UEV1, mientras que la inhibición de esta interacción por el compuesto Ib es de cerca de un 40%. Ninguno de estos dos compuestos inhibe la interacción, usada como control, entre p53 y T grande, lo que indica que ambos compuestos inhiben de forma específica la interacción entre UBC13 y UEV1. Estos resultados sugieren también que el compuesto Ia inhibe esta interacción con mayor eficacia que el compuesto Ib.

Para determinar la actividad de estos compuestos en ensayos acelulares, se realizaron experimentos de interacción proteína-proteína con proteínas recombinantes producidas en *Escherichia coli*. Para expresar UBC13 y UEV1, se transformaron células bacterianas de la cepa BL21 de *E. coli* los plásmidos pGEX-4T1-UBC13 o pGEX-4T3-UEV1, seleccionándose colonias transformadas mediante crecimiento en placas con ampicilina (100 μ g/mL). Se transfirieron colonias individuales a 3 L de medio LB sin antibióticos, creciéndose en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial (D.O._{600 nm} ~ 0'6), momento en que se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición al cultivo de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma I-6758) a una concentración de 1 mM durante 5 h. Los cultivos se transfirieron a tubos, se centrifugaron y los botones celulares se resuspendieron en el doble de su volumen de suero salino tamponado con fosfatos (PBS) a pH 7.4 y se

rompieron en un instrumento Cell Disruptor (Constant Systems). Los lisados celulares se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa con poros de 45 μ M (Millipore SLHA033SS) y se aplicaron a columnas GSTrap FF (Amersham Biosciences 17-5131-01). En el caso de UEV1, la proteína unida específicamente a la columna fue sometida a digestión enzimática sobre la misma columna con 50 unidades de trombina (Amersham Biosciences 27-0846-01) a 25 °C durante una noche. A la anterior columna se acopló una columna HiTrapBenzamidine FF (Amersham Biosciences 27-0846-01), de tal modo que la unidad GST quedó atrapada en la primera columna, y la trombina en la segunda columna. A continuación se eluyó la proteína UEV1, sin la porción GST, seguido de un paso posterior de purificación mediante cromatografía de filtración en gel con una columna Superdex 75. La proteína recombinante GST-UBC13 se expresó como se indica más arriba, purificándose mediante cromatografía de afinidad en columnas GSTrap FF, seguida de cromatografía de filtración en Superdex 75. Las fracciones correspondientes a las proteínas purificadas se concentraron mediante centrifugación en columnas Centricon YM-10 (Millipore 4205), guardándose a 4 °C hasta su utilización.

Para determinar los efectos de los compuestos Ia y Ib sobre la interacción de UBC13 con UEV1, se pre-incubaron durante 30 min a temperatura ambiente 2 μ L de la proteína recombinante quimérica GST-UBC13, a una concentración de 4'09 μ g/mL en un tampón Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, DTT 0'5 mM a pH 7'6, con los compuestos Varubin, Ib o el compuesto cíclico control VIII-N6-2-1C a concentraciones

5 finales de 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M o 100 μ M. Estas mezclas se inmovilizaron en fase s3lida mediante incubaci3n durante 60 min min con matriz Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences), seguido de lavados con 10 vol3menes de matriz de tamp3n Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, 0'5 mM DTT a pH 7'6. A continuaci3n las columnas se incubaron durante 45 min con 10 μ L de prote3na UEV1 a una concentraci3n de 0'15 μ g/mL en el mismo tamp3n. La prote3na UEV1 no unida a las columnas (fracci3n eluida, o E) fue
10 recogida mediante centrifugaci3n a 14.000 g, lav3ndose a continuaci3n las columnas con 10 vol3menes del tamp3n anterior. A continuaci3n fueron eluidos GST-UBC13 y complejos GST-UBC13-UEV1 mediante incubaci3n con un tamp3n de eluci3n conteniendo 10 mM de glutati3n reducido en Tris-
15 HCl 50 mM pH 8.0 (fracci3n remanente, o B). Las fracciones E y B se concentraron mediante centrifugaci3n en columnas Centricon YM-10, desnaturalizadas mediante ebullici3n en tamp3n Laemmli (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 500 mM DTT, 0'5% bromofenol azul, 50% glicerol, pH 6'8) y se separaron
20 electrofor3ticamente en geles de poliacrilamida al 10% - SDS. Tras la electroforesis, las prote3nas se transfirieron electrofor3ticamente a membranas PVDF, que fueron preincubadas durante 1 h con tamp3n bloqueante (leche desnatada al 5% en PBS pH 7'4 con Tween-20 0'1%), y a
25 continuaci3n incubadas durante 1 h con anticuerpos de conejo anti-UEV1 o anti-UBC13. Estos anticuerpos fueron producidos previamente en nuestro laboratorio mediante inmunizaci3n de conejos con p3ptidos sint3tico correspondientes a secuencias espec3ficas de UEV1 o UBC13,

respectivamente, purificándose los anticuerpos a partir de los sueros inmunes mediante cromatografía de afinidad con columnas sobre las que se inmovilizaron los péptidos inmunizantes [37]. Tras la incubación con estos anticuerpos, las membranas se lavaron tres veces con 20 mL de PBS-Tween-20, y se incubaron durante 30 min con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugados con peroxidasa de rábano (Dako Cytomation) diluido a 1:1000 en tampón bloqueante. Tras tres lavados con PBS-Tween-20, las reacciones sobre las membranas se visualizaron mediante quimioluminiscencia con el sistema ECL (Amersham) y exposición sobre películas autorradiográficas.

