

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 521**

51 Int. Cl.:

**C07D 495/12** (2006.01)

**C07D 495/14** (2006.01)

**C07D 519/00** (2006.01)

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/5517** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 11781422 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2571503**

54 Título: **Composiciones y su uso en el tratamiento de neoplasia, enfermedades inflamatorias y otras enfermedades**

30 Prioridad:

**14.05.2010 US 334991 P**

**04.08.2010 US 370745 P**

**22.08.2010 US 375863 P**

**24.03.2011 US 467376 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2015**

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**

**(100.0%)**

**450 Brookline Avenue**

**Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**BRADNER, JAMES, ELLIOTT y**

**QI, JUN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 534 521 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y su uso en el tratamiento de neoplasia, enfermedades inflamatorias y otras enfermedades

5 **Antecedentes de la invención**

Los extremos N-terminales de histona mantienen la estabilidad de la cromatina y son objeto de modificaciones asociadas con la regulación de la transcripción. De estas modificaciones, las que se caracteriza mejor son acetilación, metilación y fosforilación. Para cada modificación, existen enzimas que, o bien establecen la marca apropiada, o la retiran. Estas modificaciones se deben interpretar mediante la maquinaria transcripcional. El reconocimiento de la acetil-lisina está mediado principalmente por bromodominios que normalmente son componentes de complejos de factores de transcripción. La familia de bromodominio y extra-terminal (BET) (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) comparte una arquitectura de dominio común que comprende dos bromodominios N-terminales que presentan un nivel elevado de conservación de las secuencias, y un dominio C-terminal más divergente que está implicado en interacciones proteína-proteína. La regulación anómala de la modificación de la histona puede influir en la actividad del gen y desempeñar un papel en la oncogénesis. La acetilación de la cadena principal de lisina es un suceso regulador importante en la función de proteínas que no son histonas, que incluyen, pero no se limitan a los factores de transcripción Hsp90, p53, STAT, cortactina, beta-catenina y alfa-tubulina. Por lo tanto, se podría esperar que la modulación del reconocimiento de la cadena lateral de lisina ejerciera efectos fenotípicos y terapéuticos importantes en líneas generales en el desarrollo y en la enfermedad. A pesar de la importancia del reconocimiento de la acetil-lisina en la oncogénesis, se han identificado pocos moduladores del reconocimiento de la acetil-lisina.

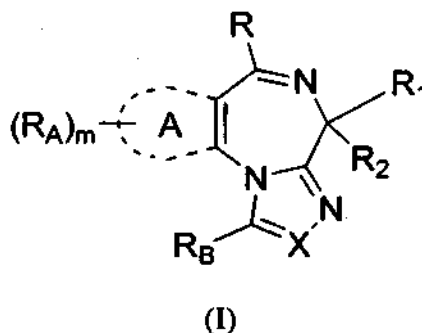
Los documentos de patente CA2710740, EP0989131, EP1297836 y US5712274 desvelan compuestos de tienotriazolodiazepina para el tratamiento de cáncer, enfermedades inflamatorias y alérgicas. Sin embargo, ninguno de estos documentos desvela los compuestos que se reivindican en la actualidad.

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las materias de objeto que no se incluyen en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Tal como se describe a continuación, los inventores desvelan composiciones y su uso en el tratamiento o la prevención de una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. En ejemplos en particular, los compuestos de la invención se usan para superar la resistencia a fármacos en neoplasia (por ejemplo, cáncer y enfermedades no malignas). Además, las composiciones que se desvelan en el presente documento se usan en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia. Más específicamente, los inventores desvelan composiciones para alterar la interacción de un polipéptido de la familia BET que comprende un bromodominio con acetil-lisina y/o cromatina (por ejemplo, alteración de una interacción del bromodominio con una modificación de acetil-lisina presente en un extremo N-terminal de histona) y para inhibir la oncogénesis. Además, los compuestos de la invención se pueden usar para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria.

Los inventores desvelan un compuesto de Fórmula I:



50 en la que

X es N o CR<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R<sub>B</sub> es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o -COO-R<sub>3</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

el anillo A es arilo o heteroarilo;

cada R<sub>A</sub> es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0-3 y L es H, -COO-R<sub>3</sub>, -CO-R<sub>3</sub>, -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), -S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

R<sub>2</sub> es H, D, halógeno, o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o -alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv) NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

R<sub>6</sub> es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que

(a) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo o fenilo sustituido, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 1 y L es -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), entonces R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino;

(b) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo sustituido, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 1 y L es -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), y uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es H, entonces el otro de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido; y

(c) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo sustituido, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 1 y L es -COO-R<sub>3</sub>, entonces R<sub>3</sub> no es metilo ni etilo;

o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, R es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, L es H, -COO-R<sub>3</sub>, -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), -S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub> o arilo opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; o NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>.

En determinados ejemplos, R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 1 y L es -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), y uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es H, y el otro de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-Y, en el que p es 1-3 (por ejemplo, p es 2) e Y es un anillo que contiene nitrógeno (que puede ser aromático o no aromático).

En determinados ejemplos, R<sub>2</sub> es H, D, halógeno o metilo.

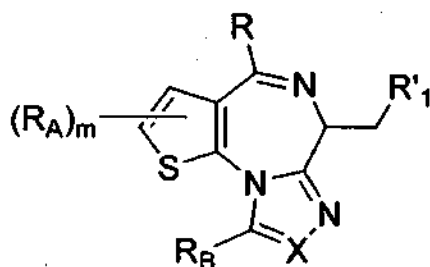
En determinados ejemplos, R<sub>B</sub> es alquilo, hidroxialquilo, haloalquilo, o alcoxi; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, R<sub>B</sub> es metilo, etilo, hidroximetilo, metoximetilo, trifluorometilo, COOH, COOMe, COOEt, o COOCH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub>.

En determinados ejemplos, el anillo A es un arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros. En determinados ejemplos, el anillo A es tiofuranilo, fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, indanilo, piridilo, furanilo, indolilo, pirimidinilo, piridizinilo, pirazinilo, imidazolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, triazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirrolilo, pirazolilo, o 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo.

- 5 En determinados ejemplos, el anillo A es fenilo o tienilo.
- En determinados ejemplos, m es 1 o 2, y al menos una aparición de  $R_A$  es metilo.
- 10 En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un arilo.

Los inventores también desvelan un compuesto de Fórmula II:



(II)

en la que

X es N o  $CR_5$ ;

$R_5$  es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

$R_B$  es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o  $-COO-R_3$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

cada  $R_A$  es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

$R'_1$  es H,  $-COO-R_3$ ,  $-CO-R_3$ , arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

cada  $R_3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo  $C_1-C_8$ , -alquenilo  $C_2-C_8$  o -alquinilo  $C_2-C_8$ , conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo  $C_3-C_{12}$ , -cicloalquilo  $C_3-C_{12}$  sustituido; -cicloalquenilo  $C_3-C_{12}$ , o -cicloalquenilo  $C_3-C_{12}$  sustituido; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que si  $R'_1$  es  $-COO-R_3$ , X es N, R es fenilo sustituido, y  $R_B$  es metilo, entonces  $R_3$  no es metilo ni etilo;

o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, R es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, R es fenilo o piridilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, R es p-Cl-fenilo, o-Cl-fenilo, m-Cl-fenilo, p-F-fenilo, o-F-fenilo, m-F-fenilo o piridinilo.

En determinados ejemplos,  $R'_1$  es  $-COO-R_3$ , arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y  $R_3$  es -alquilo  $C_1-C_8$ , que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N, y que puede estar opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos,  $R'_1$  es  $-COO-R_3$ , y  $R_3$  es metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, sec-butilo, o t-butilo; o  $R'_1$  es H o fenilo opcionalmente sustituido.

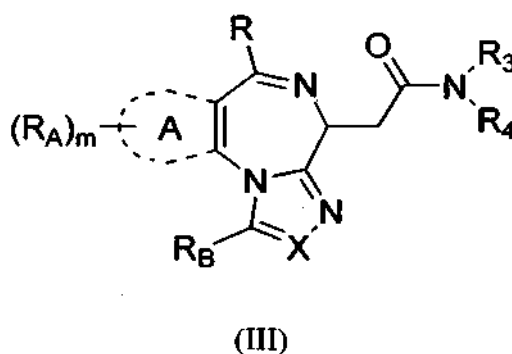
En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroxi metilo, metoximetilo, trifluorometilo,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOMe}$ ,  $\text{COOEt}$ ,  $\text{COOCH}_2\text{OC(O)CH}_3$ .

En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroxi metilo, metoximetilo, trifluorometilo,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOMe}$ ,  $\text{COOEt}$ , o  $\text{COOCH}_2\text{OC(O)CH}_3$ .

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es independientemente un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un arilo condensado.

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es metilo.

Los inventores también desvelan un compuesto de fórmula III:



en la que

$X$  es  $N$  o  $\text{CR}_5$ ;

$R_5$  es  $H$ , alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;  
 $R_B$  es  $H$ , alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxi, alcoxi, o  $-\text{COO}-R_3$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

el anillo  $A$  es arilo o heteroarilo; cada  $R_A$  es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

$R$  es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

cada  $R_3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i)  $H$ , arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ , -alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_8$  o -alquino  $\text{C}_2\text{-C}_8$ , conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre  $O$ ,  $S$  o  $N$ ; -cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$  sustituido, -cicloalqueno  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ , o -cicloalqueno  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$  sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv)  $\text{NH}_2$ ,  $\text{N}=\text{CR}_4\text{R}_6$ ;

cada  $R_4$  es independientemente  $H$ , alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;  
o  $R_3$  y  $R_4$  se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

$R_6$  es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o  $R_4$  y  $R_6$  se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

$m$  es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que:

(a) si el anillo  $A$  es tienilo,  $X$  es  $N$ ,  $R$  es fenilo o fenilo sustituido,  $R_B$  es metilo, entonces  $R_3$  y  $R_4$  no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino; y  
(b) si el anillo  $A$  es tienilo,  $X$  es  $N$ ,  $R$  es fenilo sustituido,  $R_2$  es  $H$ ,  $R_B$  es metilo, y uno de  $R_3$  y  $R_4$  es  $H$ , entonces el otro de  $R_3$  y  $R_4$  no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido;

o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, R es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, R es fenilo o piridilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

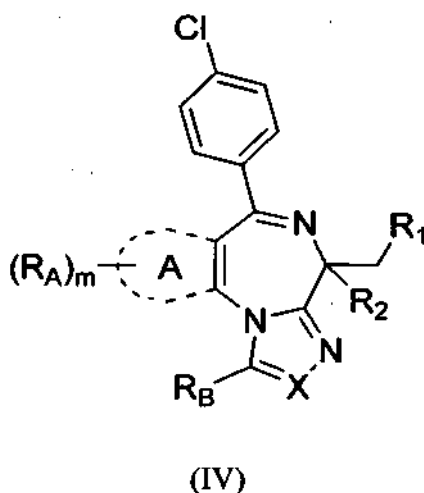
En determinados ejemplos, R es p-Cl-fenilo, o-Cl-fenilo, m-Cl-fenilo, p-F-fenilo, o-F-fenilo, m-F-fenilo o piridinilo. En determinados ejemplos, R<sub>3</sub> es H, NH<sub>2</sub>, o N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>.

En determinados ejemplos, cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, R<sub>6</sub> es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es H, y el otro de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-Y, en el que p es 1-3 (por ejemplo, p es 2) e Y es un anillo que contiene nitrógeno (que puede ser aromático o no aromático).

Los inventores también desvelan un compuesto de fórmula IV:



en la que

X es N o CR<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R<sub>B</sub> es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcóxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o -COO-R<sub>3</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

el anillo A es arilo o heteroarilo;

cada R<sub>A</sub> es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0-3 y L es H, -COO-R<sub>3</sub>, -CO-R<sub>3</sub>, -CON(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), -S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

R<sub>2</sub> es H, D, halógeno, o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o -alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv) NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

cada  $R_4$  es independientemente H, alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

o  $R_3$  y  $R_4$  se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

$R_6$  es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o  $R_4$  y  $R_6$  se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que

(a) si el anillo A es tienilo, X es N,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 0 y L es  $-CO-N(R_3R_4)$ , entonces  $R_3$  y  $R_4$  no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino;

(b) si el anillo A es tienilo, X es N,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 0 y L es  $-CO-N(R_3R_4)$ , y uno de  $R_3$  y  $R_4$  es H, entonces el otro de  $R_3$  y  $R_4$  no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido; y

(c) si el anillo A es tienilo, X es N,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ ,

en el que n es 0 y L es  $-COO-R_3$ , entonces  $R_3$  no es metilo ni etilo; o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos,  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 0-3 y L es  $-COO-R_3$ , arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y  $R_3$  es  $-alquilo C_1-C_8$ , que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N, y que puede estar opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, n es 1 o 2 y L es alquilo o  $-COO-R_3$ , y  $R_3$  es metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, sec-butilo, o t-butilo; o n es 1 o 2 y L es H o opcionalmente sustituido fenilo.

En determinados ejemplos,  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 0 y L es  $-CO-N(R_3R_4)$ , y uno de  $R_3$  y  $R_4$  es H, y el otro de  $R_3$  y  $R_4$  es  $(CH_2)_p-Y$ , en el que p es 1-3 (por ejemplo, p es 2) e Y es un anillo que contiene nitrógeno (que puede ser aromático o no aromático).

En determinados ejemplos,  $R_2$  es H o metilo.

En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroximetilo, metoximetilo, trifluorometilo, COOH, COOMe, COOEt,  $COOCH_2OC(O)CH_3$ .

En determinados ejemplos, el anillo A es fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, indanilo, piridilo, furanilo, indolilo, pirimidinilo, piridizinilo, pirazinilo, imidazolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, triazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirrolilo, pirazolilo, o 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo.

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es independientemente un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, puede formar un arilo.

Los inventores también desvelan compuestos de Fórmulas V-XXII en el presente documento, y cualquier compuesto que se describe en el presente documento.

Además adicionalmente, los inventores desvelan un método para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento.

También se desvela un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-IV. Los inventores también desvelan un método para reducir el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula neoplásica, método que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, reduciendo de ese modo el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula neoplásica.

Los inventores también desvelan un método para inducir la diferenciación en una célula neoplásica, método que comprende poner en contacto la célula con un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, induciendo de ese modo la diferenciación en la célula neoplásica.

Los inventores también desvelan un método para inducir la muerte celular en una célula neoplásica, método que comprende poner en contacto la célula con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, induciendo de ese modo la muerte celular la célula neoplásica.

En ciertos aspectos, los métodos comprenden adicionalmente seleccionar el compuesto para su unión a un bromodominio de la familia BET.

5 En ciertos aspectos, los métodos comprenden adicionalmente seleccionar el compuesto para inhibir un bromodominio de unión a cromatina en un entorno celular.

10 En ciertos aspectos, los métodos comprenden adicionalmente seleccionar el compuesto para su unión de forma específica usando fluorimetría de barrido diferencial (DSF), Calorimetría de Valoración Isotérmica, y/o un ensayo homogéneo de proximidad de luminiscencia (identificación sistemática ALPHA). En determinados ejemplos, el compuesto aumenta la estabilidad térmica del bromodominio en dicho ensayo.

En ciertos aspectos de los métodos, el miembro de la familia BET es BRD2, BRD3, BRD4 o BRDT.

15 En ciertos aspectos de los métodos, la célula está en un sujeto.

Los inventores también desvelan un método para prevenir o tratar una neoplasia en un sujeto, método que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, evitando o tratando de ese modo la neoplasia en un sujeto.

20 En ciertos aspectos, el sujeto es un mamífero. En determinados ejemplos, el sujeto es un paciente humano.

En ciertos aspectos, el método reduce el crecimiento o la proliferación de una neoplasia en un sujeto.

25 En ciertos aspectos, la neoplasia está dirigida por un activador de la transcripción. En determinados ejemplos, el activador de la transcripción es myc.

30 En ciertos aspectos, el sujeto tiene una neoplasia seleccionada entre el grupo que consiste en linfoma de Burkitt, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon, neuroblastoma, blastoma multiforme glial, leucemia dirigida por MLL, leucemia linfocítica crónica, carcinoma de línea media de NUT, carcinoma de células escamosas o cualquier otro carcinoma asociado con una reorganización de NUT.

35 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo. Los inventores también desvelan composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier otro compuesto que se describe en el presente documento y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Los inventores desvelan un compuesto farmacéutico envasado que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, e instrucciones escritas para la administración del compuesto.

45 Los inventores desvelan un método para prevenir o tratar una neoplasia en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, en el que el compuesto altera la unión del bromodominio a acetil-lisina o de otro modo desplaza un miembro de la familia BET de la cromatina, previniendo o tratando de ese modo dicha neoplasia.

50 En ciertos aspectos, el compuesto inhibe la unión del péptido H4 Kac de la Histona a un miembro de la familia BET.

En ciertos aspectos, es miembro de la familia BET es BRD2, BRD3, BRD4 o BRDT.

En ciertos aspectos, el compuesto se une a un sitio de unión de Kac de un bromodominio de la familia BET.

55 Los inventores también desvelan un método para identificar un compuesto para el tratamiento de una neoplasia, método que comprende poner en contacto un compuesto de ensayo con un miembro de la familia BET que comprende un bromodominio; y detectar la unión específica al bromodominio, identificando de ese modo de compuestos de ensayo como útil para el tratamiento de una neoplasia.

60 En ciertos aspectos, la especificidad de la unión se somete a ensayo usando fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

En ciertos aspectos, la unión aumentar la estabilidad térmica de dicho bromodominio.

65 En ciertos aspectos, la unión se detecta usando Calorimetría de Valoración Isotérmica.

En ciertos aspectos, la unión se detecta usando un ensayo homogéneo de proximidad de luminiscencia (identificación sistemática ALPHA).

En ciertos aspectos, el compuesto inhibe la unión del péptido H4 Kac de la Histona a dicho bromodominio.

En ciertos aspectos, el compuesto que forma un enlace de hidrógeno con una asparagina conservada de forma evolutiva en dicho bromodominio.

En ciertos aspectos, dicho miembro de la familia BET es BRD4 o BRD2 y la asparagina es Asn140 en BRD4(1) y Asn429 en BRD2(2).

En ciertos aspectos, el compuesto se une de forma competitiva con la cromatina en un entorno celular.

En ciertos aspectos, la unión competitiva con la cromatina se detecta usando recuperación de fluorescencia después de fotolixiviación (FRAP).

En ciertos aspectos, el método se realiza en una célula neoplásica *in vitro*.

En ciertos aspectos, el método comprende adicionalmente detectar una disminución en la proliferación celular, un aumento de la muerte celular, o un aumento de la diferenciación celular.

En ciertos aspectos, la muerte celular es muerte celular apoptótica.

En ciertos aspectos, la diferenciación celular se identifica detectando un aumento en la expresión de citoqueratina.

En ciertos aspectos, el método comprende adicionalmente detectar una reducción en la elongación de la traducción.

Los inventores también desvelan un método para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, en el que dicho compuesto es capaz de unirse a un bromodominio de la familia BET y alterar dicha interacción de bromodominios con cromatina, evitando o tratando de ese modo dicho cáncer.

En ciertos aspectos, el método induce la muerte o la diferenciación celular en una célula neoplásica de dicho sujeto.

Los inventores también desvelan una composición para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en el compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que dicho compuesto inhibe la unión del péptido H4 Kac de la Histona a un bromodominio de la familia BET.

Los inventores también desvelan un método para reducir la inflamación en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento.

Los inventores también desvelan un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, método que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-XXII, o cualquier compuesto que se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos, el sujeto es un mamífero. En determinados ejemplos, el sujeto es un paciente humano.

En ciertos aspectos, el método reduce el nivel de citoquina, la liberación de histamina, o la actividad biológica de una célula de respuesta inmune.

Los inventores también desvelan un método para identificar un compuesto para el tratamiento de inflamación, método que comprende poner en contacto un compuesto de ensayo con un miembro de la familia BET que comprende un bromodominio; y detectar la unión específica al bromodominio, identificando de ese modo el compuesto de ensayo como útil para el tratamiento de inflamación.

## Definiciones

Por "agente" se hace referencia a cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula ácido nucleico, o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anillo aromático" o "arilo" se refiere a un anillo o radical de anillo aromático monocíclico o policíclico que comprende átomos de carbono y de hidrógeno. Los ejemplos de

grupos arilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, fenilo, tolilo, antaceno, fluoreno, indenilo, azulenilo, y naftilo, así como restos carbocíclicos condensados con benzo tales como 5,6,7,8-tetrahidronaftilo. Un grupo arilo puede estar sin sustituir o está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, por ejemplo, sustituyentes tal como se describe en el presente documento para grupos alquilo (incluyendo sin limitación alquilo (preferentemente, alquilo inferior o alquilo sustituido con uno o más halo), hidroxi, alcoxi (preferentemente, alcoxi inferior), alquiltio, ciano, halo, amino, ácido borónico ( $-B(OH)_2$ , y nitro). En determinados ejemplos, el grupo arilo es un anillo monocíclico, en el que el anillo comprende 6 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificada saturado que por lo general tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-metil-hexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilpentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,3-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,2-dimetilhexilo, 3,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilhexilo, 4,4-dimetilhexilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, 2-etilhexilo, 3-etilhexilo, 4-etilhexilo, 2-metil-2-etil-pentilo, 2-metil-3-etilpentilo, 2-metil-4-etilpentilo, 2-metil-2-etilhexilo, 2-metil-3-etilhexilo, 2-metil-4-etil-hexilo, 2,2-dietilpentilo, 3,3-dietilhexilo, 2,2-dietilhexilo, 3,3-dietilhexilo y similares. Los grupos alquilo incluidos en los compuestos que se desvelan en el presente documento pueden estar sin sustituir, u opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como amino, alquilamino, arilamino, heteroarilamino, alcoxi, alquiltio, oxo, halo, acilo, nitro, hidroxi, ciano, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, ariltio, heteroariltio, arilamino, heteroarilamino, carbociclilo, carbociciloxi, carbocicililtio, carbocicilamino, heterociclilo, heterociciloxi, heterocicililamino, heterocicililtio, y similares. Los alquilos inferiores por lo general son preferentes para los compuestos que se desvelan en el presente documento.

Por "bromodominio" se hace referencia a una parte de un polipéptido que reconoce restos de lisina acetilados. En un ejemplo, un bromodominio de un polipéptido miembro de la familia BET comprende aproximadamente 110 aminoácidos y comparte un plegamiento conservado que comprende un haz girado hacia la izquierda de cuatro hélices alfa unidas por diversas regiones de bucle que interactúan con la cromatina.

Por "polipéptido de la familia BET" se hace referencia a un polipéptido que comprende dos bromodominios y un dominio extraterminal (ET) o un fragmento del mismo que tiene actividad reguladora de la transcripción o actividad de unión a lisina acetilada. Los miembros de la familia BET a modo de ejemplo incluyen BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT.

Por "polipéptido BRD2" se hace referencia a una proteína o fragmento de la misma que tiene una identidad de al menos un 85 % con NP\_005095 que es capaz de unirse a la cromatina o regular la transición.

La secuencia de un polipéptido BRD2 a modo de ejemplo es la que sigue a continuación:

```

MLQNVTPHNKLPGEAGNAGLLGLGPEAAAPGKRIRKPSLLYEGFESPTMASVPALQLTPANPPFPEVSNP
K
KPGRVTNQLQYLHKVVMKALWKHQFAWPFRRQPVDAVKLGLPDYHKI IKQPMDMGT IKRRLENNYYWAAS
E
CMQDFNTMFTNCYIYNKPTDDIVLMAQTLEKIFLQKVASMPQEEQELVVTIPKNSHKKGAKLAALQGSV
T
SAHQVPAVSSVSHTALYTFFPEIPTTVLNIHPSPVISPLLSLHSAAGPPLLAVTAAPPAQPLAKKKG
K
RKADTTTPTPTAILAPGSPASPPGSLEPKAARLPPMRRESGRPIKPPRKDLPDSQQQHQSCKKGLSEQ
L
KHCNGILKELLSKKHAAYAWPFYKPVDAALGLHDYHDI IKHPMDLSTVKKRMENRDYRDAQEFAADV
L
MFSNCKYNPPDHDVAMARKLQDVFEFRYAKMPDEPLEPGPLPVSTAMPGLAKSSSESSESSESSES
S
SEEEEEDEDEDEDEDESESSDSEERAHRLAELQEQLRAVHEQLAALSQGPISKPKRKREKKEKKKKRK
A
EKHRGRAGADEDDKGPRAPRPQPKSKKASGSGGSAALGPSGFGPSGGSGTKLPKKATKTAPPALPT
G
YDSEEEEESRPMSYDEKRQLSLDINKLPGEKLGRRVHHIQAREPSLRDSNPEEIEIDFETLKPSTLREL
E
RYVLSCLRKPKRPYTIKKPVGKTKEELALEKKRELEKRLQDVSGQLNSTKKPKKANEEKTESSSAQV
A
VSRLSASSSSSDSSSSSSSSSSSDTSDSDSG

```

Por "molécula de ácido nucleico de BRD2" se hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido de BRD2 un fragmento del mismo.

5 Por "polipéptido de BRD3" se hace referencia a una proteína o fragmento de la misma que tiene una identidad de al menos un 85 % con NP\_031397.1 que es capaz de unirse a la cromatina o de regular la transcripción.

La secuencia de un polipéptido de BRD3 a modo de ejemplo sigue a continuación:

```

1 mstattvapa gipatpgpvn ppppevsnpk kpgrktnqlq ymqnvvvktl
wkhqfawpfy
61 qpvdaiiknl pdyhkiiknp mdmgtikkrl ennywsase cmqdfntmft
ncyiynkptd
121 divlmaqale kiflqkvaqm pqeevellpp apkgkgrkpa agagsagtqq
vaavssvspa
181 tpfqsvpptv sqtpviaatp vptitanvts vpvppaaapp ppatpivpvv
pptppvvkkk
241 gvkrkadttt pttsaitasr sesppplsdq kqakvvarre sggrpikppk
kdledgevpq
301 hagkkgklse hlrycdsilr emlskkhaay awpfykpvda ealelhdyhd
iikhpmdlst
361 vkrkmdgrey pdaqgfaadv rlmfsncyky nppdhevnam arklqdvfem
rfakmpdepv
421 eapalpapaa pmvskgaess rsseesssds gssdseeera trlaelqeql
kavheqlaal
481 sqapvnkpkk kkekkekek kkdkekek hkvkaeeekk akvappakqa
qqkkapakka
541 nstttagrql kkggkqasas ydseeeegl pmsydekrql sldinrlpge
klgrvvhiig
601 srepslrdsn pdeieidfet lkpttlrele ryvksclqkk qrkpfsasgk
kqaakskeel
661 aqekkekek rlqdvsgqls sskkparkek pgsapsggps rlsssssses
gsssssgsss
721 dssdse

```

10

Por "molécula de ácido nucleico de Brd3" se hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido BRD3.

Por "polipéptido de BRD4" se hace referencia a una proteína o fragmento de la misma que tiene una identidad de al menos un 85 % con NP\_055114 que es capaz de unirse a la cromatina o de regular la transcripción.

1 msaesgpgtr lrnlpvmgdg letsqmsttq aqaqpqpana astnppppet  
 snpnkpkrrqt  
 61 nqlqyllrvv lktlwkhqfa wpfqqpvдав klnlpdyyki iktpmdmgti  
 kkrlennyyw  
 121 naqeciqrdfn tmftncyiyn kpgddivlma ealeklflqk inelpteete  
 imivqakgrg  
 181 rgrketgtak pgvstvpntt qastppqtqt pqpnpvvqa tphpfavtp  
 dliqvtpvmt  
 241 vvppqplqtp ppvppqpqp papapqpvs hppiiaatpq pvkttkgvkr  
 kadtttptti  
 301 dpiheppslp pepkttklgq rressrpvvp pkkdvpsdq hpapeksskv  
 seqlkccsgl  
 361 lkemfakkha ayawpfykpv dvealqlhdy cdiikhpm dm stiksklear  
 eyrdaqefga  
 421 dvrlmfsncy kynppdhev v amarklqdvf emrfakmpde peepvvavss  
 pavppptkv  
 481 appsssdsss dsssdsssst ddseeeraqr laelqeqlka vheqlaalsq  
 pqqnkpkkke  
 541 kdkkekkek hkrkeeven kkskakeppp kktkknssn snvskkepap  
 mskskppptye  
 601 seeedkckpm syeekrqlsl dinklpgekl grvvhiqsr epslksnpsd  
 eieidfetlk  
 661 pstlrelery vtsclrrkrk pqaekvdvia gsskmkgfss sesessess  
 ssdsedsetg  
 721 pa

Por "molécula de ácido nucleico de Brd4" se hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido de BRD4.

5 Por "polipéptido de BRDT" se hace referencia a una proteína o fragmento de la misma que tiene una identidad de al menos un 85 % con NP\_001717 que es capaz de unirse a la cromatina o de regular la transcripción.

1 mslpsrqtai ivnppppeyi ntkkngrltn qlqylqkvvl kdlwkhsfsw  
 pfqrpvdavk  
 61 lqlpdyytii knpmdlntik krlenkyak ascedfnt mfsncyllynk  
 pgddivlmaq  
 121 aleklfmqkl sqmpqeeqv gvkerikkgt qqniavssak eksspsatek  
 vfkqqeipsv  
 181 fpktsispln vvqgasvnss sqtaavtkg vkrkadttt atsavkasse  
 fsptfteksv  
 241 alppikenmp knvlpdsqqq ynvvktvkt eqlrhcseil kemlakkhfs  
 yawpfynpvd  
 301 vnalqlhnyy dvvknpmldg tikekmdnqe ykdaykfaad vrlmfmncyk  
 ynppdhevvt  
 361 marmlqdvfe thfskipiep vesmplcyik tditettgre ntneassegn  
 ssddsederv  
 421 krlaklqeql kavhqqqlqv sqvpfrklk kkekskkek kekvnnnen  
 prkmceqmr  
 481 kekskrnqpk krkqqfiglk sedednakpm nydekrqlsl ninklpqgdl  
 grvvhiqsr  
 541 epslksnpsd eieidfetlk astlreleky vsaclrkrpl kppakkimms  
 keelhsqkkq  
 601 elektrlldvn nqlnsrrkrt ksdktpksa venvsrlses ssssssses  
 esssdslss  
 661 dssdsesemf pkftevkpnd spskenvkkm knecilpegr tgvttqigycv  
 qdtttsanttl  
 721 vhttpshvm ppnhhqlafn yqelehlqtv knisplqilp psqdseqlsn  
 gitvmhpsgd

781 sdtmlesec gapvqkdiki knadswkslg kpvkpsgvmk ssdelfnqfr  
 kaaiekevka  
 841 rtqelirkhl eqntkelkas qenqrdlgnq ltvesfsnki qnksgeeqk  
 ehqqsseaqd  
 901 ksklwllkdr dlarqkeqer rrreamvgti dmtlqsdimt mfennfd

Por "molécula de ácido nucleico de BRDT" se hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido de BRDT.

5 Por "mejorar" se hace referencia a disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener, o estabilizar el desarrollo o la evolución de una enfermedad.

10 Por "alteración" se hace referencia a un cambio (aumento o disminución) en los niveles de expresión poca actividad de un gen o polipéptido tal como se detecta mediante métodos convencionales conocidos en la técnica tales como los que se describen en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, una alteración incluye un cambio de un 10 % en los niveles de expresión, preferentemente un cambio de un 25 %, más preferentemente un cambio de un 40 %, y lo más preferentemente un cambio de un 50 % o superior en los niveles de expresión.

15 Por "análogo" se hace referencia a una molécula que no es idéntica, pero que tiene características funcionales o estructurales análogas. Por ejemplo, un análogo de polipéptido mantiene al menos algunas de las actividades biológicas de un polipéptido de origen natural correspondiente, a la vez que tiene determinadas modificaciones bioquímicas que aumentan la función del análogo con respecto a un polipéptido de origen natural. Tales modificaciones bioquímicas podrían aumentar la resistencia a proteasas, permeabilidad de la membrana, o vida media del análogo, sin alterar, por ejemplo, la unión a ligandos. Un análogo puede incluir un aminoácido no natural.

20 Por "compuesto" se hace referencia a cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

25 El término "diastereómeros" se refiere a estereoisómeros con dos o más centros de asimetría y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí.  
 El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla equimolar de dos enantiómeros se denomina una "mezcla racémica" o un "racemato".

30 El término "halógeno" se refiere a -F, -Cl, -Br o -I.

El término "haloalquilo" pretende incluir grupos alquilo tal como se ha definido anteriormente que están mono-, di- o polisustituidos con halógeno, *por ejemplo*, fluorometilo y trifluorometilo.

35 El término "hidroxilo" se refiere a -OH.

El término "heteroátomo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un átomo de cualquier elemento distinto del carbono o del hidrógeno. Los heteroátomos preferentes son nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.

40 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros aromáticos que tiene 1-4 heteroátomos en el anillo si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S, y siendo carbono los átomos en el anillo restantes. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes al igual que para los grupos arilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridilo, furanilo, benzodioxolilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, triazolilo, tiadiazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzoxazolilo, benzofurilo, indolizínilo, imidazopiridilo, tetrazolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, e indolilo.

50 El término "heterocíclico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos que contienen al menos un átomo distinto del carbono (por ejemplo, S, O, N) dentro de una estructura anular. La estructura anular en estos compuestos orgánicos puede ser aromática o no aromática. Algunos ejemplos de restos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, piridina, pirimidina, pirrolidina, furano, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, y dioxano.

55 El término "isómeros" o "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

60

La expresión "derivados isotópicos" incluye derivados de compuestos en los que uno o más átomos en los compuestos están sustituidos con isótopos correspondientes de los átomos. Por ejemplo, un derivado isotópico de un compuesto que contiene un átomo de carbono ( $C^{12}$ ) sería uno en el que el átomo de carbono del compuesto está sustituido con el isótopo  $C^{13}$ .

El término "neoplásico" se refiere a aquellas células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anómala caracterizados por una proliferación rápida del crecimiento celular. Una patología neoplásica se puede clasificar como patológica, es decir, que se caracteriza o que constituye una patología, o se puede clasificar como no patológica, es decir, una desviación del estado normal pero que no está asociada con una patología. El término pretende hacer referencia a la inclusión de todo tipo de crecimientos cancerosos o de procesos oncongénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o estadio de invasión. Las células "hiperproliferativas patológicas" se producen en patologías caracterizadas por un crecimiento tumoral maligno. Los ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas.

Las neoplasias ilustrativas susceptibles de tratamiento con un compuesto de la invención incluyen leucemias (por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia de linaje mixto, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, policitemia vera, linfoma de linfocitos T cutáneo (CTCL), linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad de no Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de testículo, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma del nervio acústico, tumor neuroendocrino, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma).

En un aspecto, la neoplasia está dirigida por un activador de la transcripción dominante, tal como myc. Tales cánceres incluyen linfoma de Burkitt, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon, neuroblastoma, blastoma multiforme glial, leucemias dirigidas por MLL, leucemias linfocíticas crónicas, carcinoma de células escamosas que implica una reorganización de NUT, así como otros cánceres que implican proteínas que contienen bromodominios o reorganizaciones de NUT.

La expresión "inhibición del crecimiento" de la neoplasia incluye la ralentización, interrupción, detención o parada de su crecimiento y metástasis y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento neoplásico.

Por "formación de modelos por ordenador" se hace referencia a la aplicación de un programa de ordenador para determinar uno o más de los siguientes: la ubicación y la proximidad de unión de un ligando a un resto de unión, el espacio ocupado de un ligando unido, la cantidad de superficie de contacto complementaria entre un resto de unión y un ligando, la energía de deformación de la unión de un ligando dado a un resto de unión, y alguna estimación energías de fuerza de unión de hidrógeno, interacción de van der Waals, integración hidrófoba, y/o e interacción electrostática entre ligando y del resto de unión. La formación de modelos por ordenador también puede proporcionar comparaciones entre las características de un sistema moderno y un compuesto candidato. Por ejemplo, un experimento de formación de modelos por ordenador puede comparar un modelo farmacóforo con un compuesto candidato para evaluar el ajuste del compuesto candidato con el modelo.

Por un "sistema de ordenador" se hace referencia a los medios de hardware, medios de software y medios de almacenamiento de datos usados para analizar los datos de coordinación atómica. Los medios de hardware mínimo de los sistemas basados en ordenador que se desgrena en el presente documento comprenden una unidad de central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos. De forma deseable, se proporciona un monitor para visualizar los datos de estructuras. Los medios de almacenamiento de datos pueden ser RAM o medios de acceso a medios que se pueden leer en ordenador que se desgrena en el presente documento. los ejemplos de tales sistemas son estaciones de trabajo de microordenador disponibles en Silicon Graphics Incorporated y Sun Microsystems que ejecutan sistemas operativos basados en Unix, Windows NT o IBM OS/2.

Por "medios que se pueden leer en ordenador" se hace referencia a cualquier medio que se puede leer y acceder directamente con un ordenador por ejemplo de modo que el medio es adecuado para uso en el sistema de ordenador que se ha mencionado anteriormente. los medios incluyen, pero no se limitara: medios de

almacenamiento magnético tales como disquetes, medio de almacenamiento de disco duro y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como discos ópticos o CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

En la presente divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos y pueden hacer referencia a "incluye", "que incluye", y similares; "que consiste básicamente en" o "que consiste básicamente" del mismo modo tiene el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos y la expresión no es concluyente, lo que permite la presencia de más expresiones las que se mencionan siempre y cuando las características básicas o nuevas de lo que se menciona no cambien por la presencia de más de lo que se menciona, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito a detectar.

Por "marca detectable" se hace referencia a una composición que cuando se une una molécula de interés emite la última detectable, a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, las marcas útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos de densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, tal como se usan normalmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos.

Por "enfermedad" se hace referencia a cualquier afección o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido, u órgano. Los ejemplos de enfermedades susceptibles a tratamiento con compuestos que se definen en el presente documento incluyen una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. Los usos adicionales de las composiciones que se desvelan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia.

Por "cantidad eficaz" se hace referencia a la cantidad necesaria de un agente para mejorar los síntomas de una enfermedad con respecto a un paciente sin tratar. De la cantidad eficaz de compuesto o compuestos activos usados para poner en práctica la presente invención para tratamiento terapéutico de una enfermedad varía dependiendo del modo de administración, la edad, peso corporal, y salud general del sujeto. por último, el médico o el veterinario que prescribe decidirá la cantidad y el régimen de dosificación apropiados. Tal cantidad se denomina una cantidad "eficaz".

El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla equimolar de dos enantiómeros se denomina una "mezcla racémica" o un "racemato".

El término "halógeno" se refiere a -F, -Cl, -Br o -I.

El término "haloalquilo" pretende incluir grupos alquilo como se ha definido anteriormente que está mono-, di- o polisustituidos con halógeno, por ejemplo, fluorometilo y trifluorometilo.

El término "hidroxilo" se refiere a -OH.

El término "heteroátomo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un átomo de cualquier elemento distinto del carbono o del hidrógeno. Los heteroátomos preferentes son nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros aromático que tiene 1-4 heteroátomos en el anillo si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, con dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S, y siendo carbono los restantes átomos en el anillo. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, por ejemplo, sustituyentes tal como se describe en el presente documento para grupos arilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridilo, furanilo, benzodioxolilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, triazolilo, tiadiazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzoxazolilo, benzofurilo, indolizínilo, imidazopiridilo, tetrazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, e indolilo.

El término "heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos que contienen al menos un átomo distinto del carbono (por ejemplo, S, O, N) dentro de una estructura anular. La estructura anular en estos compuestos orgánicos puede ser aromática o, en determinados ejemplos, no aromática. Algunos ejemplos de restos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, piridina, pirimidina, pirrolidina, furano, tetrahydrofurano, tetrahidrotiofeno, y dioxano.

El término "isómeros" o "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

La expresión "derivados isotópicos" incluye derivados de compuestos en los que uno o más átomos en los compuestos están sustituidos con isótopos los correspondientes de los átomos. Por ejemplo, un derivado isotópico de un compuesto que contiene un átomo de carbono ( $C^{12}$ ) sería uno en el que el átomo de carbono del compuesto está sustituido con el isótopo  $C^{13}$ .

Los inventores desvelan un número de dianas que son útiles para el desarrollo de fármacos altamente específicos para tratamiento o un trastorno caracterizado por los métodos que se definen en el presente documento. Además, los inventores desvelan como proporcionar un medio fácil para identificar terapias que son seguras para uso en sujetos. Además, los inventores desvelan una ruta para analizar virtualmente cualquier número de compuestos para efectos en una enfermedad que se describe en el presente documento con rendimiento de alto volumen, sensibilidad elevada, y baja complejidad.

Por "ajuste" se hace referencia a la determinación, mediante medios automáticos, o semiautomáticos, de interacciones entre uno o más átomos de una molécula de agente y uno o más átomos o sitios de unión de un miembro de la familia BET (por ejemplo, un bromodominio de BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT), y determinar la extensión hasta la que son estables tales interacciones. En el presente documento se prescriben adicionalmente diversos métodos de ajuste basados en ordenador.

Por "fragmento" se hace referencia a una parte de un polipéptido o molécula de ácido nucleico. Esta parte contiene, preferentemente, al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, o un 90 % de toda la longitud de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

"Hibridación" se refiere a enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre nucleobases complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno.

Por "nucleótido aislado" se hace referencia a un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN) que está libre de los genes que, en el genoma de origen natural del organismo a partir del que tiene su origen en la molécula de ácido nucleico que se desvela en el presente documento, flanquean el gen. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido de replicación autónoma o virus; o en el ADN genómico de una célula procariota o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un ADN genómico o fragmento de ADNc producido por PCR o digestión de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Además, la expresión incluye una molécula de ARN que se transcribe a partir de una molécula de ADN, así como un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales.

Por un "polipéptido aislado" se hace referencia a un polipéptido tal como se desvela en el presente documento que se ha separado de los componentes que le acompañan de forma natural. Por lo general, el polipéptido se aísla cuando está libre en al menos un 60 %, en peso, de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que se asocia de forma natural. Preferentemente, la preparación es de al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, y lo más preferentemente al menos un 99 %, en peso, de un polipéptido que se desvela en el presente documento. Un polipéptido aislado se puede obtener, por ejemplo, por extracción a partir de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica tal polipéptido; o mediante síntesis química de la proteína. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, análisis de cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o por HPLC.

Por "marcador" se hace referencia a cualquier proteína o polinucleótido que presenta una alteración en el nivel de expresión o actividad que están asociados con una enfermedad o trastorno.

Como se usa en el presente documento, "obtener" tal como en "obtener un agente" incluye sintetizar, comprar, o de cualquier otro adquirir modo el agente.

El término "neoplásica" se refiere a las células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anómalos caracterizados por una proliferación rápida del crecimiento celular. Una patología neoplásica se puede clasificar como patológica, es decir, que se caracteriza o que constituye una patología, o se puede clasificar como no patológica, es decir, una desviación del estado normal pero que no está asociada con una patología. El término pretende incluir todo tipo de crecimientos cancerosos o de procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o estadio de invasión. Las células "hiperproliferativas patológicas" se producen en patologías caracterizadas por un crecimiento tumoral maligno. Los ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas.

La expresión "inhibición del crecimiento" de la neoplasia incluye la ralentización, interrupción, detención o parada de su crecimiento y metástasis y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento neoplásico.

El significado médico común del término "neoplasia" se refiere a "nuevo crecimiento celular" que aparece como una pérdida de respuesta a los controles de crecimiento normal, por ejemplo al crecimiento de células neoplásicas. Una "hiperplasia" se refiere a célula se experimentan una tasa de crecimiento anómalamente elevada. Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término neoplasia se refiere por lo general a que las células experimentan tasas de crecimiento celular anómalo. Las neoplasias incluyen "tumores", que pueden ser benignos, premalignos o malignos.

El término "obtener" tal como en "obtener compuestos" pretende incluir comprar, sintetizar o de otro modo adquirir el compuesto.

La expresión "isómeros ópticos" tal como se usan en el presente documento incluye moléculas, también conocidas como moléculas quirales, que son imágenes especulares no superponibles exactas entre sí.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Los términos "policíclico" o "radical policíclico" se refieren al radical de dos o más anillos cíclicos (*por ejemplo*, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, arilo y/o heterociclos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, *por ejemplo*, los anillos son "anillos condensados". Los anillos que se unen a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "unidos por puente". Cada uno de los anillos del policiclo pueden estar sustituidos con tales sustituyentes tal como se ha descrito anteriormente, tal como *por ejemplo*, halógeno, hidroxilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilo amino, dialquilamino, arilamino, diarilamino, y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureído), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterocíclico, alquilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

El término "polimorfo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a formas cristalinas sólidas de un compuesto de la presente invención o complejo de las mismas. Diferentes polimorfos del mismo compuesto pueden presentar diferentes propiedades físicas, químicas y/o espectroscopias. Las diferentes propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a estabilidad (*por ejemplo*, al calor o a la luz), capacidad de comprensión y densidad (importante en formulación y preparación de productos), y tasas de disolución (que pueden afectar a la biodisponibilidad). Las diferencias en la estabilidad pueden dar como resultado cambios en la reactividad química (*por ejemplo*, oxidación diferencial, tal como una forma de clasificación que se decolora más rápidamente cuando está formada por un polimorfo que cuando está formada por otro polimorfo) o características mecánicas (*por ejemplo*, comprimidos que se desmenuzan en el almacenamiento a medida que un polimorfo favorecido cinéticamente se convierte en un polimorfo más estable termodinámicamente) o ambos (*por ejemplo*, los comprimidos de un polimorfo son más susceptibles a descomposición a humedad elevada). Las diferentes propiedades físicas de los polimorfos pueden afectar a su procesamiento.

El término "profármaco" incluye compuestos con restos que se pueden metabolizar *in vivo*. Generalmente, los profármacos se metabolizan *in vivo* por esterasas o mediante otros mecanismos en fármacos activos. En la técnica se conocen bien ejemplos de profármacos y sus usos (Véase, *por ejemplo*, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los profármacos se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos, o haciendo reaccionar de forma separada el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente de esterificación adecuado. Los grupos hidroxilo se pueden convertir en ésteres a través de tratamiento con un ácido carboxílico. Ejemplos de restos de profármaco incluyen restos de éster de alquilo inferior ramificados o sin ramificar, sustituidos y sin sustituir, (*por ejemplo*, ésteres del ácido propiónico), ésteres alqueno de inferior, ésteres de di-alquilo inferior-amino-alquilo inferior (*por ejemplo*, éster de dimetilaminoetilo), ésteres de acilamino alquilo inferior (*por ejemplo*, éster de acetiloximetilo), ésteres de acilo alquilo inferior (*por ejemplo*, éster de pivaloiloximetilo), ésteres de arilo (éster de fenilo), ésteres de aril-alquilo inferior (*por ejemplo*, éster de bencilo), ésteres de arilo y aril-alquilo inferior sustituidos (*por ejemplo*, con sustituyentes metilo, halo, o metoxi), amidas, amidas de alquilo inferior, amidas de di-alquilo inferior, e hidroxí amidas. Los restos de profármaco preferentes son ésteres del ácido propiónico y ésteres de acilo. También se incluyen profármacos que se convierten en formas activas a través de otros mecanismos *in vivo*.

Además, la indicación de estereoquímica a través de un doble enlace carbono-carbono también es opuesta a la del campo químico general en la que "Z" se refiere a lo que a menudo se denomina una conformación "cis" (mismo lado) mientras que "E" se refiere a lo que a menudo se denomina una conformación "trans" (lado opuesto). Ambas configuraciones, cis/trans y/o Z/E se incluyen en los compuestos de la presente invención.

Con respecto a la nomenclatura de un centro quiral, los términos configuración "d" y "l" son tal como se definen en las Recomendaciones de la IUPAC. Con respecto al uso de los términos, diastereómero, racemato, epímero y enantiomérico, éstos se usarán en su contexto normal para describir la estereoquímica de las preparaciones.

- 5 Por "reduce" se hace referencia a una alteración negativa de al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 75 %, o un 100 %.

Por "referencia" se refiere a una condición estándar o de control.

- 10 Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc de longitud total o secuencia genética, o el ADNc completo o secuencia genética. Para polipéptidos, la longitud de la secuencia de polipéptidos de referencia por lo general será de aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente de al menos
- 15 aproximadamente 25 aminoácidos, e incluso más preferentemente de aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos. Para ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia por lo general será de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos, e incluso más preferentemente de aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300
- 20 nucleótidos o cualquier número entero alrededor de los mismos o entre los mismos.

- Por "se une de forma específica" se hace referencia a un compuesto o anticuerpos que reconoce y se une a un polipéptido que se desvela en el presente documento, pero que básicamente no reconoce y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente un polipéptido que se
- 25 desvela en el presente documento.

- Las moléculas de ácidos nucleicos útiles en los métodos que se desvelan en el presente documento incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se desvela en el presente documento un
- 30 fragmento de la misma. No es necesario que tales moléculas de ácidos nucleicos sean idénticas en un 100 % con una secuencia de ácidos nucleicos endógena, pero por lo general presentara una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con una secuencia endógena por lo general son capaces de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Las moléculas de ácidos nucleicos útiles en los métodos que se desvelan en el presente documento incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido que se desvela en el presente documento o un fragmento de la misma. No es
- 35 necesario que tales moléculas de ácidos nucleicos sean idénticas en un 100 % con una secuencia de ácidos nucleicos endógena, pero por lo general presentarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con una secuencia endógena por lo general son capaces de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por "hibridar" se hace referencia a una pareja para formar un anillo de molecular bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen que se
- 40 describe en el presente documento), o porciones del mismo, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152: 507).

- Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa normalmente será inferior a aproximadamente 750 mM de NaCl y 75
- 45 mM de citrato trisódico, preferentemente inferior a aproximadamente 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato trisódico, y más preferentemente inferior a aproximadamente 250 mM de NaCl y 25 mM de citrato trisódico. Se puede obtener hibridación con rigurosidad baja en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, aunque se puede obtener hibridación con rigurosidad elevada en presencia de al menos aproximadamente un 35 % de formamida, y más preferentemente al menos aproximadamente un 50 % de formamida. Las condiciones rigurosas de temperatura
- 50 incluirán normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C, y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. Los expertos en la materia conocen bien los parámetros adicionales variables, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS), y la inclusión o exclusión de un ADN vehículo. Si fuera necesario se consiguen diversos niveles de rigurosidad mediante la combinación de estas diversas condiciones. En
- 55 un ejemplo preferente, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM, y SDS al 1 %. En un ejemplo más preferente, la hibridación se producirá a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1 %, formamida al 35 %, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNss). En un ejemplo más preferente, la hibridación se producirá a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1 %, formamida al 50 %, y 200 µg/ml de ADNss. Las variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los
- 60 expertos en la materia.

- Para la mayoría de las aplicaciones, la rigurosidad de las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán. Las condiciones de rigurosidad de lavado se pueden definir por la concentración de la sal y por la temperatura. Tal como se mencionó anteriormente, la rigurosidad del lavado puede aumentar mediante la
- 65 disminución de la concentración de sal o mediante el aumento de la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferentemente inferior a aproximadamente NaCl 30 mM y citrato

trisódico 3 mM, y lo más preferentemente inferior a aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. las condiciones de temperaturas rigurosas para las etapas de lavado incluirán habitualmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 68 °C. En un ejemplo preferente, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM, y SDS al 0,1 %. En un ejemplo más preferente, las etapas de lavado se producirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM, y SDS al 0,1 %. En un ejemplo más preferente, las etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM, y SDS al 0,1 %. Las variaciones adicionales en estas condiciones serán rápidamente evidentes para los expertos en la materia. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975); Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Por "básicamente idéntica" se hace referencia a un polipéptido o molécula de ácido nucleico representa una identidad de al menos un 85 % con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se describen en el presente documento) o secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos que se describen en el presente documento). Preferentemente, tal secuencia es idéntica en al menos un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 % al nivel de aminoácido o ácido nucleico con la secuencia usada para comparación.

Por lo general, la identidad de las secuencias se mide usando software para análisis de secuencias (por ejemplo, el Paquete de Software para Análisis de Secuencias del Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, los programas BLAST, BESTFIT, GAP, o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software empareja secuencias idénticas o similares mediante la asignación de grados de homología a diversas sustituciones, supresiones, y/o otras modificaciones. Las sustituciones conservativas por lo general incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de entidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e.sup.-3 y e.sup.-100 que indica una secuencia muy relacionada.

Por "reduce" o "aumenta" se hace referencia a una alteración negativa o positiva, respectivamente, de al menos aproximadamente un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 75 %, o un 100 % con respecto a una referencia.

Por "raíz de la desviación cuadrática media" se hace referencia a la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones a partir de la media.

Por "reducir la supervivencia celular" se hace referencia a inhibir la viabilidad de una célula o inducir la muerte celular con respecto a una célula de referencia.

Por "referencia" se hace referencia a una condición estándar de control.

Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para comparación de secuencias. Una especie de referencia puede ser un subconjunto de o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia genética, o el ADNc completo o secuencia genética. Para polipéptidos, la longitud de la secuencia de polipéptidos de referencia por lo general será de aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 25 aminoácidos, e incluso más preferentemente de aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos. Para ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia será por lo general de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, preferentemente de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 75 nucleótidos, e incluso más preferentemente de aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 nucleótidos o cualquier número entero alrededor de los mismos o entre los mismos.

Por "sujeto" se hace referencia a un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino, o felino.

Por "se une de forma específica" se hace referencia a un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido que se desvela en el presente documento, pero que no reconoce básicamente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente un polipéptido que se desvela en el presente documento.

El término "sulfhidrilo" o "tio" se refiere al -SH.

Como se usa en el presente documento, el término "tautómeros" se refiere a isómeros de moléculas orgánicas que se interconvierten fácilmente mediante tautomería, en la que un átomo de hidrógeno o protón migra en la reacción, acompañado en algunas ocasiones por un intercambio de un enlace sencillo y un doble enlace adyacente.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento", y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con los mismos. Por "mejorar" se hace referencia a disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener, o estabilizar el desarrollo por evolución de una enfermedad. Se observará que, aunque no se excluye, el tratamiento de un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas asociados con los mismos se eliminen completamente.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollo de un trastorno o afección en un sujeto, que no tiene, pero que presenta el riesgo o es susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

"Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto, que transmite un efecto terapéutico en el sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, se puede medir con algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). Una cantidad eficaz de un compuesto que se describe en el presente documento puede variar de aproximadamente 1 mg/Kg a aproximadamente 5000 mg/Kg de peso corporal. Las dosis eficaces también variarán dependiendo de la vía de administración, así como de la posibilidad de co-uso con otros agentes.

Se entiende que los intervalos proporcionados en el presente documento son clave para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento", y similares se refieren a la reducción o mejora de un trastorno y/o síntomas asociados con los mismos. Se observará que, aunque no se descarte, el tratamiento de un trastorno o afección no necesita que el trastorno, afección o síntomas asociados con los mismos se eliminen completamente.

A menos que se indique de forma específica o sea evidente a partir del contexto, tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique de forma específica o sea evidente a partir del contexto, tal como se usa en el presente documento, se entiende que los términos "un", "uno", y "el" están en singular o plural.

A menos que se indique de forma específica o sea evidente a partir del contexto, tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente" está dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Se puede entender que aproximadamente está dentro de un 10 %, un 9 %, un 8 %, un 7 %, un 6 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, un 1 %, un 0,5 %, un 0,1 %, un 0,05 %, o un 0,01 % del valor indicado. A menos que quede claro de otro modo a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en el presente documento se modifican con el término aproximadamente.

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura de los dos estereoisómeros JQ1. El centro estereogénico en C6 está indicado con un asterisco (\*).

Las Figuras 2A, 2B, y 2C son gráficos que muestran que enantiómero (-)-JQ1 no se une de forma competitiva a BRD4-NUT en células. La Figura 2A muestra que la recuperación de fluorescencia después de fotolixiviación (FRAP) de GFP-BRD4 no se vea afectada por la presencia de (-)-JQ1 (250 nM, 5 h) en comparación con el control de vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 5). La Figura 2B muestra que el GFP-BRD4 expresado demuestra un aumento de la recuperación en presencia de (+)-JQ1 (250 nM, 5 h), en un estudio comparativo en paralelo. Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 5). La Figura 2C proporciona una comparación cuantitativa de la fracción móvil de GFP-BRD4 observada en estudios de FRAP (a,b). Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 5) y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas que compara muestras tratadas con ligando con controles de vehículo.

Las Figuras 3A-3J muestran que JQ1 une BRD4 de forma competitiva con cromatina y diferencia células de carcinoma de línea media de NUT humanas. La Figura 3A muestra la recuperación de fluorescencia después de fotolixiviación (FRAP) de GFP-BRD4 que demuestra un aumento de la recuperación en presencia de JQ1. los núcleos se colorean de forma falsa en proporción con la intensidad de la fluorescencia. Los círculos de color blanco indican regiones de fotolixiviación. Las Figuras 3B-3D muestran que JQ1 acelera la recuperación de fluorescencia en experimentos de FRAP realizados con GFP-BRD4 (Figura 3B) y GFP-BRD4-NUT (Figura 3C) transfectados, pero no tiene efecto en la recuperación del GFP-NUT nuclear (Figura 3D). La Figura 3E muestra una comparación cuantitativa del tiempo hasta la recuperación de la presencia semimáxima para estudios de FRAP (Figuras 3B-3D). Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 5), y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas. En la Figura 3F, JQ1 (500 nM, 48 h) provoca una pérdida de tinción nuclear focal para NUT (anti-NUT; 40x). La Figura 3G muestra que las células NMC tratadas con JQ1 (500 nM, 48 h) demuestran signos citológicos de diferenciación escamosas (H y E; 40x). La Figura 3H muestra que JQ1 (500 nM) provoca la diferenciación de las células NMC, dependiente del tiempo y se caracteriza por un aumento notable de la expresión de citoqueratina (AE1/AE3; 40x). Las Figuras 3I-3J muestran que JQ1 atenuar

la proliferación rápida de líneas celulares (Figura 3I) 797 y (Figure 3J) Per403 de NMC *in vitro* (Ki67; 40x).

La Figura 4A, 4B, y 4C son micrografías que muestran que JQ1 induce de forma selectiva la diferenciación escamosa en carcinoma de línea media de NUT. La Figura 4a muestra que las células 797 de NMC tratadas con JQ1 (500 nM) demuestran signos citológicos dependientes del tiempo de diferenciación escamosas (H y E; 40x y 100x, tal como se muestra), ejemplificados mediante formación de husos celulares, aplanamiento y el desarrollo de cromatina abierta. La Figura 4B muestra que las células Per403 de NMC tratadas con JQ1 (500 nM, 48 h) presentan signos comparables de diferenciación escamosa. La formación de husos celulares y la queratinización citosólica se ilustra por la tinción de H y E y queratina, respectivamente (40x). La Figura 4C muestra que la línea celular TE10 de carcinoma de células escamosas no NMC fracasa en la diferenciación de la respuesta a JQ1 (500 nM), ilustrada por la tinción de H y E y queratina (AE1/AE3) (40x).

La Figura 4D-a-4D-b muestra que JQ1 altera la proliferación celular de NMC. La Figura 4D-a incluye dos micrografías que muestran que JQ1 atenúa la proliferación rápida de líneas celulares Per403 de NMC *in vitro* (Ki67; 40x). Las imágenes se muestran con aumento idéntico. La Figura 4D-b es un gráfico que muestra el efecto de JQ1 en la proliferación celular (tinción y positividad de Ki67; %) tal como se mide mediante IHC animal que se realiza en (4D-a) y en la Figura 3J. las células se puntuaron manualmente como positivas (núcleos teñidos de color oscuro) o negativas (núcleos teñidos de color azul pálido) para Ki67 en cinco campos de potencia elevada. Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 5), y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas.

La Figura 4E-a, b, c, d muestra que la inducción de diferenciación escamosa en células de carcinoma de línea media de NUT por JQ1 es estereoespecífica y dependiente del tiempo. La Figura 4E-a incluye seis micrografías, que muestran que las células 797 de NMC tratadas en portaobjetos de cámara con (-)-JQ1 (100 nM) presentaban fenotípicos citosólicos comparables en comparación con los controles tratados con vehículo. (+)-JQ1 (100 nM, 48 h) provocaba diferenciación escamosa presentada por formación de husos celulares, aplanamiento y aumento de la expresión de queratina. La Figura 4E-b muestra que las células 797 de NMC tratadas con enantiómeros de JQ1 o vehículos se centrifugaron, se fijaron, se seccionaron y se tiñeron para la expresión de queratina (a la izquierda; AE1/AE3, 20x). Se realizó análisis basado en imágenes de expresión de queratina en portaobjetos preparados de forma simultánea usando algoritmos de enmascaramiento y cuantificación sin sesgar capaces de puntuar los núcleos para la intensidad de la tinción (a la derecha; 20x). La Figura 4E-c muestra que (+)-JQ1 (250 nM) indujo la expresión rápida de la queratina en células 797 de NMC tratadas en comparación con (-)-JQ1 (250 nM) y controles de vehículos, tal como se determina por inmunohistoquímica cuantitativa. Se presenta el porcentaje de núcleos positivos por condición de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 3) y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas. Figura 4E-d, (+)-JQ1 (250 nM) provoca una inducción dependiente del tiempo de tinción de queratina fuerte (3+) de células 797 de NMC tratadas, en comparación con (-)-JQ1 (250 nM). Se presenta el porcentaje de núcleos positivos por condición de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 3) y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas. Se muestran imágenes agrupadas con un aumento idéntico.

Las Figuras 4Fa-c muestran que las líneas celulares de carcinoma de células escamosas que no poseen la translocación de BRD4-NUT son menos sensibles al tratamiento con JQ 1. Se cultivaron líneas celulares de carcinoma de células escamosas gastrointestinal (TT y TE10) en presencia de (+)-JQ1 (250 nM, círculos de color rojo) o (-)-JQ1 (250 nM, círculos de color negro) durante 72 horas. Los efectos de mínimos observados en la proliferación celular con JQ1 son coherentes con un papel plausible en la evolución del ciclo celular en células en mitosis<sup>7</sup>. Los datos se presentan como media  $\pm$  d.t. (n = 3). Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon por regresión logística.

Las Figuras 5A-5K muestran que el tratamiento de JQ1 inhibe la proliferación, da lugar a la diferenciación y muerte celular *in vitro* e *in vivo*. La Figura 5a muestra los efectos de crecimiento de la inhibición de BRD4 en líneas celulares dependientes de BRD4-NUT. Las células se incubaron con (+)-JQ1 (círculos de color rojo) o (-)-JQ1 (círculos de color negro) y se controló la proliferación después de 72 horas. (+)-JQ1 únicamente atenuó la proliferación por líneas celulares de NMC. Los datos se presentan como media  $\pm$  d.t. (n = 3). Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon por regresión logística. La Figura 5B muestra que los efectos antiproliferativos progresivos de (+)-JQ1 en células 797 de NMC en el tiempo se mostraron en los días 1, 3, 7 y 10. Los puntos de datos son la media  $\pm$  d.t. (n = 3). La Figura 5C muestran los resultados de citometría de flujo para el contenido de ADN en células 797 de NMC. (+)-JQ1 (250 nM, 48 h) indujo una detención de G1 en comparación con (-)-JQ1 (250 nM) y control del vehículo. La Figura 5D muestran los resultados de un análisis de citometría de flujo de células de carcinoma de células escamosas 797 de NMC tratadas con vehículo, JQ1 o estaurosporina (STA), tal como se indica. PI, yoduro de propidio. AV, anexina-V. La Figura 5E muestra los resultados de formación de imágenes por PET de xenoinjertos de 797 de NMC de murino. La absorción de FDG xenoinjertos en extremidades posteriores se reduce en 50 mg kg<sup>-1</sup> de tratamiento de JQ1 en comparación con el control del vehículo. La Figura 5F muestra que el volumen tumoral se reduce en ratones con enfermedad establecida (xenoinjertos de 797 de NMC) tratados con 50 mg kg<sup>-1</sup> diariamente de JQ1 en comparación con el control del vehículo. Se observa una respuesta significativa a la terapia mediante un ensayo de *t* de dos colas a los 14 días (*p* = 0,039). Los datos representan la media  $\pm$  d.t. (n = 7). La Figura 5G muestra que un análisis histopatológico de tumores 797 de NMC extirpados de animales tratados con JQ1 revela la inducción de la expresión de queratina (AE1/AE3, 40x) y proliferación alterada (Ki67, 40x), en comparación con animales tratados con vehículo (la barra de escala es de 20  $\mu$ m). En las Figuras Complementarias 11, 12 se proporcionan campos expandidos. La Figura 5H muestra que la viabilidad de xenoinjertos de 11060 de NMC derivados de paciente se confirmó por formación de imágenes por

PET. La Figura 5L muestra que la respuesta terapéutica de xenoinjertos de 11060 NMC primarios a (+)-JQ1 (50 mg kg<sup>-1</sup> diariamente durante cuatro días) se demostró por formación de imágenes por PET. La Figura 5J muestra que un análisis histopatológico de tumores 11060 de NMC primarios extirpados de animales tratados con (+)-JQ1 revela la inducción de la expresión de queratina (AE1/AE3, 20x; la barra de escala es de 20 µm), en comparación con los animales tratados con vehículo. El análisis cuantitativo de inducción de queratina se realizó usando análisis de enmascaramiento de imágenes (Figura 5J, panel a la derecha) y de positividad de píxeles (Figura 5K). Se observa una respuesta significativa a la terapia mediante un ensayo de *t* de dos colas (*p* = 0,0001). Los datos representan la media ± d.t. de tres campos microscópicos amplios independientes. Las imágenes comparativas de los tumores extirpados teñidos y los enmascaramientos cuantitativos se proporcionan en la Figura 9.

La Figura 5L-a y 5L-b son gráficos que muestran que los ratones que portan xenoinjertos de 797 de NMC toleran la terapia con JQ1, que provoca un efecto antitumoral. La Figura 5L-a muestra que el tratamiento de ratones que portan xenoinjerto de 797 de NMC con JQ1 (50 mg kg<sup>-1</sup> al día) redujo la carga tumoral durante más de 14 días de terapia. Los datos representan la media ± d.t. (*n* = 7). La Figura 5L-b muestra que JQ1 no produjo efectos sintomas adversos ni pérdida de peso. Los datos representan la media ± d.t. (*n* = 7).

La Figura 5M-a-d muestra que la inducción de diferenciación escamosa en células de carcinoma de línea media de NUT por JQ1 es estereoespecífica y dependiente del tiempo. La Figura 5M-a son micrografías que muestran que las células 797 de NMC tratadas en portaobjetos de cámara con (-)-JQ1 (100 nM) presentan fenotipos citosólicos comparables en comparación con los controles tratados con vehículo. (+)-JQ1 (100 nM, 48 h) da lugar a diferenciación escamosa presentada por formación de husos celulares, aplanamiento y aumento de la expresión de queratina.

La Figura 5M-b son micrografías. Las células 797 de NMC tratadas con enantiómeros de JQ1 o vehículo se centrifugaron, se fijaron, se seccionaron y se tiñeron para expresión de queratina (a la izquierda; AE1/AE3, 20x). Se realizó análisis basado en imágenes de expresión de queratina en portaobjetos preparados de forma simultánea usando algoritmos de enmascaramiento y cuantificación sin sesgar capaces de puntuar los núcleos para la intensidad de la tinción (a la derecha; 20x). La Figura 5M-c es un gráfico que muestra que (+)-JQ1 (250 nM) induce una expresión rápida de la queratina en células 797 de NMC tratadas en comparación con (-)-JQ1 (250 nM) y control del vehículos, tal como se determina mediante inmunohistoquímica cuantitativa. Se presenta el porcentaje de núcleos positivos por condición de tratamiento. Los datos representan la media ± d.t. (*n* = 3) y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas. La Figura 5M-d es un gráfico que muestra que (+)-JQ1 (250 nM) provoca una inducción dependiente del tiempo de tinción de queratina fuerte (3+) de células 797 de NMC tratadas, en comparación con (-)-JQ1 (250 nM). Se presenta el porcentaje de núcleos positivos por condición de tratamiento. Los datos representan la media ± d.t. (*n* = 3) y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas. Se muestran imágenes agrupadas con un aumento idéntico.

Las Figuras 6A y 6B-a-6B-e proporcionan micrografías que muestran que JQ1 da lugar a diferenciación escamosa, detención del crecimiento y apoptosis *in vivo*, tal como se determina por IHC. El análisis histopatológico de tumores de NMC extirpados de animales tratados con JQ1 (panel de la derecha) revela diferenciación escamosa (H y E, 40x), borrado de focos de NUT nuclear (NUT, 100x), proliferación alterada (Ki67, 40x), inducción de expresión de queratina (AE1/AE3, 40x) y una respuesta apoptótica (TUNNEL, 40x), todo en comparación con los animales tratados con vehículo (panel de la izquierda).

Las Figuras 7A y 7B muestran que JQ1 induce de forma selectiva la apoptosis en NMC entre líneas celulares de carcinoma de células escamosas humano. La Figura 7A proporciona los resultados del análisis de FACS. Las células Per403 de NMC tratadas con JQ1 (500 nM, 24 o 48 h) presentan inducción de apoptosis por citometría de flujo, en contraste con las líneas celulares TE10 y TT de carcinoma de células escamosas no NMC. PI, yoduro de propidio, AV, anexina V. La Figura 7B muestra una cuantificación y comparación de células positivas para anexina-V por citometría de flujo tal como se realiza en la Figura 5b y a. JQ1 (500 nM) presentaba una inducción provocada y dependiente del tiempo de la apoptosis en líneas de células de NMC en comparación con líneas celulares de carcinoma de células escamosas no NMC. Los datos representan la media ± d.t. (*n* = 3), y se anotan con valores de *p* tal como se obtienen a partir de un ensayo de *t* de dos colas.

Las Figuras 8A-8C son gráficos que muestran que el tejido derivado de un paciente con NMC es sensible a los efectos antiproliferativos de (+)-JQ1 *in vitro*. La Figura 8A muestra resultados del análisis de células 11060 de NMC derivadas de paciente. Las células se aislaron a partir de material clínico descartado y cultivaron en cultivos a corto plazo para estudios *in vitro*. Los efectos antiproliferativos de la inhibición de BRD4 en células 11060 de NMC se midieron después de 72 horas de incubación con (+)-JQ1 (círculos de color rojo) o (-)-JQ1 (círculos de color negro). Las células 11060 de NMC son únicamente sensibles al enantiómero (+)-JQ1. Los datos se presentan como media ± d.t. (*n* = 3). Los valores de Cl<sub>50</sub> se calcularon por regresión logística. La Figura 8B muestra los efectos antiproliferativos progresivos de (+)-JQ1 en células 11060 de NMC derivadas de paciente en el tiempo tal como se demuestra en los días 1, 3, 7 y 10. Los puntos de datos son la media ± d.t. (*n* = 3). La Figura 8C muestran los resultados de citometría de Flujo para el contenido de ADN en células 11060 de NMC. (+)-JQ1 (250 nM, 48 h) induce una detención de G1 en comparación con (-)-JQ1 (250 nM) y control del vehículo.

Las Figuras 9A y 9B proporcionan una cuantificación de la expresión de queratina fuerte, difusa inducida por jq1 en tumores de xenoinjerto primario de 11060 de nmc derivados de paciente. La Figura 9a muestra un aumento pequeño (0,8x) de un xenoinjerto primario de 11060 de NMC extirpado derivado de un animal tratado con vehículo, seccionado y teñido para la expresión de queratina (AE1/AE3; a la izquierda). La tinción global de la queratina es baja a través de todo el tumor seccionado. Se realizó análisis basado en imágenes de la expresión

de queratina usando algoritmos de enmascaramiento y cuantificación sin sesgar capaces de puntuar píxeles individuales para intensidad de tinción (a la derecha). La Figura 9B muestra una imagen con aumento bajo (0,8x) de un xenoinjerto primario de 11060 de NMC extirpado derivado de un animal tratado con (+)-JQ1 (50 mg kg<sup>-1</sup> al día durante cuatro días), secciona detenido para la expresión de queratina (AE1/AE3; a la izquierda). Se observa tinción difusa coherente con un efecto uniforme en la inducción de queratina en tumores tratados con JQ1. Se realizó análisis basado en imágenes de la expresión de queratina usando algoritmos de enmascaramiento y cuantificación sin sesgar capaces de puntuar píxeles individuales para intensidad de tinción (a la derecha). La positividad de los píxeles se puntúa de forma cuantitativa y se informa visualmente como color azul (0), amarillo (1+), naranja (2+) y rojo (3+). Todas las imágenes emparejadas se muestran con un aumento idéntico.

La Figura 10 muestra que JQ1 presenta una biodisponibilidad oral excelente y exposición farmacocinética adecuada en roedores. Se realizaron estudios farmacocinéticos de (+)-JQ1 en ratones CD1 después de administración intravenosa (Figura 10A, B) y oral (Figura 10B, C). a, Perfiles de concentración-tiempo medio en plasma de (+)-JQ1 después de dosificación intravenosa (5 mg kg<sup>-1</sup>). Los datos representan la media y d.t. (n = 3). La Figura 10B muestra que los parámetros farmacocinéticos calculados para (+)-JQ1 demuestran una exposición al fármaco excelente [Área bajo la curva (AUC) = 2090 h\*ng/ml] y una vida media de aproximadamente una hora (T<sub>1/2</sub>). La Figura 10C muestra perfiles de concentración-tiempo en plasma medio de (+)-JQ1 después de dosificación oral (10 mg kg<sup>-1</sup>). Los datos representa la media y d.t. (n = 3). La Figura 10D muestra que los parámetros farmacocinéticos calculados para administración oral de (+)-JQ1 demuestran una biodisponibilidad moral excelente (F = 49 %), concentración máxima en plasma (C<sub>máx</sub> = 1180 ng/ml) y exposición al fármaco (AUC = 2090 h\*ng/ml). CL, eliminación; V<sub>ss</sub>, volumen en estado estacionario; MRT<sub>INF</sub>, tiempo medio de permanencia extrapolado al infinito; T<sub>máx</sub>, tiempo hasta la concentración máxima.

La Figura 11 es un gráfico que muestra los datos de unión por AlphaScreen para los enantiómeros de JQ1 que inhiben BRD4.1.

La Figura 12 es un gráfico que muestra los datos de unión por AlphaScreen para los enantiómeros de JQ1 que inhiben BRD4.2.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la formación de perfiles de JQ 1 S frente a otros miembros de la familia BET (activo) y CBP (inactivo).

La Figura 14 es un gráfico que muestra estudios de clasificación de dosis de una biblioteca enfocada de derivados de JQ1.

Las Figuras 15A y 15B son gráficos. La Figura 15A muestra que JQ1 redujo la carga tumoral en un modelo de xenoinjerto de murino de carcinoma de línea media de Nut. La Figura 15B muestra el peso de los ratones tratados con JQ 1.

Las Figuras 16A-16D son gráficos que muestran la actividad de unión de BRD4(1) y BRD4(2) de JQ1 y derivados del mismo.

Las Figuras 17A-17D son gráficos que muestran el efecto de JQ1 y derivados del mismo en la viabilidad celular de carcinoma de línea media de Nut (NMC).

Las Figuras 18-55 muestran la viabilidad de la respuesta a la dosis para diversas líneas celulares de cáncer tratadas con JQ1 y derivados del mismo.

Las Figuras 56A-56D son gráficos que muestran resultados de ensayos de unión de compuesto director.

## Descripción detallada de la invención

La invención presenta con puestos y composiciones tal como se define en las reivindicaciones adjuntas que son útiles para el tratamiento a la prevención de una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. Los compuestos y las composiciones que se desvelan en las reivindicaciones adjuntas se usan en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un inhibidor de molécula pequeña potente, permeable a la célula (JQ1) con selectividad bioquímica para la familia BET de bromodominios, y compuestos relacionados capaces de regular la familia del bromodominio, que son una familia de polipéptidos que contienen un bromodominio que reconoce restos de acetil-lisina en la cromatina nuclear. La acetilación de lisina ha aparecido como una modificación de la señalización de amplia relevancia para la biología celular y de enfermedades. La dirección de las enzimas que median de forma reversible la acetilación de la cadena lateral ha sido un área activa de investigación para descubrimiento de fármacos durante muchos años. Hasta la fecha, los esfuerzos satisfactorios se han limitado a los "escritores" (acetiltransferasas) y a los "eliminadores" (histona desacetilasas) de modificaciones coherentes que aparecen en el contexto de la cromatina nuclear. Aún no se han descrito inhibidores potentes de módulos de reconocimiento de acetil-lisina, o bromodominios. La reciente caracterización de una estructura cocrystalina de alta resolución con BRD4 reveló una complementariedad de formas excelente con la cavidad de unión a acetil-lisina. La unión de JQ1 a los bromodominios en tándem de BRD4 es competitiva para acetil-lisina y desplaza BRD4 de la cromatina en células humanas. Se observa translocación recurrente de BRD4 en un subtipo definido genéticamente, incurable de carcinoma de células escamosas humano. La unión competitiva de JQ1 a la oncoproteína de fusión de BRD4 da como resultado la diferenciación inmediata de células escamosas y efectos

antiproliferativos específicos en líneas celulares derivadas de paciente y en un modelo de murino de carcinoma dependiente de BRD4. Estos datos establecen la viabilidad de las interacciones proteína-proteína de dirección de "lectores" epigenéticos e informa de un andamiaje químico versátil para el desarrollo de sondas químicas más ampliamente a través de la familia del bromodominio.

## Proteínas que contienen bromodominios

La regulación genética se ve gobernada fundamentalmente por el ensamblaje no covalente, reversible de macromoléculas. La translocación de la señal a la ARN polimerasa requiere complejos proteínicos de orden más elevado, regulados espacialmente mediante factores de ensamblaje capaces de interpretar los estados de modificación posteriores a la traducción de la cromatina. Los lectores epigenéticos son proteínas estructuralmente diversas cada una de las cuales posee uno o más módulos efectores conservados de forma evolutiva, que reconocen modificaciones coherentes de proteínas histona o de ADN. La  $\epsilon$ -N-acetilación de restos de lisina (Kac) en extremos de histona está asociada con una arquitectura abierta de cromatina y activación de la transcripción<sup>3</sup>. El reconocimiento molecular específico del contexto de la acetil-lisina está mediado principalmente por bromodominios.

Las proteínas que contienen bromodominios son de interés biológico sustancial, como componentes de complejos de factores de transcripción (TAF1, PCAF, Gcn5 y CBP) y determinantes de la memoria epigenética<sup>4</sup>. Existen 41 proteínas humanas que contienen un total de 57 bromodominios diversos. A pesar de las grandes variaciones de secuencias, todos los bromodominios comparten un plegamiento conservado que comprende un haz girado hacia la izquierda de cuatro hélices alfa ( $\alpha_Z$ ,  $\alpha_A$ ,  $\alpha_B$ ,  $\alpha_C$ ), unido por diversas regiones de bucle (bucles ZA y BC) que determinan la especificidad del sustrato. Las estructuras cocrystalinas con sustratos peptídicos mostraron que la acetil-lisina está reconocida por una cavidad hidrófoba central y está anclada mediante un enlace de hidrógeno con un resto de asparagina presente en la mayoría de los bromodominios<sup>5</sup>. El bromodominio y la familia extra-terminal (BET) (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) comparten una arquitectura de dominio común que comprende dos bromodominios N-terminales que presentan un nivel elevado de conservación de secuencias, un dominio de reclutamiento C-terminal más divergente (Figura 1E)<sup>6</sup>.

## BRD4

La investigación reciente ha establecido una justificación convincente para dirigir BRD4, en cáncer. BRD4 funciona para facilitar la evolución del ciclo celular y el recorte en líneas celulares de cáncer en cultivo da lugar a detención de G1. BRD4 es un mediador importante de la elongación de la transcripción, funcionando para reclutar el complejo del factor positivo de elongación de la transcripción (P-TEFb)<sup>7,8</sup>. La quinasa-9 dependiente de ciclina, un componente fundamental de P-TEFb, es una diana validada en la leucemia linfocítica crónica<sup>9</sup>, y se ha relacionado recientemente con la transcripción dependiente de c-Myc<sup>10</sup>. Los bromodominios presentes en BRD4 reclutan P-TEFb a cromosomas y tópicos dando como resultado un aumento de la expresión de genes que promueven el crecimiento<sup>11</sup>. BRD4 permanece unido a los sitios de inicio de la transcripción de genes expresados durante M/G1 pero no se ha encontrado presente en sitios de inicio que se expresan posteriormente en el ciclo celular. Se ha mostrado que el recorte de BRD4 en células en proliferación conduce a detención y apoptosis<sup>12</sup> de G1 mediante la disminución de los niveles de expresión de genes importantes para la evolución<sup>13</sup> y la supervivencia<sup>14</sup> mitóticas.

De forma más importante, BRD4 se ha identificado recientemente como un componente de una translocación cromosómica de t(15;19) de una forma agresiva de carcinoma de células escamosas humano<sup>15,16</sup>. Tales translocaciones expresan los bromodominios N-terminales en tándem de BRD4 como una quimera en fase de lectura con la proteína NUT (proteína nuclear en testículos), definiendo genéticamente el denominado carcinoma de línea media de NUT (NMC). Los estudios funcionales en líneas celulares de NMC derivadas de paciente han validado el papel esencial oncoproteína BRD4-NUT en el mantenimiento de la ventaja de proliferación característica y bloqueo de diferenciación de esta neoplasia uniformemente mortal<sup>17</sup>. En particular, el silenciamiento del ARN de la expresión genética de BRD4-NUT detiene la proliferación y da lugar a diferenciación escamosa con un notable aumento de la expresión de citoqueratina. Estas observaciones ponen de relieve de la amplia utilidad y el potencial terapéutico inmediato de un inhibidor de acción directa de proteínas de bromodominio humano.

La invención presenta composiciones que son útiles para inhibir proteínas de bromodominio humano.

## Compuestos de la invención

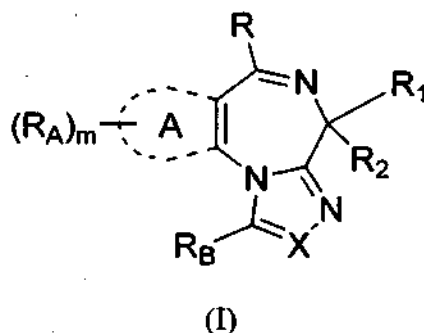
La invención proporciona compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 que se unen en el bolsillo de unión de la estructura cristalina apo del primer bromodominio de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD4). Estos compuestos pueden ser particularmente eficaces en la inhibición del crecimiento, proliferación, o supervivencia de células neoplásicas en proliferación o para inducir la diferenciación de tales células. En un enfoque, se seleccionan compuestos útiles para el tratamiento de una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina o para el uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la

diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia usando un programa de replicación molecular para identificar compuestos que se espera que se unan a un bolsillo de unión estructural de bromodominio. En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención se puede unir a un miembro de la familia BET y reducir la actividad biológica del miembro de la familia BET (por ejemplo, reducir la elongación) y/o alterar la localización subcelular del miembro de la familia BET (por ejemplo, reducir la unión a cromatina).

En determinados ejemplos, un compuesto de la invención puede prevenir, inhibir, o alterar, o reducir la actividad biológica en al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 75 %, o un 100 % de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) y/o alterar la localización subcelular de tales proteínas, por ejemplo, mediante la unión a un sitio de unión en un bolsillo de unión a apo de bromodominio.

En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención es un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es una molécula pequeña que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 1000 daltons, inferior a 800, inferior a 600, inferior a 500, inferior a 400, o inferior a aproximadamente 300 daltons. JQ1 es una nueva tieno-triazolo-1,4-diazepina. La invención también proporciona sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la reivindicación 1.

Los inventores desvelan un compuesto de Fórmula I:



en la que

X es N o CR<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R<sub>B</sub> es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o -COO-R<sub>3</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

el anillo A es arilo o heteroarilo;

cada R<sub>A</sub> es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0-3 y L es H, -COO-R<sub>3</sub>, -CO-R<sub>3</sub>, -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), -S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

R<sub>2</sub> es H, D (deuterio), halógeno, o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv) NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-

10 miembros;

$R_6$  es alquilo, alquienilo, cicloalquilo, cicloalquienilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o  $R_4$  y  $R_6$  se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que

(a) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo o fenilo sustituido,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 1 y L es  $-CO-N(R_3R_4)$ , entonces  $R_3$  y  $R_4$  no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino;

(b) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo sustituido,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 1 y L es  $-CO-N(R_3R_4)$ , y que uno de  $R_3$  y  $R_4$  es H, entonces el otro de  $R_3$  y  $R_4$  no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido; y

(c) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo sustituido,  $R_2$  es H,  $R_B$  es metilo, y  $R_1$  es  $-(CH_2)_n-L$ , en el que n es 1 y L es  $-COO-R_3$ , entonces  $R_3$  no es metilo ni etilo;

o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, R es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, L es H,  $-COO-R_3$ ,  $-CO-N(R_3R_4)$ ,  $-S(O)_2-R_3$ ,  $-S(O)_2-N(R_3R_4)$ ,  $N(R_3R_4)$ ,  $N(R_4)C(O)R_3$  o arilo opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, cada  $R_3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: H, -alquilo  $C_1-C_8$ , que está opcionalmente sustituido, que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; o  $NH_2$ ,  $N=CR_4R_6$ .

En determinados ejemplos,  $R_2$  es H, D, halógeno o metilo.

En determinados ejemplos,  $R_B$  es alquilo, hidroxialquilo, haloalquilo, o alcoxi; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroximetilo, metoximetilo, trifluorometilo,  $COOH$ ,  $COOMe$ ,  $COOEt$ , o  $COOCH_2OC(O)CH_3$ .

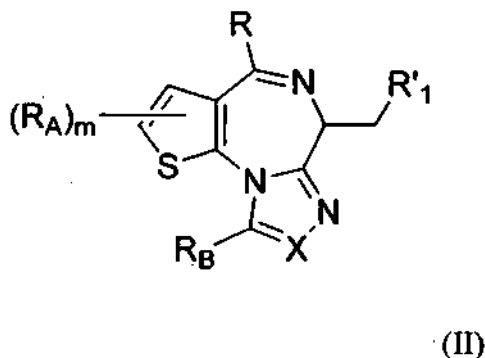
En determinados ejemplos, el anillo A es un arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros. En determinados ejemplos, el anillo A es tiofuranilo, fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, indanilo, piridilo, furanilo, indolilo, pirimidinilo, piridizinilo, pirazinilo, imidazolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, triazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirrolilo, pirazolilo, o 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo.

En determinados ejemplos, el anillo A es fenilo o tienilo.

En determinados ejemplos, m es 1 o 2, y al menos una aparición de  $R_A$  es metilo.

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un arilo.

Los inventores también desvelan un compuesto de Fórmula II:



en la que

X es N o  $CR_5$ ;

$R_5$  es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

$R_B$  es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o  $-\text{COO}-R_3$ , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

cada  $R_A$  es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

$R$  es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

$R'_1$  es H,  $-\text{COO}-R_3$ ,  $-\text{CO}-R_3$ , arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

cada  $R_3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

(iii) -alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_8$ , -alqueno  $\text{C}_2-\text{C}_8$  o -alquino  $\text{C}_2-\text{C}_8$ , conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo  $\text{C}_3-\text{C}_{12}$ , cicloalquilo  $\text{C}_3-\text{C}_{12}$  sustituido; -cicloalqueno  $\text{C}_3-\text{C}_{12}$ , o -cicloalquino  $\text{C}_3-\text{C}_{12}$  sustituido; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

$m$  es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que si  $R'_1$  es  $-\text{COO}-R_3$ ,  $X$  es N,  $R$  es fenilo sustituido, y  $R_B$  es metilo, entonces  $R_3$  no es metilo ni etilo;

o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos,  $R$  es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos,  $R$  es fenilo o piridilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos,  $R$  es p-Cl-fenilo, o-Cl-fenilo, m-Cl-fenilo, p-F-fenilo, o-F-fenilo, m-F-fenilo o piridinilo.

En determinados ejemplos,  $R'_1$  es  $-\text{COO}-R_3$ , arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y  $R_3$  es -alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_8$ , que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N, y que puede estar opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos,  $R'_1$  es  $-\text{COO}-R_3$ , y  $R_3$  es metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, sec-butilo, o t-butilo; o  $R'_1$  es H o fenilo opcionalmente sustituido.

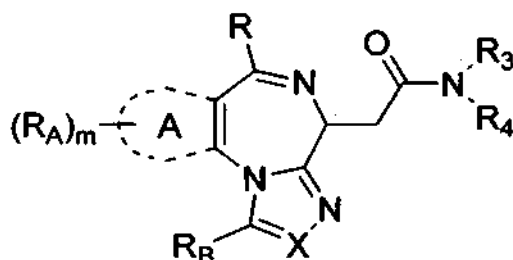
En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroxilo metilo, metoximetilo, trifluorometilo,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOMe}$ ,  $\text{COOEt}$ ,  $\text{COOCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ .

En determinados ejemplos,  $R_B$  es metilo, etilo, hidroxilo metilo, metoximetilo, trifluorometilo,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOMe}$ ,  $\text{COOEt}$ , o  $\text{COOCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ .

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es independientemente un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos  $R_A$  junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un arilo condensado.

En determinados ejemplos, cada  $R_A$  es metilo.

Los inventores también desvelan un compuesto de fórmula III:



(III)

en la que

$X$  es N o  $\text{CR}_5$ ;

$R_5$  es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está

opcionalmente sustituido;

R<sub>B</sub> es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, o -COO-R<sub>3</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

5 el anillo A es arilo o heteroarilo; cada R<sub>A</sub> es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R es alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

10 cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

15 (iii) -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o -alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv) NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

20 cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

25 R<sub>6</sub> es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que:

30 (a) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo o fenilo sustituido, R<sub>B</sub> es metilo, entonces R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino; y

(b) si el anillo A es tienilo, X es N, R es fenilo sustituido, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es H, entonces el otro de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido;

35 o una sal, solvato o hidrato del mismo.

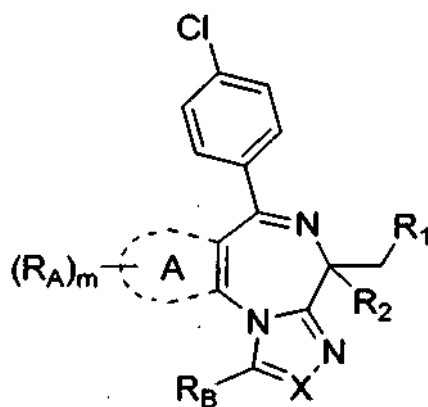
En determinados ejemplos, R es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, R es fenilo o piridilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

40 En determinados ejemplos, R es p-Cl-fenilo, o-Cl-fenilo, m-Cl-fenilo, p-F-fenilo, o-F-fenilo, m-F-fenilo o piridinilo. En determinados ejemplos, R<sub>3</sub> es H, NH<sub>2</sub>, o N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>.

45 En determinados ejemplos, cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, R<sub>6</sub> es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

50 Los inventores también desvelan un compuesto de fórmula IV:



(IV)

en la que

5 X es N o CR<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

10 R<sub>B</sub> es H, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcohalquilo, haloalquilo, hidroxi, alcoxi, o -COO-R<sub>3</sub>, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

el anillo A es arilo o heteroarilo;

15 cada R<sub>A</sub> es independientemente alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos a los que se une cada uno, pueden formar un grupo arilo o heteroarilo condensado;

R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0-3 y L es H, -COO-R<sub>3</sub>, -CO-R<sub>3</sub>, -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), -S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;

20 R<sub>2</sub> es H, D, halógeno, o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sub>3</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

(i) H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

(j) (ii) heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido;

25 (iii) -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o -alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, conteniendo cada uno 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; y

(iv) NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

30 cada R<sub>4</sub> es independientemente H, alquilo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

35 R<sub>6</sub> es alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> se toman en conjunto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo de 4-10 miembros;

m es 0, 1, 2 o 3;

con la condición de que

40 (a) si el anillo A es tienilo, X es N, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0 y L es -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), entonces R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no se toman en conjunto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de morfolino;

45 (b) si el anillo A es tienilo, X es N, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0 y L es -CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), y uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es H, entonces el otro de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no es metilo, hidroxietilo, alcoxi, fenilo, fenilo sustituido, piridilo ni piridilo sustituido; y

(c) si el anillo A es tienilo, X es N, R<sub>2</sub> es H, R<sub>B</sub> es metilo, y R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L,

en el que n es 0 y L es -COO-R<sub>3</sub>, entonces R<sub>3</sub> no es metilo ni etilo; o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, R<sub>1</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, en el que n es 0-3 y L es -COO-R<sub>3</sub>, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y R<sub>3</sub> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, que contiene 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre O, S, o N, y que puede estar opcionalmente sustituido. En determinados ejemplos, n es 1 o 2 y L es alquilo o -COO-R<sub>3</sub>, y R<sub>3</sub> es metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, sec-butilo, o t-butilo; o n es 1 o 2 y L es H o fenilo opcionalmente sustituido.

En determinados ejemplos, R<sub>2</sub> es H o metilo.

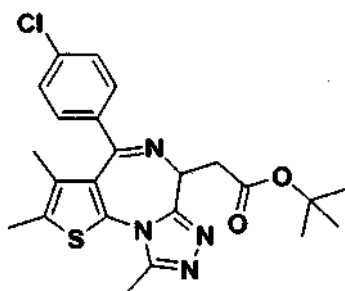
En determinados ejemplos, R<sub>B</sub> es metilo, etilo, hidroximetilo, metoximetilo, trifluorometilo, COOH, COOMe, COOEt, COOCH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub>.

En determinados ejemplos, el anillo A es fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, indanilo, piridilo, furanilo, indolilo, pirimidinilo, piridizinilo, pirazinilo, imidazolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, triazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirrolilo, pirazolilo, o 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo.

En determinados ejemplos, cada R<sub>A</sub> es independientemente un alquilo opcionalmente sustituido, o cualesquiera dos R<sub>A</sub> junto con los átomos son los que cada uno está unido, pueden formar un arilo.

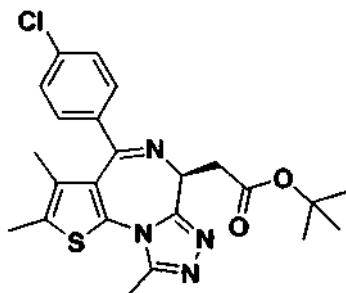
La invención se refiere a los compuestos que se definen en la reivindicación 1, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los inventores también desvelan compuestos de Fórmulas V-XXII, y cualquier compuesto que se describe en el presente documento, tal como un compuesto representado con la fórmula:



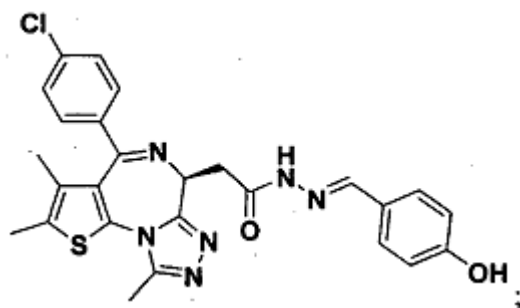
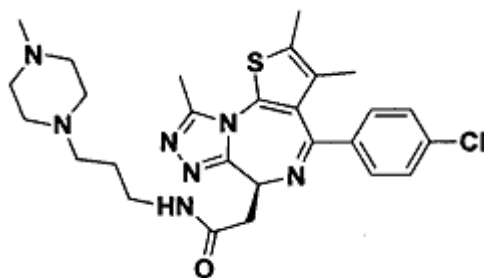
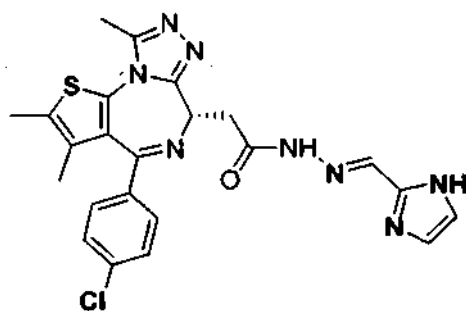
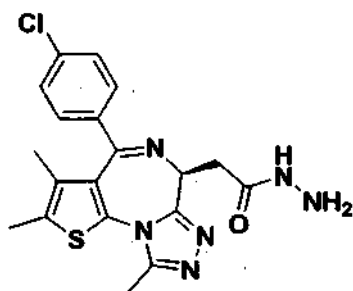
una sal, solvato o hidrato del mismo.

Por ejemplo, el compuesto puede ser (+)-JQ1:



una sal, solvato o hidrato del mismo.

Los inventores desvelan un compuesto representado con la fórmula:



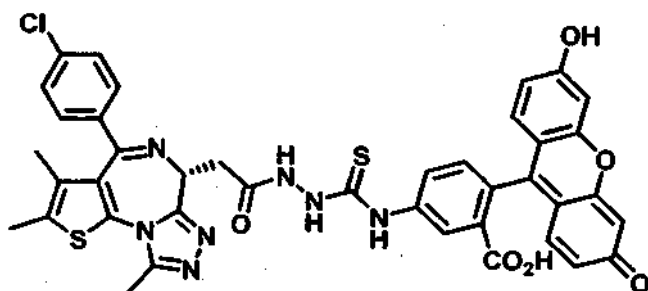
5

o

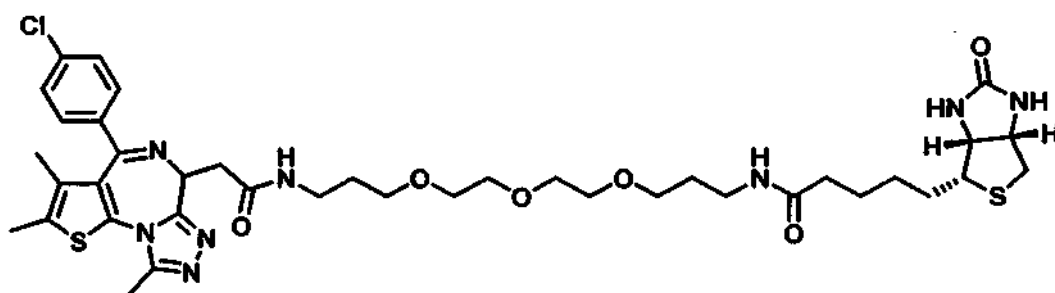
10

una sal, solvato o hidrato del mismo.