Los resultados de este ensayo se ilustran en la Figura 5(B), que muestra que los compuestos Ia y Ib, pero no el compuesto cíclico control VIII-N6-2-1C, inhiben eficientemente la unión de UEV1 a GST-UBC13, ya que hasta un 60% (para el compuesto Ia) o un 40% (para el compuesto Ib) de UEV1 aparece en la fracción eluida y no unida a GST-UBC13. Aunque la Figura 5(B) sólo muestra los resultados del ensayo realizado con 100 μ M de compuestos cíclicos, también se observó una eficiente inhibición de la interacción de UEV1 con UBC13 a concentraciones muy inferiores, de hasta 10 nM de los compuestos Ia y Ib. Teniendo en cuenta que las proteínas UEV1 y UBC13 interaccionan entre sí con gran afinidad ($K_D \approx 5 \times 10^{-10}$ M, constante que se ha determinado en un instrumento Biacore T100), estos resultados sugieren que la inhibición por los compuestos Ia y Ib de la interacción entre UBC13 y UEV1 se

debe a la interacción competitiva de estos compuestos con la superficie de UBC13 normalmente utilizada para su interacción con la primera hélice alifática de UEV1.

5 Ejemplo 5. Efectos del compuesto Ia sobre la poliubiquitilación mediada por UBC13-UEV1.

La inhibición por los compuestos Ia y Ib de la interacción entre UBC13 y UEV1, descrita en el Ejemplo 4, indica que estos compuestos pueden inhibir la actividad enzimática de UBC13. Como se describe en los Antecedentes, la poliubiquitilación del tipo K63 catalizada por UBC13-UEV1 requiere de la interacción entre ambas subunidades del heterodímero. La capacidad del compuesto Ia, el más activo de los 2 compuestos como inhibidor de la interacción entre UBC13 y UEV1, para afectar esta actividad enzimática se analizó mediante ensayos de formación de cadenas libres de poliubiquitina *in vitro*. En este ensayo, se permite la formación de cadenas de poliubiquitina en reacciones que contienen 0'1 μ M de enzima E1 (Boston Biochem), 0'2 μ M de UBC13, 0'2 μ M de UEV1 (producidas tal como se describe en el Ejemplo 4), 117 μ M de ubiquitina silvestre (Biomol UW8795) o mutada en todas las lisinas excepto la lisina en posición 63 (ubiquitina K63) o en la posición 48 (ubiquitina K48; Boston Biochem), en un tampón de reacción con 50 mM de Tris-HC a pH 7'6, 5 mM de MgCl₂ y 0'5 mM de ditiotreitól. Para los tratamientos con el compuesto Ia (Varubin), UBC13 se preincubó durante 10 min a temperatura ambiente con 100 μ M del compuesto antes de añadirse a la reacción. La reacción se inició mediante la adición de 2 mM

de ATP, y se llevó a cabo mediante incubación a 37 °C a diferentes tiempos, deteniéndose mediante la adición de tampón Laemmli (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 500 mM DTT, 0,5% bromofenol azul y 50% glycerol a pH6.8) y ebullición durante 3 min. Las muestras se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron electroforéticamente a membranas PVDF. Se siguió el procedimiento de inmunodetección descrito en el Ejemplo 4, detectándose las moléculas de ubiquitina con anticuerpo de conejo anti-ubiquitina (Biomol UG 9510), y revelándose la reactividad por quimioluminiscencia.

En la Figura 6(A) se muestra que, en ausencia de compuesto Ia, la reacción descrita arriba da lugar a la formación cadenas de poliubiquitinas de tamaño creciente con el tiempo, debido a la adición progresiva de unidades de ubiquitina. En la reacción control se evidencia la aparición de triubiquitina (Ub₃) hacia los 30 minutos de reacción, tetraubiquitina (Ub₄) a los 60 minutos, de pentaubiquitina (Ub₅) a los 90 minutos y de formas de tamaño (o complejidad) superior a tiempos más tardíos. Como se ilustra en la Figura 6(B), el análisis cuantitativo de la generación de las diferentes formas de poliubiquitinas indica que la preincubación de UBC13 con 100 μ M de compuesto Varubin (Ia) causa una menor velocidad de generación de formas poliubiquitiladas. La diferencia significativa en las pendientes de las curvas de las reacciones control y las del tratamiento con compuesto Ia indica también que la inhibición de la actividad enzimática de UBC13-UEV1 por este compuesto es de tipo competitivo.

Esta poliubiquitilación *in vitro* utiliza específicamente la lisina en posición 63 de la molécula de ubiquitina, ya que se produce tanto con la ubiquitina silvestre como cuando en la reacción se usa la ubiquitina K63 (Figura 6(C)), pero no
5 cuando en su lugar se usa ubiquitina 48. Además, la preincubación de UBC13 con el compuesto Ia inhibe la poliubiquitilación que usa como sustrato ubiquitina K63 con una eficiencia semejante a cuando el sustrato es ubiquitina silvestre (Figura 6(C)). La conclusión, por
10 tanto, es que el compuesto Ia inhibe eficientemente la poliubiquitilación de tipo K63 catalizada *in vitro* por UBC13-UEV1.

**Ejemplo 6. Actividades biológicas de los compuestos Ia y
15 Ib. Actividad en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

En la levadura *S. cerevisiae*, la poliubiquitilación de tipo K63, mediada por Ubc13p-Mms2p, de la proteína PCNA es crucial para la reparación postreplicativa de ADN en la subruta de RAD6 llamada de "reparación libre de error" [7-
20 17]. En esta ruta, tanto UBC13 como MMS2 son epistáticas respecto a RAD6, aunque con la peculiaridad de que la delección de UBC13, pero no MMS2, rescata parcialmente el fenotipo *rad6*. [14]. Ambos genes son sinérgicos con mutantes de la segunda subruta de reparación regulada por
25 RAD6, la llamada de "reparación tendente al error", o mutagénica, en que participan REV3, REV7 y REV1. Esta sinergia se manifiesta por el hecho de que la pérdida de UBC13 o MMS2 produce una mayor sensibilización de mutantes *rev3* a daños genotóxicos tales como irradiación

ultravioleta o la exposición a metil-metano sulfonato (MMS) [13-15].