Los inventores también desvelan un compuesto representado con la fórmula:



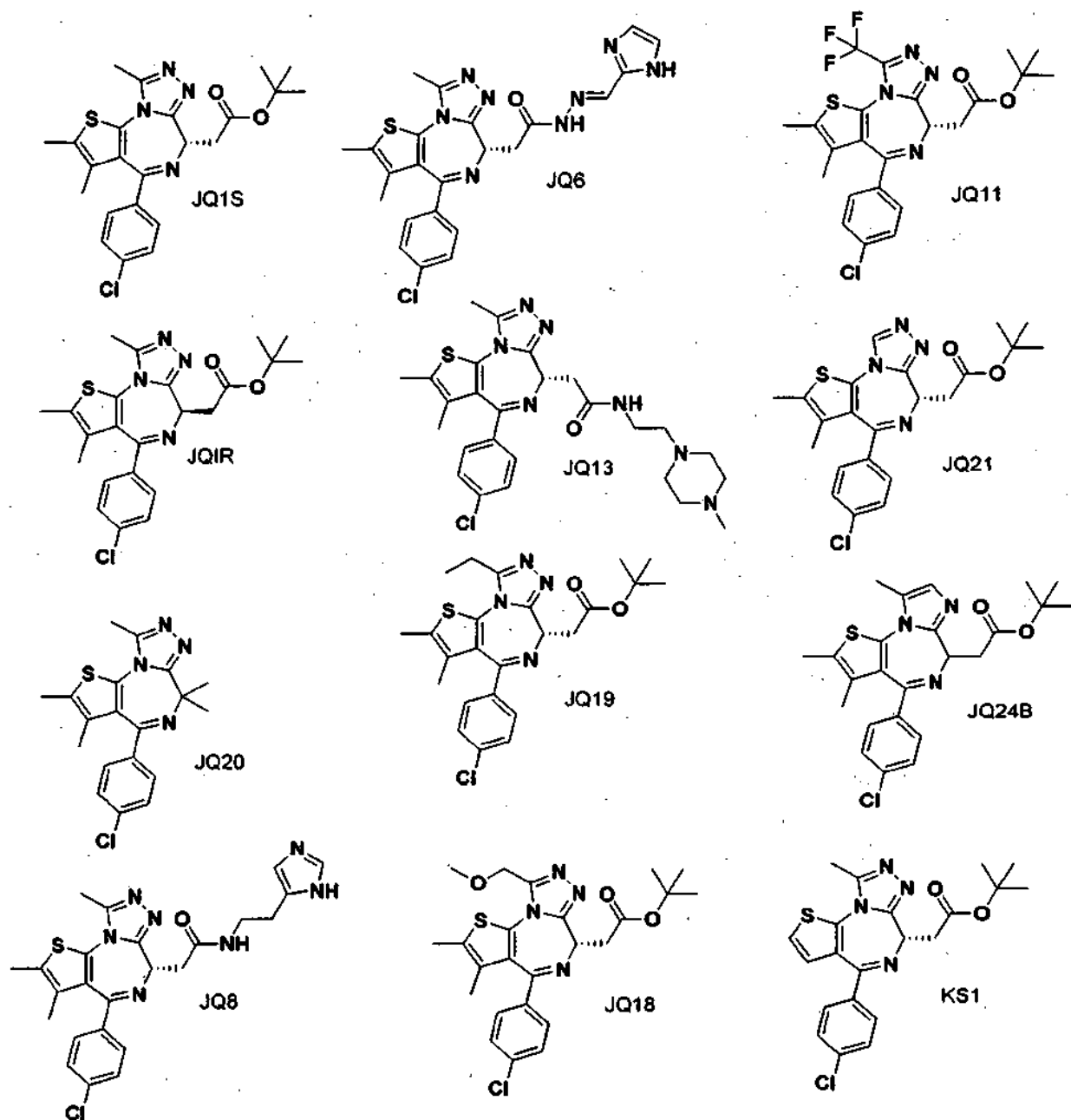
5 o



una sal, solvato o hidrato del mismo.

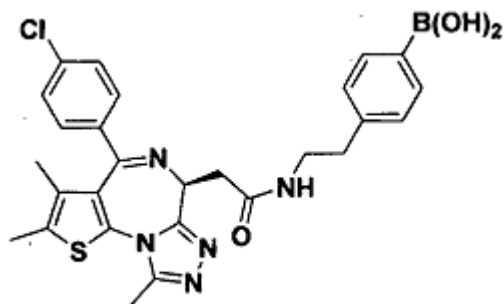
10

Los inventores también desvelan un compuesto representado con una cualquiera de las fórmulas siguientes:



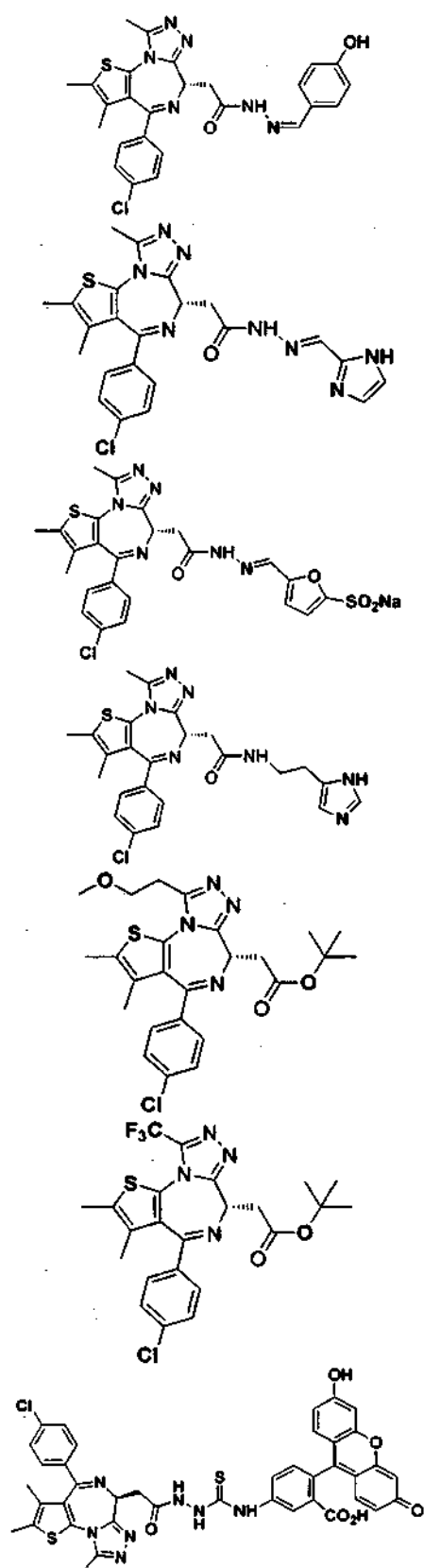
, o una sal, solvato o hidrato del mismo.

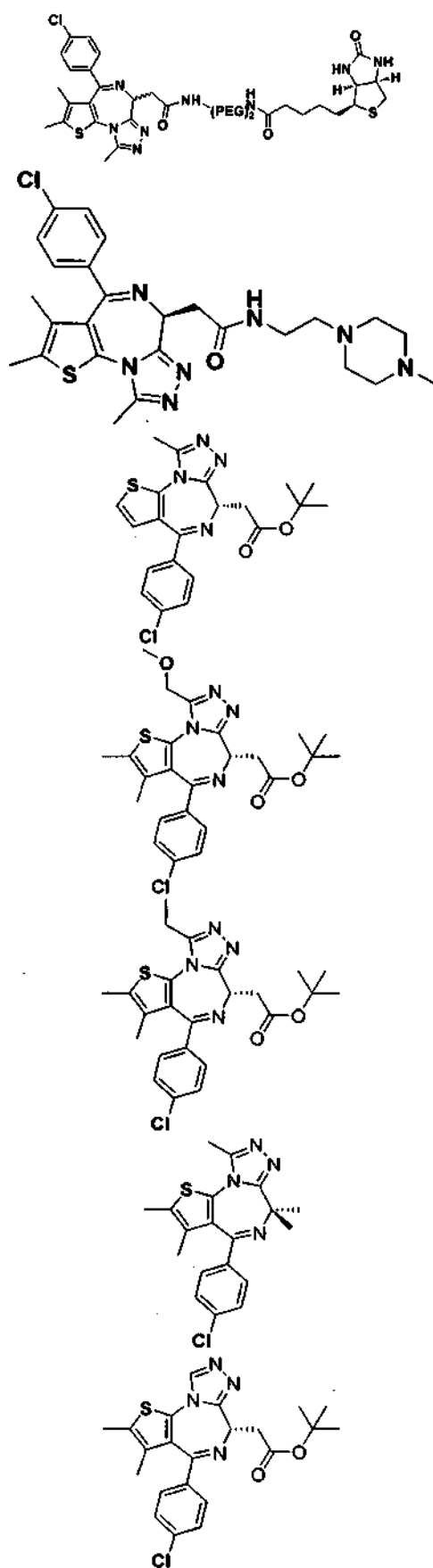
- 5 Los inventores también desvelan un compuesto representado con una cualquiera de las fórmulas siguientes:

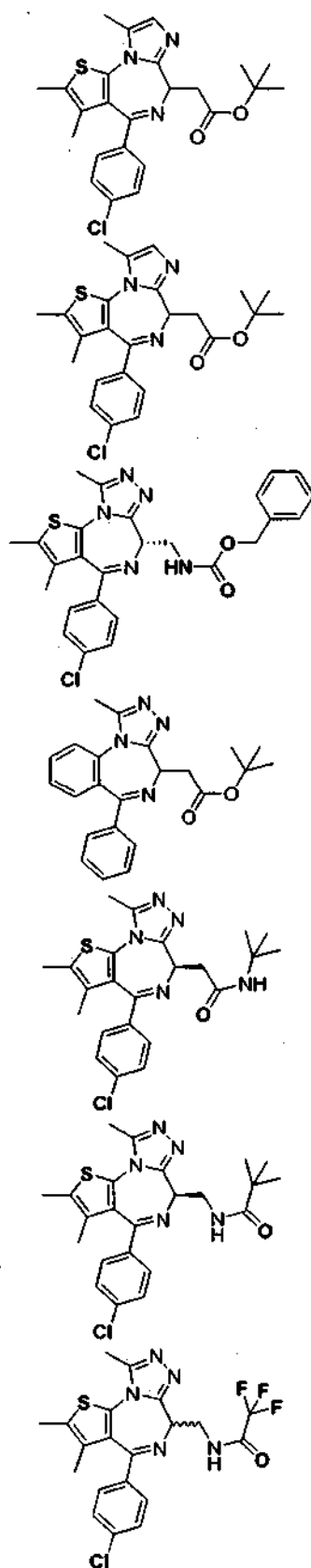


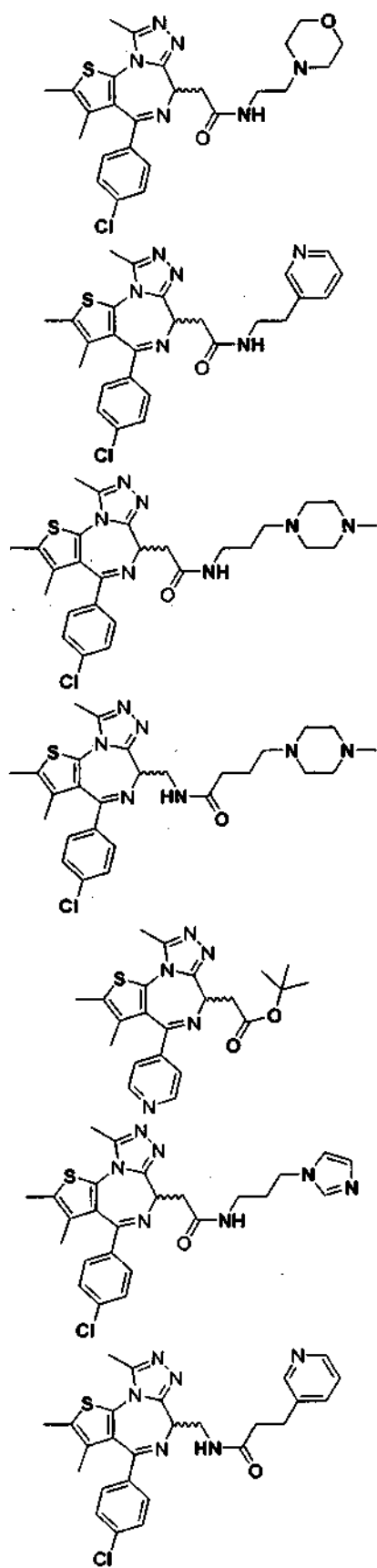
o

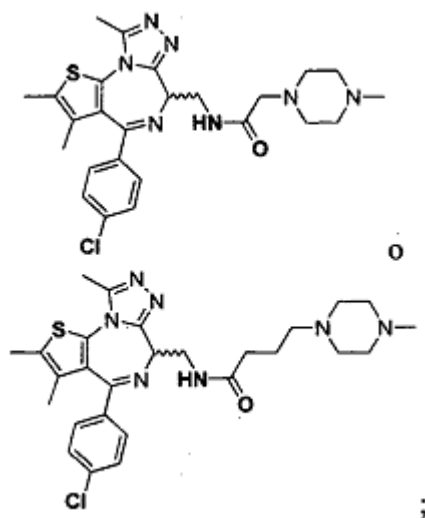






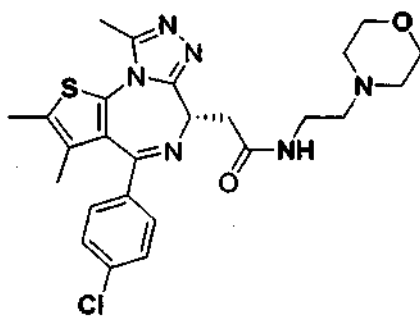
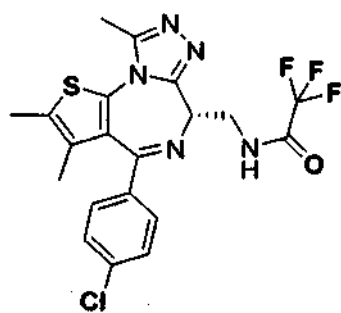
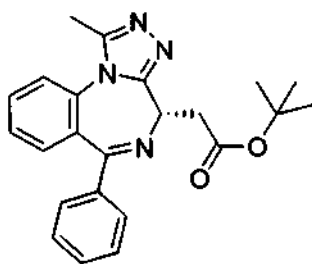


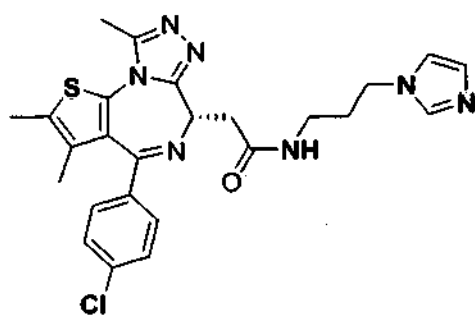
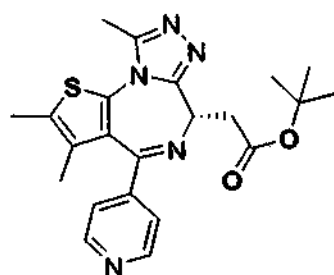
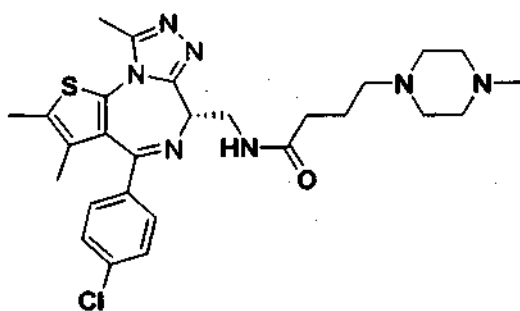
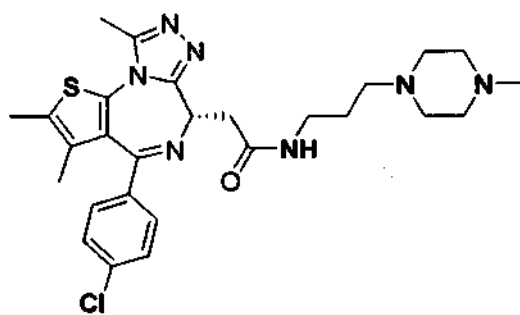
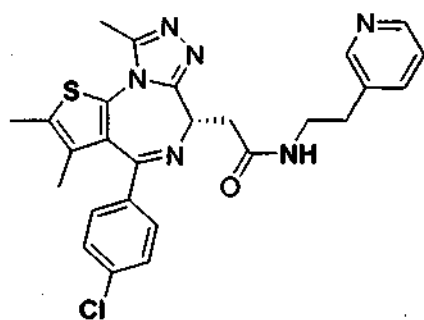


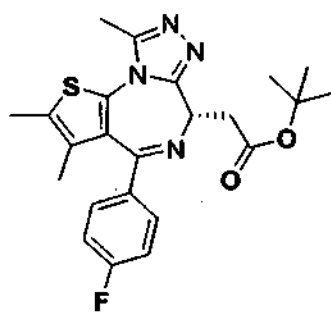
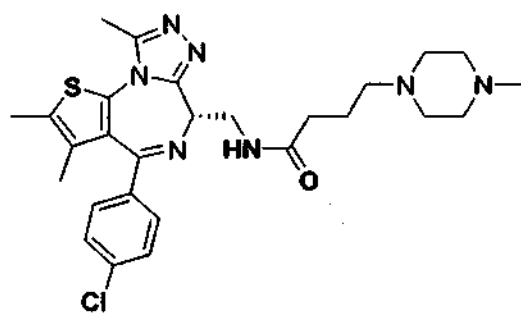
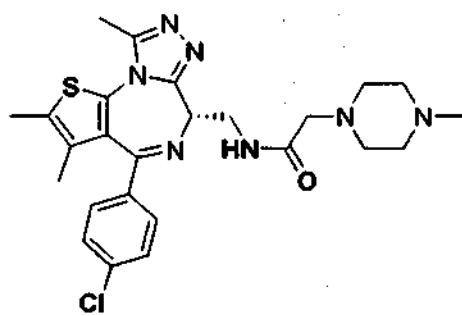
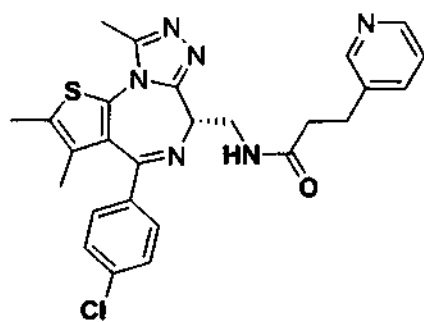


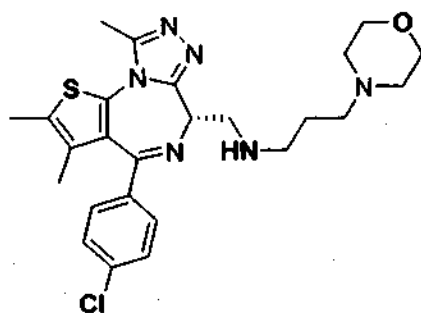
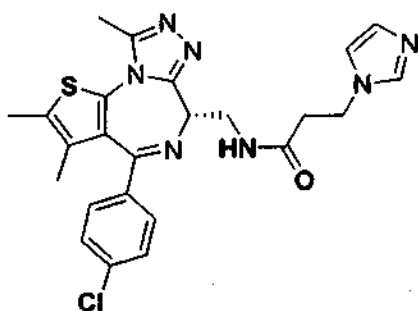
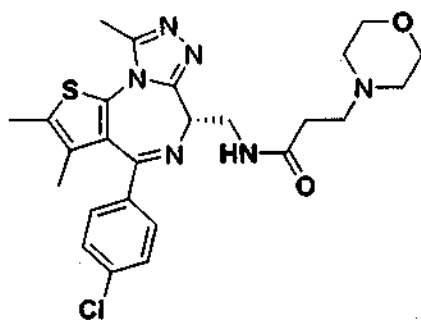
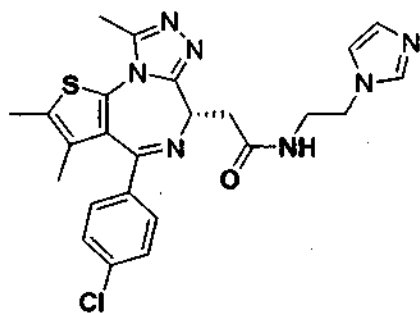
o una sal, solvato o hidrato del mismo.

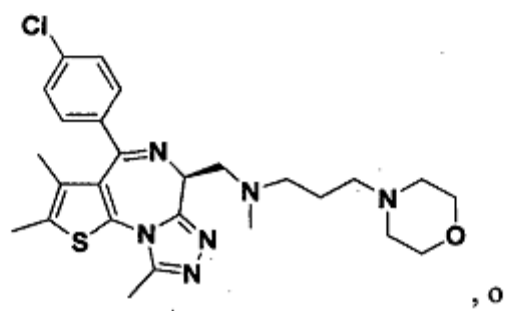
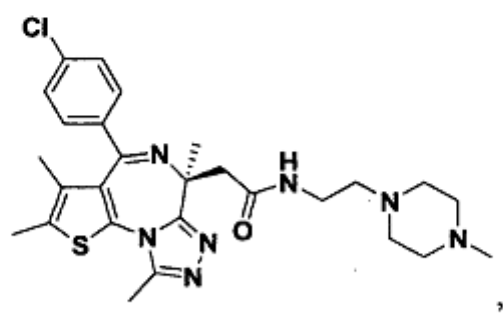
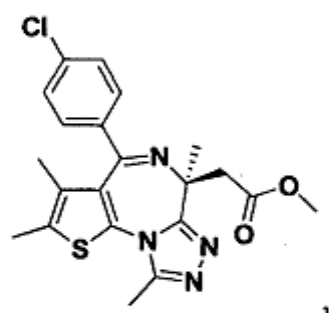
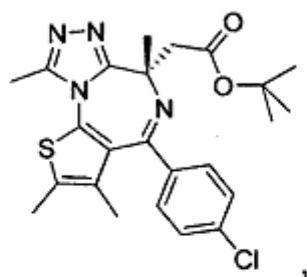
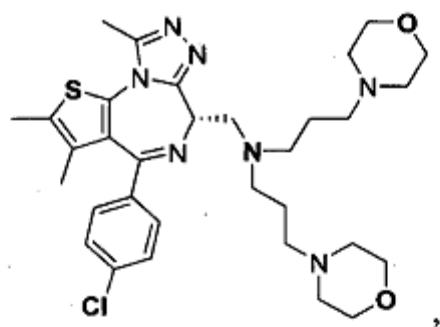
5 Los inventores desvelan las estructuras siguientes:

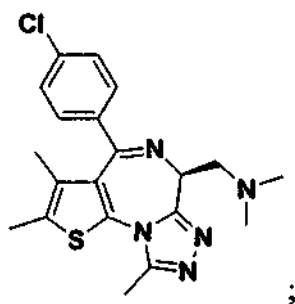






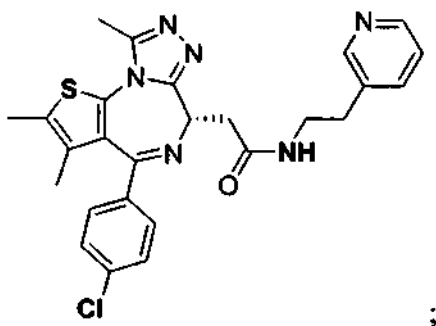






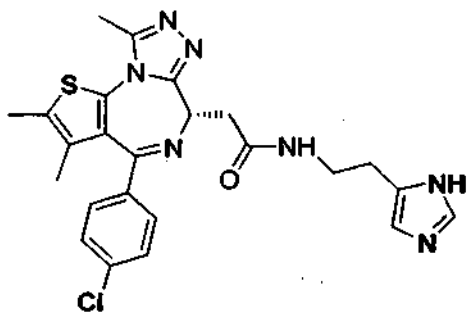
o una sal, solvato o hidrato del mismo.

5 Los inventores también desvelan un compuesto representado con la estructura:



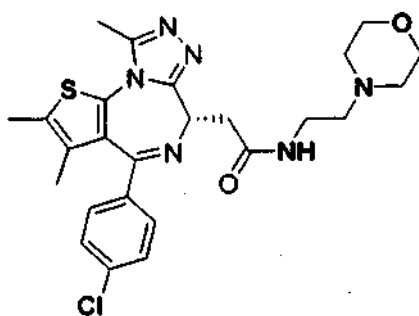
o una sal, solvato o hidrato del mismo.

10 Los inventores desvelan el compuesto representado con la estructura:



15 o una sal, solvato o hidrato del mismo.

En otra realización, el compuesto se representa con la estructura:

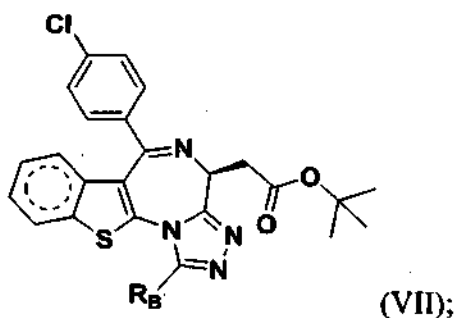
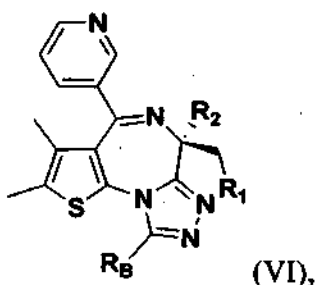
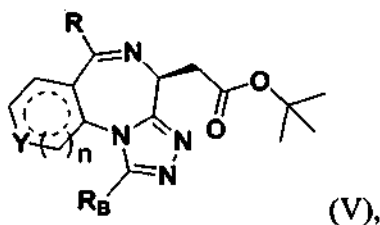


o una sal del mismo.

Los inventores también desvelan compuestos que tienen la quiralidad opuesta de cualquier compuesto que se muestra en el presente documento.

5

Los inventores desvelan un compuesto representado con la Fórmula (V), (VI), o (VII):



10 en las que R, R<sub>1</sub>, y R<sub>2</sub> y R<sub>B</sub> tienen el mismo significado que en la Fórmula (I); Y es O, N, S, o CR<sub>5</sub>, en el que R<sub>5</sub> tiene el mismo significado que en la Fórmula (I); n es 0 o 1; y el círculo con línea discontinua en la Fórmula (VII) indica un anillo aromático o no aromático; o una sal, solvato o hidrato del mismo.

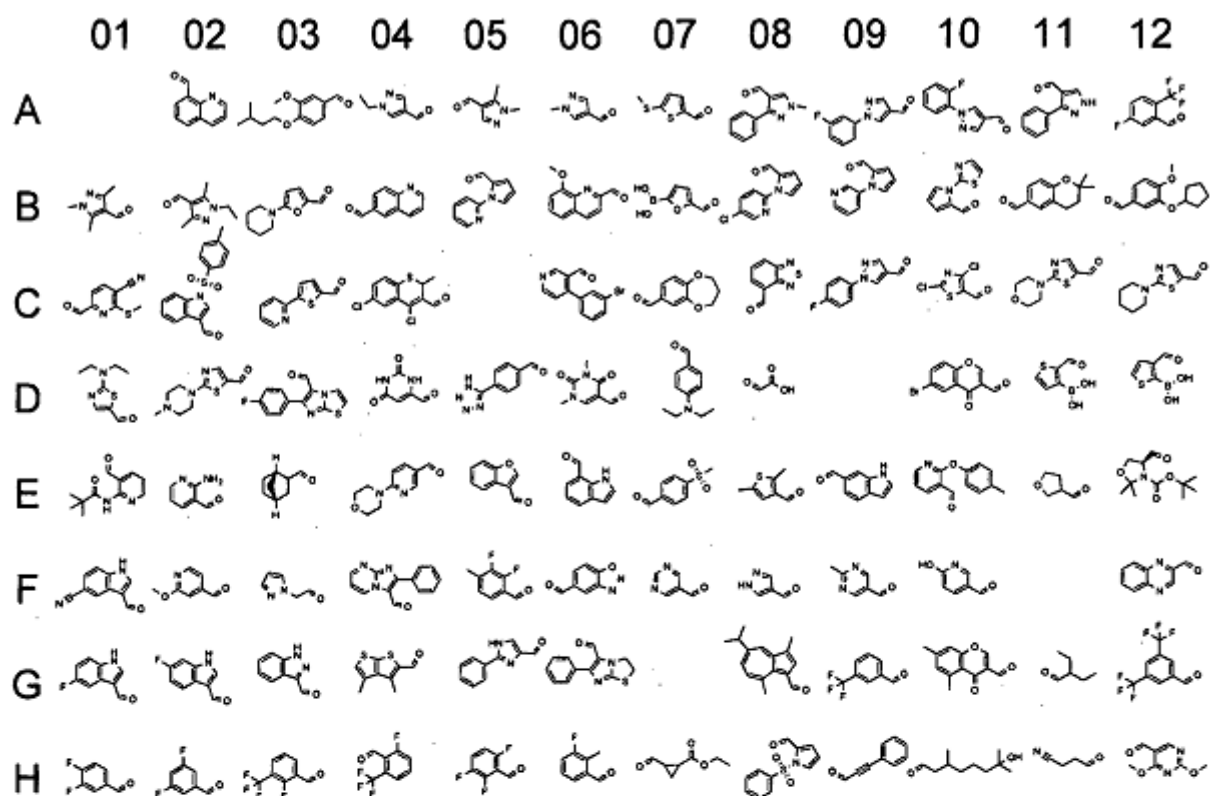
15 En ciertos aspectos de cualquiera de las Fórmulas I-IV y VI (o cualquier fórmula en el presente documento), R<sub>6</sub> representa la parte no carbonilo de un aldehído mostrado en la Tabla A, que sigue a continuación (es decir, para un aldehído de fórmula R<sub>6</sub>CHO, R<sub>6</sub> es la parte no carbonilo del aldehído). En determinados ejemplos, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> en conjunto representan la parte no carbonilo de una cetona mostrada en la Tabla A (es decir, para una cetona de fórmula R<sub>6</sub>C(O)R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son la parte no carbonilo de la cetona).

Tabla A:

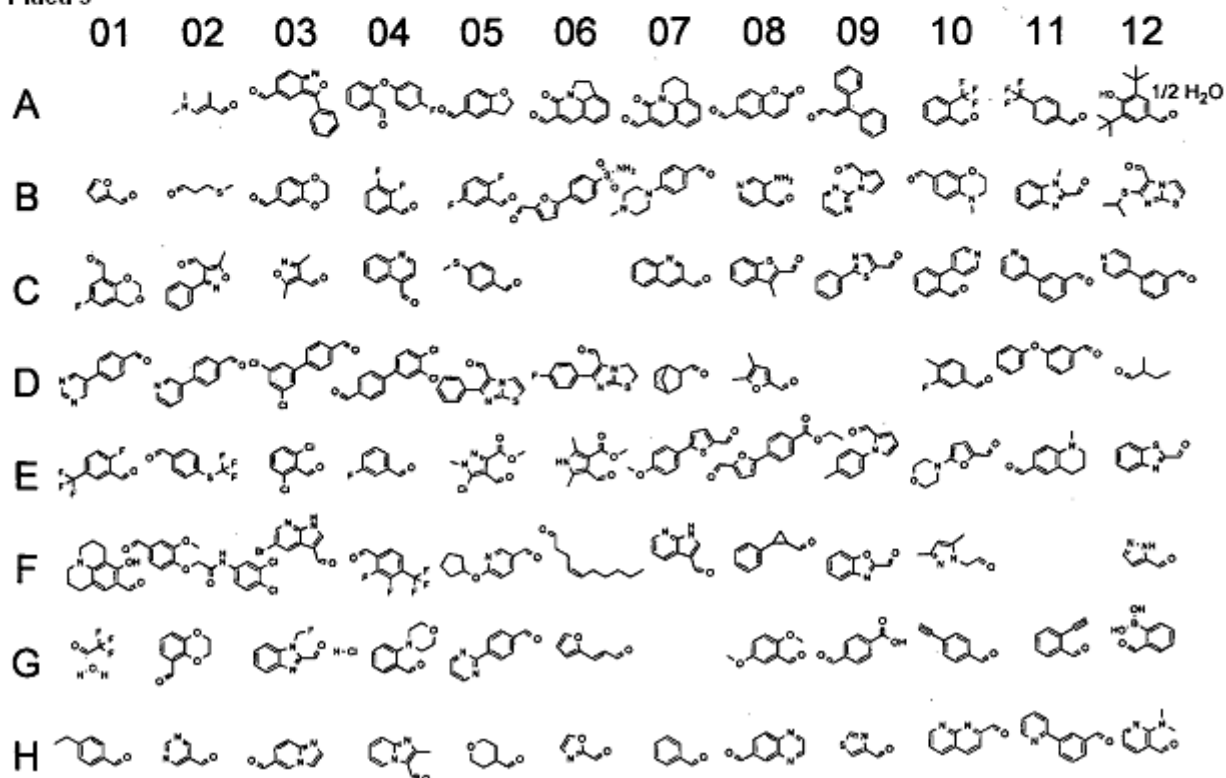
Placa 1

|   | 01                                                                                  | 02                                                                                  | 03                                                                                  | 04                                                                                  | 05                                                                                  | 06                                                                                  | 07                                                                                  | 08                                                                                   | 09                                                                                    | 10                                                                                    | 11                                                                                    | 12                                                                                    |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| A |                                                                                     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| B |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| C |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| D |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| E |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| F |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

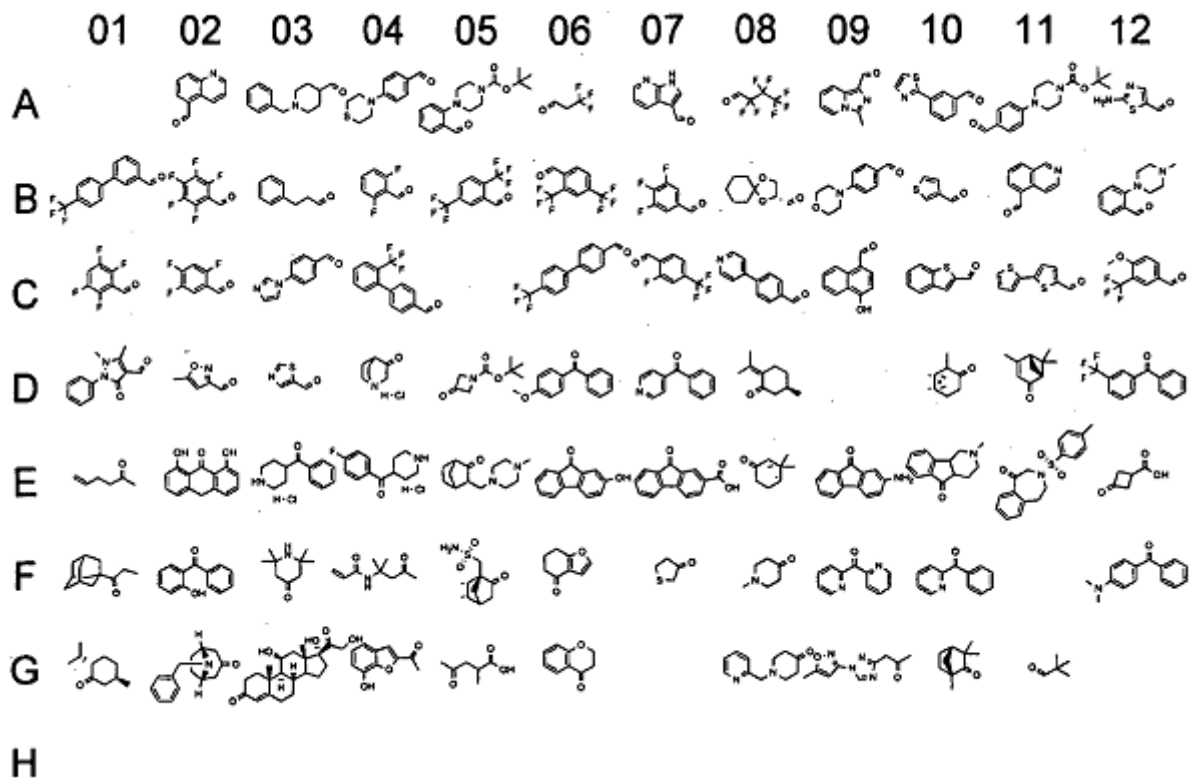
Placa 2



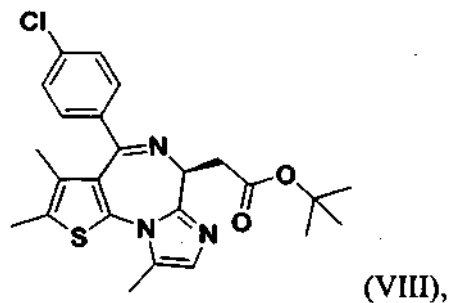
Placa 3



Placa 4

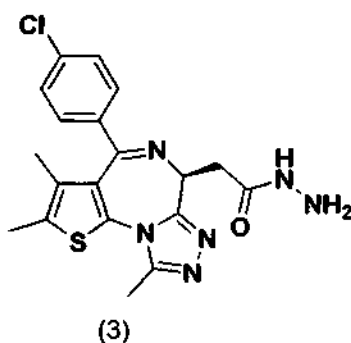


Los inventores desvelan un compuesto representado con la fórmula:

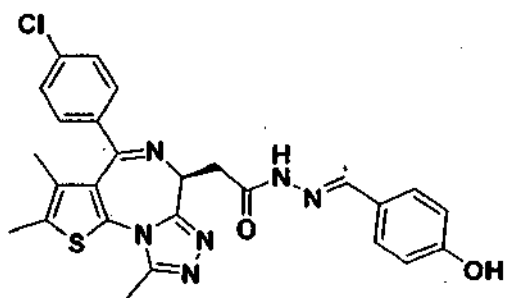


o una sal, solvato, o hidrato del mismo.

En determinados ejemplos, el compuesto es (racémico) JQ1; en determinados ejemplos, el compuesto es (+)-JQ1.  
En determinados ejemplos, el compuesto es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:



y

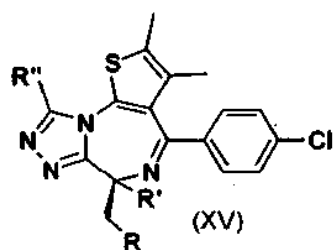
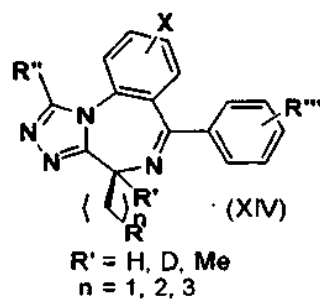
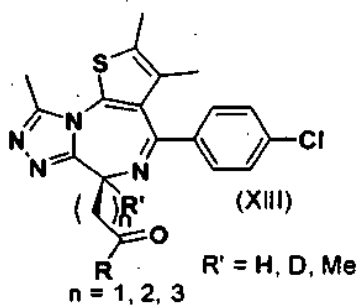
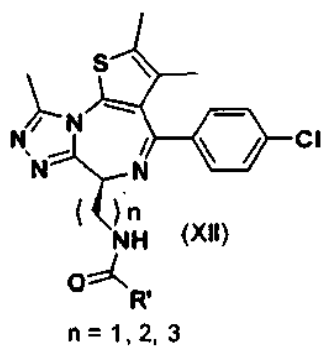
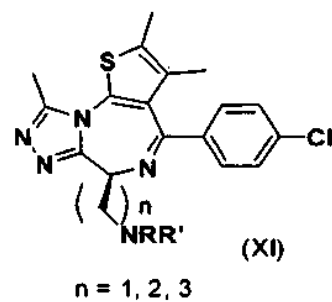
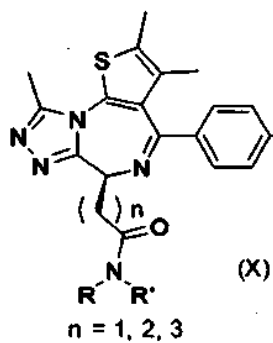
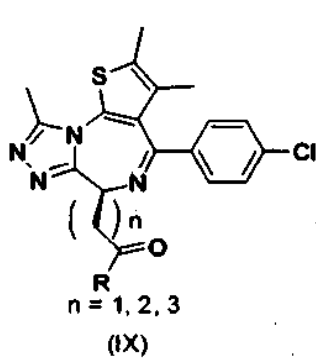


(4)

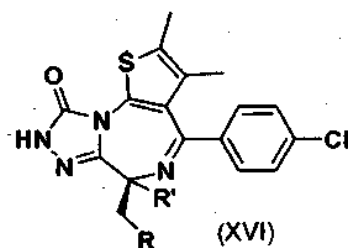
o una sal, solvato, o hidrato del mismo.

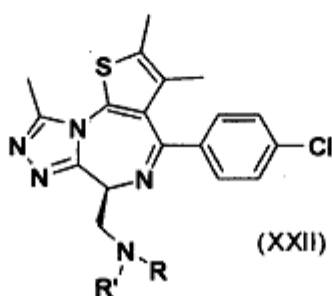
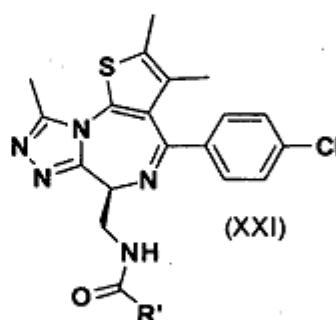
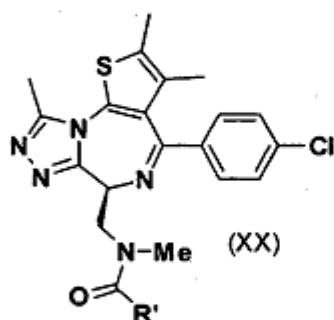
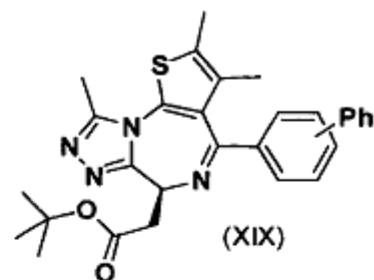
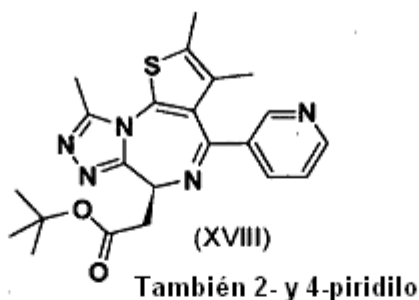
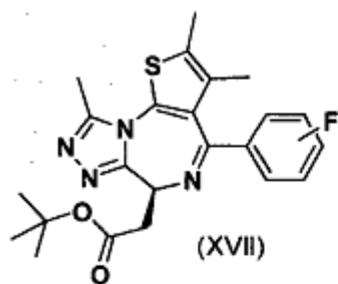
Ejemplos adicionales de compuestos incluyen los compuestos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas siguientes:

5



R'' = OMe, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OMe



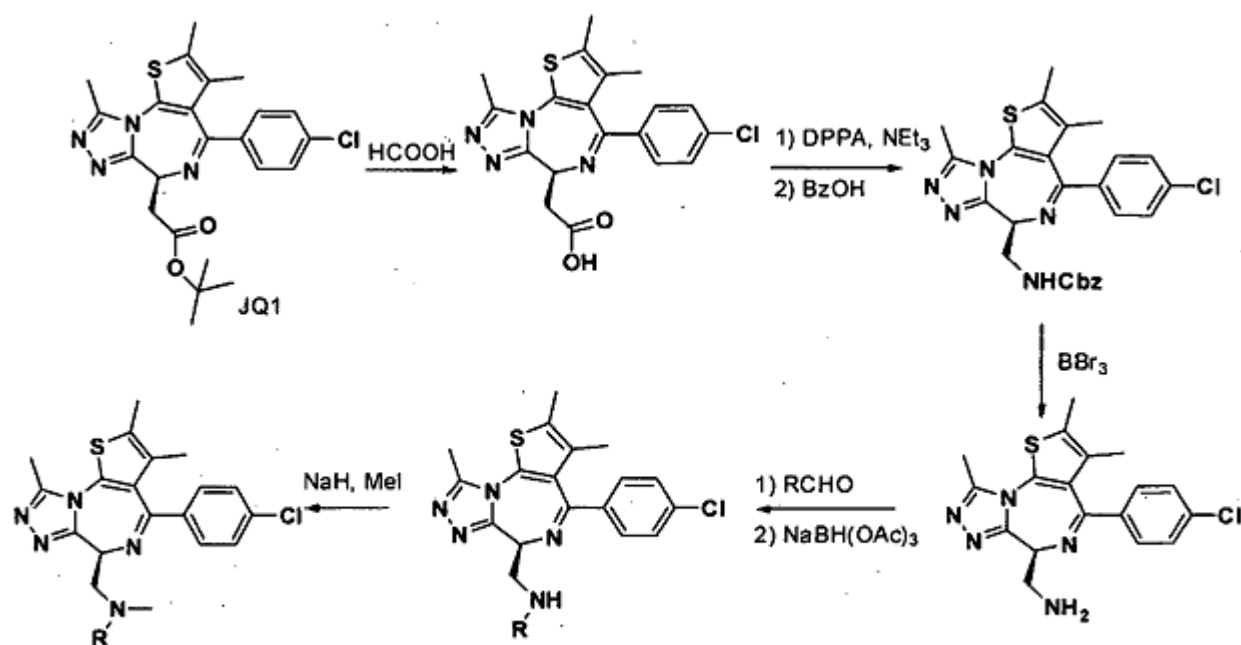


o una sal, solvato o hidrato del mismo.

- 5 En las Fórmulas IX-XXII, R y R' pueden ser, por ejemplo, H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo, heterocicloalquilo, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, -cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o -cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. En las Fórmulas XIV, X puede ser cualquier sustituyente para un grupo arilo tal como se describe en el presente documento.

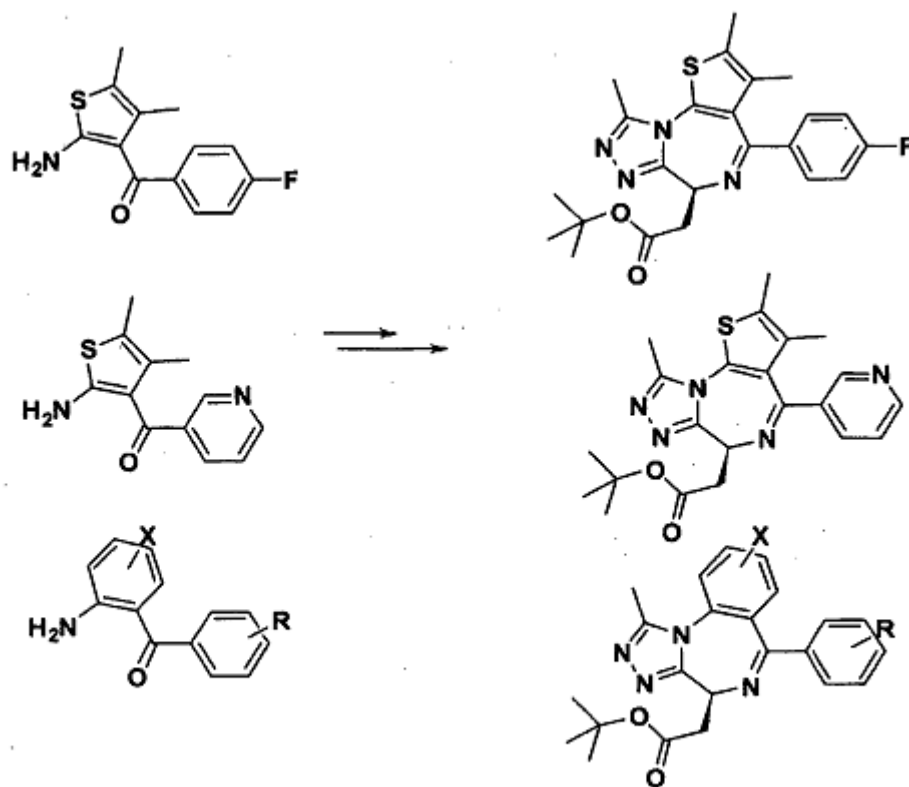
- 10 Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante diversos métodos. Por ejemplo, los Ejemplos químicos proporcionados en lo sucesivo en el presente documento proporcionan esquemas de síntesis para la preparación del compuesto JQ1 (como el racemato) y los enantiómeros (+)-JQ1 y (-)-JQ1 (véanse los Esquemas S1 y S2). Diversos compuestos de Fórmulas (I)-(XXII) se puede preparar mediante métodos análogos con sustitución de
- 15 los materiales de partida apropiados.

Por ejemplo, partiendo de JQ1, la amina análoga se puede preparar tal como se muestra en el Esquema 1, que sigue a continuación.



Esquema 1

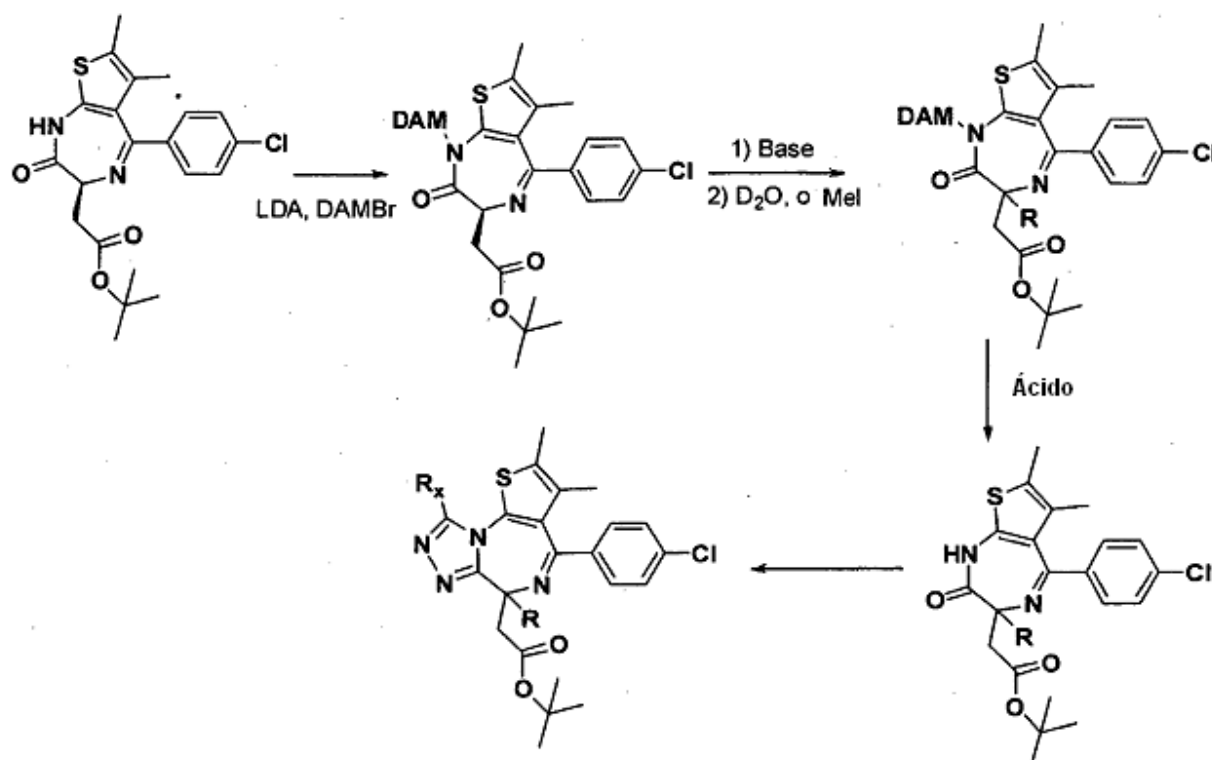
Tal como se muestra en el Esquema 1, la hidrólisis del éster de t-butilo de JQ1 proporciona el ácido carboxílico, que se trata con azida de difenilfosforilo (DPPA) y se somete a condiciones de transposición de Curtius para proporcionar la protegida amina con Cbz, que a continuación se desprotege para producir la amina. La elaboración posterior del grupo amina, por ejemplo, por aminación reductora proporciona láminas secundarias, que se pueden alquilar adicionalmente para proporcionar aminas terciarias.



Esquema 2

El Esquema 2 muestra la síntesis de ejemplos adicionales de compuestos que se desvelan en el presente documento, por ejemplo, de Fórmula I, en los que el núcleo del anillo condensado está modificado (por ejemplo, mediante sustitución de un anillo aromático diferente tal como el Anillo A en la Fórmula I). El uso de aminodiarilcetonas que tienen grupos funcionales apropiados (por ejemplo, en lugar de la aminodiarilcetona S2 en el Esquema S1, *que sigue a continuación*) proporciona nuevos compuestos que tienen una diversidad de núcleos de anillos condensados y/o apéndices de grupo arilo (que corresponden al grupo R en la Fórmula I). Tales aminodiarilcetonas están disponibles en el mercado o se pueden preparar mediante diversos métodos, algunos de los cuales se conocen en la técnica.

El Esquema 3 proporciona esquemas de síntesis a modo de ejemplo adicionales para preparar compuestos adicionales.



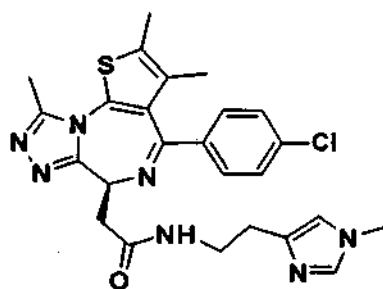
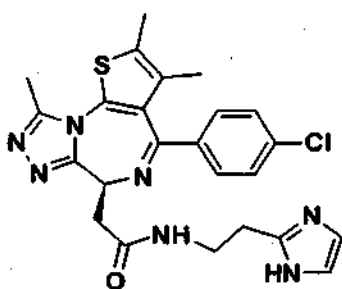
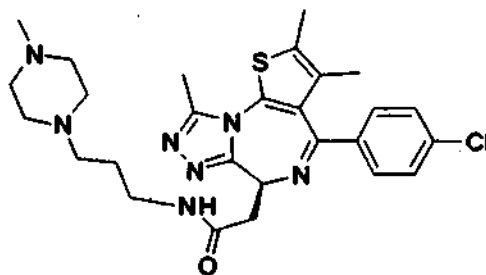
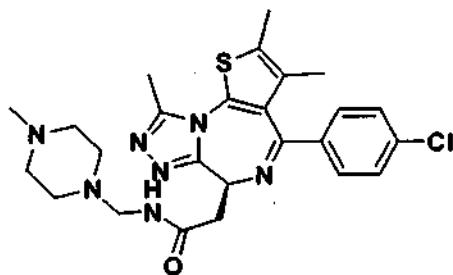
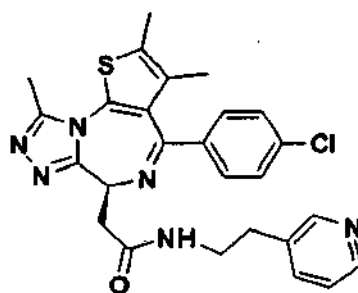
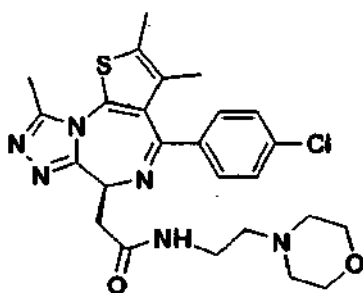
**Esquema 3**

Tal como se muestra en el Esquema 3, un precursor bicíclico condensado (véase Esquema S1, *que sigue a continuación*, para la síntesis de este compuesto) se refuncionaliza con un resto R (DAM = grupo protector dimetilaminometileno) y a continuación se elabora por reacción con una hidrazida para formar el núcleo condensado tricíclico. El sustituyente  $R_x$  puede variar mediante selección de una hidrazida adecuada.

Ejemplos adicionales de compuestos que se desvelan en el presente documento (que se pueden preparar con los métodos que se describen en el presente documento) incluyen:

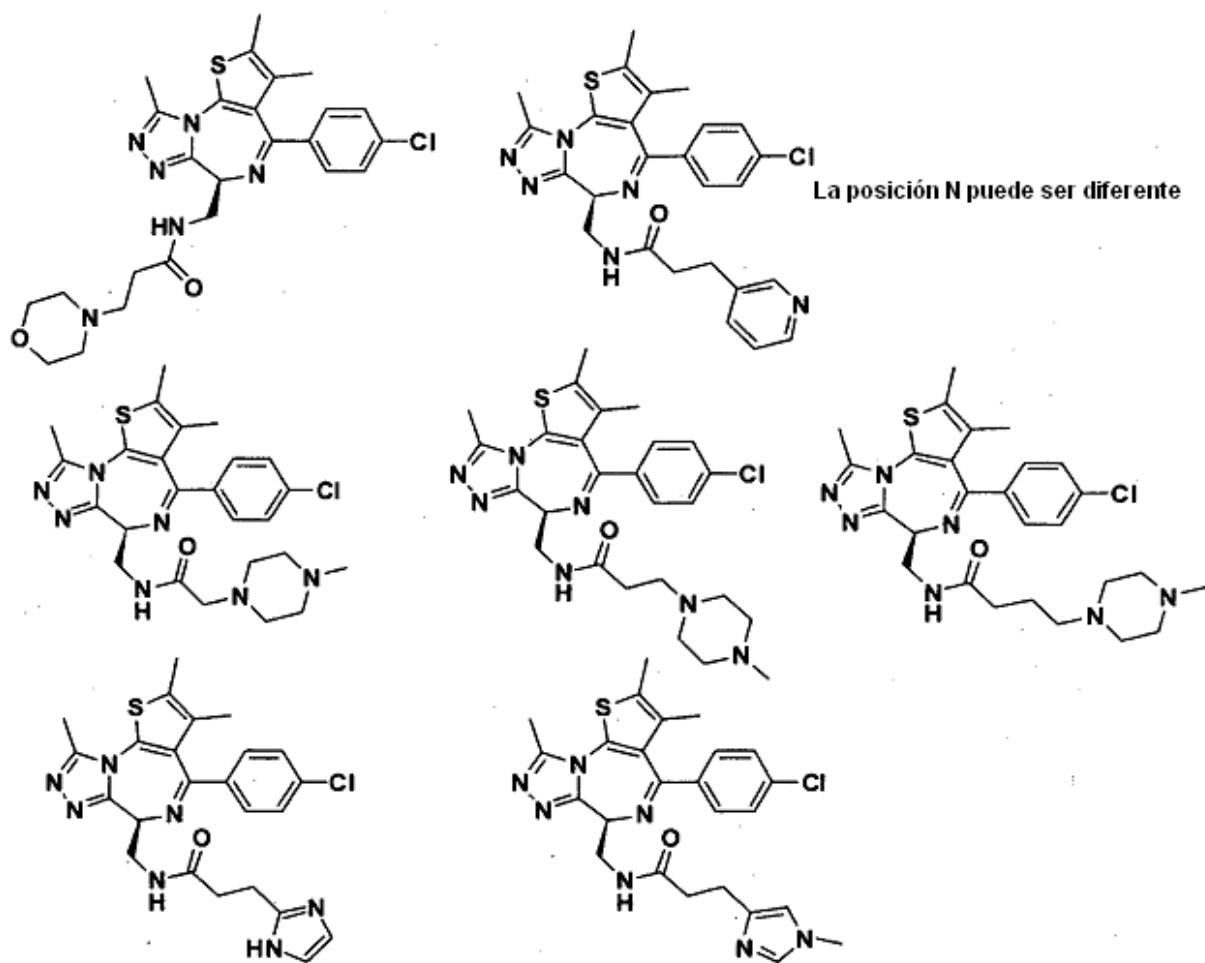
Amidas:

Las amidas se pueden preparar, por ejemplo, mediante preparación de un ácido o éster carboxílico correspondiente seguido de amidación con una amina apropiada usando condiciones estándar. En determinados ejemplos, una amida proporciona un "conector" de dos carbonos con un anillo que contiene nitrógeno terminal (por ejemplo, piridilo, piperidilo, piperazinilo, imidazolilo (incluyendo N-metil-imidazolilo), morfolinilo, y similares. Las estructuras de amida a modo de ejemplo incluyen:

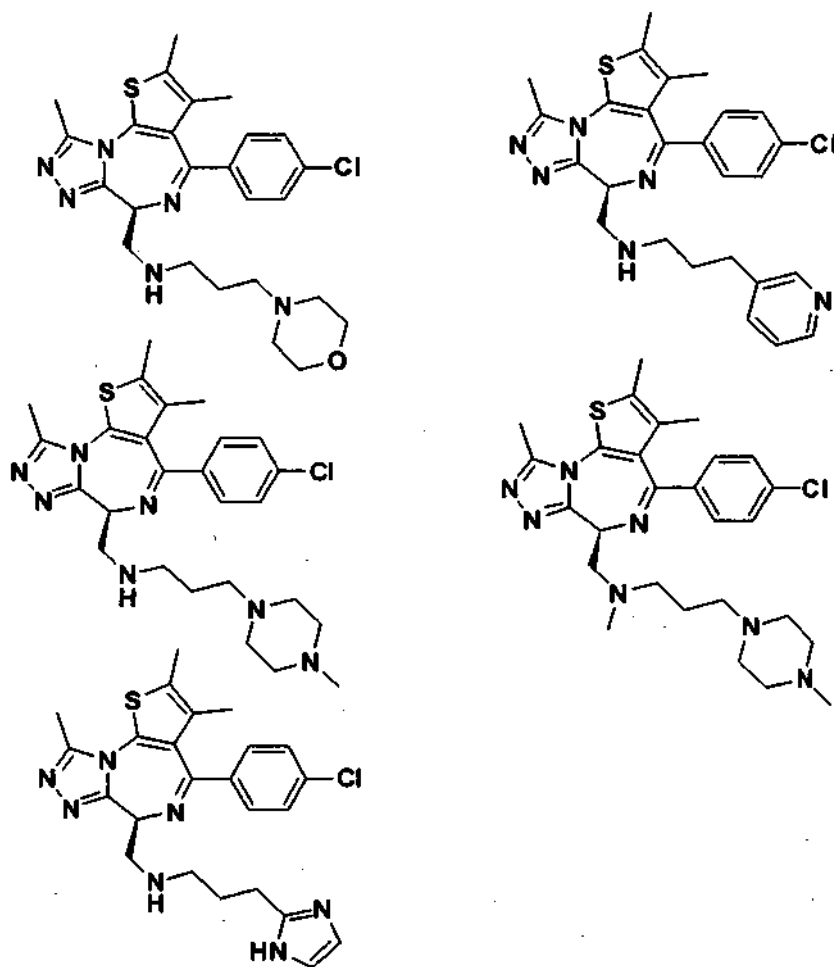


5 El uso de un conector de dos carbonos entre el resto de amida y el anillo que contiene nitrógeno terminal es preferente.

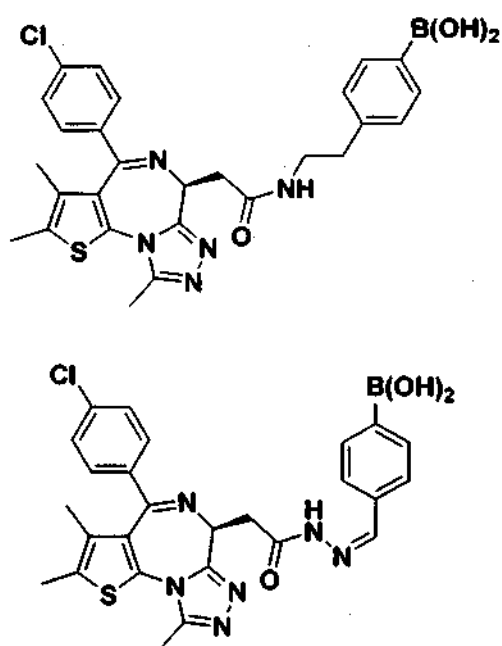
"Amidas inversas":



Aminas secundarias:

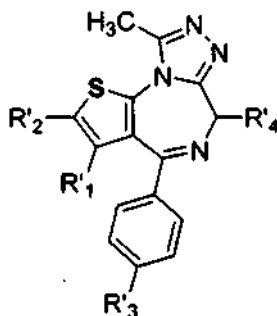


Ácidos borónicos:



En ciertos aspectos, un compuesto que tiene al menos un centro quiral está presente en forma racémica. En ciertos aspectos, un compuesto que tiene al menos un centro quiral está enriquecido de forma enantiomérica, es decir, tiene un exceso enantiomérico (e.e.) de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 90 %, un 95 %, un 99 %, un 99 % o un 100 %. En ciertos aspectos, un compuesto tiene la misma configuración absoluta que el compuesto (+)-JQ1, 2-(4-(4-Clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1.2.4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetato de ((5)-*terc*-butilo, que se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos de cualquiera de las Fórmulas que se desvelan en el presente documento, el compuesto no se representa con la siguiente estructura:



en la que:

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

R<sub>2</sub> es hidrógeno, halógeno, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo;

R<sub>3</sub> es un átomo de halógeno, fenilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o ciano;

-NR<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>6</sub> en el que R<sub>5</sub> es un átomo de hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, m es un número entero de 0-4, y R<sub>6</sub> es fenilo o piridilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno; o -NR<sub>7</sub>-CO--(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>8</sub> en el que R<sub>7</sub> es un átomo de hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, n es un número entero de 0-2, y R<sub>8</sub> es fenilo o piridilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno; y

R<sub>4</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-CO-NH-R<sub>9</sub> en el que a es un número entero de 1-4, y R<sub>9</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; o fenilo o piridilo opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, amino o un grupo hidroxilo o -(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-COOR<sub>10</sub> en el que b es un número entero de 1 -4, y R<sub>10</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal preparada a partir de un compuesto que se desvela en el presente documento (por ejemplo, JQ1, un compuesto de Fórmulas I-XXII) o cualquier otro compuesto que se describe en el presente documento, que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable. Las bases adecuadas incluyen, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio, y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc; amoniaco, y aminas orgánicas, tales como mono-, di-, o trialkilaminas sin sustituir o sustituidas con hidroxilo; diciclohexilamina; tributil amina; piridina; N-metil-N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis-, o tris-(2-hidroxi-alquil aminas inferiores), tales como mono-, bis-, o tris-(2-hidroxietil)- amina, 2-hidroxi-*terc*-butilamina, o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alquil inferior-N-(hidroxilo alquil inferior)-aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)- amina, o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" también se refiere a una sal preparada a partir de un compuesto que se desvela en el presente documento, o cualquier otro compuesto que se describe en el presente documento, que tiene un grupo funcional básico, tal como grupo funcional amino, y un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable. Los ácidos adecuados incluyen hidrógeno sulfato, ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido clorhídrico, bromuro de hidrógeno, yoduro de hidrógeno, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido isonicotínico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido maleico, ácido besílico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glucarónico, ácido sacárico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido glutámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, y ácido p-toluenosulfónico.

#### Métodos y Sistemas de Identificación Sistemática *In Silico*

Los inventores desvelan un medio de almacenaje que se puede leer con ordenador que comprende las combinaciones estructurales de un sitio de unión a polipéptido miembro de la familia BET (por ejemplo, dominio de BRD4) identificado en el presente documento. este es el sitio de unión propuesto para JQ1. un medio de

almacenamiento codificado con estos datos es capaz de presentar una representación gráfica tridimensional de una molécula o complejo molecular que comprende tales sitios de unión en una pantalla de ordenador o dispositivo de visualización similar.

Los inventores también desvelan métodos para diseñar, evaluar e identificar compuestos que se unen al sitio de unión que se ha mencionado anteriormente. Se espera que tales compuestos inhiban la actividad biológica de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) y/o que alteren la localización subcelular de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT). Los inventores también desvelan un ordenador para producir a) una representación tridimensional de una molécula o complejo molecular, en la que dicha molécula o complejo molecular comprende un sitio de unión; o b) una representación tridimensional de un homólogo de dicha molécula o complejo molecular, en la que dicho homólogo comprende un sitio de unión que tiene una raíz de la desviación cuadrática media a partir de los átomos de la estructura principal de dichos aminoácidos no superior a aproximadamente 2,0 (más preferentemente no superior a 1,5) angstroms, en los que dicho ordenador comprende:

- (i) un medio de almacenamiento de datos que se pueden leer con ordenador que comprende un material de almacenamiento de datos codificados con datos que se pueden leer con ordenador, en el que dichos datos comprenden las combinaciones de estructuras de restos de aminoácidos en el bolsillo de unión estructural de bromodominio otro sitio de unión de miembro de la familia BET;
- (ii) una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para procesar dichos datos que se pueden leer con ordenador;
- (iii) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos que se pueden leer con ordenador para procesar dichos datos que se pueden leer con ordenador en dicha representación tridimensional; y
- (iv) un monitor acoplado a dicha unidad de procesamiento central para visualizar dicha representación tridimensional.

Por lo tanto, el ordenador produce una estructura gráfica tridimensional de una molécula o un complejo molecular que comprende un sitio de unión.

Los inventores también desvelan un ordenador para producir una representación tridimensional de una molécula o complejo molecular definido por combinaciones de estructuras de aminoácidos de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT), o una representación tridimensional de un homólogo de dicha molécula o complejo molecular, en la que dicho homólogo comprende un sitio de unión que tiene una raíz de la desviación cuadrática media a partir de los átomos de la estructura principal de dichos aminoácidos no superior a 2,0 (más preferentemente no superior a 1,5) angstroms

En aspectos en particular, el ordenador o sistema de ordenadores pueden incluir componentes que son convencionales en la técnica, por ejemplo, tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup>s 5.978.740 y/o 6.183.121. Por ejemplo, un sistema de ordenador puede incluir un ordenador que comprende una unidad de procesamiento central ("CPU"), una memoria de trabajo (que puede ser, por ejemplo, RAM (memoria de acceso aleatorio) o memoria "núcleo"), una memoria de almacenamiento masivo (tal como una o más unidades de disco o unidades de CD-ROM), uno o más tubos de rayos catódicos (CRT) o terminales de visualización de monitor de cristal líquido (LCD), uno o más teclados, una o más líneas de entrada, y una o más líneas de salida, todos los cuales están interconectados mediante un canal de sistema convencional.

Los datos que se pueden leer con ordenador tal como se desvela en el presente documento se pueden introducir en el ordenador mediante el uso de un módem o módems conectados mediante una línea de datos. Como alternativa o adicionalmente, el hardware de entrada puede incluir unidades de CD-ROM, unidades de disco o memoria flash. En conjunto con un terminal de visualización, también se puede usar un teclado como un dispositivo de entrada.

Del mismo modo se puede implementar hardware de salida acoplado al ordenador mediante líneas de salida mediante dispositivos convencionales. A modo de ejemplo, el hardware de salida puede incluir un terminal de visualización de CRT o LCD para visualizar una representación gráfica de un bolsillo de unión tal como se desvela en el presente documento usando un programa tal como QUANTA o PYMOL. El hardware de salida también podría incluir una impresora, o una unidad de disco para almacenar la salida del sistema para uso posterior.

Cuando está en funcionamiento, la CPU coordina el uso de los diversos dispositivos de entrada y salida, Cortina los accesos de datos desde el almacenamiento masivo y accede a y desde la memoria de trabajo, y determinar la secuencia de las etapas de procesamiento de datos. Se puede usar un número de programas para procesar los datos que se pueden ver con ordenador del tipo que se desvela en el presente documento, incluyendo el software disponible en el mercado.

Un medio de almacenamiento magnético para almacenar datos que se pueden leer con ordenador que se desvela en el presente documento puede ser convencional. Un medio de almacenamiento de datos magnéticos se puede codificar con datos que se pueden leer con ordenador y se puede realizar mediante un sistema tal como el sistema de ordenador que se ha descrito anteriormente. el medio puede ser un disquete floppy o disco duro, que tiene un

sustrato adecuado que puede ser convencional, y un revestimiento adecuado, que también puede ser convencional, en uno o ambos lados, que contiene dominios magnéticos cuya polaridad u orientación se puede alterar de forma magnética. El medio también puede tener una abertura (no se muestra) para recibir el huso de una unidad de disco o de otro dispositivo de almacenamiento de datos.

5 Los dominios magnéticos del medio están polarizados orientados con el fin de codificar, de una manera que puede ser convencional, datos que se pueden leer con ordenador tal como los que se describen en el presente documento, para ejecución por un sistema tal como el sistema de ordenador que se describe en el presente documento.

10 Un medio de almacenamiento de datos de lectura óptica también se prevé codificar con datos que se pueden leer con ordenador, o un conjunto de instrucciones, que se pueden realizar con un sistema de ordenador. El medio puede ser un disco compacto de memoria de solo lectura convencional (CD-ROM) o un medio que se puede reescribir un disco magneto-óptico que se puede leer ópticamente y se puede escribir de forma magneto-óptica.

15 En el caso del CD-ROM, tal como se conoce, un revestimiento de disco es reflexivo y se impresiona con una pluralidad de pistas para codificar los datos que se pueden leer con ordenador. La disposición de las pistas se lee reflejando la luz láser en la superficie del revestimiento. Se proporciona un revestimiento protector, que preferentemente es básicamente transparente, en la parte superior del revestimiento reflectante.

20 En el caso de un disco magneto-óptico, tal como se conoce bien, un revestimiento de registro de datos no tiene pistas, pero tiene una pluralidad de dominios magnéticos cuya polaridad u orientación puede cambiar magnéticamente cuando se calienta por encima de una determinada temperatura, tal como mediante un láser. La orientación de los dominios se puede leer midiendo la polarización de la luz láser reflejada desde el revestimiento. La disposición de los dominios codifican los datos tal como se ha descrito anteriormente.

25 Los datos de estructuras, cuando se usan en conjunto con un ordenador programado con software para traducir esas combinaciones en la estructura de 3 dimensiones de una molécula o complejo molecular que comprende un bolsillo de unión se pueden usar para diversos fines, tales como descubrimiento de fármacos.

30 Por ejemplo, la estructura codificada con los datos se puede evaluar por ordenador para su capacidad para asociarse con entidades químicas. Se espera que las entidades químicas que se asocian con un sitio de unión de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) inhiban la proliferación o induzcan la diferenciación de una célula neoplásica, para inhibir la actividad biológica de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT), y/o para alterar la localización subcelular. Tan descompuestos son candidatos potenciales a fármacos. Como alternativa, la estructura codificada con los datos se puede presentar en una representación gráfica tridimensional en una pantalla de ordenador. Esto permite la inspección visual de la estructura, así como la inspección visual de la asociación de la estructura con entidades químicas.

40 Por lo tanto, los inventores también desvelan un método para evaluar el potencial de una entidad química para asociarse con a) una molécula o complejo molecular que comprende un sitio de unión definido por combinaciones de estructuras de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT), tal como se describe en el presente documento, o b) un homólogo de dicha molécula o complejo molecular, en la que dicho homólogo comprende un bolsillo de unión que tiene una raíz de la desviación cuadrática media a partir de los átomos de la estructura principal de dichos aminoácidos no superior a 2,0 (más preferentemente 1,5) angstroms.

45 Este método comprende las etapas de:

50 i) usar métodos de computación para realizar una operación de ajuste entre la entidad química y un sitio de unión de un polipéptido miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) o fragmento del mismo o complejo molecular; y

55 ii) analizar los resultados de la operación de ajuste para cuantificar la asociación entre la entidad química y el bolsillo de unión. Este ejemplo se refiere a la evaluación del potencial de una entidad química para asociarse con unirse a un sitio de unión de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) o fragmento del mismo.

La expresión "entidad química", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos químicos, complejos de al menos dos compuestos químicos, y fragmentos de tales compuestos o complejos.

60 En ciertos aspectos, el método evalúa el potencial de una entidad clínica para asociarse con una molécula o complejo molecular definido mediante combinaciones de estructuras de todos los aminoácidos de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT), tal como se describe en el presente documento, o un homólogo de dicha molécula o complejo molecular que tiene una raíz de la desviación cuadrática media a partir de los átomos de la estructura principal de dichos aminoácidos no superior a 2,0 (más preferentemente no superior a 1,5) angstroms.

65

En un aspecto adicional, las combinaciones estructurales de uno de los sitios de unión que se describen en el presente documento se pueden usar en un método para identificar un antagonista de una molécula que comprende un sitio de unión a bromodominio (por ejemplo, un bolsillo de unión estructural de bromodominio). Este método comprende las etapas de:

- a) usar las combinaciones atómicas de un miembro de la familia BET; y
- b) usar la estructura tridimensional para diseñar o seleccionar el agonista o antagonista potencial. El compuesto se puede obtener mediante cualquier medio disponible. Por "obtener" se hace referencia, por ejemplo, a sintetizar, comprar, o de otro modo procurar el agonista o antagonista. Si se desea, el método implica adicionalmente poner en contacto el agonista o antagonista con un polipéptido miembro de la familia BET o un fragmento del mismo para determinar la capacidad del agonista o antagonista potencial para interactuar con la molécula. Si se desea, el método también implica adicionalmente la etapa de poner en contacto una célula neoplásica con un compuesto de unión a bromodominio y evaluar la citotoxicidad, evaluar la proliferación de células neoplásicas, muerte celular, actividad biológica de miembro de la familia BET, o localización subcelular.

En otro aspecto, los inventores desvelan un método para identificar un antagonista potencial de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT), método que comprende las etapas de:

- a) usar las combinaciones atómicas de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) (por ejemplo, bolsillo de unión estructural de bromodominio); y
- b) usar la estructura tridimensional para diseñar o seleccionar el agonista o antagonista potencial.

El esclarecimiento por parte de los presentes inventores de sitios de unión de un bromodominio sin identificar hasta el momento proporciona la información necesaria para diseñar nuevas entidades y compuestos químicos que pueden interactuar con bromodominios, totalmente o en parte, y por lo tanto pueden modular (por ejemplo, inhibir) la actividad de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT).

El diseño de compuestos que se unen a una secuencia de bolsillo de unión estructural de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) que reduce la actividad biológica de un bromodominio, o que altera la localización subcelular de un miembro de la familia BET, tal como se describe en el presente documento por lo general implica la consideración de varios factores. En un ejemplo, el compuesto se asocia física y/o estructuralmente con al menos un fragmento de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT), tal como un sitio de unión dentro de una secuencia de bolsillo de unión estructural de bromodominio. Las interacciones moleculares no covalentes importantes en esta asociación incluyen formación de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas e interacciones electrostáticas. De forma deseable, el compuesto adopta una conformación que permite que se asocie directamente con el sitio o los sitios de unión a bromodominio. Aunque determinadas partes del compuesto pueden no participar directamente en estas asociaciones, esas partes de la entidad aún pueden influir en la conformación global de la molécula. Esto, a su vez, puede tener un impacto significativo en la potencia del compuesto. Tales requisitos conformacionales incluyen la estructura tridimensional global y la orientación del compuesto químico con respecto a todo o una parte del sitio de unión, o el espaciamiento entre grupos funcionales que comprenden varios compuestos químicos que interactúan directamente con el sitio de unión o un homólogo del mismo.

El efecto inhibitorio o de unión potencial de un compuesto químico en un sitio de unión a bromodominio se puede analizar antes de su síntesis real y someter a ensayo mediante el uso de técnicas de formación de modelos por ordenador. Si la estructura teórica del compuesto dado sugiere una interacción y asociación insuficientes entre el mismo y el sitio de unión diana, se evita someter a ensayo el compuesto. Sin embargo, si la formación de modelos por ordenador indica una interacción fuerte, la molécula se sintetiza y somete a ensayo para su capacidad para unirse a una secuencia de bolsillo de unión estructural de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) o se somete a ensayo su actividad biológica para evaluar por ejemplo, la citotoxicidad en una célula neoplásica, evaluando una reducción de la actividad biológica de un miembro de la familia BET, o mediante evaluación de la localización subcelular de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT). Los compuestos candidatos se pueden evaluar por ordenador por medio de una serie de etapas en las que las entidades químicas o fragmentos se identifican sistemáticamente y se seleccionan por su capacidad para asociarse con el bolsillo de unión estructural de bromodominio.

Un experto en la materia puede usar uno de varios métodos para identificar sistemáticamente compuestos químicos, o fragmentos para su capacidad para asociarse con un sitio de unión a bromodominio. Este proceso puede comenzar mediante inspección visual, por ejemplo, de un sitio de unión en la pantalla del ordenador basado en las combinaciones de estructuras de un miembro de la familia BET que se describen en el presente documento, u otras combinaciones que definen una forma similar generada a partir del medio de almacenamiento que se pierde con ordenador. Los fragmentos o los compuestos químicos seleccionados se colocan a continuación en diversas orientaciones, o se acoplan, dentro de ese sitio de unión tal como se ha definido anteriormente. El acoplamiento se puede conseguir usando software tal como Quanta y DOCK, seguido de minimización de energía y dinámica molecular con campos de fuerza mecánica molecular convencionales, tales como CHARMM y AMBER.

Los programas de ordenador especializados (por ejemplo, tal como se conocen en la técnica y/o están disponibles en el mercado y/o se describen en el presente documento) también pueden ayudar en el proceso de selección de fragmentos o entidades químicas.

5 Una vez que se han seleccionado las entidades o fragmentos químicos adecuados, se pueden ensamblar en un solo compuesto o complejo. El ensamblaje puede ir precedido de inspección visual de la relación de fragmentos entre sí en la imagen tridimensional presentada en una pantalla de ordenador con respecto a las combinaciones de estructuras del sitio de unión diana.

10 En lugar de proceder a construir un inhibidor de un bolsillo de unión de una manera en etapas de un fragmento o entidad química en un momento tal como se ha descrito anteriormente, se pueden diseñar compuestos inhibidores u otros compuestos de unión como un todo o "de novo" usando cualquiera de un sitio de unión vacío o que opcionalmente incluye alguna parte o partes de un inhibidor o inhibidores conocidos. En la técnica se conocen muchos métodos de diseño de ligandos de novo, algunos de los cuales están disponibles en el mercado (por ejemplo, LeapFrog, disponible en Tripos Associates, St. Louis, Mo.).

También se pueden usar otras técnicas de formación de modelos moleculares (véase, por ejemplo, N. C. Cohen *et al.*, "Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry, J. Med. Chem., 33, pp. 883-894 (1990); véase también, M. A. Navia y M. A. Murcko, "The Use of Structural Information in Drug Design", Current Opinions in Structural Biology, 2, pp. 202-210 (1992); L. M. Balbes *et al.*, "A Perspective of Modern Methods in Computer-Aided Drug Design", en Reviews in Computational Chemistry, Vol. 5, K. B. Lipkowitz y D. B. Boyd, Eds., VCH, New York, pp. 337-380 (1994); véase también, W. C. Guida, "Software For Structure-Based Drug Design", Curr. Opin. Struct. Biology, 4, pp. 777-781 (1994)).

25 Una vez que se ha diseñado o seleccionado un compuesto, la eficacia con la que esa entidad se puede unir a un sitio de unión se puede someter a ensayo y optimizar mediante evaluación computacional.

El software de ordenador específico está disponible en la técnica para evaluar la energía de formación del compuesto e interacciones electrostáticas. Los ejemplos de programas diseñados para tales usos incluyen: AMBER; QUANTA/CHARMM (Accelrys, Inc., Madison, WI) y similares. Estos programas se pueden implementar, por ejemplo, usando una estación de trabajo gráfico disponible en el mercado. Los expertos en la materia conocerán bien otros sistemas de hardware y paquetes de software.

35 Otra técnica implica la identificación sistemática *in silico* de bibliotecas virtuales de compuestos, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, Ejemplos). Muchos miles de compuestos se pueden identificar sistemáticamente de forma rápida y los mejores compuestos virtuales se pueden seleccionar la identificación sistemática adicional (por ejemplo, mediante síntesis y ensayo *in vitro* o *in vivo*). Se pueden identificar sistemáticamente bases de datos de moléculas pequeñas para entidades o compuestos químicos que se pretende unir, totalmente o en parte, a un sitio de unión a bromodominio de un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT). En esta identificación sistemática, la calidad del ajuste de tales entidades al sitio de unión se puede juzgar mediante complementariedad de formas o mediante estimación de energía de interacción.

Un ordenador para producir una representación tridimensional de

45 a) a molécula o complejo molecular, en el que dicha molécula o complejo molecular comprende un bolsillo de unión estructural de un miembro de la familia BET definido mediante combinaciones de estructuras de restos de aminoácidos en la secuencia de bolsillo de unión estructural de un bromodominio; o  
b) una representación tridimensional de un homólogo de dicha molécula o complejo molecular, en la que dicho homólogo comprende un sitio de unión que tiene una raíz de la desviación cuadrática media a partir de los átomos de la estructura principal de dichos aminoácidos no superior a aproximadamente 2,0 (más preferentemente no superior a 1,5) angstroms, en la que dicho ordenador comprende:

(i) un medio de almacenamiento de datos que se pueden leer con ordenador que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos que se pueden leer con ordenador, en el que dichos datos comprenden las combinaciones de estructuras de restos de aminoácidos en la secuencia de bolsillo de unión estructural de un miembro de la familia BET;

55 (ii) una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para procesar dichos datos que se pueden leer con ordenador;

(iii) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos que se pueden leer con ordenador para procesar dichos datos que se pueden leer con ordenador en dicha representación tridimensional; y

60 (iv) un monitor acoplado a dicha unidad de procesamiento central para visualizar dicha representación tridimensional. Tal como se describe en los Ejemplos, los compuestos identificados usando métodos *in silico* se pueden someter a ensayo opcionalmente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, usando los "Métodos de Identificación Sistemática Adicionales" que se describen a continuación, o cualquier otro método conocido en la técnica.

65

## Métodos de Identificación Sistemática Adicionales

Tal como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona ejemplos específicos de compuestos químicos así como otros compuestos sustituidos que se unen a un bolsillo de unión a bromodominio que induce la diferenciación celular o que reduce la proliferación celular en una célula neoplásica. Los inventores también desvelan un medio sencillo para identificar agentes (incluyendo ácidos nucleicos, péptidos, inhibidores de molécula pequeña, y miméticos) que son capaces de unirse a un miembro de la familia BET, que son citotóxicos para una célula neoplásica, que reducen la actividad biológica de un miembro de la familia BET, o que alteran la localización subcelular de un miembro de la familia BET. También se espera que tales compuestos sean útiles para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. Además, las composiciones que se desvelan en el presente documento se usan en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia.

En particular, determinados aspectos de la invención se basan al menos en parte en el descubrimiento de que los agentes que reducen la actividad biológica de un polipéptido miembro de la familia BET son probablemente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento a la prevención de una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. Además, las composiciones que se desvelan en el presente documento se usan en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia. En aspectos en particular, se analiza el efecto de un compuesto de la invención u otro agente sometiendo al ensayo la proliferación celular, supervivencia celular o muerte celular. En otro enfoque, los compuestos de la invención y otros agentes se evalúan por su efecto en la regulación de la transcripción o en la elongación. Se identifican agentes y compuestos de la invención que reducen el crecimiento, proliferación o capacidad invasión de una neoplasia como útiles para el tratamiento con la prevención de una neoplasia. Los compuestos de la invención también se pueden evaluar por su efecto en una célula inmunorreceptora, en la liberación de citoquinas o histamina, o en cualquier otro marcador de enfermedad inflamatoria.

Virtualmente, cualquier agente que se une de forma específica a un miembro de la familia BET o que reduce la actividad biológica de un miembro de la familia BET se puede usar en los métodos que se desvelan en el presente documento. Los métodos que se desvelan en el presente documento son útiles para la identificación sistemática de bajo coste de alto rendimiento de agentes candidatos que reducen, ralentizan, o estabilizan el crecimiento o la proliferación de una neoplasia o para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias. Un agente candidato que se une de forma específica a un bromodominio de un miembro de la familia BET se aísla a continuación y se somete a ensayo para actividad en un ensayo *in vitro* o ensayo *in vivo* por su capacidad para reducir la proliferación de células neoplásicas, inducir la diferenciación, y/o a aumentar la muerte de células neoplásicas. Un experto de la materia observa que los efectos de un agente candidato en una célula por lo general se comparan con una célula de control que no está en contacto con el agente candidato. Por lo tanto, los métodos de identificación sistemática incluyen comparar la proliferación de una célula neoplásica en contacto con un agente candidato a la proliferación de una célula de control sin tratar.

En otros aspectos, la expresión o actividad de un miembro de la familia BET en una célula tratada con un agente candidato se compara con muestras de control sin tratar para identificar un compuesto candidato que disminuye la actividad biológica de un miembro de la familia BET en la célula puesta en contacto. La expresión o la actividad del polipéptido se puede comparar con procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como ensayos de transferencia de Western, citometría de flujo, inmunocitoquímica, unión a perlas magnéticas y/o a perlas revestidas con anticuerpo específicas de bromodominio, hibridación *in situ*, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), ELISA, análisis de micromatrices, RT-PCR, transferencia de Northern, o colorimétricos, tales como el Ensayo de Bradford y el Ensayo de Lowry.

En un ejemplo de trabajo, se añaden uno o más agentes candidatos en concentraciones variables al medio de cultivo que contiene una célula neoplásica. Un agente que reduce la expresión de un miembro de la familia BET expresado en la célula se considera útil en la invención; tal agente se puede usar, por ejemplo, como un agente terapéutico para prevenir, retrasar, mejorar, estabilizar, o tratar una neoplasia o enfermedad inflamatoria. Una vez identificados, los agentes de la invención (por ejemplo, agentes que se unen de forma específica a y/o que antagonizan un bromodominio) se pueden usar para tratar una neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina. Además, las composiciones que se desvelan en el presente documento, se usan en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia. Un agente identificado de acuerdo con un método que se desvela en el presente documento se

administra por vía local o sistémica para tratar neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina o para uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), o facilitando la pluripotencia *in situ*.

En un aspecto, el efecto de un agente candidato, como alternativa, se puede medir al nivel de producción de miembro de la familia BET usando el mismo enfoque general y técnicas inmunológicas convencionales, tales como transferencia de Western o inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para el miembro de la familia BET. Por ejemplo, se pueden usar inmunoensayos para detectar o para controlar la expresión de un miembro de la familia BET en una célula neoplásica. En un aspecto, se puede identificar un anticuerpo policlonal o monoclonal (producido tal como se describe en el presente documento) que es capaz de unirse a o de bloquear la actividad biológica o alterar la localización subcelular de un miembro de la familia BET. Un compuesto que altera la localización subcelular, o que reduce la actividad biológica de un miembro de la familia BET se considera particularmente útil. De nuevo, tal agente se puede usar, por ejemplo, como un agente terapéutico para prevenir o para tratar una neoplasia o enfermedad inflamatoria.

Como alternativa, o además, se pueden identificar propuestos candidatos primero mediante evaluación de los que se unen de forma específica a antagonizan un miembro de la familia BET (por ejemplo, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) y posteriormente sometiendo a ensayos su efecto en células neoplásicas tal como se describe en los Ejemplos. En un aspecto, la eficacia de un agente candidato depende de su estabilidad para interactuar con el miembro de la familia BET. Tal interacción se puede evaluar rápidamente usando cualquier número de técnicas de unión convencionales y ensayos funcionales (por ejemplo, los que se describen en Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Por ejemplo, un compuesto candidato se puede someter a ensayo *in vitro* para interacción y unión con un polipéptido que se desvela en el presente documento y su capacidad para modular la proliferación de células neoplásicas se puede evaluar mediante cualquier ensayo convencional (por ejemplo, los que se describen en el presente documento). En un aspecto, la división de células neoplásicas se determina mediante la evaluación de la incorporación de BrdU usando análisis de citometría de flujo. En otro aspecto, la expresión de un miembro de la familia BET se controla de forma inmunohistoquímica.

Los antagonistas de bromodominio potenciales incluyen moléculas orgánicas, péptidos, miméticos de péptido, polipéptidos, ligandos de ácidos nucleicos, aptámeros, y anticuerpos que se unen a un bromodominio de miembro de la familia BET y reducen su actividad. En un aspecto en particular, un compuesto candidato que se une a un miembro de la familia BET se puede identificar usando una técnica basada en cromatografía. Por ejemplo, un polipéptido recombinante miembro de la familia BET tal como se desvela en el presente documento se puede purificar mediante técnicas convencionales a partir de células sometidas a ingeniería para expresar el polipéptido, o se puede sintetizar de forma química, una vez purificado el péptido se inmoviliza en una columna. Una solución de agentes candidatos se pasa a continuación a través de la columna, y un agente que se une de forma específica al polipéptido miembro de la familia BET o un fragmento del mismo se identifica basándose en su capacidad para unirse al polipéptido miembro de la familia BET y se inmoviliza en la columna. Para aislar el agente, la columna se lava para retirar moléculas unidas de forma no específica, y a continuación el agente de interés se libera de la columna y se recoge. Los agentes aislados con este método (o con cualquier método apropiado), si se desea, se pueden purificar adicionalmente (por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento). Además, estos agentes candidatos se pueden someter a ensayo por su capacidad para reducir la proliferación o la viabilidad de células neoplásicas. Los agentes aislados con este enfoque, por ejemplo, también se pueden usar como agentes terapéuticos para tratar o prevenir neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades infecciosas asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina para uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia. Los compuestos identificados como que se unen a un miembro de la familia BET con una afinidad constante inferior o igual a 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM o 10 µM se consideran particularmente útiles en la invención.

### Compuestos y Extractos de Ensayo

En determinados aspectos, se identifican antagonistas miembros de la familia BET (por ejemplo, agentes que se unen de forma específica y reducen la actividad de un bromodominio) a partir de bibliotecas grandes de productos naturales o extractos sintéticos (o semisintéticos) o bibliotecas químicas o a partir de bibliotecas de polipéptidos o ácidos nucleicos, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los expertos en el campo del descubrimiento y desarrollo de fármacos entenderán que la fuente precisa de extractos o compuestos de ensayo no es crítica para el procedimiento o procedimientos de identificación sistemática que se desvelan en el presente documento. Los agentes usados en identificaciones sistemáticas pueden incluir los conocidos como agentes para el tratamiento de una neoplasia o enfermedad inflamatoria. Como alternativa, se puede identificar sistemáticamente de forma virtual cualquier número de extractos o compuestos químicos desconocidos usando los métodos que se describen en el

presente documento. Ejemplos de tales extractos o compuestos incluyen, pero no se limitan a, extractos a base de plantas, hongos, procariotas o animales, caldos de fermentación, y compuestos sintéticos, así como la modificación de polipéptidos existentes.

En el mercado están disponibles bibliotecas de polipéptidos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngico, vegetales, y animales a partir de un número de fuentes, que incluyen Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Fla.), y PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, Mass.). tales polipéptido se puede modificar para que incluyan un dominio de transducción de proteínas usando métodos conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento. Además, si se desea, se producen bibliotecas naturales y producidas de forma sintética, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante métodos de extracción y fraccionamiento convencionales. En la técnica se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909, 1993; Erb *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, J. Med. Chem. 37: 2678, 1994; Cho *et al.*, Science 261: 1303, 1993; Carrell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059, 1994; Carell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061, 1994; y Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1233, 1994. además, si se desea, cualquier biblioteca o compuesto se puede modificar fácilmente usando métodos convencionales químicos, físicos, o bioquímicos.

También están disponibles numerosos métodos para generar síntesis aleatoria o dirigida (por ejemplo, semisíntesis o síntesis total) de cualquier número de polipéptidos, compuestos químicos, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos, y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles en el mercado en Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.). Como alternativa, compuestos químicos a usar como compuestos candidatos se pueden sintetizar a partir de materiales de partidas disponibles fácilmente usando técnicas de síntesis convencionales y metodologías conocidas por los expertos habituales en la materia. En la técnica se conocen transformaciones de química sintética y metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para la síntesis de los compuestos identificados con los métodos que se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, aquéllas tales como las que se describen en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en solución (por ejemplo, Houghten, Biotechniques 13: 412-421, 1992), o en perlas (Lam, Nature 354:82-84, 1991), chips (Fodor, Nature 364: 555-556, 1993), bacterias (Ladner, Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409), esporas (Ladner, Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 89: 1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, Science 249: 386-390, 1990; Devlin, Science 249: 404-406, 1990; Cwirla *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222: 301-310, 1991; Ladner  *mencionado anteriormente*).

Además, los expertos en la materia de descubrimiento y desarrollo de fármacos entienden fácilmente que siempre que sea posible se deberían usar métodos para desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica, y desreplicación química, o cualquier combinación de las mismas) o la eliminación de replicados o repeticiones de materiales ya conocidos por su actividad.

Cuando se encuentra que un extracto en bruto tiene actividad de unión a bromodominio miembro de la familia BET, es necesario el fraccionamiento adicional del extracto director positivo para aislar componentes moleculares responsables del efecto observado. Por lo tanto, el objetivo de los procesos de extracción, fraccionamiento, y purificación es la caracterización e identificación cuidadosa de una entidad química dentro del extracto en bruto que reduce la proliferación o la viabilidad de células neoplásicas. En la técnica se conocen métodos de fraccionamiento y de purificación de tales extractos heterogéneos. Si se desea, los compuestos que se muestra que son útiles como agentes terapéuticos se modifican químicamente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Los inventores desvelan métodos para tratar enfermedades y/o trastornos o síntomas de los mismos que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de las fórmulas en el presente documento a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Por lo tanto, un aspecto es un método para tratar un sujeto que padece o que es susceptible a una enfermedad o trastorno neoplásico o síntoma de los mismos. El método desvelado incluye la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéutica de una cantidad de un compuesto en el presente documento suficiente para tratar la enfermedad o trastorno con síntomas de los mismos, en condiciones en las que se trata la enfermedad o trastorno.

Los métodos desvelados en el presente documento incluyen la administración al sujeto (incluyendo un sujeto identificado como con necesidad de tal tratamiento) una cantidad eficaz de un compuesto que se describe en el presente documento, o una composición que se describe en el presente documento para producir tal efecto. La identificación de un sujeto con necesidad de tal tratamiento puede estar en el criterio de un sujeto o un profesional de cuidados de la salud y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, que se puede medir con un método de ensayo o de diagnóstico).