Para determinar si los compuestos Ia y Ib inhiben la función de Ubc13p-Mms2p, se evaluó su capacidad de mimetizar en *S. cerevisiae* los fenotipos de reparación de ADN generados por la mutación nula de *ubc13*. Así, se utilizaron cepas mutantes en RAD6 o REV3 y su cepa parental (control) en ensayos de viabilidad tras la exposición a radiación ultravioleta o MMS. Los genotipos de las cepas usadas son los siguientes:

1) Cepa parental (control) BY4741: MAT a his3 \square 1 leu2 \square 0 lys2 \square 0 ura3 \square 0

2) Cepa \square rad6: MAT a his3 \square 1 leu2 \square 0 lys2 \square 0 ura3 \square 0 rad6::kanMX4

3) Cepa \square rev3: MAT a his3 \square 1 leu2 \square 0 lys2 \square 0 ura3 \square 0 rev3::kanMX4

Se inocularon células en cultivos líquidos con medio YPD durante una noche a 30 °C, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Para los tratamientos con radiación ultravioleta, alícuotas de células, crecidas en presencia o no de 100 \square M de los compuestos Ia o Ib fueron irradiadas en un instrumento Stratalinker (Stratagene) a las energías indicadas en las Figuras 7 y 8. Para los tratamientos con el agente mutagénico MMS, se incubaron alícuotas de células crecidas o no en medio con 100 \square M de los compuestos Ia o Ib, añadiéndose MMS al 0'03%, con incubación posterior durante los tiempos indicados en las Figuras 7 y 8. Tras uno u otro tratamiento, se sembraron

500 células en placas con medio YPD, procediendo al recuento de colonias al cabo de 2 días.

Tal como se esperaba, en estos ensayos los mutantes $\Delta rad6$ presentan una alta sensibilidad tanto a irradiación UV como a MMS, con un rápido descenso de la supervivencia a medida que se aumentan las dosis de los agentes mutágenos (**Figura 7**). Sin embargo, la presencia de 100 μM de compuesto Ia o compuesto Ib rescató claramente el fenotipo $rad6$ inducido por irradiación UV, y, en menor grado, el fenotipo generado por el tratamiento con MMS (Figura 7). Este es un fenotipo característico de mutantes $\Delta ubc13$, y por tanto los compuestos Ia y Ib mimetizan este fenotipo, sugiriendo que actúan a través de la inhibición de UBC13. Por otra parte, la incubación de los mutantes $\Delta rev3$ con el compuesto Ia y, en menor medida, el compuesto Ib, produjo una mayor sensibilización de las células a los efectos de la radiación UV o la exposición al MMS, con una sinergia semejante al de una mutación $\Delta ubc13$ (Figura 8). Por tanto, los dos fenotipos analizados indican que los compuestos Ia y Ib afectan la ruta de reparación de ADN regulada por RAD6, y que lo hacen mediante la inhibición de Ubc13p.

Ejemplo 7. Actividades biológicas de los compuestos Ia y Ib. Inhibición de la estimulación del factor transcripcional NF- κ B por TNF.

Tal como se describe en los Antecedentes, una de las rutas bioquímicas reguladas por poliubiquitilación tipo K63, catalizada por UBC13-UEV1 (o UBC13-UEV2), es la

activación del factor transcripcional NF- κ B por señales inducidas por citoquinas, TNF α y otros polipéptidos.

Para determinar la actividad de los compuestos Ia y Ib sobre la estimulación de la actividad NF- κ B por TNF α se llevaron a cabo ensayos de inducción de actividad luciferasa (determinada con el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System, de Promega, número de catálogo E1910) generada por expresión del gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) dirigida por un promotor que contiene tres sitios de reconocimiento para NF- κ B. Para ello, se cotransfectaron células HeLa con el plásmido pRL-TK, que codifica para la Luciferasa de *Renilla reniformis* y es un control de eficiencia de transfección, y el plásmido prLUC, plásmido que permite determinar la actividad de transcripcional de NF- κ B, usando como vehículo de transfección Fugene (Roche). Se sembraron 100.000 células en placas de 6 pocillos (Costar). Al día siguiente, se procedió a formar el complejo de transfección con 0'5 μ g de cada plásmido y 3 μ l de Fugene durante 15 minutos. El complejo se añadió a las células en medio Optimem (Invitrogen), y al cabo de 5 horas se cambió a medio completo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium con suero fetal bovino al 10%, 2 mM de glutamina, suplementado con penicilina y estreptomina), al que se añadió, o no, compuesto Varubin (Ia) o Ib a distintas concentraciones. Al día siguiente, las células se incubaron con TNF α (10 ng/mL) durante 4 h, tras lo cual se lavaron con suero salino tamponado con fosfatos (PBS) y se lisaron con 250 μ L de tampón de lisis, siguiendo las indicaciones del fabricante

(Promega). Al lisado se añadieron 100 μ L de reactivo de luciferasa (LARII) para medir la actividad luciferasa de luciérnaga, tras lo cual se paró la reacción con 100 μ L de tampón de parada con sustrato para luciferasa de *Renilla reniformis*, determinándose en ese momento esta segunda actividad. La actividad luciferasa de luciérnaga se normalizó en relación a la actividad luciferasa de *Renilla*. Los valores correspondientes a células transfectadas pero no estimuladas con TNF α se usaron como normalizadores para el resto de valores experimentales. Finalmente, se realizó una tercera normalización en que todos los valores se reflejan en relación a los valores de inducción de actividad luciferasa por TNF α , sin añadir los fármacos objeto de la presente invención (control TNF α).

En la Figura 9 se muestra que la preincubación de células HeLa con compuesto Ia o compuesto Ib inhibe de forma dependiente de dosis la estimulación de la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF α . Esta inhibición es mayor con el compuesto Ia que con el compuesto Ib, llegando a una inhibición de cerca del 50% de la activación de NF- κ B por TNF α cuando las células HeLa se preincuban con Varubin (Ia) a una concentración de 100 μ M. Por tanto, los compuestos Ia y Ib son eficientes inhibidores de la activación de NF- κ B, con lo que serán de aplicación en procesos en que esta activación es importante, incluyendo procesos inflamatorios y neoplásicos.

Ejemplo 8. Actividades biológicas de los compuestos Ia y Ib. Sensibilización de células tumorales a los efectos citotóxicos de la doxorubicina y el etopósido.

La activación del factor transcripcional NF- κ B es uno
5 de los mecanismos de supervivencia de células normales y
tumorales cuando se les somete a diferentes formas de
estrés o daño [44-47]. Por ello, una de las consecuencias
de la inhibición de la activación de este factor
transcripcional es que produce una mayor sensibilidad a los
10 efectos citotóxicos de diversos agentes, físicos o
químicos, que causan daño genotóxico u otro tipo de estrés
celular. Por tanto, la incubación de células con los
compuestos Ia o Ib, debido en parte a su capacidad para
inhibir la activación de NF- κ B, podría causar una
15 sensibilización celular a los efectos de agentes
quimioterápicos tales como doxorubicina o etopósido. Es
decir, la combinación de doxorubicina o etopósido (a
determinadas dosis) con compuesto Ia o Ib debería causar un
efecto citotóxico mayor que la doxorubicina o el etopósido
20 por sí solos y semejante al que puedan causar dosis
superiores de doxorubicina o etopósido, respectivamente.

Para demostrar experimentalmente esta predicción, se
realizaron experimentos de recuentos de células mediante el
procedimiento CyQuant (Molecular Probes, núm. cat. C-7026).
25 Este método de cuantificación de células se basa en un
compuesto cuya fluorescencia es estimulada
cuantitativamente tras unirse a ácidos nucleicos. Se
sembraron 10.000 células en cada pocillo de placas de 96
pocillos, permitiendo su adhesión a la superficie de las

placas durante una noche a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, tras lo cual las células fueron sometidas a los distintos tratamientos. Al finalizar los tratamientos experimentales, los pocillos se lavaron una
5 vez con suero salino tamponado con fosfatos (PBS), congelándose a continuación las placas a -70 °C hasta el momento de realizar el ensayo CyQuant. Para la cuantificación, las placas se descongelaron a temperatura ambiente y a cada pocillo se añadieron 200 μ L de tampón de
10 lisis que contenía el colorante CyQuant GR (siguiendo indicaciones del fabricante). Tras incubar a temperatura ambiente durante 2-5 minutos, se procedió a cuantificar la fluorescencia emitida a 480 nm y 520 nm. Para el cálculo del número de células correspondiente a las lecturas
15 fluorimétricas, se generaron rectas patrón de fluorescencia emitida según números conocidos de células, y se utilizaron estos datos para extrapolar los datos experimentales.

Como se muestra en la Figura 10, se trataron células HeLa (procedentes de un carcinoma de cérvix) o PC-3
20 (procedentes de un carcinoma de próstata) con etopósido y doxorubicina, respectivamente, a concentraciones de entre 0'05 μ M hasta 50 μ M, añadiendo, o no, 100 μ M de compuesto Ia. Del gráfico de la Figura 10 puede deducirse que la IC50 para doxorubicina es en células PC-3 de cerca de 0'5 μ M a
25 las 72 h de tratamiento, y la IC50 para etopósido es en células HeLa de aproximadamente 1'25 μ M a las 24 h de tratamiento. La adición de 100 μ M de Ia redujo la IC50 de doxorubicina hasta 0'1 μ M para células PC-3 y la IC50 de etopósido hasta 0'04 μ M para células HeLa. Por tanto, el

tratamiento con 100 μ M de compuesto Ia produce una sensibilización a los efectos citotóxicos de la doxorubicina de entre 5 veces (células PC-3) y una sensibilización a los efectos citotóxicos de etopósido de 5 30 veces (células HeLa).

Ejemplo 9. Actividad antitumoral del compuesto Ia (Varubin) como quimiosensibilizante en modelos murinos de xenoinjertos de células tumorales humanas.

10 Con el fin de determinar si Varubin presenta una actividad antitumoral *in vivo*, se analizaron sus efectos en ratones portadores de tumores formados a partir de células PC-3. Los tumores experimentales se formaron mediante la inoculación intramuscular de células PC-3.luc [48]. Estas
15 últimas son células prostáticas PC-3 en las que se han integrado mediante transfección del plásmido pRC/CMV-luc, que expresa en células de mamífero el gen para la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). La incubación de las células PC-3.luc con D-luciferina, sustrato de la
20 luciferasa, produce luz, que se puede cuantificar de forma absoluta (número de fotones) bien mediante un luminómetro, o bien mediante detección con una cámara CCD (charge-coupled device). Este último procedimiento permite, además, representar en tiempo real imágenes de la localización de
25 las células tumorales en los animales inoculados, así como el tamaño del tumor, ya que la intensidad de la luz (número de fotones) emitida en presencia de luciferina es directamente proporcional al número de células PC-3.luc.

Para estos estudios se utilizaron 24 ratones macho Balb/c nu/nu (Charles River Laboratories) de 6 semanas de edad. Estos animales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en todo momento, habiéndose mantenido durante 1
5 semana después de su recepción en el animalario, antes de la manipulación experimental. Tras ser anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i. p.) de una mezcla a partes iguales de 6 mg/Kg de droperidol (Roche, Basilea, Suiza) y 12 mg/Kg de midazolam (Rovi S.A, Madrid, España),
10 se procedió a realizar inyecciones intramusculares (i. m.), tanto en el muslo derecho como en el muslo izquierdo de cada animal, de 1×10^6 células PC-3.Sluc, suspendidas en 100 μ L de medio de cultivo carente de suero fetal bovino. Se permitió el desarrollo de tumores en los sitios de
15 inoculación durante 2 semanas, tras lo cual se realizó una primera medición de fotones emitidos y una primera captación de imágenes con un instrumento ORCA-2BT Imaging System, (Hamamatsu Photonics) dotado de una cámara CCD (refrigerada a -80 °C) modelo C4742-98-LWG-MOD, a una
20 resolución de 512 x 512 pixels. Para el seguimiento in vivo de los niveles de emisión lumínica de los tumores, los animales fueron anestesiados como se describe arriba, e inmediatamente después se procedió a la inyección i. p. de 150 μ L de D-luciferina (Promega), a una dosis de 100 mg/Kg.
25 Cuatro minutos después, se procedió a la detección y cuantificación de fotones durante 5 min en el instrumento arriba descrito. Las determinaciones se expresan en unidades lumínicas relativas (RLUs, o Relative Light Units). En todas las determinaciones se llevó a cabo una

sustracción de la señal de fondo, correspondiente a áreas de los animales alejadas de los tumores (tórax). Inmediatamente después de la adquisición de la primera imagen, se procedió a la toma de una imagen con luz visible del mismo animal en la misma posición. La cuantificación y el análisis de fotones se realizaron con ayuda del programa de análisis de imagen WASABI (Hamamatsu Photonics). La transformación de la información cuantitativa en imágenes se realizó bien en pseudocolores o en escala de grises, manteniendo los mismos parámetros y rangos de intensidad y colores para todos los animales, de modo que las intensidades de color de gris/negro representan fielmente los datos cuantitativos, siendo comparables entre experimentos y entre distintos animales. Para las representaciones gráficas, los datos cuantitativos (RLUs) fueron normalizados, para cada tumor, en relación con las RLUs del día 0 de tratamiento.