También se desvelan los métodos terapéuticos que comprenden (que incluyen tratamiento profiláctico) en general la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos en el presente documento, tal como un compuesto de las fórmulas en el presente documento a un sujeto (por ejemplo, animal, ser humano) con necesidad del mismo, incluyendo un mamífero, en particular un ser humano. Tal tratamiento se administrará adecuadamente a sujetos, en particular seres humanos, que padecen, que tienen o que son susceptibles a, o están en riesgo de una enfermedad, trastorno, o síntoma de los mismos. La determinación de esos sujetos "en riesgo" se puede realizar mediante cualquier determinación objetiva o subjetiva con un ensayo de diagnóstico o con una opinión de un sujeto o profesional de cuidados de la salud (por ejemplo, ensayo genético, marcador enzimático o de proteínas, Marcador (tal como se define en el presente documento), historia familiar, y similares). Los compuestos de la reivindicación 1 también se pueden usar en el tratamiento de cualquier otro trastorno en el que puede estar implicada neoplasia o inflamación.

Los inventores también desvelan un método para controlar la evolución del tratamiento. El método incluye la etapa de determinar un nivel de marcador diagnóstico (Marcador) (por ejemplo, cualquier diana descrita en el presente documento modulada con un compuesto en el presente documento, una proteína o indicador de la misma, etc.) o medida de diagnóstico (por ejemplo, identificación sistemática, ensayo) en un sujeto que padece o que es susceptible a un trastorno o síntomas del mismo asociado con neoplasia, en la que se ha administrado al sujeto una cantidad terapéutica de un compuesto en el presente documento suficiente para tratar la enfermedad síntomas de la misma. El nivel de Marcador determinado en el método se puede comparar con niveles conocidos de Marcador en cualquier control normal sano o en otros pacientes afectados para establecer el estado de enfermedad del sujeto. En ejemplos preferentes, un segundo nivel de Marcador en el sujeto se determina en un punto temporal posterior a la determinación del primer nivel, y los dos niveles se comparan para controlar el transcurso de la enfermedad o la eficacia de la terapia. En determinados ejemplos preferentes, un nivel de tratamiento previo de Marcador en el sujeto se determina antes de comenzar el tratamiento; este nivel de tratamiento previo de Marcador se puede comparar a continuación con el nivel de Marcador en el sujeto después de que comience el tratamiento, para determinar la eficacia del tratamiento.

#### **Agentes Terapéuticos Farmacéuticos**

Los agentes que se ha descubierto que tienen valor medicinal (por ejemplo, JQ1 o un compuesto de una fórmula que se describe en el presente documento) usando el métodos que se describen en el presente documento son útiles como un fármaco o como información para modificación estructural de compuestos existentes, por ejemplo, mediante diseño racional de fármacos. Tales métodos son útiles para identificación sistemática de agentes que tienen un efecto en neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina o para uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia.

Para usos terapéuticos, las composiciones como agentes identificados usando los métodos que se desvelan en el presente documento se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, se pueden formular en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica. Las vías de administración preferentes incluyen, por ejemplo, inyecciones subcutánea, intravenosa, interperitoneal, intramuscular, o intradérmica que proporcionan niveles sostenidos, continuos del fármaco en el paciente. El tratamiento de pacientes humanos o de otros animales se realizará usando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico identificado en el presente documento en un vehículo fisiológicamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. La cantidad del agente terapéutico a administrar varía dependiendo del modo de administración, la edad del peso corporal del paciente, y con los síntomas clínicos de la neoplasia, enfermedad inflamatoria, obesidad, hígado graso (NASH u otros), diabetes, aterosclerosis, oclusión por endoprótesis vascular arterial, insuficiencia cardíaca, caquexia, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades por infección asociadas con bromodominios, el tratamiento de parásitos, malaria, tripanosomas, y para reducir la fertilidad masculina o para uso en trasplante de órganos, modulación del estado celular para medicina regenerativa (es decir, mediante la estimulación o la inhibición de la diferenciación celular), y facilitando la pluripotencia. Generalmente, las cantidades estarán en el intervalo de las usadas para otros agentes usados en el tratamiento de otras enfermedades asociadas con tales enfermedades o patologías, aunque en determinados casos se necesitarán cantidades inferiores debido al aumento de especificidad del compuesto. Un compuesto se administra a una dosificación que es citotóxica para una célula neoplásica, que reduce la actividad biológica de un miembro de la familia BET, o que reduce la proliferación, supervivencia, o capacidad invasión de una célula neoplásica tal como se determina con un método conocido por un experto en la materia, o usando cualquier ensayo que mida la expresión o la actividad biológica de un miembro de la familia BET. En otro ejemplo, el compuesto se administra a una dosificación que reduce la inflamación o un síntoma de la enfermedad inflamatoria.

## Enfermedad inflamatoria

Las composiciones y compuestos de la reivindicación 1 son útiles para reducir la inflamación y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. La inflamación es el resultado de una serie compleja de señales moleculares que implican al sistema inmune, normalmente como respuesta a infección o daño celular o tisular. Normalmente la inflamación constituye el inicio de la curación del cuerpo; sin embargo cuando no es una inflamación apropiadamente regulada puede dar como resultado enfermedades crónicas, tales como artritis.

Por "respuesta inflamatoria" o "respuesta inmune" se hace referencia a la reacción de tejidos vivos a lesión, infección o irritación caracterizados por enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor, y pérdida de función producidos, como el resultado del aumento del flujo sanguíneo y un influxo de células inmunes y secreciones. La inflamación es la reacción del cuerpo a microorganismos infecciosos invasivos y da como resultado un aumento del flujo sanguíneo en el área afectada, la liberación de compuestos químicos que atraen a los glóbulos blancos, un aumento del flujo de plasma, y la llegada de monocitos para limpiar los residuos. Cualquier cosa que estimule la respuesta inflamatoria se dice que es inflamatorio.

La cascada innata, o la respuesta inmune innata, es la respuesta no específica organizada por el sistema inmune y se caracteriza por la infiltración de células, tales como leucocitos, linfocitos citolíticos naturales, mastocitos, eosinófilos y basófilos, así como fagocitos, tales como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas como respuesta a la señalización quimiotáctica en el sitio de la lesión o de la infección. Las moléculas secretadas por las células mencionadas anteriormente, tales como histamina y diversas citoquinas; y el sistema de complemento de circulación de proteínas contribuyen a la inflamación. Las enfermedades caracterizadas por inflamación son causas significativas de morbilidad y de mortalidad en seres humanos.

En determinados ejemplos, el trastorno inflamatorio es un trastorno reumatoide. Trastornos reumatoides, tal como se usa en el presente documento, se refieren a cualquiera de diversos trastornos inflamatorios caracterizados por inflamación, y en algunos casos degeneración y/o trastorno metabólico, de las estructuras de tejido conectivo, especialmente las articulaciones, ligamentos, y tendones. Por lo general, los trastornos reumatoides dan como resultado dolor, rigidez, y/o limitación del movimiento. El tejido o tejidos afectados en particular depende del trastorno reumatoide. Los trastornos reumatoides a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis juvenil, bursitis, espondilitis, gota, esclerodermia, enfermedad de Still, y vasculitis.

En determinados ejemplos, el trastorno reumatoide es la artritis reumatoide y el "tratamiento" de la artritis reumatoide incluye disminución de la gravedad, frecuencia, y/o aparición de uno o más de los síntomas de la artritis reumatoide. En otros ejemplos, el trastorno reumatoide es artritis juvenil, bursitis, espondilitis, gota, esclerodermia, enfermedad de Still, o vasculitis. Los métodos que se desvelan en el presente documento disminuyen la gravedad, frecuencia, y/o aparición de uno cualquiera o más de los síntomas de estas afecciones.

En diversos ejemplos, los síntomas de la artritis o de otras enfermedades inflamatorias incluyen enrojecimiento, hinchazón, inflamación, fiebre, disminución de la amplitud del movimiento, y dolor. Los ejemplos de reducción de la aparición o gravedad de dos síntomas incluyen, disminución del número de articulaciones hinchadas, disminución del número de articulaciones con dolor, disminución de la dependencia de la medicación para el dolor, disminución de una autoevaluación del paciente de la frecuencia o la gravedad de su dolor, aumento de libertad de movimiento, aumento de la movilidad, disminución de la fiebre, y aumento de la capacidad para realizar las tareas diarias.

La neuroinflamación, caracterizada por microglía y astrocitos activados y expresión local de una amplia gama de mediadores de la inflamación, es una reacción fundamental para la lesión cerebral, ya sea por traumatismo, apoplejía, infección, o neurodegeneración. Se cree que esta respuesta local del tejido local es parte de un proceso de reparación y de restauración. Al igual que muchas afecciones inflamatorias en enfermedades periféricas, la neuroinflamación puede contribuir a la patofisiología de los trastornos del SNC.

En determinados ejemplos, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio de la piel. Los trastornos inflamatorios de la piel incluyen rosácea, dermatitis atópica, acné, dermatitis seborreica, y celulitis.

En otros ejemplos, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad cardiovascular isquémica o inflamatoria. Una enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio puede ser una enfermedad o trastorno oclusivos, aterosclerosis, una enfermedad de las válvulas cardíacas, estenosis, reestenosis, estenosis en endoprótesis vascular, infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, síndromes coronarios agudos, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, isquemia de miocardio, o trombosis. En otros ejemplos, el sitio su sitio secundario de lesión isquémica, tal como el SNC por el riñón.

En otros ejemplos, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad intestinal isquémica o inflamatoria.

Enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) se refiere a una enfermedad inflamatoria recurrente crónica de etiología no clara que afecta al intestino delgado y al colon que incluye tanto enfermedad de Crohn (CD) como colitis ulcerativa (UC). La enfermedad de Crohn puede implicar cualquier parte del tracto intestinal pero lo más habitualmente implica

al intestino delgado distal y/o al colon. La colitis ulcerativa implica solamente al colon, limitada generalmente al recto o al colon distal. Estudios de modelos murinos de CD y de UC sugieren fuertemente que ambas enfermedades se deben a la desregulación de la respuesta inmune de la mucosa a antígenos en la microflora de la mucosa (Sartor, R. B. (1995). *Gastroenterol Clin North Am* 24, 475-507) (Strober W, *et al.* (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20: 495-549).

La colitis ulcerativa o colitis indeterminada se refiere a una afección del colon caracterizada por un estado de inflamación en la que se pueden detectar una o más de las siguientes características histológicas: una inflamación superficial caracterizada por la presencia de pérdida de células epiteliales y de ulceración irregular, supresión pronunciada de células caliciformes que producen mucina, y reducción de la densidad de las glándulas tubulares. Además, en la lámina propia, se observa un infiltrado de células inflamatorias mixtas que consiste en linfocitos y granulocitos (consistiendo los últimos principalmente en neutrófilos y, en menor medida, eosinófilos) asociado con una exudación de células en el lumen del intestino. Además, el nivel submucosal puede presentar edema notable con pocas células inflamatorias, mientras que, en la capa de músculo más externa, <sup>1</sup> experto en la materia observaría poca o ninguna evidencia de inflamación. Véase por ejemplo Boirivant *et al.* *Journal of Experimental Medicine* 188: 1929-1939 (1998). Los síntomas clínicos pueden incluir, pero no se limitan a, diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso, dolor abdominal, y deshidratación.

La enfermedad de Crohn se refiere a una inflamación que afecta a cualquier parte del tracto alimentario pero lo más a menudo afecta a la parte terminal del intestino delgado y/o el colon ascendente adyacente. frecuentemente, la inflamación se caracteriza por "lesiones focales" que consisten en áreas de inflamación que se alternan con áreas de mucosa normal. El área del intestino afectada en la enfermedad de Crohn está marcada con eritema, edema y aumento de la friabilidad; en ocasiones, el intestino es estenótico y está unido a otros órganos abdominales o a la pared del intestino. No son infrecuentes las fístulas entre el intestino afectado y otras estructuras que incluyen la piel. Examen microscópico del tejido en la enfermedad de Crohn revela erosiones epiteliales, pérdida de células caliciformes que producen mucina y una extensa infiltración linfocítica que implica todas las capas de la mucosa; en ocasiones este infiltrado contiene células gigantes que indican la formación de granuloma. Cuando la inflamación está presente durante un período de tiempo largo (crónico), en ocasiones puede producir cicatrización (fibrosis). El tejido cicatricial por lo general no es tan flexible como el tejido sano. Por lo tanto, cuando se produce fibrosis en los intestinos, la cicatrización puede estrechar el ancho de la vía de paso (lumen) de los segmentos implicados en el intestino. Estas áreas constreñidas se denominan estenosis. La estenosis puede ser leve o grave, dependiendo de lo mucho que bloquean los contenidos del intestino del paso a través del área estrechada. Los signos/síntomas clínicos de la enfermedad de Crohn pueden incluir, pero no se limitan a: caquexia, pérdida de peso, retraso del crecimiento, dolor abdominal, fístulas que drenan, prolapso rectal y deshidratación.

En determinados ejemplos, una enfermedad inflamatoria es una enfermedad o trastorno hepático inflamatorio. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno hepático inflamatorio se selecciona entre el grupo que consiste en hepatitis autoinmune, cirrosis hepática, y cirrosis biliar.

#### **Formulación de Composiciones Farmacéuticas**

La administración de un compuesto para el tratamiento de una neoplasia o enfermedad inflamatoria se puede realizar mediante cualquier medio adecuado que da como resultado una concentración del agente terapéutico que, combinada con otros componentes, es eficaz para mejorar, reducir, o estabilizar una neoplasia o enfermedad inflamatoria. El compuesto puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia vehículo adecuada, y por lo general está presente en una cantidad de un 1-95 % en pesos del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación que es adecuada para vía de administración parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, o por vía intraperitoneal). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (20<sup>a</sup> ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Las cantidades de dosificación en seres humanos se pueden determinar inicialmente por extrapolación de la cantidad de compuesto usado en ratones, tal como un experto en la materia reconoce que es rutinario en la técnica para modificar la dosificación para seres humanos en comparación con modelos animales. En ciertas realizaciones se prevé que la dosificación puede variar de entre aproximadamente 1 mg de compuesto/Kg de peso corporal a aproximadamente 5000 mg de compuesto/Kg de peso corporal; o de aproximadamente 5 mg/Kg de peso corporal a aproximadamente 4000 mg/Kg de peso corporal o de aproximadamente 10 mg/Kg de peso corporal a aproximadamente 3000 mg/Kg de peso corporal; o de aproximadamente 50 mg/Kg de peso corporal a aproximadamente 2000 mg/Kg de peso corporal; o de aproximadamente 100 mg/Kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg/Kg de peso corporal; o de aproximadamente 150 mg/Kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/Kg de peso corporal. En otras realizaciones esta dosis puede ser de aproximadamente 1,5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, o 5000 mg/Kg de peso corporal. En otras realizaciones, se prevé que las dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 5 mg de compuesto/Kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg de compuesto/Kg

de peso corporal. En otras realizaciones las dosis pueden ser de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16 o 18 mg/Kg de peso corporal. Por supuesto, esta cantidad de dosificación se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo, y se realiza de forma rutinaria en tales protocolos de tratamiento, dependiendo los resultados de los ensayos clínicos iniciales y de las necesidades de un paciente en particular.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para liberar el compuesto activo básicamente inmediatamente después de la administración o en cualquier periodo de tiempo predeterminado o periodo de tiempo después de la administración. Los últimos tipos de composiciones se conoce generalmente como formulaciones de liberación controlada, que incluyen (i) formulaciones que crean una concentración básicamente constante del fármaco dentro del organismo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retraso predeterminado crean una concentración básicamente constante del fármaco dentro del organismo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción durante un periodo de tiempo predeterminado mediante el mantenimiento de un nivel eficaz, relativamente constante en el organismo con minimización simultánea de efectos secundarios no deseados asociados con fluctuaciones en el nivel en plasma de la sustancia activa (patrón cinético de dientes de sierra); (iv) formulaciones que focalizan la acción, por ejemplo, mediante colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a poco en contacto con el timo; (v) formulaciones que permiten una dosificación conveniente, de modo que tales dosis se administran, por ejemplo, una vez cada una o dos semanas; y (vi) formulaciones que se dirigen a una neoplasia o enfermedad inflamatoria usando vehículos o derivados químicos para administrar el agente terapéutico a un tipo de célula en particular (por ejemplo, célula neoplásica). Para algunas aplicaciones, las formulaciones de liberación controlada evitan la necesidad de dosificación frecuente durante el día para mantener el nivel en plasma a un nivel terapéutico.

Se puede buscar cualquiera de una serie de estrategias para obtener liberación controlada en la que la tasa de liberación es mayor que la tasa de metabolismo del compuesto en cuestión. En un ejemplo, la liberación controlada se obtiene mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de formulación, que incluyen, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y revestimientos de liberación controlada. Por lo tanto, el agente terapéutico se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, después de la administración, libera el agente terapéutico de una manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas unitarios individuales o múltiples, abluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, complejos moleculares, nanopartículas, parches, y liposomas.

### **Composiciones Parenterales**

La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral mediante inyección, infusión o implante (subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, o similar) en formas de dosificación, formulaciones, o mediante dispositivos de administración o implantes adecuados que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. La formulación y la preparación de tales composiciones son bien conocidas por los expertos en la materia de la formulación farmacéutica. Se pueden encontrar formulaciones en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, mencionado anteriormente.

Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas de una sola dosis), o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante que adecuado (véase a continuación). La composición se puede presentar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de administración para implante, o se puede presentar como un polvo seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Aparte del principio activo que reduce lo que mejora una neoplasia o enfermedad inflamatoria, la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El agente o agentes terapéuticos activos se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares para liberación controlada. Además, la composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, de ajuste del pH, agentes para el ajuste de la tonicidad, y/o agentes de dispersión.

Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden presentar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar tal composición, el agente o agentes terapéuticos antineoplásicos activos adecuados se disuelven o se suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar se encuentran el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico y solución de dextrosa. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, metilo, etilo o p-hidroxibenzoato de n-propilo). En los casos en los que uno de los compuestos es solamente moderada o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un potenciador de la disolución o un agente de solubilidad, o el disolvente puede incluir un 10-60 % en p/p de propilenglicol o similar.

### **Composiciones Parenterales de Liberación Controlada**

Las composiciones parenterales de liberación controlada se puede presentar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas, o emulsiones.

Como alternativa, el fármaco activo se puede incorporar en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes, o dispositivos de infusión biocompatibles.

Los materiales para uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli-(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutaminina) y, poli(ácido láctico). Los vehículos biocompatibles que se pueden usar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas, o anticuerpos. Los materiales para uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetil siloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres) o combinaciones de los mismos).

### Formas de Dosificación Sólidas Para Uso Oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el principio o principios activos en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Tales formulaciones son conocidas por el experto en la materia. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato cálcico, cloruro sódico, lactosa, fosfato cálcico, sulfato cálcico, o fosfato sódico); agentes de granulación y disgregantes (por ejemplo, derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patatas, croscarmelosa sódica, alginatos, o ácido algínico); agentes aglutinantes (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábica, ácido algínico, alginato sódico, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio y aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona, o polietilenglicol); y agentes lubricantes, agentes deslizantes, y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de cinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes saborizantes, agentes plastificantes, humectantes, agentes de taponamiento.

Los comprimidos pueden estar sin revestir o se pueden revestir con técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionando de ese modo una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. El revestimiento se puede adaptar para liberar el fármaco activo en un patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de conseguir una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para que no libere el fármaco activo hasta después del paso del estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento de película (por ejemplo, a base de hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (por ejemplo, basado en copolímero del ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropil metilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo, goma laca, y/o etilcelulosa). Además, se puede usar un material para retrasar el tiempo, tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimido sólido pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados, (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia terapéutica activa). El revestimiento se puede aplicar en la forma de dosificación sólida de una manera similar a la que se describe en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, mencionada anteriormente.

Al menos dos agentes terapéuticos se pueden mezclar en conjunto en el comprimido, o se pueden repartir. En un ejemplo, el primer agente terapéutico activo antineoplasia está contenido en la parte interior del comprimido, y el segundo agente terapéutico activo está en la parte exterior, de modo que una parte sustancial del segundo agente terapéutico se libera antes de la liberación del primer agente terapéutico.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva. Se pueden preparar polvos y granulados usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de manera convencional usando, por ejemplo, una mezcladora, un aparato de lecho fluido o un equipo desecado por pulverización.

### Formas de Dosificación Oral de Liberación Controlada

Se pueden preparar composiciones de liberación controlada para uso oral, por ejemplo, para liberar el agente terapéutico activo antineoplasia o antiinflamatorio mediante el control de la disolución y/o la difusión de la sustancia activa. La liberación controlada por disolución o difusión se puede conseguir mediante el revestimiento apropiado de un comprimido, cápsula, gránulo, o formulación granulada de compuestos, o mediante la incorporación del compuesto en una matriz apropiada. un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento que se han mencionado anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, glicowax, cera de ricino, cera de carnaúba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo,

palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato butirato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinil pirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butilen glicol, metacrilato de etilenglicol, y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnaúba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno, y/o fluorocarbono halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más compuestos terapéuticos también se puede presentar en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, después de la administración oral, flota en la parte superior del contenido gástrico durante un determinado periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del compuesto o compuestos se puede preparar mediante granulación de una mezcla del compuesto o compuestos con excipientes y un 20-75 % en p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir a continuación para formar comprimidos. En contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel básicamente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel participa en el mantenimiento de una densidad inferior a uno, permitiendo de ese modo que el comprimido se mantenga flotando en el jugo gástrico.

### Terapias de Combinación

Opcionalmente, un agente terapéutico antineoplasia o antiinflamatorio se puede administrar en combinación con cualquier otra terapia convencional antineoplasia o anti inflamatoria conocida en la técnica; tales métodos son conocidos por el experto en la materia y se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. Si se desea, los agentes de la invención (u otros compuestos de fórmulas que se describen en el presente documento, y derivados de los mismos) se administran en combinación con cualquier terapia antineoplásica convencional, cirugía, terapia de radiación, o quimioterapia. En ejemplos en particular, un compuesto de la invención se administra en combinación con un modulador epigenético o de la transcripción (por ejemplo, inhibidor de la ADN metiltransferasa, inhibidor de la histona desacetilasa (inhibidor de HDAC), inhibidor de la lisina metiltransferasa), con fármacos antimetabólicos (por ejemplo, taxanos, alcaloides de la vinca), moduladores de receptores de hormonas (por ejemplo, moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos), inhibidores de la ruta de señalización celular (por ejemplo, inhibidores de la tirosina quinasa), moduladores de la estabilidad de proteínas (inhibidores de proteasomas), inhibidores de hsp90, agentes quimioterapéuticos convencionales, glucocorticoides, ácido todo-trans retinoico u otros agentes que estimulan la diferenciación.

### Kits o Sistemas Farmacéuticos

Las presentes composiciones se pueden ensamblar en kits o sistemas farmacéuticos para uso para mejorar una neoplasia o enfermedad inflamatoria. Los kits o sistemas farmacéuticos de acuerdo con este aspecto comprenden un medio de vehículo, tal como una caja, cartón, tubo, que tienen confinamiento cercano al mismo uno o más medios de envase, tales como viales, tubos, ampollas, botellas. Los kits o sistemas farmacéuticos también pueden comprender instrucciones asociadas para uso de los agentes de la invención.

La práctica de la presente invención usa, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que es también dentro de la competencia del experto en la materia. tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos que se desvelan en el presente documento, y, como tal, se pueden tener en consideración en la preparación y en la práctica de la invención. En las secciones que siguen a continuación se analizarán técnicas particularmente útiles para realizaciones en particular.

### Ejemplos

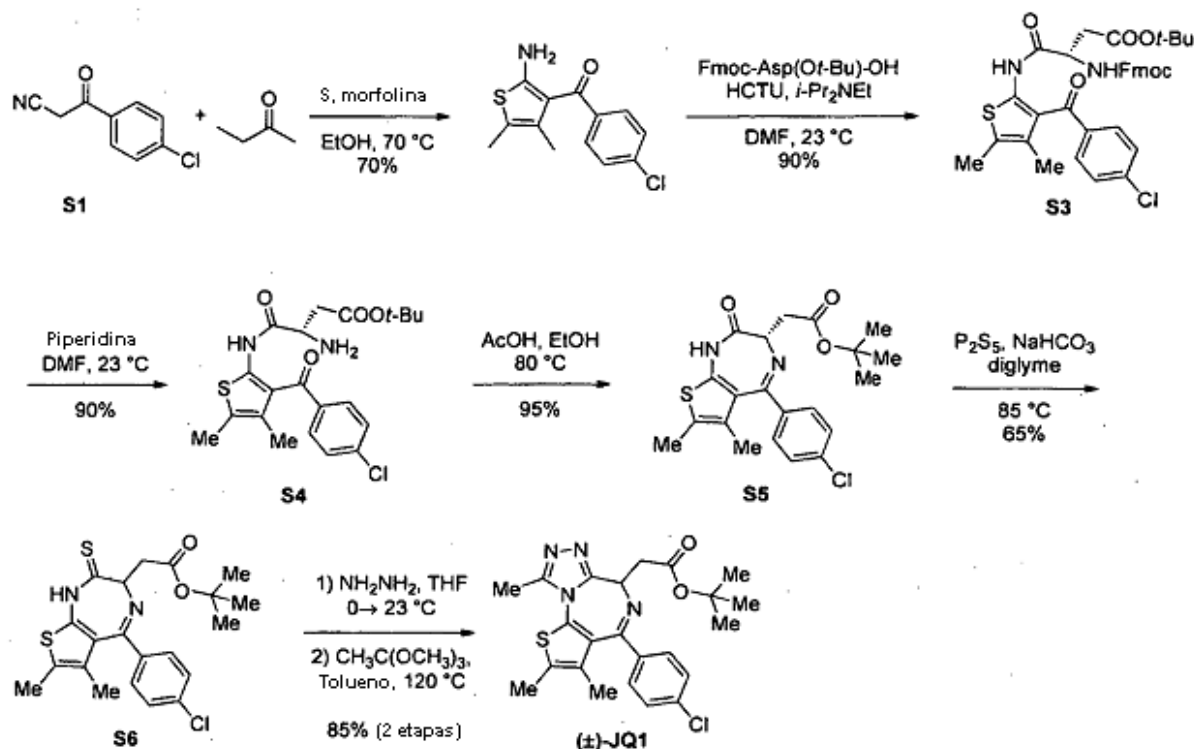
La práctica de la presente invención usa, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están bien dentro de la competencia del experto en la materia. tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos tal como se desvela en el presente documento, y, como tal, se pueden tener en consideración en la preparación y práctica de la invención. En las secciones que siguen a continuación se analizarán técnicas particularmente útiles para realizaciones en particular.

Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar el ensayo, identificación sistemática, y métodos terapéuticos que se desvelan en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores contemplan como su invención.

## I. EJEMPLOS QUÍMICOS – SÍNTESIS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar con métodos que se describen en el presente documento, y/o de acuerdo con métodos conocidos por un experto habitual en la materia a la vista de la descripción en el presente documento.

### Esquema S1. Síntesis del inhibidor de bromodominio racémico (±)-JQ1



(2-amino-4,5-dimethylthien-3-yl)(4-chlorophenyl)methanone (**S2**)

El compuesto JQ1 se preparó de acuerdo con El esquema que se ha mostrado anteriormente.

Se añadió azufre (220 mg, 6,9 mmol, 1,00 equiv.) en forma de un sólido a una solución de 4-clorobenzoyl acetonitrilo **S1** (1,24 g, 6,9 mmol, 1 equiv.), 2-butanona (0,62 ml, 6,9 mmol, 1,00 equiv.), y morfolina (0,60 ml, 6,9 mmol, 1,00 equiv.) en etanol (20 ml, 0,35 M) a 23 °C<sup>21</sup>. A continuación, la mezcla se calentó a 70 °C. Después de 12 horas, la mezcla de reacción se enfrió a 23 °C se vertió en salmuera (100 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 40 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar **S2** (1,28 g, 70 %) en forma de un sólido de color amarillo.

(*S*)-*tert*-Butil-3-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)-4-[[3-(4-clorobenzoyl)-4,5-dimetiltiofen-2-il]amino]-4-oxobutanoato (**S3**)

Se añadieron hexafluorofosfato de (2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) (827 mg, 2,0 mmol, 2,00 equiv.), y *N,N*-diisopropiletilamina (0,72 ml, 4,0 mmol, 4,00 equiv.) secuencialmente a una solución de éster de β-*tert*-butilo del ácido 9-fluorenilmetoxicarbonil-aspártico [Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH] (864 mg, 2,1 mmol, 2,10 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1,5 ml, 1,0 M). A continuación, la mezcla se agitó a 23 °C durante 5 min. A continuación se añadió **S2** (266 mg, 1,0 mmol, 1 equiv.) en forma de un sólido. La mezcla de reacción se agitó a 23 °C. Después de 16 horas, se añadieron acetato de etilo (20 ml) y salmuera (20 ml). Las dos fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se

purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (Combiflash RF, 40 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar **S3** (625 mg, 90 %) en forma de un aceite de color marrón.

3-Amino-4-((3-(4-clorobenzoil)-4,5-dimetiltiofen-2-il)amino)-4-oxobutanoato de (*S*)-*tert*-butilo (**S4**)

El compuesto **S3** (560 mg, 0,85 mmol, 1 equiv.) se disolvió en piperidina al 20 % en solución de DMF (4,0 ml, 0,22 M) a 23 °C. Después de 30 min, se añadieron acetato de etilo (20 ml) y salmuera (20 ml) a la mezcla de reacción. Las dos fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3 x 25 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 24 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar la amina **S4** libre (370 mg, 90 %) en forma de un sólido de color amarillo. La pureza enantiomérica descendió a un 75 % (determinada con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) usando una columna AS-H).

2-(5-(4-Clorofenil)-6,7-dimetil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-3-il)acetato de (*s*)-*tert*-butilo (**S5**)

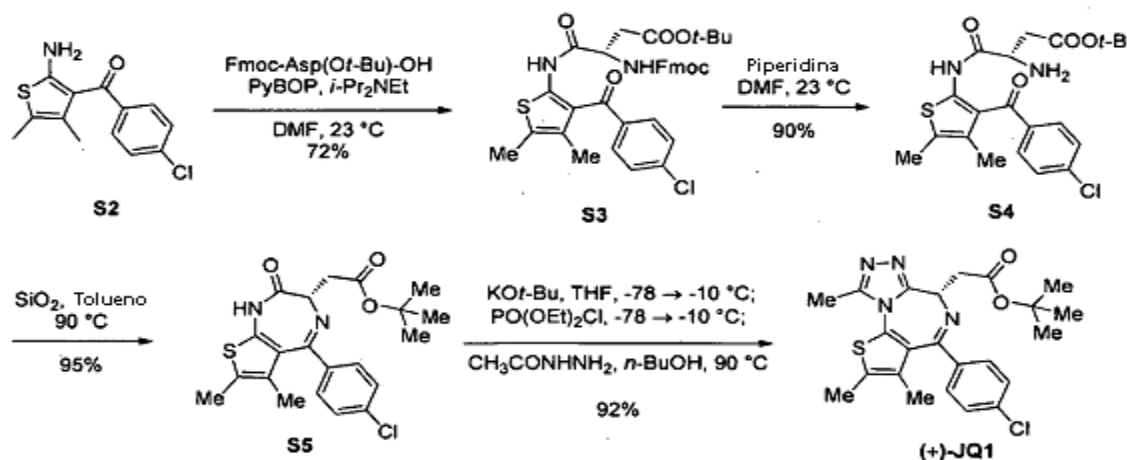
Se disolvió amina cetona (**S4**) (280 mg, 0,63 mmol) en solución de etanol y ácido acético al 10 % (21 ml, 0,03 M). La mezcla de reacción se calentó a 85 °C. Después de 30 minutos, todos los disolventes se retiraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 12 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar el compuesto **S5** (241 mg, 95 %) en forma de un sólido de color blanco. La pureza enantioméricamente **S5** era de un 67 % (determinada con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) usando una columna AS-H).

2-(5-(4-Clorofenil)-6,7-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-3-il)acetato de *tert*-butilo (**S6**)

Se añadieron pentasulfuro de fósforo (222 mg, 1,0 mmol, 2,00 equiv.), bicarbonato sódico (168 mg, 2,0 mmol, 4,00 equiv.) secuencialmente a una solución de **S5** (210 mg, 0,5 mmol, 1 equiv.) en diglyme (1,25 ml, 0,4 M). La mezcla de reacción se calentó a 90 °C. Después de 16 h, se añadieron salmuera (20 ml) y acetato de etilo (35 ml). Las dos fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 15 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 24 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar **S6** (141 mg, 65 %) en forma de un sólido de color marrón con **S5** recuperado (73 mg, 34 %).

2-(4-(4-Clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetato de *tert*-butilo [(±)**JQ1**]

Se añadió hidrazina (0,015 ml, 0,45 mmol, 1,25 equiv.) a una solución de **S6** (158 mg, 0,36 mmol, 1 equiv.) en THF (2,6 ml, 0,14 M) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a 23 °C, y se agitó a 23 °C durante 1 h. Todos los disolventes se retiraron a presión reducida. La hidrazina resultante se usó directamente sin purificación. La hidrazina se disolvió a continuación en una mezcla 2:3 de ortoacetato de trimetilo y tolueno (6 ml, 0,06 M). La mezcla de reacción se calentó a 120 °C. Después de 2 h, todos los disolventes se retiraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash, 4 g de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar **JQ1** (140 mg, 85 % en 2 etapas) en forma de un sólido de color blanco. Las condiciones de reacción epimerizaron adicionalmente el centro estereogénico, dando como resultado el racemato, **JQ1** (determinado con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) con una columna AS-H).

**Esquema S2.** Síntesis de **(+)-JQ1** enriquecido enantioméricamente.

(*S*)-*tert*-Butil-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-4-[[3-(4-clorobenzoil)-4,5-dimetiltiofen-2-il]amino]-4-oxobutanoato (**S3**)

Se añadieron (benzotriazol-1-iloxil)tripirrolidinofosfonio (PyBOP) (494 mg, 0,95 mmol, 0,95 equiv.), N,N-diisopropiletilamina (0,50 ml, 2,8 mmol, 2,75 equiv.) secuencialmente a una solución de éster de β-*tert*-butilo del ácido 9-fluorenilmetoxicarbonil-aspártico [Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH] (411 mg, 1,00 mmol, 1,0 equiv.) en N,N-dimetilformamida (1,0 ml, 1,0 M). A continuación, la mezcla se agitó a 23 °C durante 5 min. A continuación se añadió **S2** (266 mg, 1,0 mmol, 1 equiv.) en forma de un sólido. La mezcla de reacción se agitó a 23 °C. Después de 4 h, se añadieron acetato de etilo (20 ml) y salmuera (20 ml). Las dos fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 40 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar **S3** (452 mg, 72 %) en forma de un aceite de color marrón.

3-Amino-4-((3-(4-clorobenzoil)-4,5-dimetiltiofen-2-il)amino)-4-oxobutanoato de (*S*)-*tert*-butilo (**S4**)

El compuesto **S3** (310 mg, 0,47 mmol, 1 equiv.) se disolvió en piperidina al 20 % en solución de DMF (2,2 ml, 0,22 M) a 23 °C. Después de 30 min, se añadieron acetato de etilo (20 ml) y salmuera (20 ml) a la mezcla de reacción. Las dos fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3 x 25 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 24 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexano) para proporcionar la amina libre **S4** (184 mg, 90 %) en forma de un sólido de color amarillo. La pureza enantiomérica era de un 91 % (comprobado con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) usando una columna AS-H).

2-(5-(4-Clorofenil)-6,7-dimetil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-3-il)acetato de (*S*)-*tert*-butilo (**S5**)

Se disolvió amino cetona (**S4**) (184 mg, 0,42 mmol) en tolueno (10 ml, 0,04 M). Se añadió gel de sílice (300 mg), y la mezcla de reacción se calentó a 90 °C. Después de 3 h, la mezcla de reacción se enfrió a 23 °C. El gel de sílice se filtró, y se lavó con acetato de etilo. Los filtrados combinados se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (sistema Combiflash RF, 12 gramos de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar el compuesto **S5** (168 mg, 95 %) en forma de un sólido de color blanco. La pureza enantiomérica de **S5** era de un 90 % (determinada con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) usando una columna AS-H).

2-(4-(4-Clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetato de (*S*)-*tert*-Butilo **[(+)-JQ1]**

Se añadió *tert*-butóxido potásico (solución 1,0 M en THF, 0,3 ml, 0,30 mmol, 1,10 equiv.) a una solución de **S5** (114 mg, 0,27 mmol, 1 equiv.) en THF (1,8 ml, 0,15 M) a -78 °C. La mezcla de reacción se calentó a -10 °C, y se agitó a 23 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió a -78 °C. Se añadieron clorofosfato de dietilo (0,047 ml, 0,32 mmol, 1,20 equiv.) a la mezcla de reacción<sup>22</sup>. La mezcla resultante se calentó a -10 °C durante 45 min. Se añadió hidrazida acética (30 mg, 0,40 mmol, 1,50 equiv.) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 23 °C. Después de 1 h, se añadió 1-butanol (2,25 ml) a la mezcla de reacción, que se calentó a 90 °C. Después de 1 h, todos los disolventes se retiraron a presión reducida. El residuo se purificó con cromatografía en columna

ultrarrápida (sistema Combiflash, 4 g de gel de sílice, gradiente de un 0 a un 100 % de acetato de etilo-hexanos) para proporcionar (+)-**JQ1** (114 mg, 92 %) en forma de un sólido de color blanco con una pureza enantiomérica de un 90 % (determinada con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) usando columna AS-H, hexanos-metanol al 85 %, 210 nm,  $t_R$  (enantiómero R) = 1,59 min,  $t_R$  (enantiómero S) = 3,67 min). El producto se purificó adicionalmente por HPLC preparativa quiral (Cromatografía Líquida a Alta Presión de Agilent usando una columna OD-H) para proporcionar el enantiómero S con un ee superior a un 99 %.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  7,39 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 2H), 4,54 (t,  $J$  = 6,6 MHz, 1H), 3,54-3,52 (m, 2H), 2,66 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,67 (s, 3H), 1,48 (s, 9H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  171,0, 163,8, 155,7, 150,0, 136,9, 131,1, 130,9, 130,6, 130,3, 128,9, 81,2, 54,1, 38,1, 28,4, 14,6, 13,5, 12,1.

HRMS(ESI) calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 457,1460, encontrado 457,1451 m/z

TLC (EtOAc),  $R_f$ : 0,32 (UV)

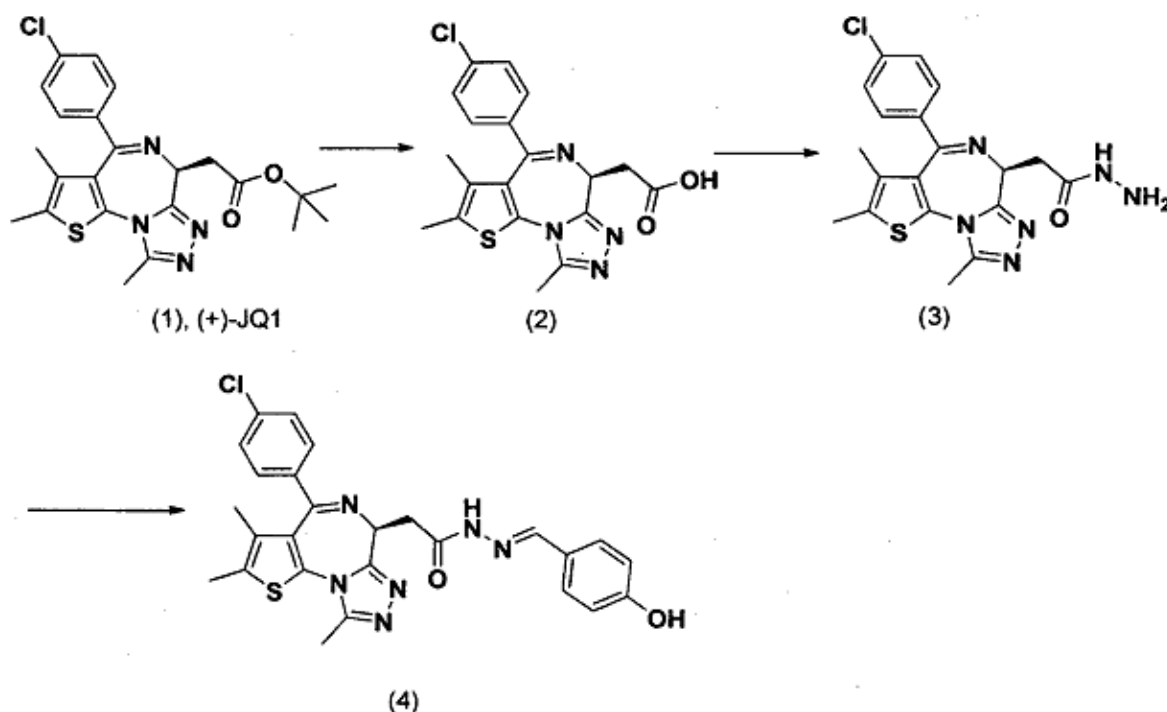
$[\alpha]_D^{22} = +75$  (c 0,5,  $\text{CHCl}_3$ )

(-)-**JQ1** se sintetizó de una manera similar, usando Fmoc-D-Asp(Ot-Bu)-OH como un material de partida, y se purificó adicionalmente por HPLC preparativa quiral (Cromatografía Líquida a Alta Presión de Agilent usando una columna OD-H) para proporcionar el enantiómero R con un ee superior a un 99 %.  $[\alpha]_D^{22} = -72$  (c 0,5,  $\text{CHCl}_3$ )

#### Síntesis de Compuestos Adicionales

Los compuestos adicionales se prepararon tal como se ilustra en el Esquema S3.

**Esquema S3.** Síntesis de derivados de hidrazina



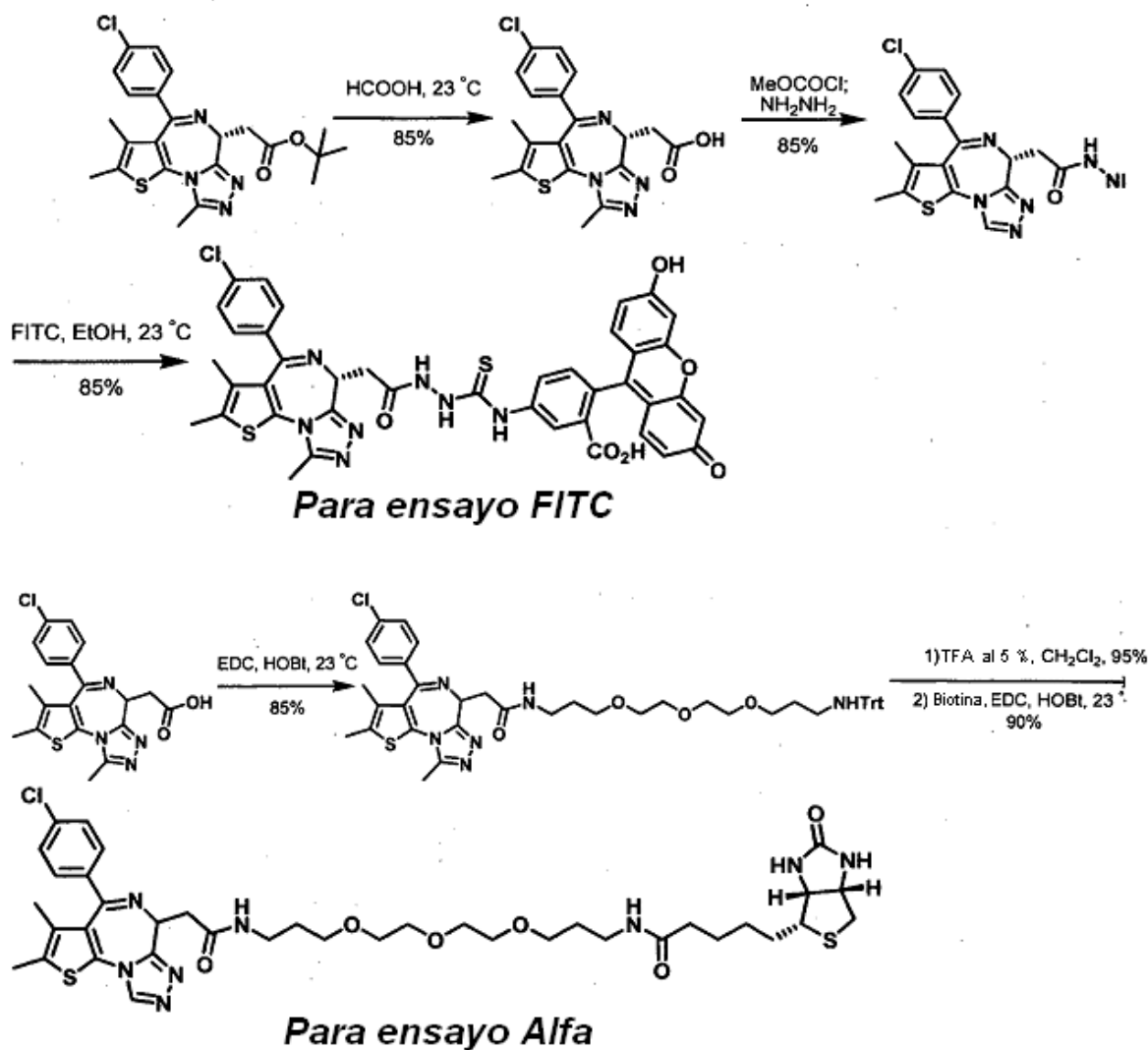
Tal como se muestra en el Esquema S3, el éster de t-butilo de (+)-JQ (1) se escindió para producir el ácido libre (2), que se acopló con hidrazina para producir la hidrazida (3). La reacción con 4-hidroxibenzaldehído proporcionó la hidrazona (4).

Tanto la hidrazida (3) como la hidrazona (4) presentaban actividad en al menos un ensayo biológico.

Se preparó una biblioteca de compuestos por reacción de la hidrazida (3) con diversos compuestos que contienen carbonilo (véase la Tabla A, mostrada anteriormente).

Se prepararon compuestos adicionales para uso, por ejemplo, como sondas para desarrollo del ensayo. Una síntesis a modo de ejemplo se muestra en el Esquema S4, que sigue a continuación.