Los 24 ratones, portadores de tumores luminiscentes en ambos muslos, se encuadraron en 4 grupos experimentales:

- (1) Grupo control, en los que se procedió a una inyección intravenosa (i. v.) de 100 μ L de suero salino tamponado con fosfatos pH 7.4 (PBS) y 50 μ L de PBS intratumoral (i. t.).
- (2) Grupo tratado con doxorrubicina (Sigma, Alcobendas, Madrid, España) i. v., 5 mg/Kg en 100 μ L de PBS, una vez a la semana.
- (3) Grupo tratado con Varubin i. t., 100 μ M en 50 μ L de PBS, dos veces a la semana.
- (4) Grupo de tratamiento combinado con doxorrubicina i. v. una vez a la semana y con Varubin dos veces a la semana, con las dosis y vías de administración indicadas arriba. La emisión

lumínica de los tumores fue analizada a lo largo de 56 días desde el inicio del tratamiento. Los resultados muestran que los tumores de los animales controles crecieron a un ritmo generalmente constante a lo largo del experimento, con excepción de un descenso a los 14 días de iniciado el experimento (Figura 11). Este descenso de RLUs (y por tanto del tamaño de los tumores) se observó en todos los grupos, independientemente del tratamiento de cada grupo, y por tanto corresponde al patrón intrínseco de crecimiento de estas células en las condiciones de xenoinjerto de este experimento. A diferencia de los tumores de los ratones control, los tumores de los ratones tratados únicamente con doxorubicina (grupo 2) apenas experimentaron crecimiento durante el experimento (Figura 11). Igualmente, los ratones tratados tanto con doxorubicina i. v. como con Varubin i. m. tampoco crecieron significativamente durante este experimento. Finalmente, los tumores de los animales tratados únicamente con Varubin i. m. presentaron asimismo un crecimiento muy limitado (sin diferencias significativas con respecto a los tratados con doxorubicina), y en cualquier caso significativamente inferior al de los tumores de los ratones controles.

Por tanto, Varubin muestra actividad antitumoral en este modelo de tumores transplantados en ratones nu/nu, a una concentración de 100 μ M, en inyección intramuscular.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72, 2004.
- 5 [2] Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616, 2004.
- [3] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**:94-102, 2000.
- 10 [4] Hofmann RM, Pickart CM. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J Biol Chem* **276**:27936-27943, 2001.
- [5] Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. Cell cycle-regulated modification of the ribosome
- 15 by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**:67-76, 2000.
- [6] Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**:645-653, 1999.
- 20 [7] Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**:135-41, 2002.
- [8] Torres-Ramos CA, Prakash S, Prakash L. Requirement of
- 25 RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**:2419-2426, 2002.
- [9] Haracska L, Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash S, Prakash L. Opposing effects of ubiquitin conjugation and

SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24:4267-4274, 2004.

5 [10] Branzei D, Seki M, Enomoto T. Rad18/Rad5/Mms2-mediated polyubiquitination of PCNA is implicated in replication completion during replication stress. *Genes Cells* 9:1031-1042, 2004.

10 [11] Haracska L, Unk I, Prakash L, Prakash S. Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6477-82, 2006.

[12] Smirnova M, Klein HL. Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res* 532:117-135, 2003.

15 [13] Broomfield S, Chow BL, Xiao W. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5678-5683, 1998.

20 [14] Brusky J, Zhu Y, Xiao W. UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* :168-174, 2000.

25 [15] Xiao W, Chow BL, Broomfield S, Hanna M. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* 155:1633-1641, 2000.

[16] Tsui C, Raguraj A, Pickart CM. Ubiquitin binding site of the ubiquitin E2 variant (UEV1) protein Mms2 is required

- for DNA damage tolerance in the yeast RAD6 pathway. *J Biol Chem* 280:19829-19835, 2005.
- [17] Ulrich HD, Jentsch S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* 19:3388-3397, 2000.
- [18] Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7:758-765, 2005.
- [19] Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361, 2000.
- [20] Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351, 2001.
- [21] Ea CK, Sun L, Inoue J, Chen ZJ. TIFA activates IkappaB kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15318-15323, 2004.
- [22] Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15:535-548, 2004.
- [23] Didier C, Broday L, Bhoumik A, Israeli S, Takahashi S, Nakayama K, Thomas SM, Turner CE, Henderson S, Sabe H, Ronai Z. RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Mol Cell Biol* 23:5331-5345, 2003.

- [24] Duncan LM, Piper S, Dodd RB, Saville MK, Sanderson CM, Luzio JP, Lehner PJ. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* 25:1635-1645, 2006.
- 5 [25] Zhao H, Li CC, Pardo J, Chu PC, Liao CX, Huang J, Dong JG, Zhou X, Huang Q, Huang B, Bennett MK, Molineaux SM, Lu H, Daniel-Issakani S, Payan DG, Masuda ES. A novel E3 ubiquitin ligase TRAC-1 positively regulates T cell activation. *J Immunol* 174:5288-5297, 2005.
- 10 [26] VanDemark AP, Hofmann RM, Tsui C, Pickart CM, Wolberger C. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* 105:711-720, 2001.
- [27] Moraes TF, Edwards RA, McKenna S, Pastushok L, Xiao W, 15 Glover JN, Ellison MJ. Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat Struct Biol* 8:669-673, 2001.
- [28] Pastushok L, Moraes TF, Ellison MJ, Xiao W. A single Mms2 "key" residue insertion into a Ubc13 pocket determines 20 the interface specificity of a human Lys63 ubiquitin conjugation complex. *J Biol Chem* 280:17891-17900, 2005.
- [29] Takeuchi T, Yokosawa H. ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 336:9-13, 2005.
- 25 [30] Zou W, Papov V, Malakhova O, Kim KI, Dao C, Li J, Zhang DE. ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 336:61-68, 2005.

- [31] Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57:33-47, 2006.
- [32] Gaczynska M, Osmulski PA. Small-molecule inhibitors of proteasome activity. *Methods Mol Biol* 301:3-22, 2005.
- [33] Tsukamoto S, Yokosawa H. Natural products inhibiting the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, a target for drug development. *Curr Med Chem* 13:745-754, 2006.
- [34] Tsukamoto S, Hirota H, Imachi M, Fujimuro M, Onuki H, Ohta T, Yokosawa H. Himeic acid A: a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. *Bioorg Med Chem Lett* 15:191-194, 2005.
- [35] Masip I, Cortes N, Abad MJ, Guardiola M, Perez-Paya E, Ferragut J, Ferrer-Montiel A, Messeguer A. Design and synthesis of an optimized positional scanning library of peptoids: identification of novel multidrug resistance reversal agents. *Bioorg Med Chem* 13:1923-1929, 2005.
- [36] Humet M, Carbonell T, Masip I, Sanchez-Baeza F, Mora P, Canton E, Gobernado M, Abad C, Perez-Paya E, Messeguer A. A positional scanning combinatorial library of peptoids as a source of biological active molecules: identification of antimicrobials. *J Comb Chem* 5:597-605, 2003.
- [37] Plans V, Scheper J, Soler M, Loukili N, Okano Y, Thomson TM. The RING finger protein RNF8 recruits UBC13 for lysine 63-based self polyubiquitylation. *J Cell Biochem* 97:572-582, 2006.
- [38] Case DA, Darden TA, Cheatham TE, III, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Merz KM, WangB, Pearlman DA,

Crowley B, Brozell S, Tsui V, Gohlke H, Mongan J, Hornak V, Cui G, Beroza P, Schafmeister C, Caldwell JW, Ross WS, Kollman PA. AMBER 8, University of California, San Francisco, 2004.

5 **[39]** Corina Molecular Networks, GmbH Computerchemie Langemarckplatz 1, Erlangen, Germany, 2000.

[40] Besler BH, K.M. Merz KH, Kollman PA. Atomic charges derived from semiempirical methods J Comp Chem 11:431-439,
10 1990.

[41] Deward MJS, Thiel W. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. J Am Chem Soc 99:4899-4907, 1977.

[42] Stewart JJ. MOPAC: a semiempirical molecular orbital
15 program. J Comput Aided-Mol Des 4:1-105, 1990.

[43] Pérez C, Ortiz AR. Evaluation of docking functions for protein-ligand docking. J Med Chem 44:3768-3785, 2001.

[44] Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and
20 ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. Cell 115:565-576, 2003.

[45] Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, Goldring MB, Zhou JR, Libermann TA. NF-kappa B-mediated repression of growth
25 arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13618-13623, 2004.

[46] Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S, Binaschi M. NF-kappaB activation contributes to

anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *Int J Oncol* 27:799-806, 2005.

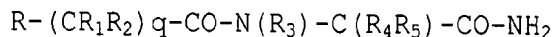
[46] Janssens S, Tinel A, Lippens S, Tschopp J. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell* 123:1079-1092, 2005.

[47] Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311:1141-1146, 2006.

[48] Rubio N, Villacampa MM, El Hilali N, Blanco J. Metastatic burden in nude mice organs measured using prostate tumor PC-3 cells expressing the luciferase gene as a quantifiable tumor cell marker. *Prostate* 44:133-1343, 2000.

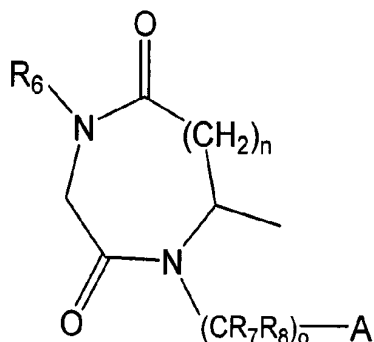
REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I):



donde:

5 - R es el radical



donde:

- R₆ es un radical seleccionado entre: H, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heterociclilo sustituido o sin sustituir y heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir;
- A es un radical seleccionado entre arilo sustituido o sin sustituir y heterociclilo sustituido o sin sustituir;
- R₇ y R₈ se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, propilo e isopropilo,
- o es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 y 4,
- n es un número seleccionado entre 0 y 1,
- la línea — indica el lugar de enlace del radical R con el resto de la molécula de fórmula (I);

-R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, propilo e isopropilo;

5 -R₃ es un radical seleccionado entre: H, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heterociclilo sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido y sin sustituir;

10 - R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, propilo e isopropilo;

- q es un número seleccionado entre 0 y 1;

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

15

2.- Compuesto según la reivindicación 1 caracterizado porque R₆ es un radical seleccionado entre H, arilalquilo sustituido o sin sustituir y heterociclalquilo sustituido o sin sustituir, y porque R₃ es un radical seleccionado entre
20 H, arilalquilo sustituido o sin sustituir y heterociclalquilo sustituido o sin sustituir, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