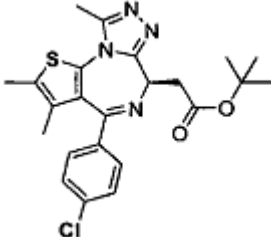
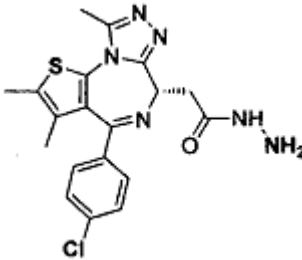
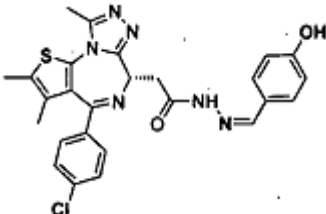
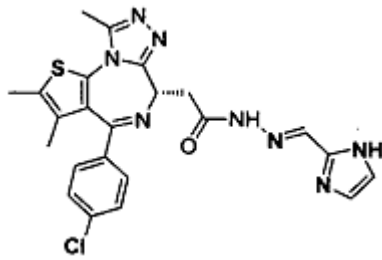
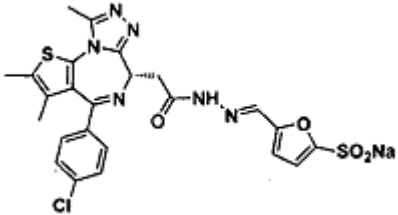
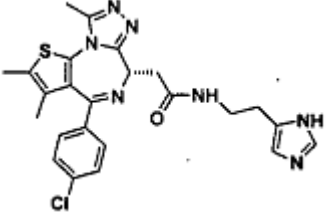
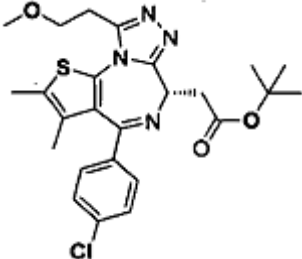
**Esquema S4.** Síntesis de derivados útiles como sondas

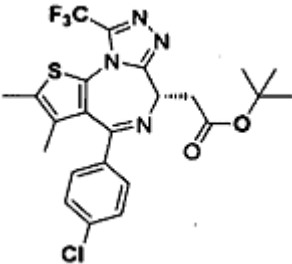
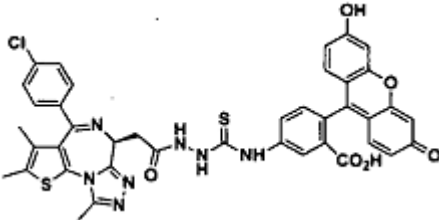
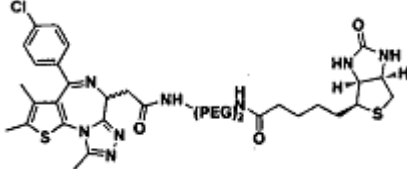
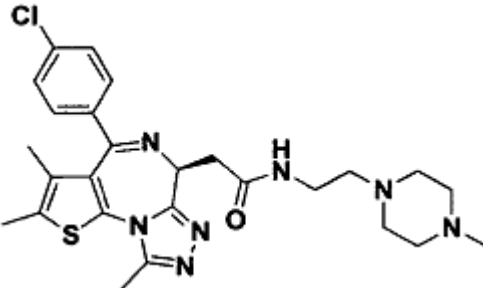
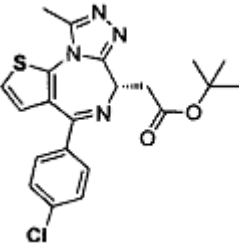
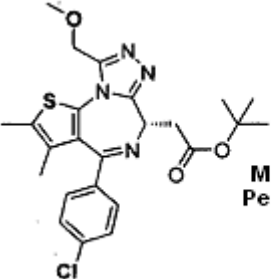


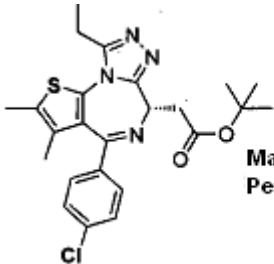
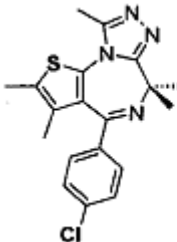
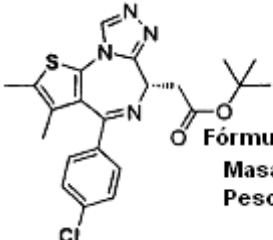
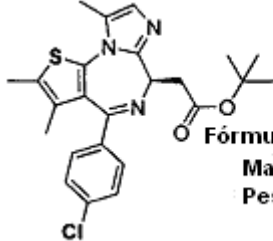
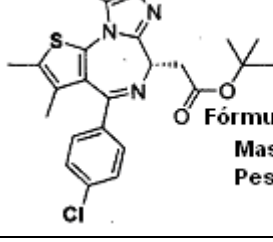
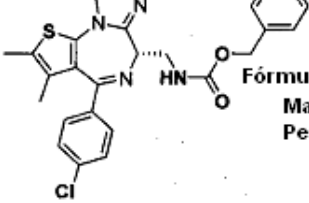
Se prepararon compuestos adicionales tal como se muestra en la Tabla B, que sigue a continuación:

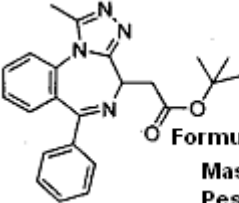
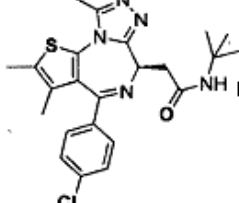
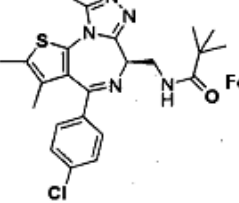
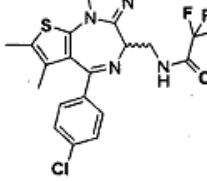
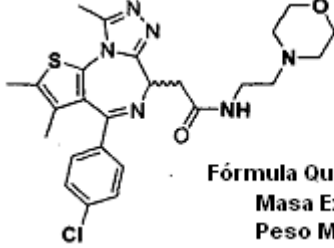
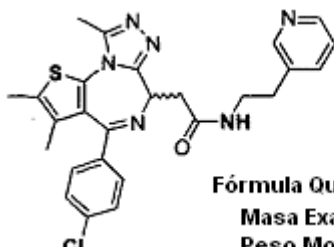
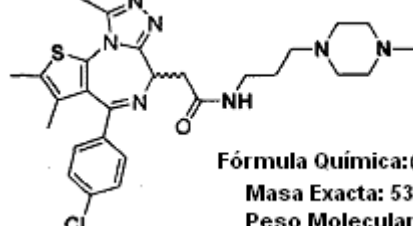
10

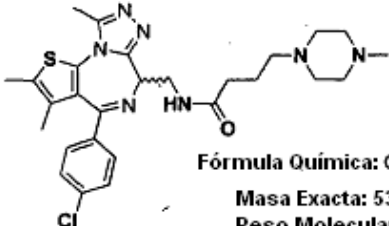
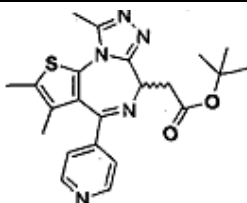
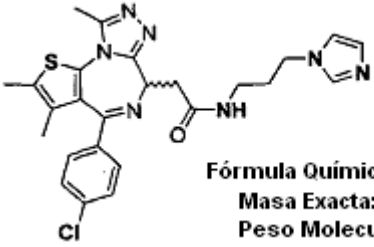
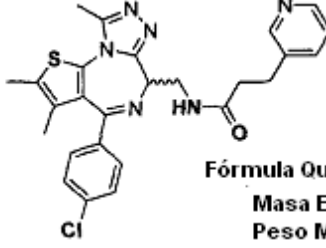
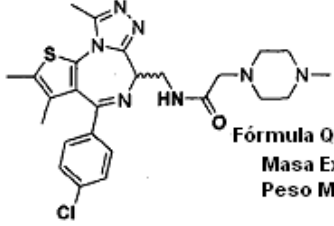
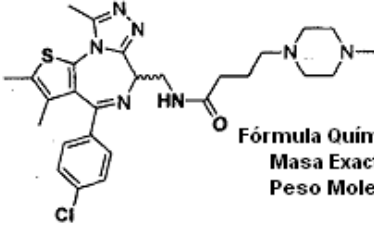
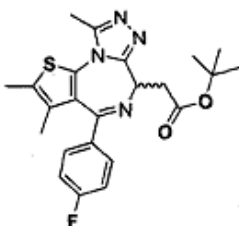
| Nombre del compuesto | Estructura | MS $[M+H]^+$ m/z (Observado) |
|----------------------|------------|------------------------------|
| (S)-JQ1              |            | 457,1                        |

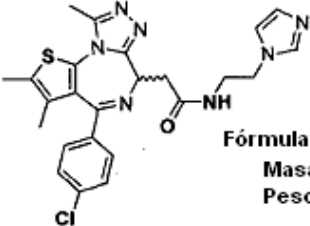
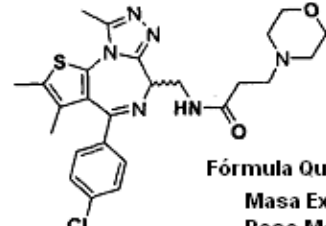
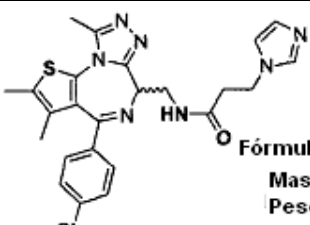
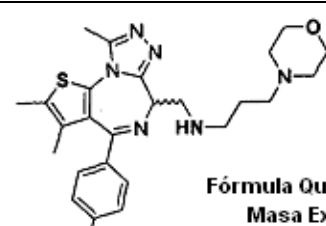
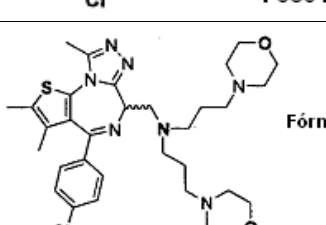
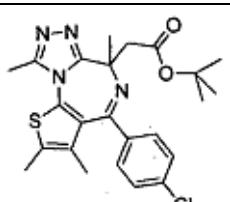
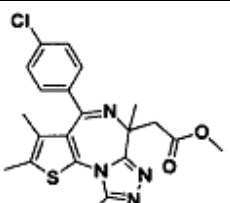
|         |                                                                                     |       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| (R)-JQ1 |    | 457,1 |
| JQ3     |    | 415,1 |
| JQ4     |   | 519,1 |
| JQ6     |  | 493,1 |
| JQ7     |  | 579,0 |
| JQ8     |  | 494,1 |
| JQ10    |  | 501,1 |

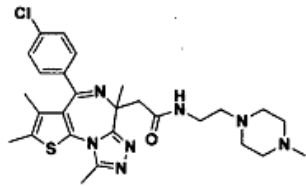
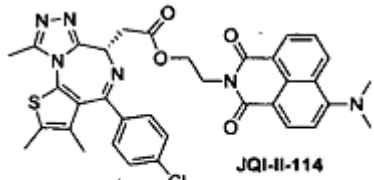
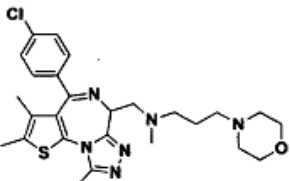
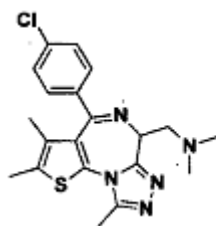
|             |                                                                                                                                                                                                                                     |       |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQ11        |                                                                                                                                                    | 511,1 |
| JQ1-FITC    |                                                                                                                                                    | 804,1 |
| JQ1-Biotina |                                                                                                                                                    | 829,3 |
| JQ13        |                                                                                                                                                 | 526,2 |
| KS1         |                                                                                                                                                  | 429,1 |
| JQ18        |  <p><b>Fórmula Química:</b><br/> <math>C_{24}H_{27}ClN_4O_3S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 486,14924<br/> <b>Peso Molecular:</b> 487,01418</p> | 487,1 |

|       |                                                                                                                                                                                                                                               |       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQ19  |  <p><b>Fórmula Química:</b><br/> <math>C_{24}H_{27}ClN_4O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 470,15432<br/> <b>Peso Molecular:</b> 471,01478</p>             | 471,1 |
| JQ20  |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{19}H_{19}ClN_4S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 370,10190<br/> <b>Peso Molecular:</b> 370,89896<br/> JQI-II-023</p>     | 370,1 |
| JQ21  |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{22}H_{23}ClN_4O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 442,12302<br/> <b>Peso Molecular:</b> 442,96162<br/> JQI-II-024</p> | 443,1 |
| JQ24A |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{24}H_{26}ClN_3O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 455,1434<br/> <b>Peso Molecular:</b> 456,0001</p>                  | 456,1 |
| JQ24B |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{24}H_{26}ClN_3O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 455,1434<br/> <b>Peso Molecular:</b> 456,0001</p>                  | 456,1 |
| JQ25  |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{26}H_{24}ClN_5O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 505,1339<br/> <b>Peso Molecular:</b> 506,0191</p>                  | 506,1 |

|      |                                                                                                                                                                                                                                         |       |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQB  |  <p> <b>Formula Química:</b> <math>C_{23}H_{24}N_4O_2</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 388,1899<br/> <b>Peso Molecular:</b> 388,4623         </p>       | 389,2 |
| JQ30 |  <p> <b>Formula Química:</b> <math>C_{23}H_{26}ClN_5OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 455,1547<br/> <b>Peso Molecular:</b> 456,0034         </p>      | 456,2 |
| JQ31 |  <p> <b>Formula Química:</b> <math>C_{23}H_{26}ClN_5OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 455,1547<br/> <b>Peso Molecular:</b> 456,0034         </p>      | 456,2 |
| JQ32 |  <p> <b>Fórmula Química:</b> <math>C_{20}H_{17}ClF_3N_5OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 467,0794<br/> <b>Peso Molecular:</b> 467,8951         </p> | 468,1 |
| JQ33 |  <p> <b>Fórmula Química:</b> <math>C_{25}H_{29}ClN_6O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 512,1761<br/> <b>Peso Molecular:</b> 513,0548         </p>  | 512,2 |
| JQ34 |  <p> <b>Fórmula Química:</b> <math>C_{26}H_{25}ClN_6OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 504,1499<br/> <b>Peso Molecular:</b> 505,0343         </p>    | 505,1 |
| JQ35 |  <p> <b>Fórmula Química:</b> <math>C_{27}H_{34}ClN_7OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 539,2234<br/> <b>Peso Molecular:</b> 540,1232         </p>    | 540,2 |

|      |                                                                                                                                                                                                      |       |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQ36 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{27}H_{34}ClN_7OS</math><br/>Masa Exacta: 539,2234<br/>Peso Molecular: 540,1232</p>    | 540,2 |
| JQ37 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{22}H_{25}N_5O_2S</math><br/>Masa Exacta: 423,1729<br/>Peso Molecular: 423,5312</p>    | 424,2 |
| JQ38 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{25}H_{26}ClN_7OS</math><br/>Masa Exacta: 507,1608<br/>Peso Molecular: 508,0382</p>    | 508,2 |
| JQ39 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{26}H_{25}ClN_6OS</math><br/>Masa Exacta: 504,1499<br/>Peso Molecular: 505,0343</p>  | 505,1 |
| JQ40 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{25}H_{30}ClN_7OS</math><br/>Masa Exacta: 511,1921<br/>Peso Molecular: 512,0700</p>  | 512,2 |
| JQ41 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{27}H_{34}ClN_7OS</math><br/>Masa Exacta: 539,2234<br/>Peso Molecular: 540,1232</p>  | 540,2 |
| JQ42 |  <p>Fórmula Química: <math>C_{23}H_{25}FN_4O_2S</math><br/>Masa Exacta: 440,1682<br/>Peso Molecular: 440,5336</p> | 441,2 |

|      |                                                                                                                                                                                                                              |       |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQ43 |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{24}H_{24}ClN_7OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 493,1452<br/> <b>Peso Molecular:</b> 494,0117</p>     | 494,1 |
| JQ44 |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{25}H_{29}ClN_6O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 512,1761<br/> <b>Peso Molecular:</b> 513,0548</p>   | 513,2 |
| JQ45 |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{24}H_{24}ClN_7OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 493,1452<br/> <b>Peso Molecular:</b> 494,0117</p>     | 494,1 |
| JQ46 |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{25}H_{31}ClN_6OS</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 498,1969<br/> <b>Peso Molecular:</b> 499,0712</p>   | 499,2 |
| JQ47 |  <p><b>Fórmula Química:</b> <math>C_{32}H_{44}ClN_7O_2S</math><br/> <b>Masa Exacta:</b> 625,2966<br/> <b>Peso Molecular:</b> 626,2555</p> | 626,3 |
| JQ48 |  <p><b>Masa Exacta:</b> 470,1543<br/> <b>Peso Molecular:</b> 471,0148</p>                                                                 | 471,2 |
| JQ49 |  <p><b>Masa Exacta:</b> 428,1074<br/> <b>Peso Molecular:</b> 428,9350</p>                                                                 | 429,1 |

|      |                                                                                                                                                            |       |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| JQ50 |  <p>Masa Exacta: 539,2234<br/>Peso Molecular: 540,1232</p>                | 540,2 |
| JQ51 |  <p>JQI-II-114<br/>Masa Exacta: 666,1816<br/>Peso Molecular: 667,1764</p> | 667,2 |
| JQ52 |  <p>Masa Exacta: 512,2125<br/>Peso Molecular: 513,0978</p>                | 513,2 |
| JQ53 |  <p>Masa Exacta: 399,1284<br/>Peso Molecular: 399,9402</p>               | 400,1 |

Los datos espectrales para cada compuesto eran coherentes con la estructura asignada.

## II. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5

### Ejemplo de Referencia 1: JQ1

La Figura 1 muestra enantiómeros de JQ1.

10

### Ejemplo de Referencia 2: JQ1 desplaza a BRD4 de la cromatina nuclear en células.

15

Para establecer si JQ1 une bromodominios de forma competitiva con cromatina en un entorno celular, se realizaron experimentos de recuperación de fluorescencia después de fotolixiviación (FRAP) en BRD4. La investigación anterior ha demostrado la utilidad de FRAP en la evaluación del ritmo de redistribución lateral de la quimera fluorescente que contiene bromodominio después de la fotolixiviación selectiva de regiones discretas de cromatina nuclear<sup>27</sup>. Las células de osteosarcoma humano (U2OS) transfectadas con un GFP-BRD4 presentan una recuperación dependiente del tiempo de la intensidad de la fluorescencia (Fig. 2A y 2B). En presencia de **JQ1** (500 nM), la recuperación observada es inmediata y coherente con el BRD4 nuclear desplazado (Fig. 3A y 3B). Los estudios de FRAP celular confirmaron que los efectos en la fracción móvil de BRD4 se limitan al estereoisómero (+)-**JQ1** bioquímicamente activo (Figura 2A-2C).

20

25

Habiendo demostrado unión selectiva, potente a BRD4 en ensayos homogéneos y basados en células, se evaluó el efecto de JQ1 en fenotipos celulares dependientes de BRD4, relevantes para la enfermedad. La proteína de fusión BRD4-NUT patológica que surge a partir de la translocación de t(15;19) en NMC se une a focos de cromatina acetilada de forma rápida a discreta, transmitiendo una ventaja proliferativa y bloqueo de la diferenciación. Usando FRAP, se evaluó la capacidad de JQ1 para dirigirse directamente a la oncoproteína BRD4-NUT. En comparación con un control de vehículo, JQ1 (500 nM) aceleró de forma notable el tiempo hasta la recuperación de la intensidad de la fluorescencia en regiones fotolixiviadas de células transfectadas con GFP-BRD4-NUT (Fig. 3C, 3E). De forma importante, no se observó efecto alguno en la redistribución de GFP-NUT (Fig. 3D, 3E). En resumen, estos datos son coherentes con la unión competitiva de JQ1 a BRD4 en células cultivadas.

30

### Ejemplo de Referencia 5: JQ1 induce la diferenciación escamosa y la detención del crecimiento en carcinoma dependiente de BRD4.

La inhibición directa de productos genéticos expresados a partir de translocaciones oncogénicas, recurrentes es un enfoque terapéutico validado en cáncer<sup>28,29</sup>. Se exploraron las consecuencias fenotípicas de la inhibición química de los bromodominios de la familia BET en el carcinoma de línea media de NUT dependiente de BRD4. La localización de la cromatina de BRD4-NUT esta unidad de forma mecanicista a los bromodominios en tándem conservados de BRD4 en la proteína de fusión<sup>17</sup>. un elemento característico de NMC es la aparición de puntitos nucleares discretos de la oncoproteína BRD4-NUT mediante inmunohistoquímica dirigida por NUT (IHC)<sup>30</sup>. El tratamiento de la línea celular de 797 de NMC derivada del paciente durante 48 horas con JQ1 (500 nM) eliminó los focos nucleares, produciendo tinción difusa de NUT nuclear por IHC (Fig. 3f).

Se observa un fenotipo de diferenciación sorprendente con genosupresión de BRD4-NUT en líneas celulares de NMC<sup>17</sup>. El JQ1 produjo un fenotipo de diferenciación dependiente de la dosis y del tiempo, equivalente, caracterizado por propagación de células y aplanamiento, cromatina abierta y morfología de husos en células 797 y Per403 de NMC (Fig. 3 g y Fig. 4A, 4B, 4C). La diferenciación fue rápida (< 24 horas) y se caracterizaba por un aumento notable de la expresión de citoqueratina, una marca distintiva de diferenciación escamosa (Fig. 3h). Después de siete días en cultivo con exposiciones sub-micro molares a JQ1, se observó diferenciación terminal. De forma importante, las líneas de células de carcinoma de células escamosas no dependiente de BRD4 (TE10 y TT) fracasaron al presentar efectos de diferenciación de JQ1 (Fig. 4A, 4B, 4C). En células dependientes de BRD4 NMC, la diferenciación va acompañada de forma esperada por detención del crecimiento, evidenciado por incisión reducida de Ki67 (Fig. 3i, j y 4L-a, 4L-b). Apoyando adicionalmente un mecanismo de acción en la diana, diferenciación y detención del crecimiento, los fenotipos están provocados solamente por (+)-JQ1, mientras que (-)-JQ1 no muestran efecto observable (Figura 4E-a-4E-d).

En particular, el tratamiento con JQ1 fenocopia los cambios morfológicos y el aumento de expresión de queratina observados con el silenciamiento de BRD4-NUT por el ARN de interferencia (Figura 4F-a, b). Corroborando estos estudios morfológicos y de IHC, el análisis de expresión de tres genes canónicos de tejido escamoso mediante RT-PCR identificaron una inducción notable (30 veces) de la Queratina-14 por (+)-JQ1 en células 797 de NMC (Fig. 3i). La modesta inducción de la Queratina-10 y el efecto ausente en la transglutaminasa epidérmica (TGM1) son coherentes con la diferenciación progresiva hacia el epitelio escamoso torácico, coherente con el tumor primario del mediastino a partir del que se derivan las células 797 de NMC<sup>28</sup>. La inducción de la diferenciación con tinción fuerte con (3+) queratina por IHC es progresiva durante 72 h, tal como se determina con el análisis cuantitativo de IHC (Figura 4M). Apoyando un mecanismo de acción en la diana, el fenotipo de diferenciación está provocado solamente por (+)-JQ1 mientras que (-)-JQ1 no muestra efecto observable. De forma importante, una línea celular de carcinoma de células escamosas no dependiente de BRD4 (TE10) fracasa al presentar efectos de diferenciación a partir del tratamiento con JQ1 (Figura 4N-c). En células de NMC dependientes de BRD4, la diferenciación va acompañada de forma esperada por detención del crecimiento, lo que se pone en evidencia por tinción reducida de Ki67 (Fig. 4A-4G).

La actividad antiproliferativa de los enantiómeros de JQ1 se evaluó a continuación líneas celulares de carcinoma de células escamosas humano dependiente de BRD4 (797 y Per403) e independiente de BRD4 (TE10 y TT). Tal como se muestra en la Figura 5a y en la Figura 4F-a-c, (+)-JQ1 presentaba únicamente una inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis solamente en líneas celulares dependientes de BRD4 (797  $CI_{50}$  = 140 nM; Per403  $CI_{50}$  = 60 nM). El efecto antiproliferativo potente y la diferenciación irreversible observados con IHC sugieren la inducción de la muerte celular. Por lo tanto, la apoptosis temprana y tardía se evaluó con tinción con anexina-V y yoduro de propidio por citometría de flujo. Tal como se esperaba, JQ1 indujo apoptosis inmediata y progresiva en células de carcinoma humano dependientes de BRD4 pero a la concentración usada no se detectaron niveles significativos de células apoptóticas en líneas celulares que no portan la fusión de BRD-NUT (Fig. 5b y Fig. 7).

### Ejemplo de Referencia 6: Eficacia *in vivo* y efecto farmacodinámico de JQ1 en un modelo murino de NMC.

Para establecer si JQ1 podría atenuar el crecimiento de carcinoma dependiente de BRD4 como un solo agente *in vivo*, se desarrolló un modelo de xenoinjerto de ratón de NMC en ratones usando la línea de células 797 de NMC. Los estudios de tratamiento a corto plazo se realizaron con formación de imágenes con PET como un punto final primario para explorar si la actividad antitumoral de JQ1 se podía demostrar y posteriormente seguido de formación de imágenes no invasiva. Las poblaciones base de ratones emparejados con cargas establecidas y comparables de enfermedad que se puede medir se clasificaron al azar para el tratamiento con JQ1 (50 mg kg<sup>-1</sup>) o vehículo, administrado mediante inyección intraperitoneal diariamente. Antes de la clasificación al azar y después de cuatro días de terapia, los ratones evaluaron mediante formación de imágenes con PET. Se observó un respuesta notable en la absorción de FDG con el tratamiento con JQ1, mientras que los animales tratados con vehículo demostraron enfermedad progresiva, evidente (Fig. 5e).

En paralelo, las poblaciones base emparejadas de ratones que portaban tumor de 797 de NMC se estudiaron para los efectos de JQ1 en el volumen del tumor mediante medidas con calibrador y efecto farmacodinámico mediante IHC cuantitativo. El crecimiento agresivo de xenoinjertos de 797 de NMC dio lugar a la terminación del estudio en el

día catorce de tratamiento, punto en el que todos los animales tratados con vehículo ase habían aproximado a los límites institucionales de tamaño tumoral. Los animales que recibieron JQ1 presentaban una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral (Fig. 5c,  $p = 0,039$ ; ensayo de  $t$  de dos colas). Para capturar datos comparativos mecanismos y farmacodinámicos, todos los animales se sacrificaron y los tumores se explantaron para análisis histopatológico. En particular, JQ1 era bien tolerado a esta dosis y programación sin signos adversos de toxicidad ni pérdida de peso evidente (Fig. 5d, 5L).

Para confirmar que el efecto antineoplásico observado con el tratamiento con JQ1 estaba asociado con el compromiso de diana, se examinó tejido tumoral seccionado para la oncoproteína BRD4-NUT. Tal como se presenta en la Figura 5e y en la Figura 6A, el tratamiento con JQ1 dio como resultado un borrador de puntitos nucleares de NUT, coherente con la unión competitiva a la cromatina nuclear. La propagación celular y el aumento de la expresión de queratina confirmaron la diferenciación escamosa farmacodinámica. La disminución de la tinción nuclear para Ki67 y el aumento de la tinción de TUNEL en animales tratados confirmaban un efecto apoptótico, antiproliferativo en desarrollo. En conjunto, estos datos proporcionan un enlace mecanismo y por entre la inhibición de BRD4 y la respuesta terapéutica a JQ1 *in vivo*.

En un esfuerzo para informar el biomarcador farmacodinámico (PD) de la expresión de queratina tumoral en una manera sin sesgar, se establecieron protocolos para adquisición y análisis cuantitativos de imágenes de IHC. Las muestras emparejadas de animales tratados y sin tratar se prepararon y se analizaron protocolos estandarizados y software disponible en el mercado (ImageScope; Aperio Technologies). **JQ1** provocó una fuerte expresión de queratina (3+) en xenoinjertos de 797 de NMC, uniformemente dentro de muestras de ensayo de tumor extirpadas (Figura 6Ba-e).

En paralelo con estos estudios, se identificó un paciente de 29 años de edad con NMC positivo para BRD4-NUT ampliamente metastásico que surge del mediastino. Con el objetivo de desarrollar un modelo de enfermedad más relevante clínicamente, se establecieron cultivos a corto plazo usando material clínico descartado obtenido de drenaje de fluido pleural de un tubo paliativo en el pecho del paciente. Tal como se presenta en la Figura 8, los estudios *in vitro* confirmaban el efecto potente, estereoselectivo de **(+)-JQ1** en la viabilidad celular ( $CI_{50} = 4$  nM), crecimiento y evolución del ciclo celular. Cuatro animales insertados con material de tumor derivado de paciente desarrollaron una enfermedad medible, que era fuertemente positiva para PET (Fig. 5h). Los animales se asignaron de forma aleatoria a poblaciones base de tratamiento con vehículo o **(+)-JQ1**. Antes de la asignación del tratamiento y después de cuatro días de terapia, los ratones se evaluaron mediante formación de imágenes con PET. Se observó una respuesta notable en la absorción de FDG con tratamiento con **(+)-JQ1**, mientras que los animales tratados con vehículo demostraron enfermedad progresiva, evidente (Fig. 5i). de nuevo, se preparó material tumoral para análisis cuantitativo de IHC, que demostró la inducción de la expresión de queratina después del tratamiento con **(+)-JQ1** (Fig. 5j, k, Figura 9). En conjunto, estos datos proporcionan un enlace mecanístico entre la inhibición de BRD4 y una respuesta terapéutica a **JQ1** *in vivo*.

En todo el panorama mutacional complejo, emergente del genoma del cáncer, las reorganizaciones de cromosomas recurrentes comprenden un subconjunto convincente de objetivos genéticos, largos en el cáncer. Tal como se pone en evidencia con el desarrollo exitoso de inhibidores de quinasas que se dirigen a BCR-ABL en CML, compuestos sonda bien caracterizados<sup>31,32</sup>, datos cristalográficos de alta resolución<sup>33</sup>, estudios de investigación de traducción<sup>34</sup>, y modelos de murino informativos<sup>35</sup>, cuando están disponibles, proporcionar una plataforma óptima para el descubrimiento de ligandos y validación de dianas. Tal como se informa en el presente documento, es probable que un nuevo inhibidor de molécula pequeña dirigido a BRD4 sea útil para el tratamiento de carcinoma de células escamosas humano definido genéticamente asociado con la fusión de NUT-BRD4.

Más allá del carcinoma de línea media de NUT, los bromodominios de la familia BET contribuyen a otras numerosas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. BRD4 dirige el complejo P-TEFb a cromosomas en mitosis dando como resultado la expresión de genes que estimulan el crecimiento tales como c-Myc<sup>119</sup> y la diana para el cáncer bien establecida, Aurora B<sup>13</sup>. Además, BRD4 se amplifica en cáncer de mama<sup>36</sup> y es un marcador predictivo de supervivencia entre pacientes con cáncer de mama<sup>37</sup>. aparte de estas funciones en la biología del cáncer, se han reconocido miembros de la familia BET como genes esenciales para la replicación de virus<sup>38,39</sup> y en la mediación de respuestas inflamatorias<sup>14</sup>. Por lo tanto, la disponibilidad de **(+)-JQ1** y **(-)-JQ1** como sondas químicas emparejadas dará lugar a investigación informativa ampliamente en biología de traducción, desarrollo y enfermedades. También se encontró que **JQ1** presenta pocos efectos fuera de diana en receptores celulares y propiedades farmacocinéticas excelentes incluyendo propiedades biodisponibilidad oral al 49 % (Fig. 10), estableciendo la credibilidad del desarrollo de derivados de tipo fármaco para aplicación terapéutica.

El descubrimiento y la optimización de inhibidores de molécula pequeña de dianas epigenéticas es un enfoque principal de la investigación biomédica actual. Los enfoques satisfactorios hasta la fecha se limitan a la identificación de ligandos para enzimas que modifican la cromatina<sup>40</sup>. Probablemente los más estudiados son los moduladores de la desacetilación de la cadena lateral de lisina, para la que se han desarrollado clínicamente numerosos inhibidores farmacéuticos. Los inventores desvelan composiciones y métodos para desarrollar inhibidores selectivos, potentes de lectores epigenéticos incluyendo el primer inhibidor caracterizar de forma minuciosa del bromodominio de la familia BET. A la vista de este descubrimiento, el enfoque que se resume en el presente documento se puede usar

para la identificación de candidatos adicionales para la identificación de inhibidores adicionales que tienen selectividad dentro de la familia BET.

#### **Ejemplo de Referencia 7: enantiómeros de JQ1 se unen e inhiben BRD4.1 y BRD4.2**

Las Figuras 11 y 12 muestran que los enantiómeros de JQ1 se unen e inhiben BRD4.1 y BRD4.2. La Figura 13 muestra una comparación de la unión de JQ1S y la inhibición de los miembros de la familia BET (activo) y CBP (inactivo). La Figura 14 muestra los resultados de estudios de clasificación de dosis de una biblioteca enfocada de derivados de JQ1 (para estructuras de los compuestos, véase la Tabla B, mencionada anteriormente).

#### **Ejemplo de Referencia 8: JQ1 es eficaz para el tratamiento de cáncer de BRD3-NUT**

Se implantaron células BRD3-NUT en ratones por vía subcutánea. Los datos de la medida del tumor se recogieron semanalmente. Cuando los tumores hicieron palpables, los ratones se dividieron en 2 grupos de tratamiento (n = 10): JQ1 se administró a 50 mg/kg por vía intraperitoneal (IP) 7 días/semana y se administró vehículo IP 7 días/semana. En el día 24 después de la inyección, cinco ratones de cada grupo se sacrificaron y se recogieron muestras del tumor para enviarlas a la laboratorio de análisis. Durante todo el resto del estudio, las muestras de tumor se recogían a medida que los ratones se sacrificaban. Para todas las muestras, la mitad del tumor se fijaba en formalina al 10 % y la otra mitad se congelaba rápidamente en hielo seco. El tratamiento terminó en el día 32. Se recogieron volúmenes y pesos de tumor semanalmente hasta que todos los ratones llegaban a estar moribundos o los tumores alcanzaban 2 cm en cualquier dimensión. La Figura 15A es un gráfico que muestra que JQ1 presentaba eficacia *in vivo* frente a BRD3-NUT en un modelo de xenoinjerto murino. El tratamiento con JQ1 dio como resultado la regresión del tumor mientras seguía la terapia. Después de parar la terapia, el crecimiento tumoral continuó. Las diferencias de volúmenes tumorales serán significativas en todos los puntos (p = 7,65274E-09 en el Día 24). JQ1 se administró a 50 mg/kg. La Figura 15B muestra que los ratones tratados con JQ1 presentaban una pérdida de peso leve con rápida recuperación después de detener la terapia.

#### **Ejemplo 9: JQ1 y análogos del mismo son eficaces frente a diversos cánceres**

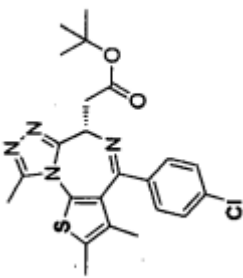
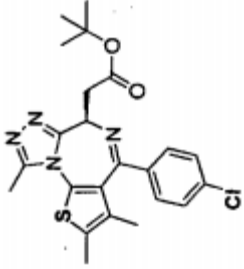
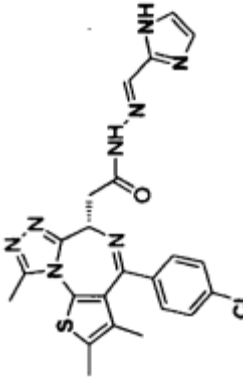
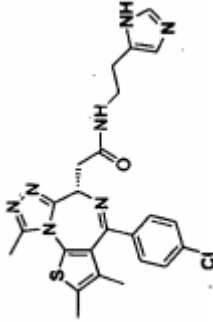
Las Figuras 16A-16D muestran que JQ1 y derivados del mismo inhiben la unión de Brd4.1 y Brd4.2 a JQ1 5  $\mu$ M (para estructuras del compuesto, véase la Tabla A, mencionada anteriormente). Las Figuras 17A-17D muestran la viabilidad celular de carcinoma de línea media de NUT (NMC) después del tratamiento con JQ1 y derivados del mismo a compuesto 2  $\mu$ M (para estructuras del compuesto, véase la Tabla A, mencionada anteriormente). Las Figuras 18-55 muestran la viabilidad de la respuesta a la dosis para diversas líneas celulares de cáncer. Estos datos indican que JQ1 y derivados del mismo muestran eficacia anticáncer frente a un amplio intervalo de cánceres.

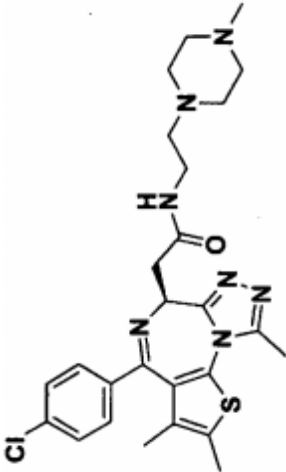
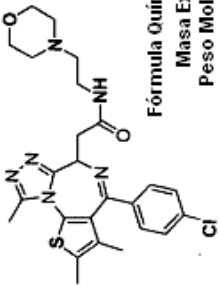
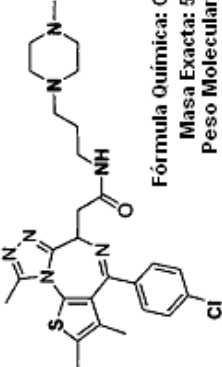
Los resultados informados en el presente documento se obtuvieron usando los métodos y materiales siguientes.

#### **Ejemplo 10: Resultados del Ensayo de Unión**

Los resultados de un ensayo de unión se muestran a continuación en la Tabla C.

Taba C:  $Cl_{50}$  del ensayo Biológico y  $Cl_{50}$  del ensayo Celular

| Nombre del Compuesto | Estructura                                                                            | $Cl_{50}$ del ensayo biológico ( $\mu M$ ) |          | $Cl_{50}$ del ensayo celular ( $\mu M$ ) |               |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------|------------------------------------------|---------------|
|                      |                                                                                       | BDR4(1)                                    | BDR4(2)  | Células 797                              | Células 10326 |
| (S)-JQ1              |    | 0,018                                      | 0,014    | 0,0056                                   | 0,0015        |
| (R)-JQ1              |    | 8,354                                      | 52,120   | 1,543                                    | 11,82         |
| JQ6                  |   | 0,00348                                    | 0,00024  | 0,0010                                   | 0,000051      |
| JQ8                  |  | 0,002189                                   | 0,000427 | 0,6                                      | 0,0028        |

| Nombre del Compuesto | Estructura                                                                                                                                                                                                                   | Cl <sub>50</sub> del ensayo biológico (μM) |           | Cl <sub>50</sub> del ensayo celular (μM) |               |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|------------------------------------------|---------------|
|                      |                                                                                                                                                                                                                              | BDR4(1)                                    | BDR4(2)   | Células 797                              | Células 10326 |
| JQ13                 |                                                                                                                                           | 0,002493                                   | 0,0005843 | 10,860                                   | 0,00000031    |
| JQ33                 |  <p>Fórmula Química: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<br/>Masa Exacta: 512,1761<br/>Peso Molecular: 513,0548</p> | 0,085                                      | 0,0295    | 0,00297                                  | 0,0080        |
| JQ35                 |  <p>Fórmula Química: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>OS<br/>Masa Exacta: 539,2234<br/>Peso Molecular: 540,1232</p>            | 0,0243                                     | 0,00613   | 0,00609                                  | 0,0030        |

La actividad de unión de compuestos directores con el sitio 1 de BRD4 se determinó mediante un ensayo Alfa con una curva de respuesta a la dosis de 12 puntos (Figura 56A). El compuesto (S)-JQ1 (JQS) se usó como un control positivo. (R)-JQ1 (JQR) se usó como un control negativo. Los compuestos JQ6, JQ8, JQ13, JQ33 y JQ35 presentaban una actividad de unión excelente. Los resultados de la actividad de unión de todos los compuestos directores con el sitio 2 de BRD4 también se determinó con un ensayo Alfa con una curva de respuesta a la dosis de 12 puntos (Figura 56B). Los compuestos JQ6, JQ8, JQ13, JQ33 y JQ35 presentaban una actividad de unión excelente.

La actividad de los compuestos directores se examinó en un ensayo celular con la línea celular 797 (derivada del paciente) para determinar los efectos de crecimiento de la inhibición de BRD4 en líneas celulares dependientes de BRD4-NUT. Las células se incubaron con compuestos y se controló la proliferación después de 72 horas. el ajuste de la curva se calculó mediante regresión logística (Figura 56C). Todos los compuestos directores se examinaron en ensayos celulares con la línea celular 10326 que se derivaba directamente de un paciente para determinar los efectos del crecimiento de la inhibición de BRD4 en líneas celulares dependientes de BRD4-NUT (Figura 56D). Las células se incubaron con compuestos y se controló la proliferación después de 72 horas. El ajuste de la curva se calculó mediante regresión logística.

#### Reactivos.

Anteriormente se describieron líneas celulares de carcinoma de línea media que expresan BRD4-NUT endógeno, 797<sup>1</sup> y PER-403<sup>2</sup>. Las líneas celulares de carcinoma de células escamosas humano no NMC, TE10 y TT, se obtuvieron de los Drs. Anil Rustgi (Universidad de Pennsylvania) y Adam Bass (Dana-Farber Cancer Institute). Las células U2OS se obtuvieron de la ATCC. Anteriormente se han descrito constructos de sobreexpresión de mamífero GFP-BRD4, GFP-NUT y GFP-BRD4-NUT<sup>3</sup>. Los medios, tripsina, y antibióticos para cultivo tisular se adquirieron en Mediatech. Los anticuerpos y los colorantes para inmunohistoquímica y citometría de flujo se obtuvieron en Dako (Anticuerpo de Citoqueratina AE1/AE3 N° de Cat N1590), Millipore (TUNEL N° de Cat S7100), Vector (Ki67 N° de Cat VP-RM04), Cell Signaling Technologies (NUT N° de Cat 3625), BD Pharmingen (Anexina V-FITC N° de Cat 556547) e Invitrogen (yoduro de propidio N° de Cat P3566).

#### Ensayo de Unión a Acetil-Histona.

Los ensayos se realizaron tal como se ha descrito anteriormente<sup>8</sup> con modificaciones menores con respecto al protocolo del fabricante (PerkinElmer, USA). Todos los reactivos se diluyeron en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, BSA al 0,1 %, pH 7,4 complementado con CHAPS al 0,05 % y se permitió que se equilibraran a temperatura ambiente antes de la adición a las placas. Se preparó una dilución en serie de los ligandos a 1:2 de 24 puntos aproximadamente en el intervalo de 150 - 0  $\mu$ M y se transfirieron 4  $\mu$ l a placas de 384 pocillos de volumen bajo (ProxiPlateTM-384 Plus, PerkinElmer, USA), seguido de 4  $\mu$ l de proteína marcada con HIS (BRD4/1, 250 nM, BRD4/2 y CREBBP, 2000 nM). Las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, antes de la adición de 4  $\mu$ l de péptido biotinilado a concentración equimolar a la proteína [péptido para BRD4(1) y BRD4(2): H4K5acK8acK12acK16ac, H-SGRGK(Ac)GGK(Ac)GLGK(Ac)GGAK(Ac)RHRK(Biotina)-OH; péptido para CREBBP: H3K36ac, Biotina-KSAPAT-GGVK(Ac)KPHRYRPGT-OH (Cambridge Research Biochemicals, UK)]. Las placas se sellaron y se incubaron durante un periodo adicional de 30 minutos, antes de la adición de 4  $\mu$ l de perlas dadoras revestidas con estreptavidina (25  $\mu$ g/ml) y 4  $\mu$ l de perlasceptoras de quelato de níquel (25  $\mu$ g/ml) en condiciones de luz baja. Las placas se sellaron con papel de aluminio para proteger la luz, se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos y se leyeron en un lector de placas PHERAstar FS (BMG Labtech, Alemania) usando un conjunto de filtro AlphaScreen de excitación a 680/emisión a 570. Los valores de la CI<sub>50</sub> se calcularon en Prism 5 (GraphPad Software, USA) después de normalización frente a los controles de DMSO correspondientes y se proporcionan como la concentración final de compuesto en el volumen de reacción de 20  $\mu$ l.

#### Alineación de Secuencias.

Las secuencias de aminoácidos para bromodominios humanos de longitud completa se obtuvieron en el NCBI (N° de Registro de BRD2 NP\_005095, N° de Registro de BRD3 NP\_031397.1, N° de Registro de BRD4 NP\_055114.1, N° de Registro de BRD-T NP\_001717.2). La alineación de las secuencias múltiples de los bromodominios individuales se realizó usando ClustalW<sup>19</sup>.

#### Recuperación de Fluorescencia Después de Fotolixiviación (FRAP).

Se realizaron estudios de FRAP en células U2OS tal como se ha descrito anteriormente<sup>3,20</sup>. En resumen, las células U2OS se transfectaron (lipofectamina; Invitrogen) con constructos de sobreexpresión de mamífero que codifican quimera de GFP con BRD4, NUT y BRD4-NUT. Se lixivió una región nuclear de 5  $\mu$ m<sup>2</sup> con intensidad elevada de láser en una cédula dentro de cada campo, y se midió la recuperación con intensidad baja de láser y un poro de 150  $\mu$ m. Las imágenes de los campos idénticos se adquirieron usando un microscopio confocal C1 Plus de Nikon equipado con una cámara calentada a 37 °C y módulos de FRAP durante aproximadamente 90 segundos. Las intensidades medias de la región lixiviada se midieron en el tiempo y usando MetaMorph v7, y se normalizaron a una región independiente de interés antes de la lixivación. Los datos se analizaron a continuación para evaluar el tiempo

hasta la recuperación de fluorescencia máxima media en Microsoft Excel Mac 12.2.4.

### Imunohistoquímica de Diferenciación y Proliferación.

5 Se cultivaron líneas celulares de cáncer (797, Per403, TT y TE10) en portaobjetos de cámara a  $1,0 \times 10^4$  células por cámara (portaobjetos de 4 cámaras) o  $5,0 \times 10^3$  células por cámara (portaobjetos de 8 cámaras). Las células se trataron con JQ1-racémico, (+)-JQ1, (-)-JQ1, o vehículo (DMSO) y se incubaron durante varios intervalos de tiempo. A continuación, los medios se retiraron y las cámaras se lavaron con PBS frío. Las células se fijaron a continuación en formaldehído al 4 % durante 20 minutos a 4 °C, se lavaron con PBS y transfirieron al Núcleo de los Servicios de  
10 Histopatología Especializados del Centro de Cáncer de Dana-Farber/Harvard (DF/HCC) en el Hospital de Brigham and Women para tinción, tal como se describe a continuación. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos de sedimentos celulares primero haciendo crecer líneas celulares de cáncer (797 y Per403) en matraces T-75, se trataron con cualquiera de JQ1 o vehículo (DMSO) durante 48 horas. A continuación, las células se tripsinaron y se formaron sedimentos celulares por centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos, se estabilizaron con  $\frac{1}{2}$  volumen de HistoGel (Richard-Allen Scientific) y albúmina en suero bovino al 10 %. Los sedimentos celulares se lavaron con PBS y se fijaron en formaldehído al 4 % durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron a continuación con PBS y se transfirieron al Laboratorio Núcleo de DF/HCC en el hospital de Brigham and Women para tinción, tal como se describe a continuación. Se realizó análisis cuantitativo de la tinción de Ki67 (puntuación celular) mediante  
15 microscopía de luz usando cinco campos de división de alta potencia (40x) por experimento. Todo el material fijado se embebió, se seccionó y se hizo tinción en el Laboratorio Núcleo DF/HCC en el de Hospital Brigham and Women, usando protocolos optimizados establecidos. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio BX40 de Olympus (Olympus Imaging America, Center Valley, PA) y una cámara a color Micropublisher 3.3 RTV (QImaging, Surrey, BC).

### 25 Ensayo de Proliferación Celular.

Las células se sembraron en placas de microtitulación de 384 pocillos, de color blanco (Nunc) a 500 células por pocillo un volumen total de 50  $\mu$ l de medios. Las células 797, TT y TE10 se cultivaron en DMEM que contenía penicilina/estreptomicina al 1 % y FBS al 10 %. Las células Per403 se cultivaron en DMEM que contenía  
30 penicilina/estreptomicina al 1 % y FBS al 20 %. Los compuestos se administraron a placas de ensayo de microtitulación mediante transferencia robótica con fijación (PerkinElmer JANUS equipado con una herramienta de fijación de 100 nl de V&P Scientific). Después de una incubación de 48 h a 37 °C, las células se lisaron y los pocillos se evaluaron para el contenido total de ATP usando un ensayo de proliferación comercial (Cell TiterGlo; Promega). Se realizaron medidas por replicado con respecto a dosis y las estimaciones de la  $CI_{50}$  se calcularon mediante  
35 regresión logística (GraphPad Prism).

### Citometría de Flujo.

Se hicieron crecer células de cáncer humano cultivadas (797, Per403, TT y TE10) en placas de cultivo tisular de 6  
40 pocillos (BD Falcon) a una concentración de partida de  $5,0 \times 10^4$  células por pocillo. Las células se trataron con JQ1 (500 nM), estaurosporina (50 nM) o vehículo (DMSO al 0,05 %) durante 24 o 48 horas. Las células tripsinadas se mezclaron a 1:1 en hielo con tampón de Anexina-V/yoduro de propidio (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$ , 2,5 mM) que contenía Anexina V-FITC (BD Pharmingen, 1:500) y yoduro de propidio (Invitrogen, 1:1000). Las muestras se analizaron inmediatamente en un BD FACS Canto II. Se generaron visualizaciones y análisis de  
45 fracciones apoptóticas usando software para análisis de FlowJo (Tree Star, Inc.).

### Estudios de Eficacia de Xenoinjerto.

Se establecieron xenoinjertos de NMC por inyección de células de NMC 797 ( $10^7$ ) en Matrigel al 30 % (BD Biosciences) en el costado de ratones atímicos NCr hembra de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories). Doce días después de la inyección, los ratones con tumores que se podían medir se dividieron en poblaciones base a tratar con JQ1 a 50 mg/kg IP o vehículos (DMSO al 5 % en dextrosa al 5 %). El tamaño medio de los tumores en el grupo de tratamiento con JQ1 ( $n = 8$ ) y el grupo de vehículo ( $n = 7$ ) era similar ( $63,8 \pm 17,1$  y  $73,6 \pm 14,4$  mm<sup>3</sup> respectivamente) al inicio del tratamiento. los animales se siguieron diariamente para los síntomas clínicos. Las  
55 medidas del tumor se evaluaron con medidas de calibrador, y el volumen se calculó usando la fórmula  $Vol = 0,5 \times L \times W^2$ . Después de 2 semanas de tratamiento, todos los ratones se sacrificaron humanamente, y los tumores se fijaron en formalina al 10 % para examen histopatológico. La significancia estadística de los volúmenes tumorales se calculó mediante ensayo de t de Students de dos lados. Todos los estudios con animales estaban aprobados por el IACUC del DFCI.

### 60 Instrumentación.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13 (RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C) se registraron con un espectrómetro 600 INOVA de sonda inversa de Varian en las Instalaciones del Harvard Medical School East  
65 Quad RMN. Los desplazamientos químicos se registraron en partes por millón en la escala  $\delta$  y se toman como referencia a partir del protio residual en el disolvente de RMN ( $CHCl_3$ :  $\delta$  7,24) para RMN <sup>1</sup>H, las resonancias del

carbono del disolvente (CDCl<sub>3</sub>: δ 77,2) para RMN <sup>13</sup>C respectivamente. los datos se informan como sigue a continuación: desplazamiento químico [multiplicidad (s = singlete, d = duplete, t = triplete, c = cuádruplete, m = multiplete, s = ancho), constante o constantes de acoplamiento en Hercios, integración]. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro APEX 4.7 Tesler FTMS de Bruker usando fuente de iones de electronebulización (ESI) en la Instalación de Instrumentación del Departamento de Química, del Instituto de Tecnología de Massachusetts. Los compuestos intermedios y el producto final se purificaron con un sistema CombiFlash RF (Teledyne Isco). Las soluciones orgánicas se concentraron en rotavapores Büchi R-205. Las purezas enantioméricas se comprobaron con Cromatografía de Fluidos Supercríticos de Berger (SFC) y una columna AS-H. La purificación preparativa enantiomérica se realizó con Cromatografía Líquida a Alta Presión de Agilent y con una columna OD-H (Broad Institute de Harvard y MIT).