25

3.- Compuesto según la reivindicación 2 caracterizado porque R₆ es un radical seleccionado entre fenilpropilo sustituido o sin sustituir, feniletilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, furilpropilo sustituido o sin sustituir, furiletilo sustituido o sin sustituir, furilmetilo sustituido o sin sustituir,

imidazolilpropilo sustituido o sin sustituir,
imidazoliletilo sustituido o sin sustituir,
imidazolilmetilo sustituido o sin sustituir
piridinilpropilo sustituido o sin sustituir, piridiniletilo
5 sustituido o sin sustituir, piridinilmetilo sustituido o
sin sustituir, piperidinilpropilo sustituido o sin
sustituir, piperidiniletilo sustituido o sin sustituir,
piperidinilmetilo sustituido o sin sustituir; y porque R_3
es un radical seleccionado entre fenilpropilo sustituido o
10 sin sustituir, feniletilo sustituido o sin sustituir,
bencilo sustituido o sin sustituir, furilpropilo sustituido
o sin sustituir, furiletilo sustituido o sin sustituir,
furilmetilo sustituido o sin sustituir, imidazolilpropilo
sustituido o sin sustituir, imidazoliletilo sustituido o
15 sin sustituir, imidazolilmetilo sustituido o sin sustituir,
piridinilpropilo sustituido o sin sustituir, piridiniletilo
sustituido o sin sustituir, piridinilmetilo sustituido o
sin sustituir, piperidinilpropilo sustituido o sin
sustituir, piperidiniletilo sustituido o sin sustituir,
20 piperidinilmetilo sustituido o sin sustituir, y sales,
solvatos, profármacos, o estereoisómeros del mismo.

4.- Compuesto según la reivindicación 3 caracterizado
porque R_6 es un radical sustituido por uno o más radicales
25 seleccionados entre fluor, cloro, bromo, trifluorometilo,
hidroxilo, alcoxilo, alquilcarbonilo, alquilamino y
sulfonamino, ciano, nitro, nitrito, nitrato, tionitrato,
carboxamido y sales, solvatos, profármacos o
estereoisómeros del mismo.

- 5.- Compuesto según la reivindicación 3 caracterizado porque R_3 es un radical sustituido por uno o más radicales seleccionados entre fluor, cloro, bromo, trifluorometilo, hidroxilo, alcoxilo, alquilcarbonilo, alquilamino y sulfonamino, ciano, nitro, nitrito, nitrato, tionitrato, carboxamido y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.
- 10 6.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque R_6 es el radical *p*-fluorofeniletilo o 2,4-diclorofeniletilo, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.
- 15 7.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque A es un fenilo sustituido por cloro, fluor y/o bromo, y o es un número seleccionado entre 1, 2 y 3, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.
- 20 8.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque R_7 y R_8 son ambos H, o es 2, y A es *p*-fluorofenilo y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.
- 25 9.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque R_3 es 2-pirimidiniletilo, 2,4-diclorofeniletilo o 4-metoxifeniletilo, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

10.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque n es 1, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

5

11.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque n es 0, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

10

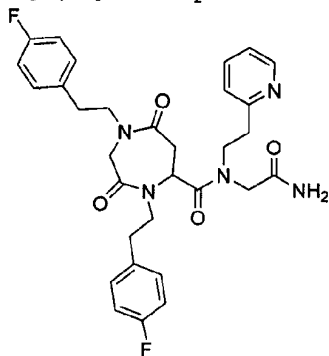
12.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque q es 0, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

15

13.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizado porque q es 1, y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

20

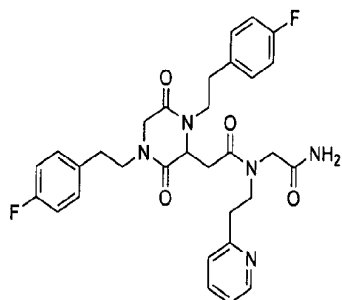
14- Compuesto según la reivindicación 1 caracterizado porque presenta fórmula Ia (N-aminocarbamoilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-5-carboxamida):



(Ia)

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

15- Compuesto según la reivindicación 1 caracterizado porque presenta la fórmula Ib (1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-aminocarbonilmetil-N-(2'-(2''piridil)etil)-carbonilmetil] piperazina-3,6-diona):



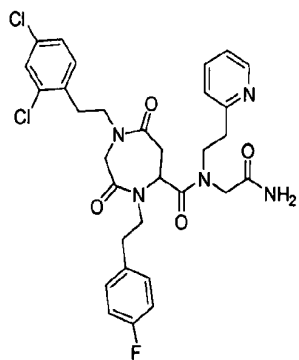
10

(Ib)

y sales, solvatos, profármacos o estereoisómeros del mismo.

16.- Compuesto según la reivindicación 1 caracterizado porque presenta una de las siguientes fórmulas:

15

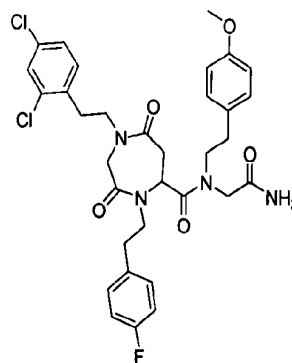


N-

aminocarbonylmetil-

N-(2'-(2''-

piridil)etil)-1-[2'



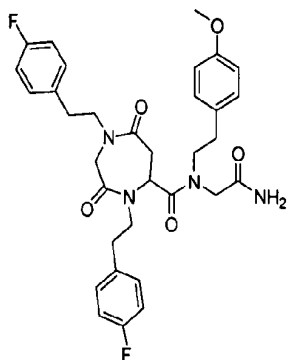
N-aminocarbonylmetil-N-(2'-(4''-

metoxifenil)etil)-1-[2'-(2'',4''-

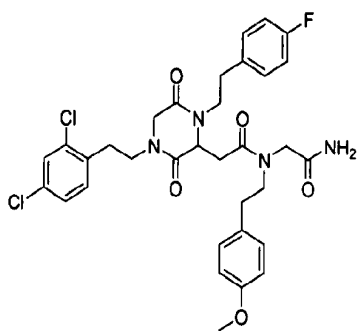
diclorofenil)etil]-4-[2'-(4''-

fluorofenil)etil]-3,7-dioxo-[1,4]diazepan-

(2'',4''-
diclorofenil)etil]-
4-[2'-(4''-
fluorofenil)etil]-
3,7-dioxo-
[1,4]diazepan-5-
carboxamida

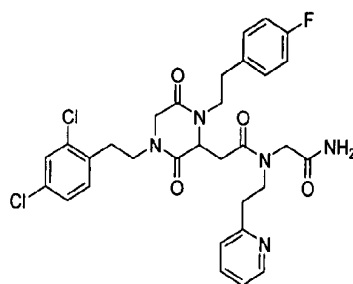


N-
aminocarbamoilmetil-
N-(2'-(4''-
metoxifenil)etil)-
1,4-bis[2'-(4''-
fluorofenil)etil]-
3,7-dioxo-
[1,4]diazepan-5-
carboxamida

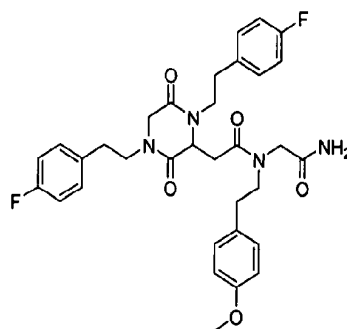


1-[2'-(2'',4''-

5-carboxamida

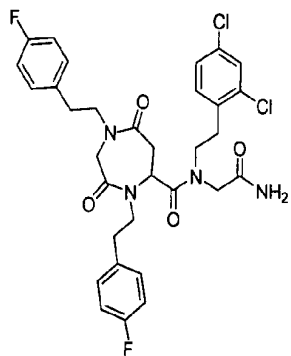


1-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-4-[2'-(
(4''-fluorofenil)etil]-2-[*N*-
aminocarbonilmetil-*N*-(2'-(2''-piridil)etil)
carbonilmetil] piperazina-3,6-diona



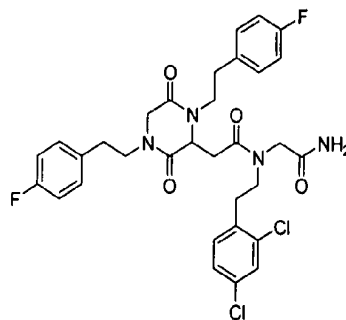
1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[*N*-

diclorofenil)etil]-
 4-[2'-(4''-
 fluorofenil)etil]-2-
 [N-
 aminocarbonilmetil-
 N-(2'-(4''-
 metoxifenil)etil)
 carbonilmetil]
 piperazina-3,6-diona



N-

aminocarbamoilmetil-
 N-[2'-(2'',4''-
 diclorofenil)etil]-
 1,4-bis[2'-(4''-
 fluorofenil)etil]-
 3,7-dioxo-
 [1,4]diazepan-5-
 carboxamida



[1,4-bis[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-[N-
 aminocarbonilmetil-N-(2'-(2'',4''-
 diclorofenil)etil)carbonilmetil]piperazina-
 3,6-diona

17.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo para uso médico.

18.- Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento dirigido al tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13.

19.- Uso según la reivindicación 18 donde las patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 son enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

20.- Uso según la reivindicación 19 donde las patologías o enfermedades inflamatorias y autoinmunes son: enfermedad inflamatoria intestinal, patologías articulares inflamatorias, dermatitis atópicas y otras patologías dermatológicas inflamatorias, neuritis, encefalitis, encefalomiелitis y patologías inflamatorias que afectan al sistema nervioso central o periférico, miositis, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades infecciosas que cursan con inflamación, reacciones de rechazo de huésped contra injerto, conjuntivitis y oculopatías inflamatorias, otitis o mucositis.

21.- Uso según la reivindicación 18 donde las patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene la enzima UBC13 son el cáncer o neoplasia

22.- Uso según la reivindicación 21 donde el cáncer o neoplasia es carcinoma de próstata, mama, pulmón, páncreas, colorrectal, gástrico, esofágico, de laringe, de tiroides, hepático, de vejiga urinaria, renal, uterino, y de cerviz; osteosarcoma, sarcoma de partes blandas y angiosarcoma; tumor hematopoyético incluyendo de leucemias y linfomas, neuroblastomas, glioblastomas y astrocitomas, melanoma, carcinoma dérmico de células basales o carcinoma dérmico de células escamosas.

10

23.- Uso de un compuesto según cada una de las reivindicaciones 1 a 16, o una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento dirigido al tratamiento y/o profilaxis de patologías o enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que interviene el factor transcripcional NF- κ B.

15

24.- Uso según reivindicación 23 donde las patologías o enfermedades son procesos inflamatorios o neoplásicos.

20

25.-Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para la elaboración de un medicamento dirigido a la terapia antitumoral, en donde dicho medicamento es un antagonista de, o inhibe, la ruta de tolerancia a daños genotóxicos mediada por PCNA y RAD6 produciendo efectos quimio- o radiosensibilizantes.

25

- 26.- Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en la elaboración de un medicamento para aumentar la sensibilidad de un mamífero al tratamiento con un agente antitumoral.
- 5
- 27.- Uso según reivindicación 26 en el que el agente antitumoral es doxorubicina o etopósido.
- 10
- 28.- Composición farmacéutica caracterizada porque comprende un compuesto según las reivindicaciones 1 a 16, o una sal, solvato, profármacos o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15
- 29.- Composición farmacéutica según la reivindicación 28 caracterizada porque comprende adicionalmente, en una cantidad terapéuticamente efectiva, al menos, un segundo agente terapéutico.
- 20
- 30.- Composición farmacéutica según la reivindicación 29 caracterizada porque el segundo agente terapéutico es un compuesto según las reivindicaciones 1 a 16, una sal, solvato, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25

RESUMEN

El compuesto (I) en el que R es un radical heterociclilo;
 R₁ y R₂ son independientemente H o alquilo; R₃ es H,
 5 alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alquenilo,
 arilo, arilalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo; R₄
 y R₅ son independientemente H o alquilo; q es un número
 seleccionado entre 0 y 1; y sus sales, solvatos,
 profármacos o estereoisómeros tienen actividad inhibidora
 10 de las interacciones UBC13-UEV y pueden ser utilizados en
 la elaboración de composiciones farmacéuticas dirigidas a
 la terapia antitumoral o al tratamiento y/o profilaxis de
 enfermedades asociadas a rutas metabólicas en las que
 interviene la enzima UBC13, rutas metabólicas en las que
 15 interviene el factor transcripcional NF-κB, o rutas en las
 que intervienen PCNA o RAD6.