## Referencias

- 1 Ptashne, M. Binding reactions: epigenetic switches, signal transduction and cancer. *Curr Biol* 19, R234-241, (2009).
- 2 Schreiber, S. L. y Bernstein, B. E. Signaling network model of chromatin. *Cell* 111, 771-778, (2002).
- 3 Marushige, K. Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3937-3941, (1976).
- 4 Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J. y Ozato, K. Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* 20, 4899-4909, (2009).
- 5 Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J* 19, 6141-6149, (2000).
- 6 Zeng, L. & Zhou, M. M. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513, 124-128, (2002).
- 7 Yang, X. J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24, 1653-1662, (2005).
- 8 Yang, Z. *et al.* Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19, 535-545, (2005).
- 9 Phelps, M. A. *et al.* Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 2637-2645, (2009).
- 10 Rahl, P. B. *et al.* c-Myc Regulates Transcriptional Pause Release. *Cell* 141, 4323-4445, (2010).
- 11 Yang, Z., He, N. y Zhou, Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28, 967-976, (2008).
- 12 Mochizuki, K. *et al.* The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase. *J Biol Chem* 283, 9040-9048, (2008).
- 13 You, J. *et al.* Regulation of aurora B expression by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell Biol* 29, 5094-5103, (2009).
- 14 Huang, B., Yang, X. D., Zhou, M. M., Ozato, K. y Chen, L. F. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol* 29, 1375-1387, (2009).
- 15 French, C. A., Miyoshi, I., Aster, J. C. y *et al.* BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t (15;19). *Am J Pathol* 159 (6), 1987-1992, (2001).
- 16 French, C. A. *et al.* BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res* 63, 304-307, (2003).
- 17 French, C. A. *et al.* BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene* 27, 2237-2242, (2008).
- 18 Miyoshi, S., Ooike, S., Iwata, K., Hikawa, H. y Sugaraha, K. ANTITUMOR AGENT. (2009).
- 19 Adachi, K. *et al.* (2006).
- 20 Sueoka, H., Komatsu, H., Kobayashi, H. y Ehara, S. Thienotriazolodiazepine compounds and medicinal uses thereof. (1998).

21 VonVoigtlander, P. F. y Straw, R. N. Alprazolam: Review of Pharmacological, Pharmacokinetic y Clinical Data. Drug Development Research 6, 1-12,(1985).

22 Niesen, F. H., Berglund, H. y Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nat Protoc 2, 2212-2221, (2007).

23 Fedorov, O. *et al.* A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 20523-20528, (2007).

24 Bullock, A. N. *et al.* Structural basis of inhibitor specificity of the human protooncogene proviral insertion site in moloney murine leukemia virus (PIM-1) kinase. J Med Chem 48, 7604-7614, (2005).

25 Quinn, A. M. *et al.* homogeneous method for investigation of methylation-dependent protein-protein interactions in epigenetics. Nucleic Acids Res 38, e11, (2010).

26 Vollmuth, F., Blankenfeldt, W. y Geyer, M. Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein Brd4 at atomic resolution. J Biol Chem 284, 36547-36556, (2009).

27 French, C. A. Molecular pathology of NUT midline carcinomas. J Clin Pathol, (2008).

28 Huang, M. E. *et al.* Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 72, 567-572, (1988).

29 Druker, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase en chronic myeloid leukemia.. N Engl J Med 344, 1031-1037, (2001).

30 Haack, H. *et al.* Diagnosis of NUT Midline Carcinoma Using a NUT-specific Monoclonal Antibody. Am J Surg Pathol, (2009).

31 Buchdunger, E. *et al.* Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. Proc Natl Acad Sci USA 92, 2558-2562, (1995).

32 Buchdunger, E. *et al.* Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. Cancer Res 56, 100-104, (1996).

33 Schindler, T. *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science 289, 1938-1942, (2000).

34 Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 2, 561-566, (1996).

35 le Coutre, P. *et al.* In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. J Natl Cancer Inst 91, 163-168, (1999).

36 Kadota, M. *et al.* Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA. Cancer Res 69, 7357-7365, (2009).

37 Crawford, N. P. *et al.* Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival. Proc Natl Acad Sci USA 105, 6380-6385, (2008).

38 You, J. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts con bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes. J Virol 80, 8909-8919, (2006).

39 Abbate, E. A., Voitenleitner, C. y Botchan, M. R. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. Mol Cell 24, 877-889, (2006).

40 Cole, P. A. Chemical probes for histone-modifying enzymes. Nat Chem Biol 4, 590-597, (2008).

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> COMPOSICIONES Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIA, ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y OTRAS ENFERMEDADES

<130> 86363WO(70157)  
 <140> PCT/US2011/036701  
 <141> 16-05-2011  
 5  
 <150> 61/467.376  
 <151> 24-03-2011  
 10  
 <150> 61/375.863  
 <151> 22-08-2010  
 <150> 61/370.745  
 <151> 04-08-2010  
 15  
 <150> 61/334.991  
 <151> 14-05-2010  
 <160> 6  
 20  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 801  
 <212> PRT  
 25  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1

Met Leu Gln Asn Val Thr Pro His Asn Lys Leu Pro Gly Glu Gly Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Leu Leu Gly Leu Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro Gly Lys Arg  
 20 25 30  
 Ile Arg Lys Pro Ser Leu Leu Tyr Glu Gly Phe Glu Ser Pro Thr Met  
 35 40 45  
 Ala Ser Val Pro Ala Leu Gln Leu Thr Pro Ala Asn Pro Pro Pro Pro  
 50 55 60  
 Glu Val Ser Asn Pro Lys Lys Pro Gly Arg Val Thr Asn Gln Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu His Lys Val Val Met Lys Ala Leu Trp Lys His Gln Phe Ala  
 85 90 95  
 Trp Pro Phe Arg Gln Pro Val Asp Ala Val Lys Leu Gly Leu Pro Asp  
 100 105 110  
 Tyr His Lys Ile Ile Lys Gln Pro Met Asp Met Glv Thr Ile Lys Arg

| 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Leu | Glu | Asn | Asn | Tyr | Tyr | Trp | Ala | Ala | Ser | Glu | Cys | Met | Gln | Asp |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Phe | Asn | Thr | Met | Phe | Thr | Asn | Cys | Tyr | Ile | Tyr | Asn | Lys | Pro | Thr | Asp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Ile | Val | Leu | Met | Ala | Gln | Thr | Leu | Glu | Lys | Ile | Phe | Leu | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Ala | Ser | Met | Pro | Gln | Glu | Glu | Gln | Glu | Leu | Val | Val | Thr | Ile | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Lys | Asn | Ser | His | Lys | Lys | Gly | Ala | Lys | Leu | Ala | Ala | Leu | Gln | Gly | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val | Thr | Ser | Ala | His | Gln | Val | Pro | Ala | Val | Ser | Ser | Val | Ser | His | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Tyr | Thr | Pro | Pro | Pro | Glu | Ile | Pro | Thr | Thr | Val | Leu | Asn | Ile |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | His | Pro | Ser | Val | Ile | Ser | Ser | Pro | Leu | Leu | Lys | Ser | Leu | His | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Gly | Pro | Pro | Leu | Leu | Ala | Val | Thr | Ala | Ala | Pro | Pro | Ala | Gln | Pro |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Leu | Ala | Lys | Lys | Lys | Gly | Val | Lys | Arg | Lys | Ala | Asp | Thr | Thr | Thr | Pro |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Thr | Pro | Thr | Ala | Ile | Leu | Ala | Pro | Gly | Ser | Pro | Ala | Ser | Pro | Pro | Gly |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Glu | Pro | Lys | Ala | Ala | Arg | Leu | Pro | Pro | Met | Arg | Arg | Glu | Ser |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Gly | Arg | Pro | Ile | Lys | Pro | Pro | Arg | Lys | Asp | Leu | Pro | Asp | Ser | Gln | Gln |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gln | His | Gln | Ser | Ser | Lys | Lys | Gly | Lys | Leu | Ser | Glu | Gln | Leu | Lys | His |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Cys | Asn | Gly | Ile | Leu | Lys | Glu | Leu | Leu | Ser | Lys | Lys | His | Ala | Ala | Tyr |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |

Ala Trp Pro Phe Tyr Lys Pro Val Asp Ala Ser Ala Leu Gly Leu His  
370 375 380

Asp Tyr His Asp Ile Ile Lys His Pro Met Asp Leu Ser Thr Val Lys  
385 390 395 400

Arg Lys Met Glu Asn Arg Asp Tyr Arg Asp Ala Gln Glu Phe Ala Ala  
405 410 415

Asp Val Arg Leu Met Phe Ser Asn Cys Tyr Lys Tyr Asn Pro Pro Asp  
420 425 430

His Asp Val Val Ala Met Ala Arg Lys Leu Gln Asp Val Phe Glu Phe  
435 440 445

Arg Tyr Ala Lys Met Pro Asp Glu Pro Leu Glu Pro Gly Pro Leu Pro  
450 455 460

Val Ser Thr Ala Met Pro Pro Gly Leu Ala Lys Ser Ser Ser Glu Ser  
465 470 475 480

Ser Ser Glu Glu Ser Ser Ser Glu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu  
485 490 495

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Ser Glu Ser Ser Asp Ser  
500 505 510

Glu Glu Glu Arg Ala His Arg Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gln Leu Arg  
515 520 525

Ala Val His Glu Gln Leu Ala Ala Leu Ser Gln Gly Pro Ile Ser Lys  
530 535 540

Pro Lys Arg Lys Arg Glu Lys Lys Glu Lys Lys Lys Lys Arg Lys Ala  
545 550 555 560

Glu Lys His Arg Gly Arg Ala Gly Ala Asp Glu Asp Asp Lys Gly Pro  
565 570 575

Arg Ala Pro Arg Pro Pro Gln Pro Lys Lys Ser Lys Lys Ala Ser Gly  
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Leu Gly Pro Ser Gly Phe Gly Pro Ser  
595 600 605

Gly Gly Ser Gly Thr Lys Leu Pro Lys Lys Ala Thr Lys Thr Ala Pro  
610 615 620

Pro Ala Leu Pro Thr Gly Tyr Asp Ser Glu Glu Glu Glu Glu Ser Arg  
625 630 635 640

Pro Met Ser Tyr Asp Glu Lys Arg Gln Leu Ser Leu Asp Ile Asn Lys  
645 650 655

Leu Pro Gly Glu Lys Leu Gly Arg Val Val His Ile Ile Gln Ala Arg  
660 665 670

Glu Pro Ser Leu Arg Asp Ser Asn Pro Glu Glu Ile Glu Ile Asp Phe  
675 680 685

Glu Thr Leu Lys Pro Ser Thr Leu Arg Glu Leu Glu Arg Tyr Val Leu  
690 695 700

Ser Cys Leu Arg Lys Lys Pro Arg Lys Pro Tyr Thr Ile Lys Lys Pro  
705 710 715 720

Val Gly Lys Thr Lys Glu Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Arg Glu Leu  
725 730 735

Glu Lys Arg Leu Gln Asp Val Ser Gly Gln Leu Asn Ser Thr Lys Lys  
740 745 750

Pro Pro Lys Lys Ala Asn Glu Lys Thr Glu Ser Ser Ser Ala Gln Gln  
755 760 765

Val Ala Val Ser Arg Leu Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser  
770 775 780

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr Ser Asp Ser Asp Ser  
785 790 795 800

Gly

<210> 2  
<211> 726  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 2

Met Ser Thr Ala Thr Thr Val Ala Pro Ala Gly Ile Pro Ala Thr Pro  
1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Pro Pro Pro Pro Glu Val Ser Asn Pro Ser Lys Pro  
20 25 30

5

10

Gly Arg Lys Thr Asn Gln Leu Gln Tyr Met Gln Asn Val Val Val Lys  
35 40 45

Thr Leu Trp Lys His Gln Phe Ala Trp Pro Phe Tyr Gln Pro Val Asp  
50 55 60

Ala Ile Lys Leu Asn Leu Pro Asp Tyr His Lys Ile Ile Lys Asn Pro  
65 70 75 80

Met Asp Met Gly Thr Ile Lys Lys Arg Leu Glu Asn Asn Tyr Tyr Trp  
85 90 95

Ser Ala Ser Glu Cys Met Gln Asp Phe Asn Thr Met Phe Thr Asn Cys  
100 105 110

Tyr Ile Tyr Asn Lys Pro Thr Asp Asp Ile Val Leu Met Ala Gln Ala  
115 120 125

Leu Glu Lys Ile Phe Leu Gln Lys Val Ala Gln Met Pro Gln Glu Glu  
130 135 140

Val Glu Leu Leu Pro Pro Ala Pro Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Ala  
145 150 155 160

Ala Gly Ala Gln Ser Ala Gly Thr Gln Gln Val Ala Ala Val Ser Ser  
165 170 175

Val Ser Pro Ala Thr Pro Phe Gln Ser Val Pro Pro Thr Val Ser Gln  
180 185 190

Thr Pro Val Ile Ala Ala Thr Pro Val Pro Thr Ile Thr Ala Asn Val  
195 200 205

Thr Ser Val Pro Val Pro Pro Ala Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ala Thr  
210 215 220

Pro Ile Val Pro Val Val Pro Pro Thr Pro Pro Val Val Lys Lys Lys  
225 230 235 240

Gly Val Lys Arg Lys Ala Asp Thr Thr Thr Pro Thr Thr Ser Ala Ile  
245 250 255

Thr Ala Ser Arg Ser Glu Ser Pro Pro Pro Leu Ser Asp Pro Lys Gln  
260 265 270

Ala Lys Val Val Ala Arg Arg Glu Ser Gly Gly Arg Pro Ile Lys Pro  
275 280 285

Pro Lys Lys Asp Leu Glu Asp Gly Glu Val Pro Gln His Ala Gly Lys  
 290 295 300  
 Lys Gly Lys Leu Ser Glu His Leu Arg Tyr Cys Asp Ser Ile Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Glu Met Leu Ser Lys Lys His Ala Ala Tyr Ala Trp Pro Phe Tyr Lys  
 325 330 335  
 Pro Val Asp Ala Glu Ala Leu Glu Leu His Asp Tyr His Asp Ile Ile  
 340 345 350  
 Lys His Pro Met Asp Leu Ser Thr Val Lys Arg Lys Met Asp Gly Arg  
 355 360 365  
 Glu Tyr Pro Asp Ala Gln Gly Phe Ala Ala Asp Val Arg Leu Met Phe  
 370 375 380  
 Ser Asn Cys Tyr Lys Tyr Asn Pro Pro Asp His Glu Val Val Ala Met  
 385 390 395 400  
 Ala Arg Lys Leu Gln Asp Val Phe Glu Met Arg Phe Ala Lys Met Pro  
 405 410 415  
 Asp Glu Pro Val Glu Ala Pro Ala Leu Pro Ala Pro Ala Ala Pro Met  
 420 425 430  
 Val Ser Lys Gly Ala Glu Ser Ser Arg Ser Ser Glu Glu Ser Ser Ser  
 435 440 445  
 Asp Ser Gly Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Arg Ala Thr Arg Leu Ala  
 450 455 460  
 Glu Leu Gln Glu Gln Leu Lys Ala Val His Glu Gln Leu Ala Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Ser Gln Ala Pro Val Asn Lys Pro Lys Lys Lys Glu Lys Lys Glu  
 485 490 495  
 Lys Glu Lys Lys Lys Lys Asp Lys Glu Lys Glu Lys Glu Lys His Lys  
 500 505 510  
 Val Lys Ala Glu Glu Glu Lys Lys Ala Lys Val Ala Pro Pro Ala Lys  
 515 520 525  
 Gln Ala Gln Gln Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Asn Ser Thr Thr  
 530 535 540

Thr Ala Gly Arg Gln Leu Lys Lys Gly Gly Lys Gln Ala Ser Ala Ser  
545 550 555 560

Tyr Asp Ser Glu Glu Glu Glu Glu Gly Leu Pro Met Ser Tyr Asp Glu  
565 570 575

Lys Arg Gln Leu Ser Leu Asp Ile Asn Arg Leu Pro Gly Glu Lys Leu  
580 585 590

Gly Arg Val Val His Ile Ile Gln Ser Arg Glu Pro Ser Leu Arg Asp  
595 600 605

Ser Asn Pro Asp Glu Ile Glu Ile Asp Phe Glu Thr Leu Lys Pro Thr  
610 615 620

Thr Leu Arg Glu Leu Glu Arg Tyr Val Lys Ser Cys Leu Gln Lys Lys  
625 630 635 640

Gln Arg Lys Pro Phe Ser Ala Ser Gly Lys Lys Gln Ala Ala Lys Ser  
645 650 655

Lys Glu Glu Leu Ala Gln Glu Lys Lys Lys Glu Leu Glu Lys Arg Leu  
660 665 670

Gln Asp Val Ser Gly Gln Leu Ser Ser Ser Lys Lys Pro Ala Arg Lys  
675 680 685

Glu Lys Pro Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly Pro Ser Arg Leu Ser Ser  
690 695 700

Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser  
705 710 715 720

Asp Ser Ser Asp Ser Glu  
725

<210> 3  
<211> 722  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 3

Met Ser Ala Glu Ser Gly Pro Gly Thr Arg Leu Arg Asn Leu Pro Val  
1 5 10 15

Met Gly Asp Gly Leu Glu Thr Ser Gln Met Ser Thr Thr Gln Ala Gln  
20 25 30

Ala Gln Pro Gln Pro Ala Asn Ala Ala Ser Thr Asn Pro Pro Pro Pro  
35 40 45

Glu Thr Ser Asn Pro Asn Lys Pro Lys Arg Gln Thr Asn Gln Leu Gln  
50 55 60

Tyr Leu Leu Arg Val Val Leu Lys Thr Leu Trp Lys His Gln Phe Ala  
65 70 75 80

Trp Pro Phe Gln Gln Pro Val Asp Ala Val Lys Leu Asn Leu Pro Asp  
85 90 95

Tyr Tyr Lys Ile Ile Lys Thr Pro Met Asp Met Gly Thr Ile Lys Lys  
100 105 110

Arg Leu Glu Asn Asn Tyr Tyr Trp Asn Ala Gln Glu Cys Ile Gln Asp  
115 120 125

Phe Asn Thr Met Phe Thr Asn Cys Tyr Ile Tyr Asn Lys Pro Gly Asp  
130 135 140

Asp Ile Val Leu Met Ala Glu Ala Leu Glu Lys Leu Phe Leu Gln Lys  
145 150 155 160

Ile Asn Glu Leu Pro Thr Glu Glu Thr Glu Ile Met Ile Val Gln Ala  
165 170 175

Lys Gly Arg Gly Arg Gly Arg Lys Glu Thr Gly Thr Ala Lys Pro Gly  
180 185 190

Val Ser Thr Val Pro Asn Thr Thr Gln Ala Ser Thr Pro Pro Gln Thr  
195 200 205

Gln Thr Pro Gln Pro Asn Pro Pro Pro Val Gln Ala Thr Pro His Pro  
210 215 220

Phe Pro Ala Val Thr Pro Asp Leu Ile Val Gln Thr Pro Val Met Thr  
225 230 235 240

Val Val Pro Pro Gln Pro Leu Gln Thr Pro Pro Pro Val Pro Pro Gln  
245 250 255

Pro Gln Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Val Gln Ser His Pro  
260 265 270

Pro Ile Ile Ala Ala Thr Pro Gln Pro Val Lys Thr Lys Lys Gly Val  
275 280 285

Lys Arg Lys Ala Asp Thr Thr Thr Pro Thr Thr Ile Asp Pro Ile His  
 290 295 300  
 Glu Pro Pro Ser Leu Pro Pro Glu Pro Lys Thr Thr Lys Leu Gly Gln  
 305 310 315 320  
 Arg Arg Glu Ser Ser Arg Pro Val Lys Pro Pro Lys Lys Asp Val Pro  
 325 330 335  
 Asp Ser Gln Gln His Pro Ala Pro Glu Lys Ser Ser Lys Val Ser Glu  
 340 345 350  
 Gln Leu Lys Cys Cys Ser Gly Ile Leu Lys Glu Met Phe Ala Lys Lys  
 355 360 365  
 His Ala Ala Tyr Ala Trp Pro Phe Tyr Lys Pro Val Asp Val Glu Ala  
 370 375 380  
 Leu Gly Leu His Asp Tyr Cys Asp Ile Ile Lys His Pro Met Asp Met  
 385 390 395 400  
 Ser Thr Ile Lys Ser Lys Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Asp Ala Gln  
 405 410 415  
 Glu Phe Gly Ala Asp Val Arg Leu Met Phe Ser Asn Cys Tyr Lys Tyr  
 420 425 430  
 Asn Pro Pro Asp His Glu Val Val Ala Met Ala Arg Lys Leu Gln Asp  
 435 440 445  
 Val Phe Glu Met Arg Phe Ala Lys Met Pro Asp Glu Pro Glu Glu Pro  
 450 455 460  
 Val Val Ala Val Ser Ser Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Lys Val Val  
 465 470 475 480  
 Ala Pro Pro Ser Ser Ser Asp Ser Ser Ser Asp Ser Ser Ser Asp Ser  
 485 490 495  
 Asp Ser Ser Thr Asp Asp Ser Glu Glu Glu Arg Ala Gln Arg Leu Ala  
 500 505 510  
 Glu Leu Gln Glu Gln Leu Lys Ala Val His Glu Gln Leu Ala Ala Leu  
 515 520 525  
 Ser Gln Pro Gln Gln Asn Lys Pro Lys Lys Lys Glu Lys Asp Lys Lys

530                      535                      540  
 Glu Lys Lys Lys Glu Lys His Lys Arg Lys Glu Glu Val Glu Glu Asn  
 545                      550                      555                      560  
 Lys Lys Ser Lys Ala Lys Glu Pro Pro Pro Lys Lys Thr Lys Lys Asn  
 565                      570                      575  
 Asn Ser Ser Asn Ser Asn Val Ser Lys Lys Glu Pro Ala Pro Met Lys  
 580                      585                      590  
 Ser Lys Pro Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Glu Glu Glu Asp Lys Cys Lys  
 595                      600                      605  
 Pro Met Ser Tyr Glu Glu Lys Arg Gln Leu Ser Leu Asp Ile Asn Lys  
 610                      615                      620  
 Leu Pro Gly Glu Lys Leu Gly Arg Val Val His Ile Ile Gln Ser Arg  
 625                      630                      635                      640  
 Glu Pro Ser Leu Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Ile Glu Ile Asp Phe  
 645                      650                      655  
 Glu Thr Leu Lys Pro Ser Thr Leu Arg Glu Leu Glu Arg Tyr Val Thr  
 660                      665  
 Ser Cys Leu Arg Lys Lys Arg Lys Pro Gln Ala Glu Lys Val Asp Val  
 675                      680                      685  
 Ile Ala Gly Ser Ser Lys Met Lys Gly Phe Ser Ser Ser Glu Ser Glu  
 690                      695                      700  
 Ser Ser Ser Glu Ser Ser Ser Ser Asp Ser Glu Asp Ser Glu Thr Gly  
 705                      710                      715                      720

Pro Ala

<210> 4  
 <211> 947  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Ser Leu Pro Ser Arg Gln Thr Ala Ile Ile Val Asn Pro Pro Pro  
 1                      5                      10                      15

Pro Glu Tyr Ile Asn Thr Lys Lys Asn Gly Arg Leu Thr Asn Gln Leu  
 20                      25                      30

Gln Tyr Leu Gln Lys Val Val Leu Lys Asp Leu Trp Lys His Ser Phe  
 35 40 45  
 Ser Trp Pro Phe Gln Arg Pro Val Asp Ala Val Lys Leu Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Asp Tyr Tyr Thr Ile Ile Lys Asn Pro Met Asp Leu Asn Thr Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Lys Arg Leu Glu Asn Lys Tyr Tyr Ala Lys Ala Ser Glu Cys Ile Glu  
 85 90 95  
 Asp Phe Asn Thr Met Phe Ser Asn Cys Tyr Leu Tyr Asn Lys Pro Gly  
 100 105 110  
 Asp Asp Ile Val Leu Met Ala Gln Ala Leu Glu Lys Leu Phe Met Gln  
 115 120 125  
 Lys Leu Ser Gln Met Pro Gln Glu Glu Gln Val Val Gly Val Lys Glu  
 130 135 140  
 Arg Ile Lys Lys Gly Thr Gln Gln Asn Ile Ala Val Ser Ser Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Lys Ser Ser Pro Ser Ala Thr Glu Lys Val Phe Lys Gln Gln Glu  
 165 170 175  
 Ile Pro Ser Val Phe Pro Lys Thr Ser Ile Ser Pro Leu Asn Val Val  
 180 185 190  
 Gln Gly Ala Ser Val Asn Ser Ser Ser Gln Thr Ala Ala Gln Val Thr  
 195 200 205  
 Lys Gly Val Lys Arg Lys Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ala Thr Ser Ala  
 210 215 220  
 Val Lys Ala Ser Ser Glu Phe Ser Pro Thr Phe Thr Glu Lys Ser Val  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Pro Pro Ile Lys Glu Asn Met Pro Lys Asn Val Leu Pro Asp  
 245 250 255  
 Ser Gln Gln Gln Tyr Asn Val Val Lys Thr Val Lys Val Thr Glu Gln  
 260 265 270  
 Leu Arg His Cys Ser Glu Ile Leu Lys Glu Met Leu Ala Lys Lys His

| 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Ser | Tyr | Ala | Trp | Pro | Phe | Tyr | Asn | Pro | Val | Asp | Val | Asn | Ala | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Gly | Leu | His | Asn | Tyr | Tyr | Asp | Val | Val | Lys | Asn | Pro | Met | Asp | Leu | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Thr | Ile | Lys | Glu | Lys | Met | Asp | Asn | Gln | Glu | Tyr | Lys | Asp | Ala | Tyr | Lys |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Phe | Ala | Ala | Asp | Val | Arg | Leu | Met | Phe | Met | Asn | Cys | Tyr | Lys | Tyr | Asn |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Pro | Pro | Asp | His | Glu | Val | Val | Thr | Met | Ala | Arg | Met | Leu | Gln | Asp | Val |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Phe | Glu | Thr | His | Phe | Ser | Lys | Ile | Pro | Ile | Glu | Pro | Val | Glu | Ser | Met |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Pro | Leu | Cys | Tyr | Ile | Lys | Thr | Asp | Ile | Thr | Glu | Thr | Thr | Gly | Arg | Glu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asn | Thr | Asn | Glu | Ala | Ser | Ser | Glu | Gly | Asn | Ser | Ser | Asp | Asp | Ser | Glu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asp | Glu | Arg | Val | Lys | Arg | Leu | Ala | Lys | Leu | Gln | Glu | Gln | Leu | Lys | Ala |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Val | His | Gln | Gln | Leu | Gln | Val | Leu | Ser | Gln | Val | Pro | Phe | Arg | Lys | Leu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Asn | Lys | Lys | Lys | Glu | Lys | Ser | Lys | Lys | Glu | Lys | Lys | Lys | Glu | Lys | Val |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Asn | Asn | Ser | Asn | Glu | Asn | Pro | Arg | Lys | Met | Cys | Glu | Gln | Met | Arg | Leu |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Lys | Glu | Lys | Ser | Lys | Arg | Asn | Gln | Pro | Lys | Lys | Arg | Lys | Gln | Gln | Phe |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Ile | Gly | Leu | Lys | Ser | Glu | Asp | Glu | Asp | Asn | Ala | Lys | Pro | Met | Asn | Tyr |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Asp | Glu | Lys | Arg | Gln | Leu | Ser | Leu | Asn | Ile | Asn | Lys | Leu | Pro | Gly | Asp |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |

Lys Leu Gly Arg Val Val His Ile Ile Gln Ser Arg Glu Pro Ser Leu  
 530 535 540  
 Ser Asn Ser Asn Pro Asp Glu Ile Glu Ile Asp Phe Glu Thr Leu Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Ser Thr Leu Arg Glu Leu Glu Lys Tyr Val Ser Ala Cys Leu Arg  
 565 570 575  
 Lys Arg Pro Leu Lys Pro Pro Ala Lys Lys Ile Met Met Ser Lys Glu  
 580 585 590  
 Glu Leu His Ser Gln Lys Lys Gln Glu Leu Glu Lys Arg Leu Leu Asp  
 595 600 605  
 Val Asn Asn Gln Leu Asn Ser Arg Lys Arg Gln Thr Lys Ser Asp Lys  
 610 615 620  
 Thr Gln Pro Ser Lys Ala Val Glu Asn Val Ser Arg Leu Ser Glu Ser  
 625 630 635 640  
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Glu Ser Ser Ser Ser Asp  
 645 650 655  
 Leu Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ser Glu Met Phe Pro Lys  
 660 665 670  
 Phe Thr Glu Val Lys Pro Asn Asp Ser Pro Ser Lys Glu Asn Val Lys  
 675 680 685  
 Lys Met Lys Asn Glu Cys Ile Leu Pro Glu Gly Arg Thr Gly Val Thr  
 690 695 700  
 Gln Ile Gly Tyr Cys Val Gln Asp Thr Thr Ser Ala Asn Thr Thr Leu  
 705 710 715 720  
 Val His Gln Thr Thr Pro Ser His Val Met Pro Pro Asn His His Gln  
 725 730 735  
 Leu Ala Phe Asn Tyr Gln Glu Leu Glu His Leu Gln Thr Val Lys Asn  
 740 745 750  
 Ile Ser Pro Leu Gln Ile Leu Pro Pro Ser Gly Asp Ser Glu Gln Leu  
 755 760 765  
 Ser Asn Gly Ile Thr Val Met His Pro Ser Gly Asp Ser Asp Thr Thr  
 770 775 780

Met Leu Glu Ser Glu Cys Gln Ala Pro Val Gln Lys Asp Ile Lys Ile  
785 790 795 800

Lys Asn Ala Asp Ser Trp Lys Ser Leu Gly Lys Pro Val Lys Pro Ser  
805 810 815

Gly Val Met Lys Ser Ser Asp Glu Leu Phe Asn Gln Phe Arg Lys Ala  
820 825 830

Ala Ile Glu Lys Glu Val Lys Ala Arg Thr Gln Glu Leu Ile Arg Lys  
835 840 845

His Leu Glu Gln Asn Thr Lys Glu Leu Lys Ala Ser Gln Glu Asn Gln  
850 855 860

Arg Asp Leu Gly Asn Gly Leu Thr Val Glu Ser Phe Ser Asn Lys Ile  
865 870 875 880

Gln Asn Lys Cys Ser Gly Glu Glu Gln Lys Glu His Gln Gln Ser Ser  
885 890 895

Glu Ala Gln Asp Lys Ser Lys Leu Trp Leu Leu Lys Asp Arg Asp Leu  
900 905 910

Ala Arg Gln Lys Glu Gln Glu Arg Arg Arg Arg Glu Ala Met Val Gly  
915 920 925

Thr Ile Asp Met Thr Leu Gln Ser Asp Ile Met Thr Met Phe Glu Asn  
930 935 940

Asn Phe Asp  
945

<210> 5  
<211> 20  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
15 <223> Lys(Ac)

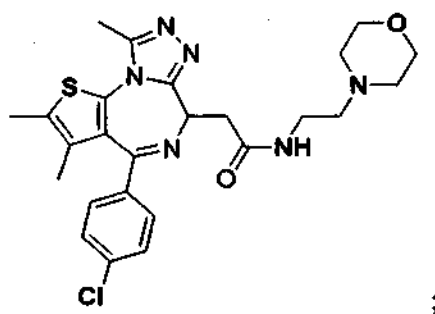
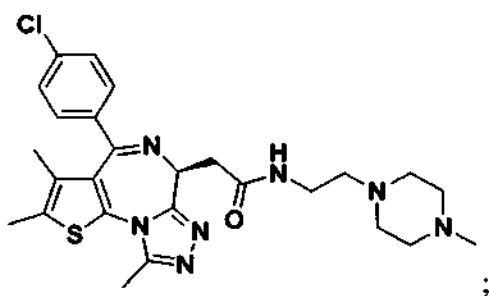
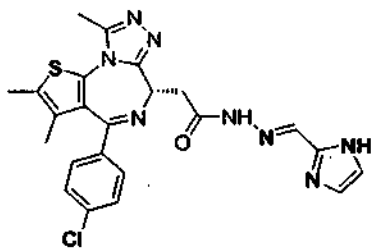
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
20 <223> Lys(Ac)

<220>  
<221> MOD\_RES  
25 <222> (12)..(12)  
<223> Lys(Ac)

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Lys(Ac)  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Lys(Biotina)-OH  
 10  
 <400> 5  
  
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys  
 1 5 10 15  
  
 Arg His Arg Lys  
 20  
 15 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Biotina-Lys  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Lys(Ac)  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Thr-OH  
 <400> 6  
  
 Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg  
 1 5 10 15  
 40 Pro Gly Thr

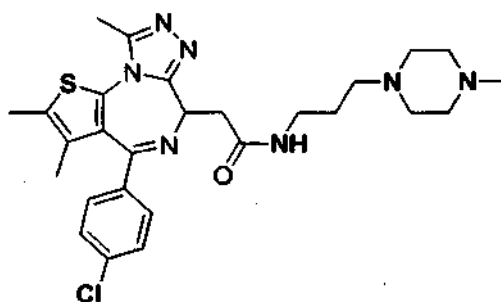
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado con una fórmula estructural seleccionada entre el grupo que consiste en:



5

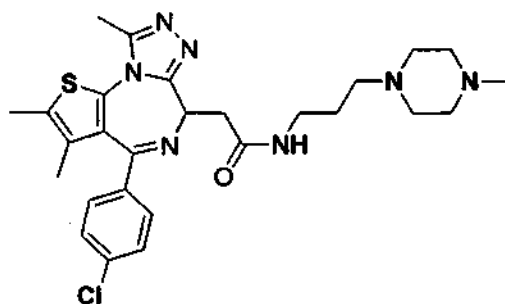
y



10

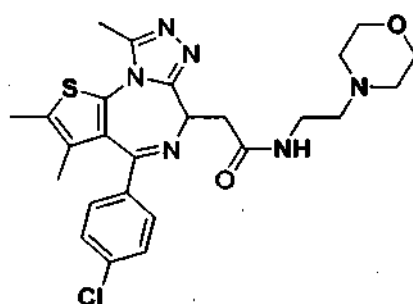
o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, representado con la fórmula estructural



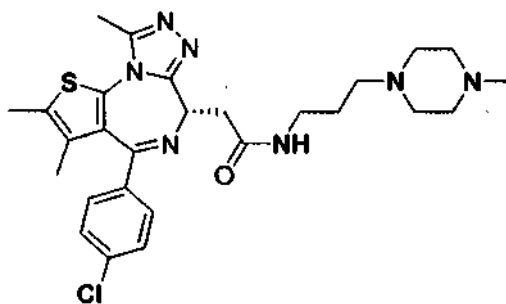
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 3. Un compuesto de la reivindicación 1, representado con la fórmula estructural



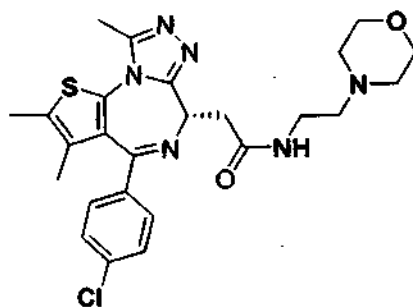
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 4. Un compuesto de la reivindicación 2, representado con la fórmula estructural



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de la reivindicación 3, representado con la fórmula estructural



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptables del mismo.

Figura 1

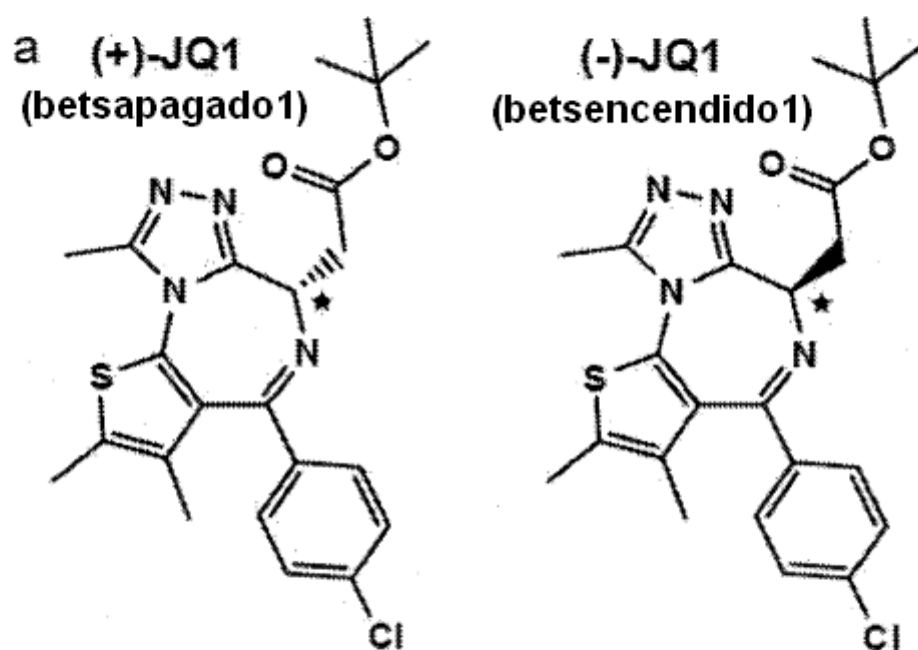
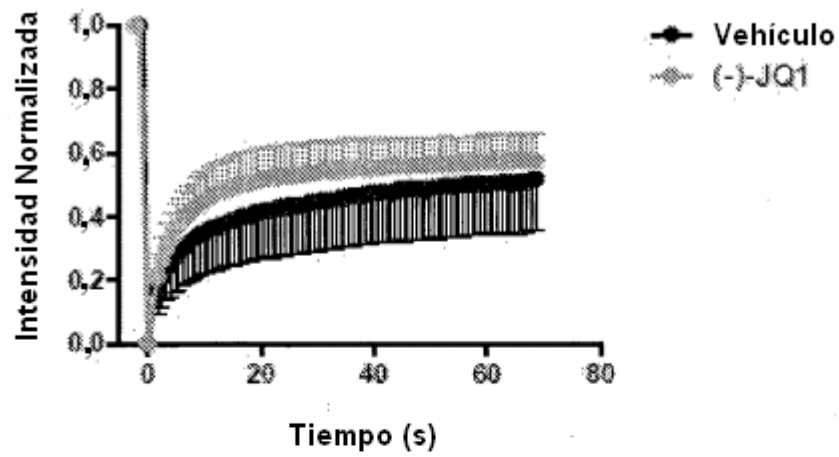
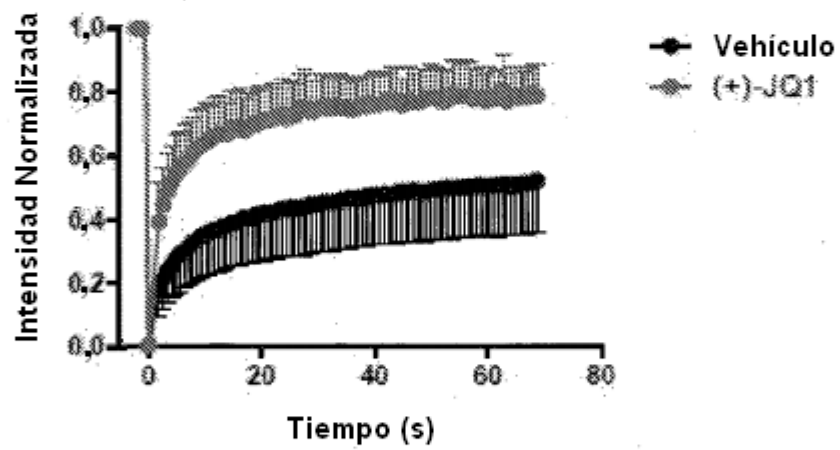


Figura 2

a



b



c

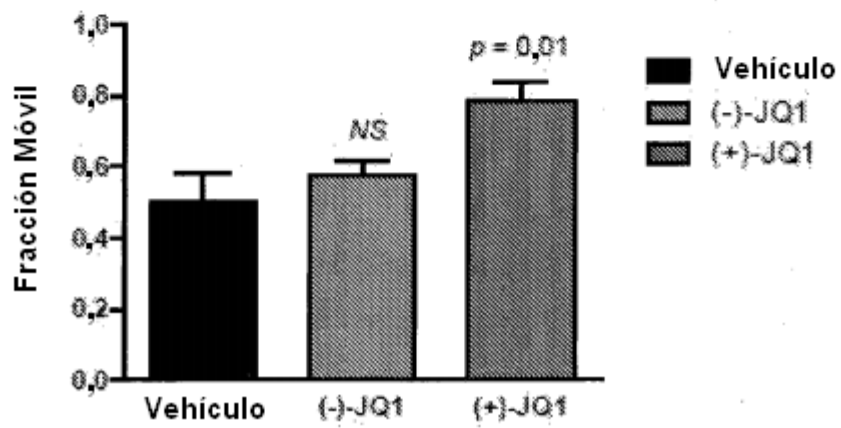


Figura 3

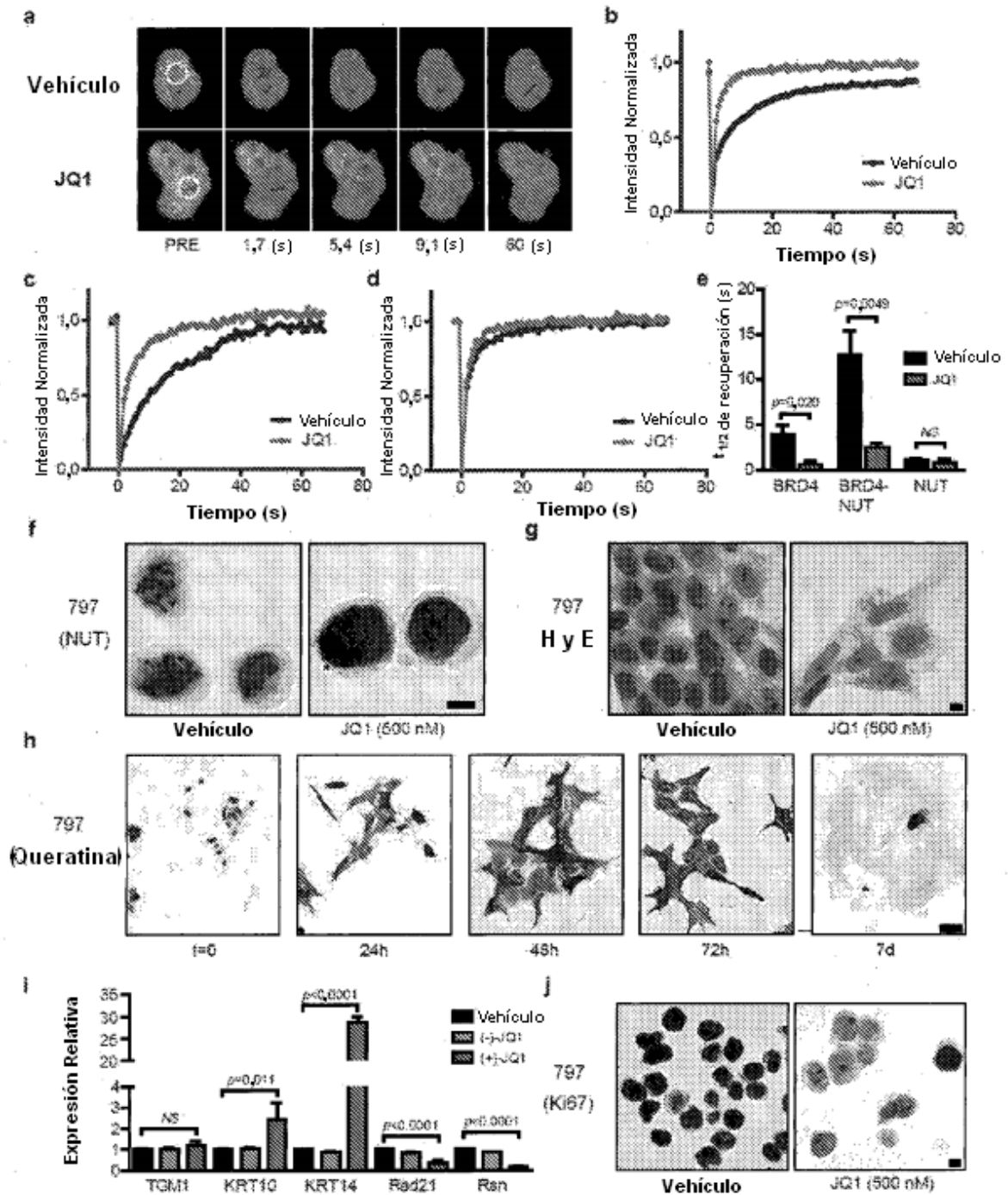


Figura 4

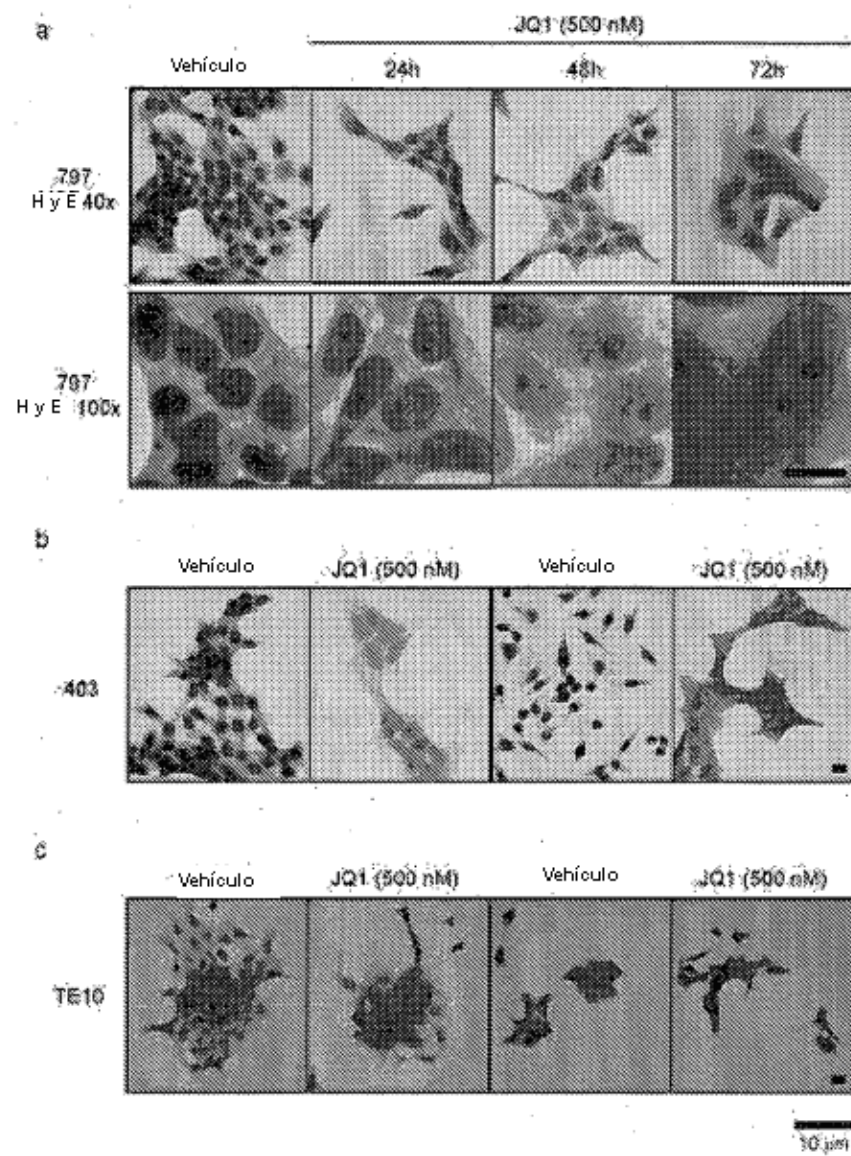
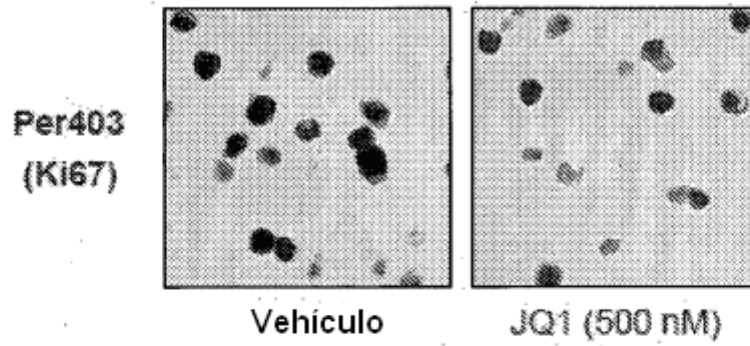


Figura 4D

a



b

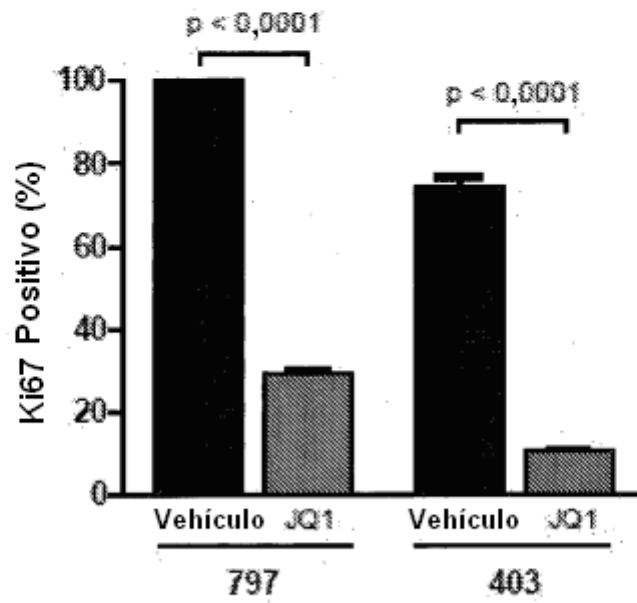


Figura 4E

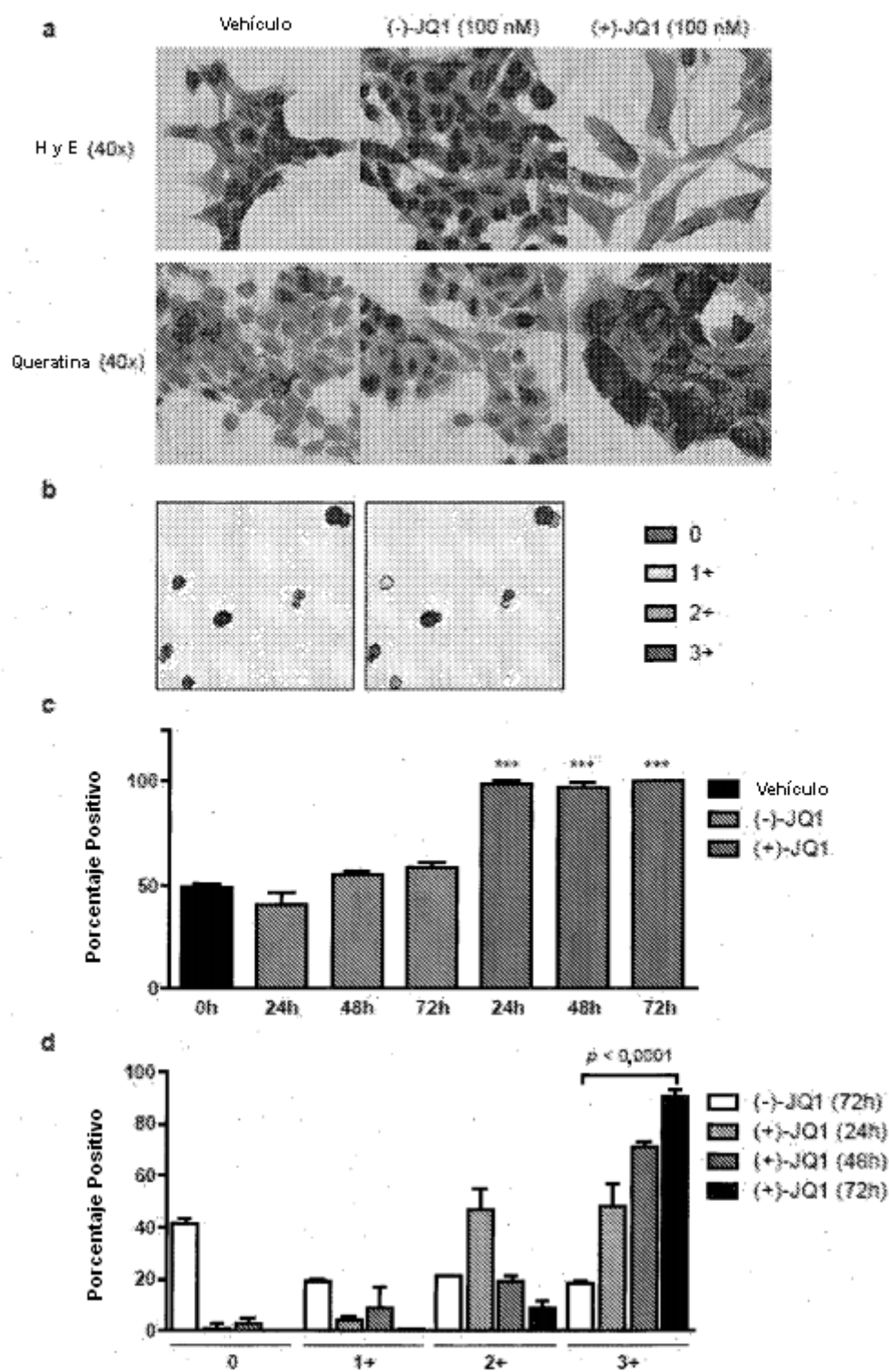
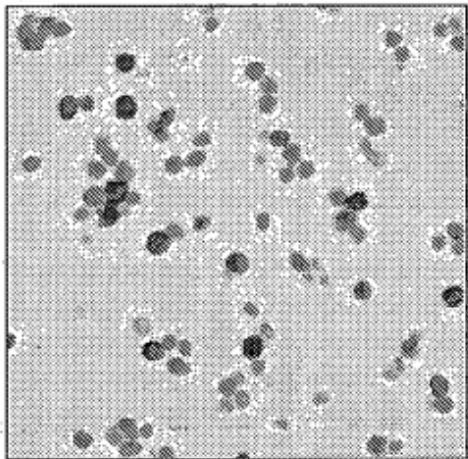
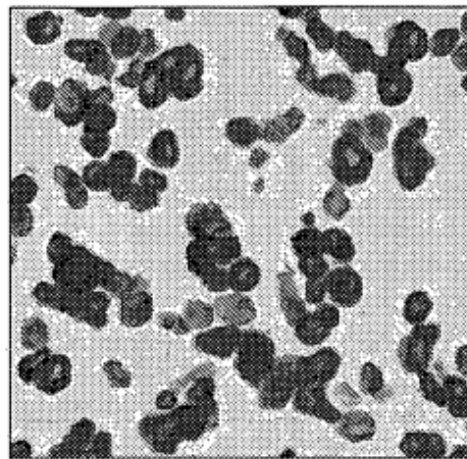


Figura 4F

a

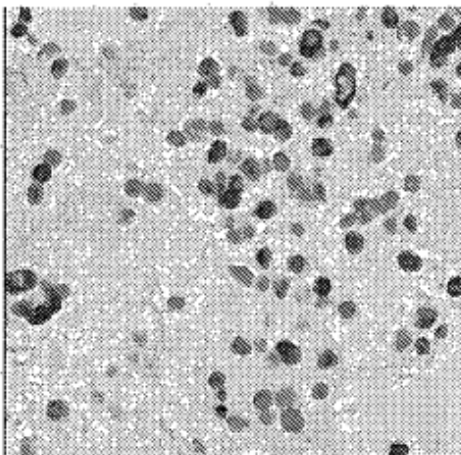


Vehiculo

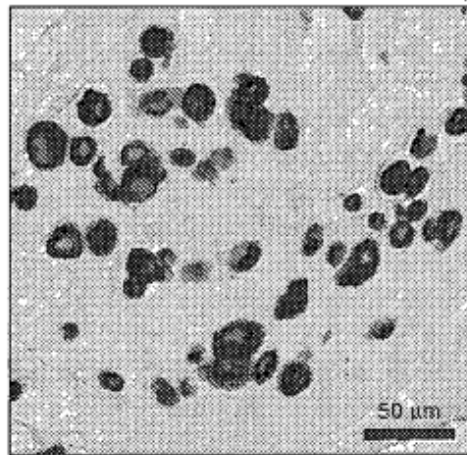


JQ1

b



Control



Recorte de BRD4-NUT

Figura 4F-c

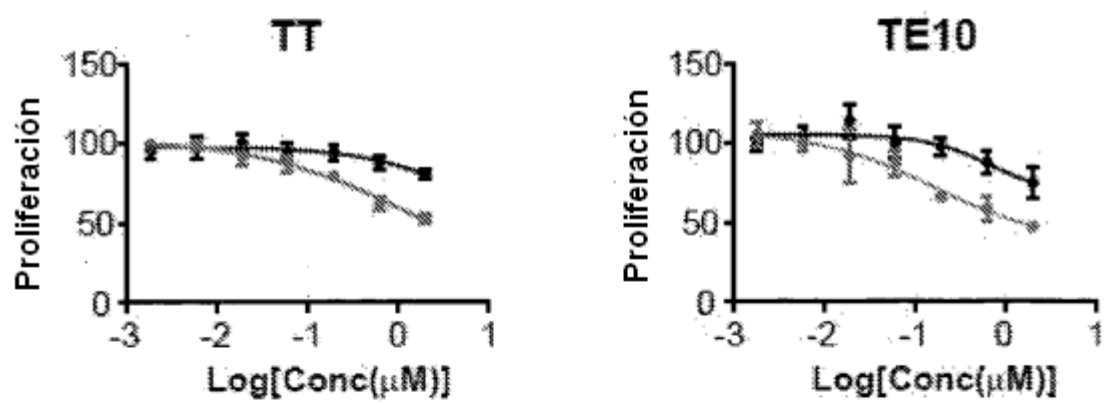


Figura 5

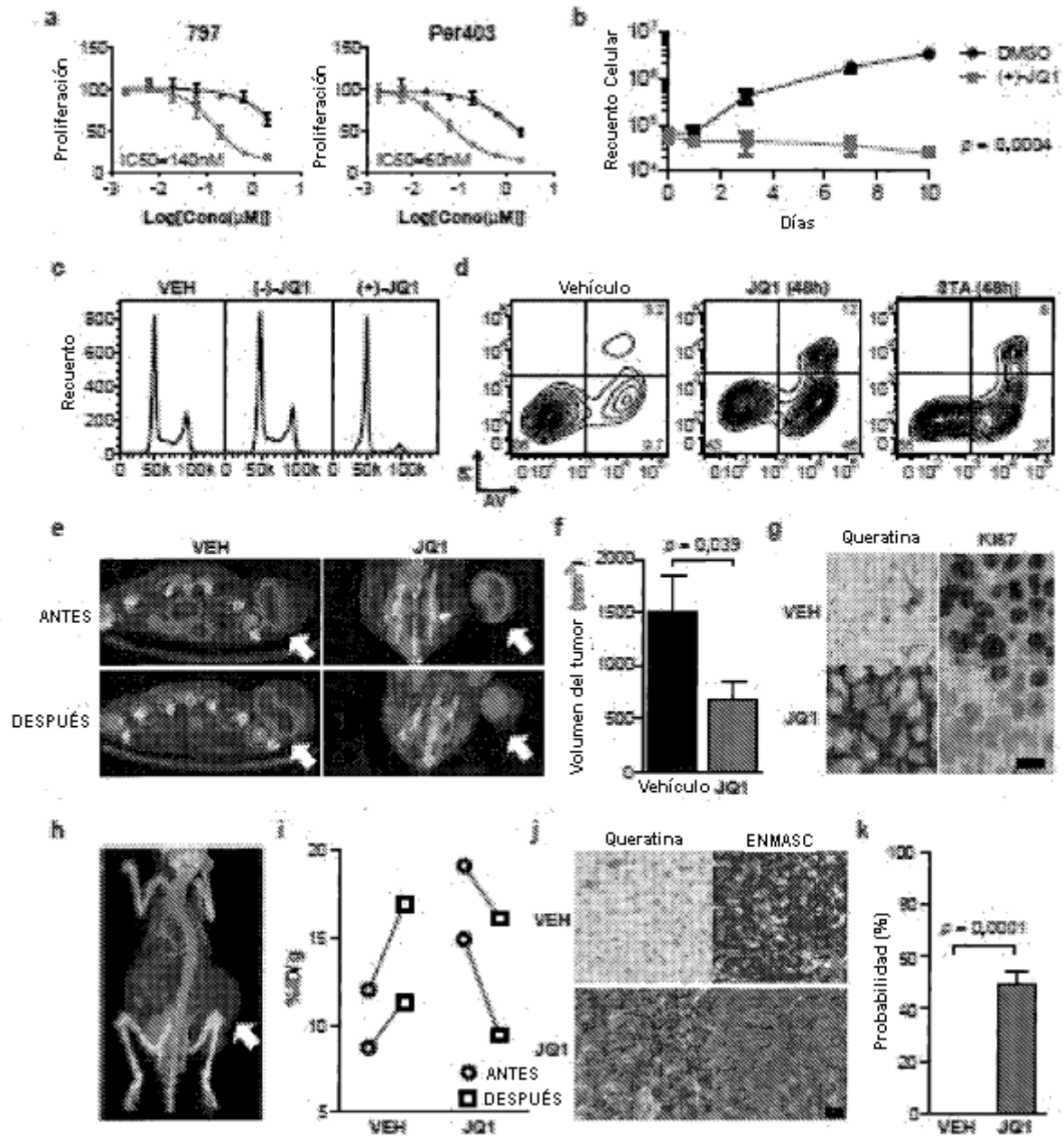


Figura 5L

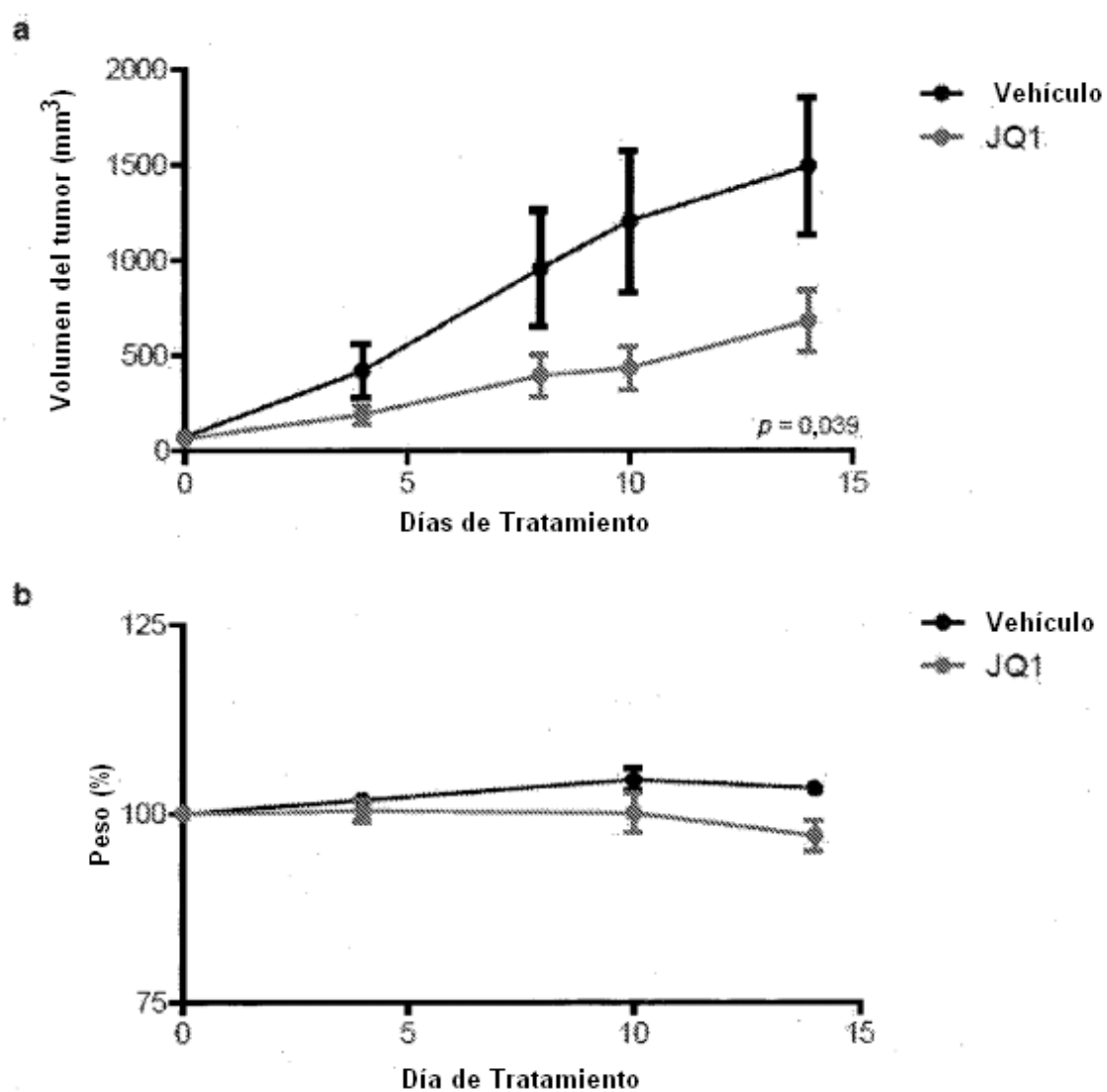


Figura 5M

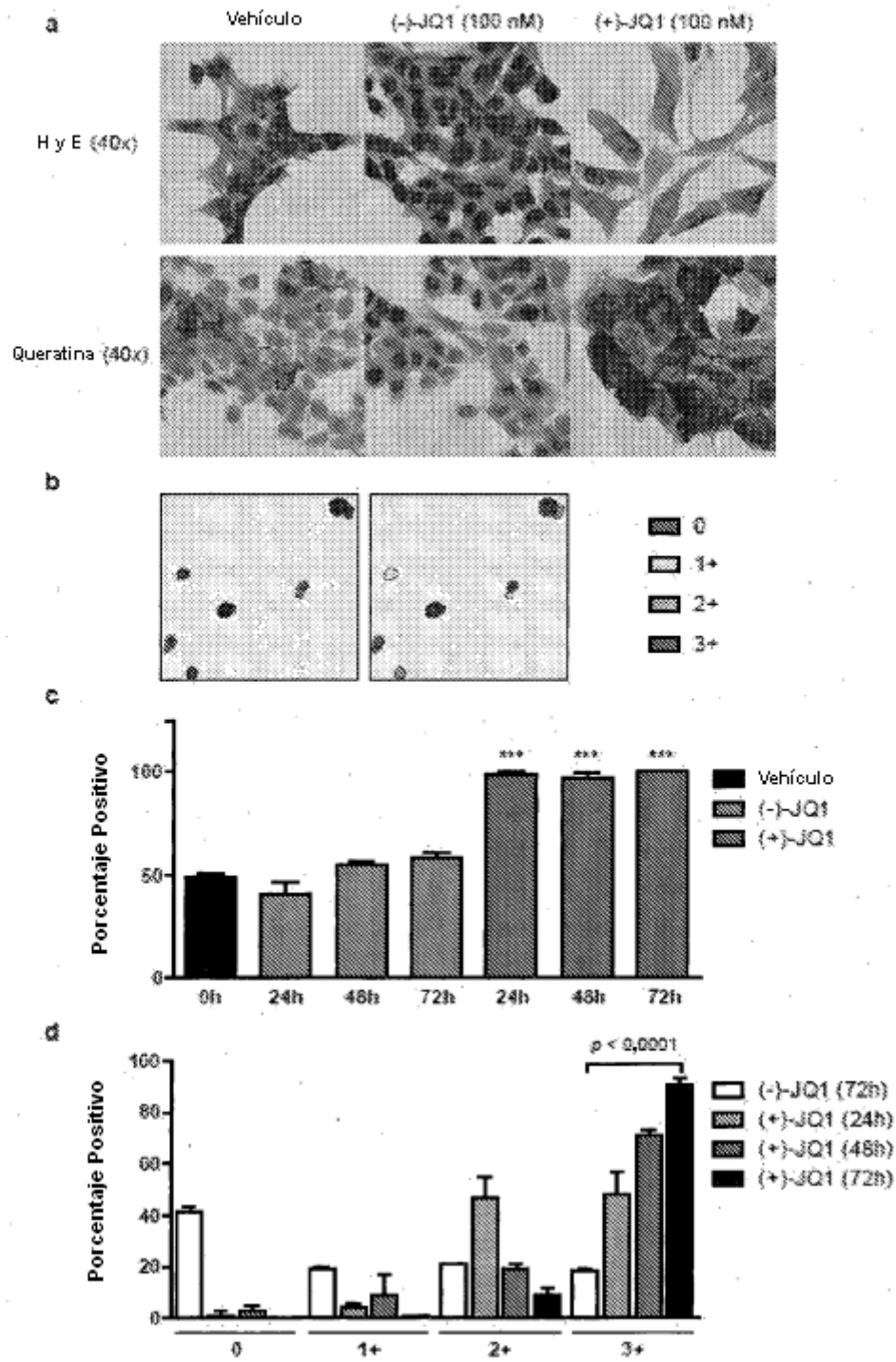


Figura 6A

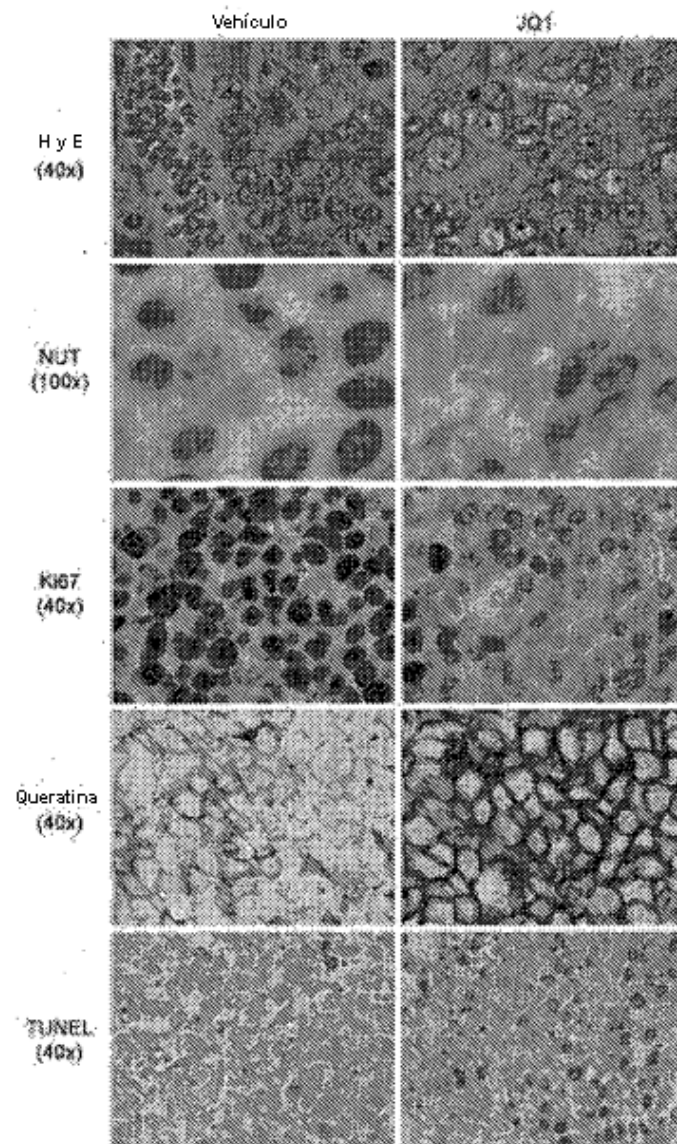


Figura 6B

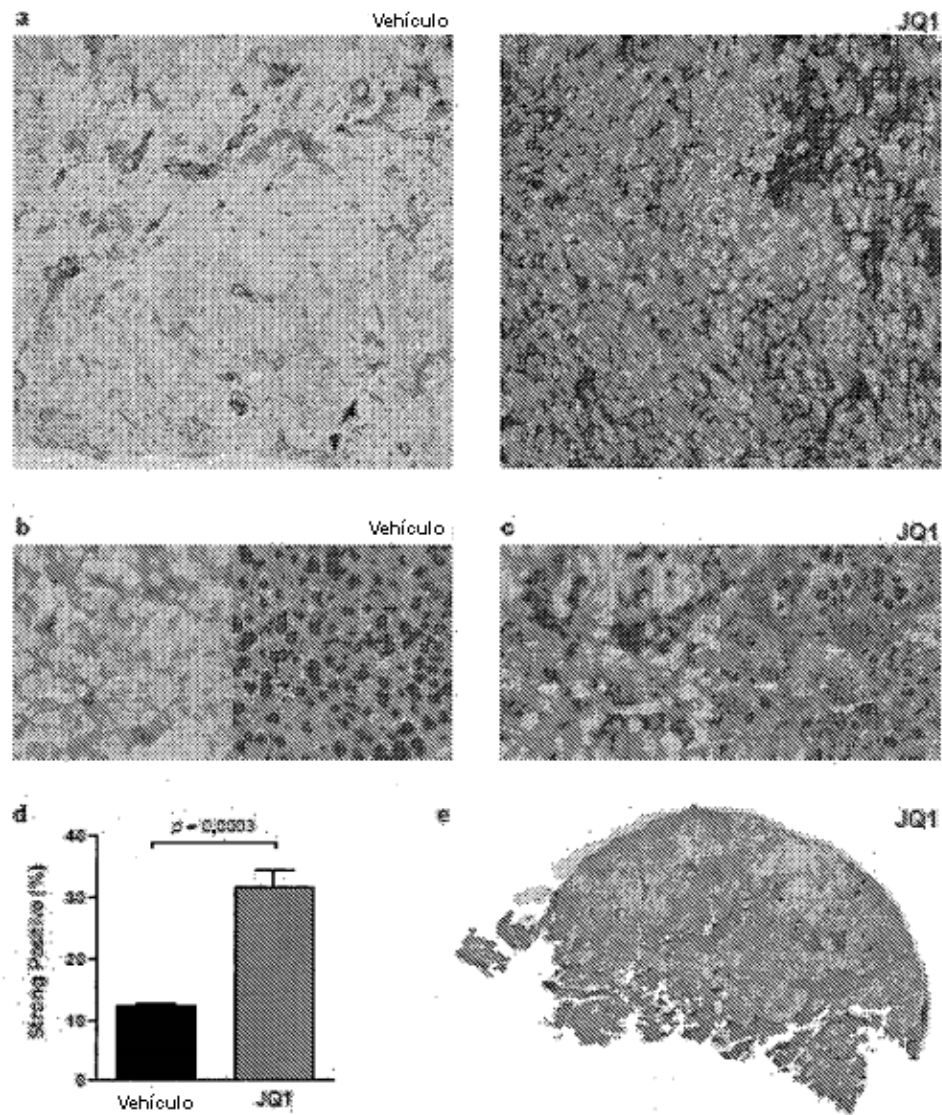


Figura 7

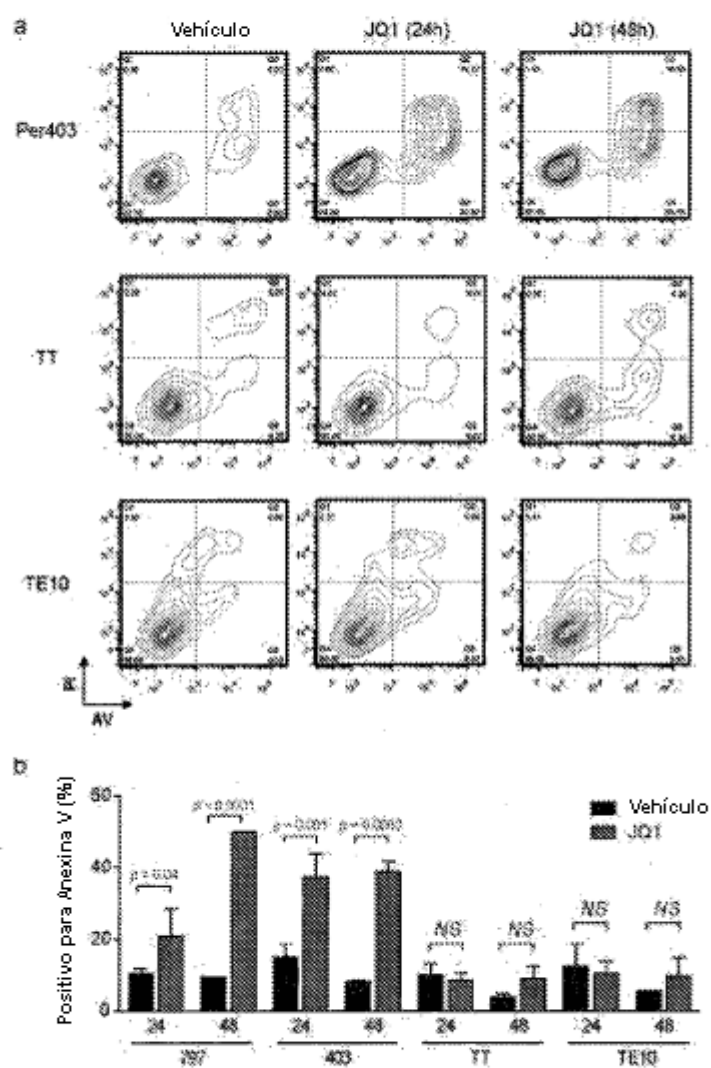
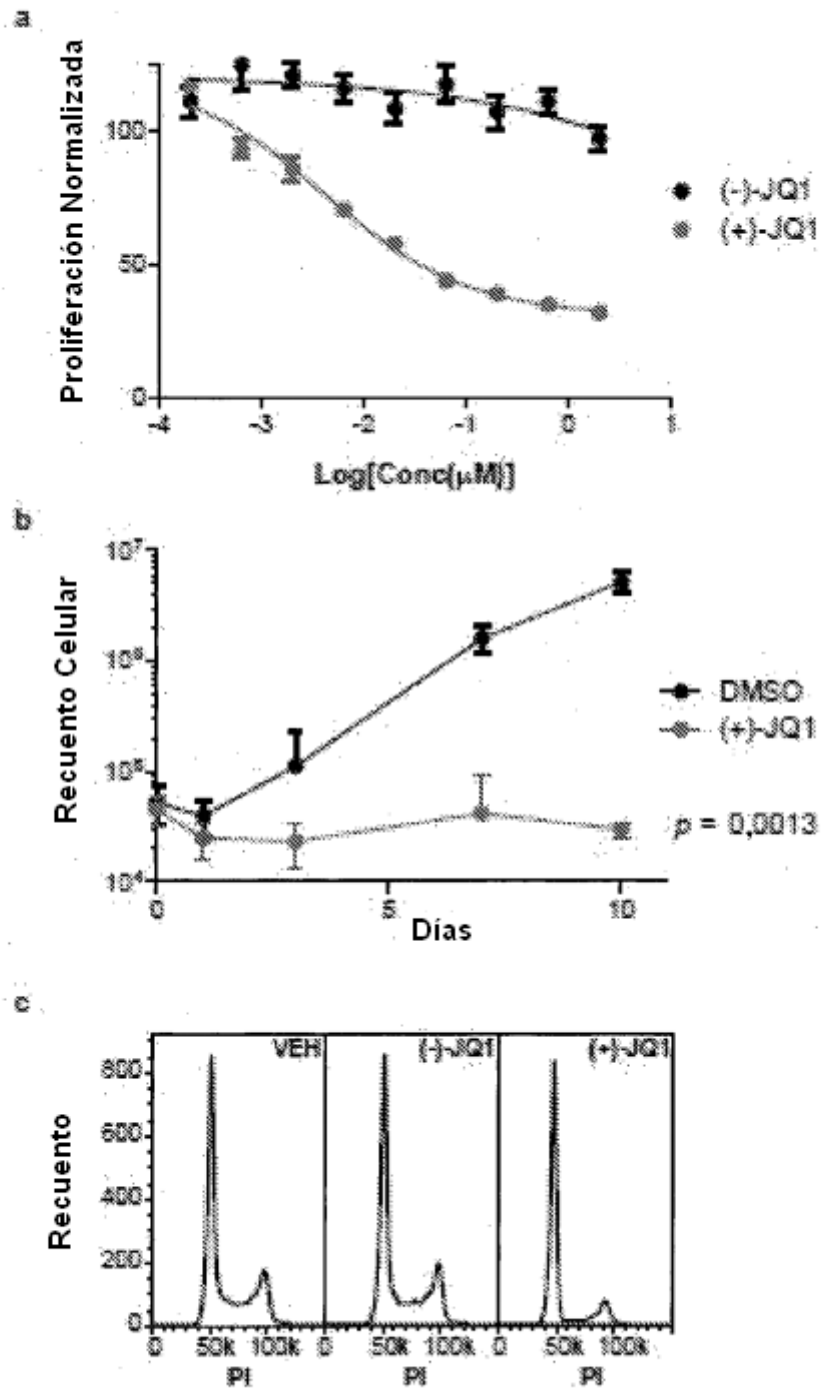


Figura 8



**Figura 9**

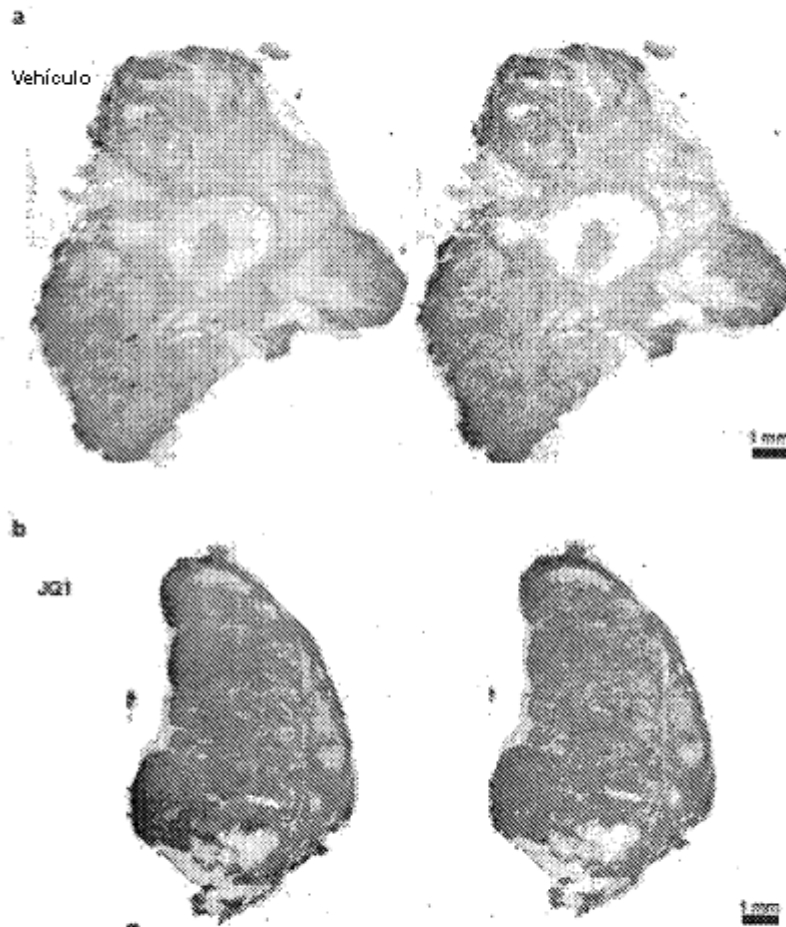


Figura 10

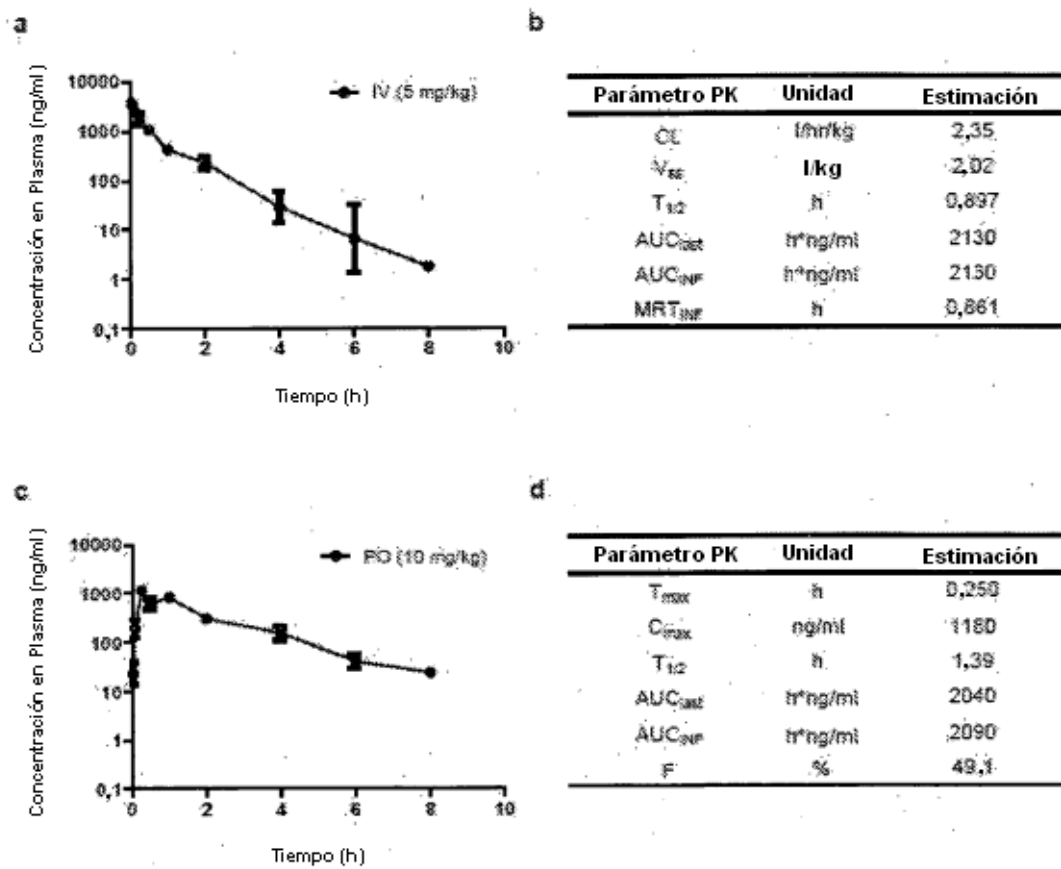


Figura 11

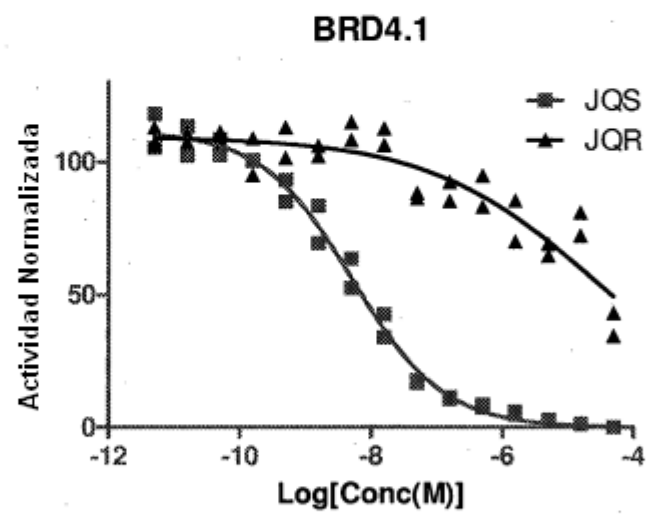


Figura 12

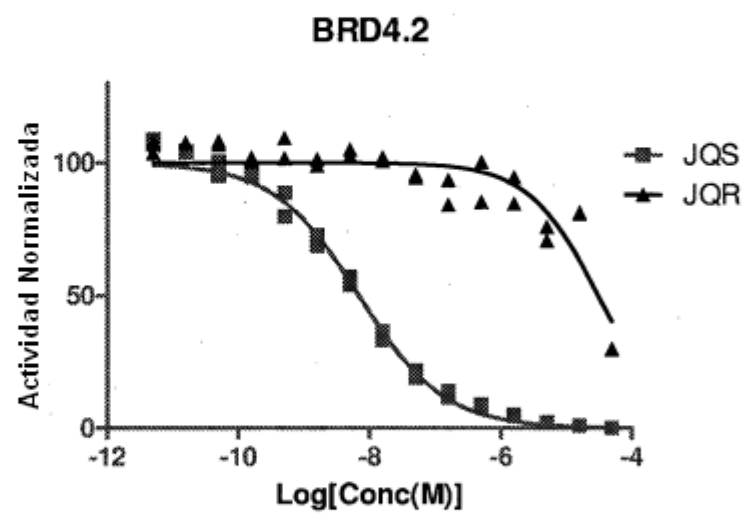


Figura 13

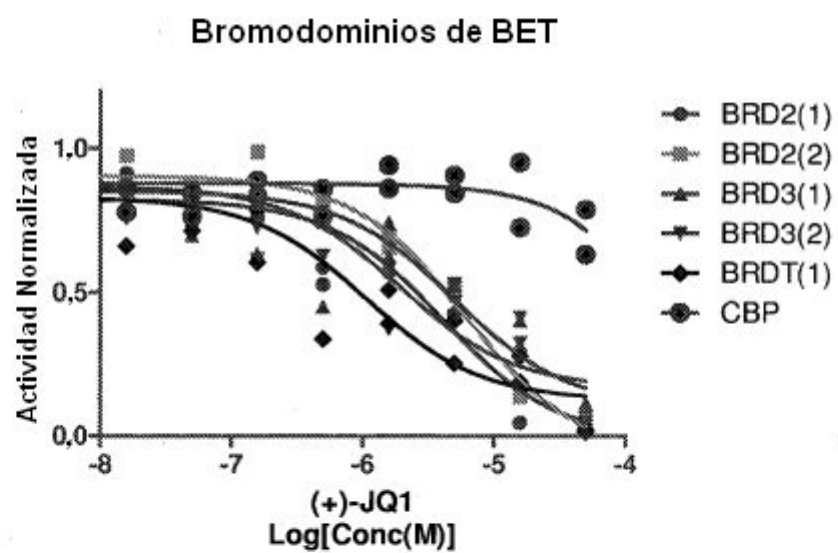


Figura 14

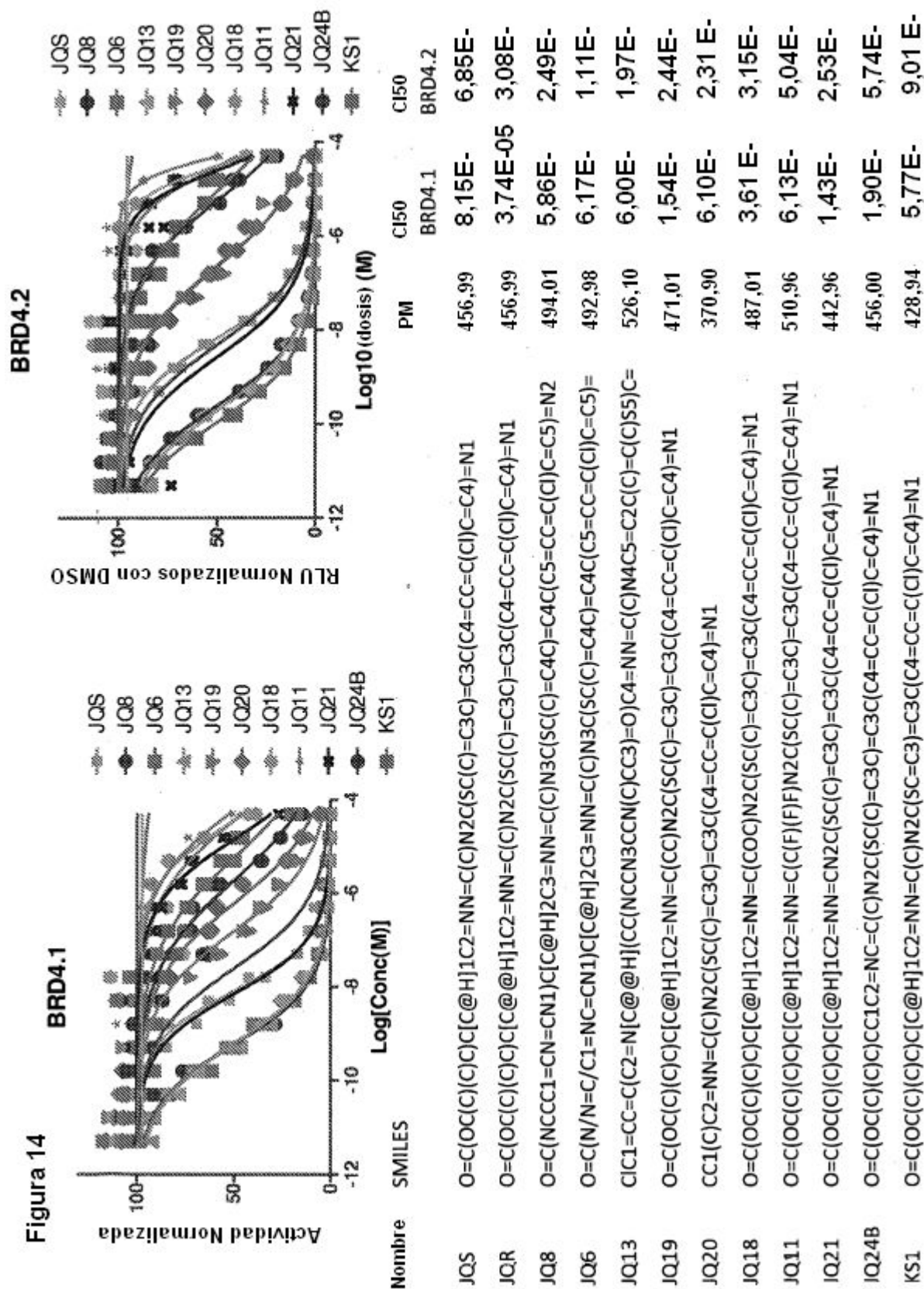


Figura 15A

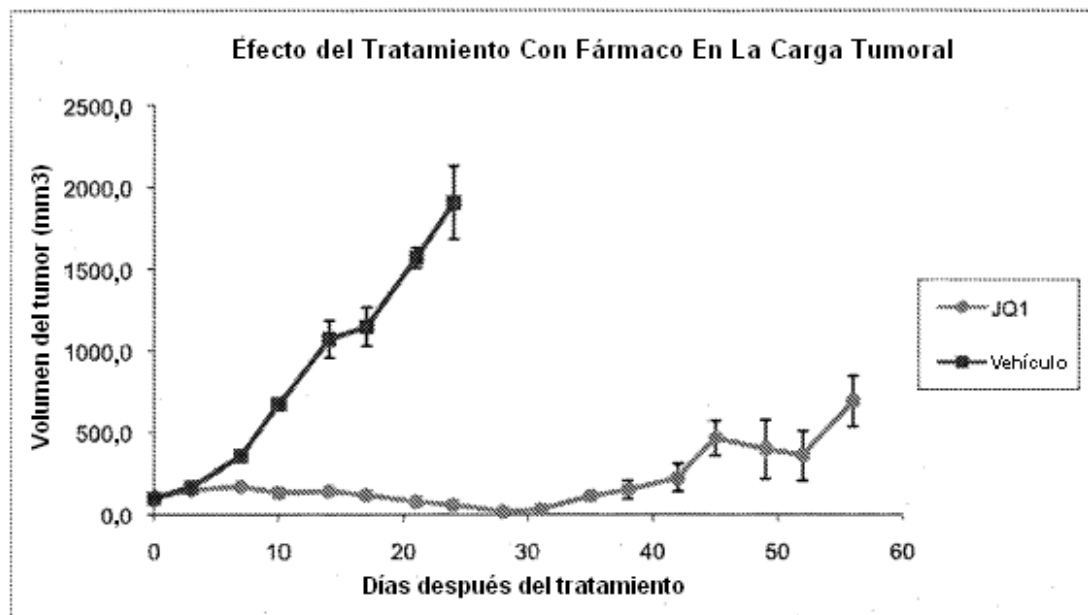


Figura 15B

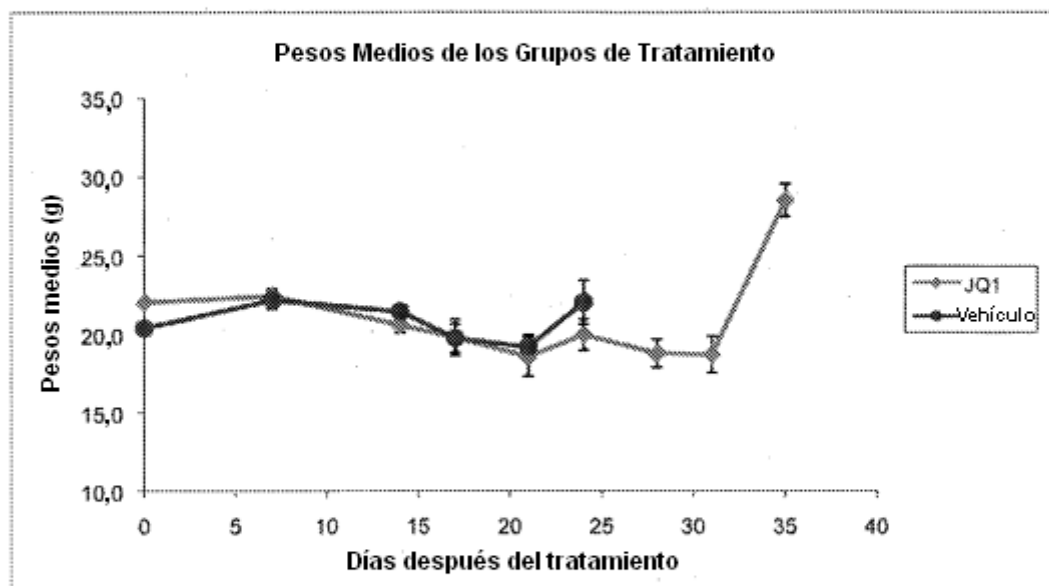


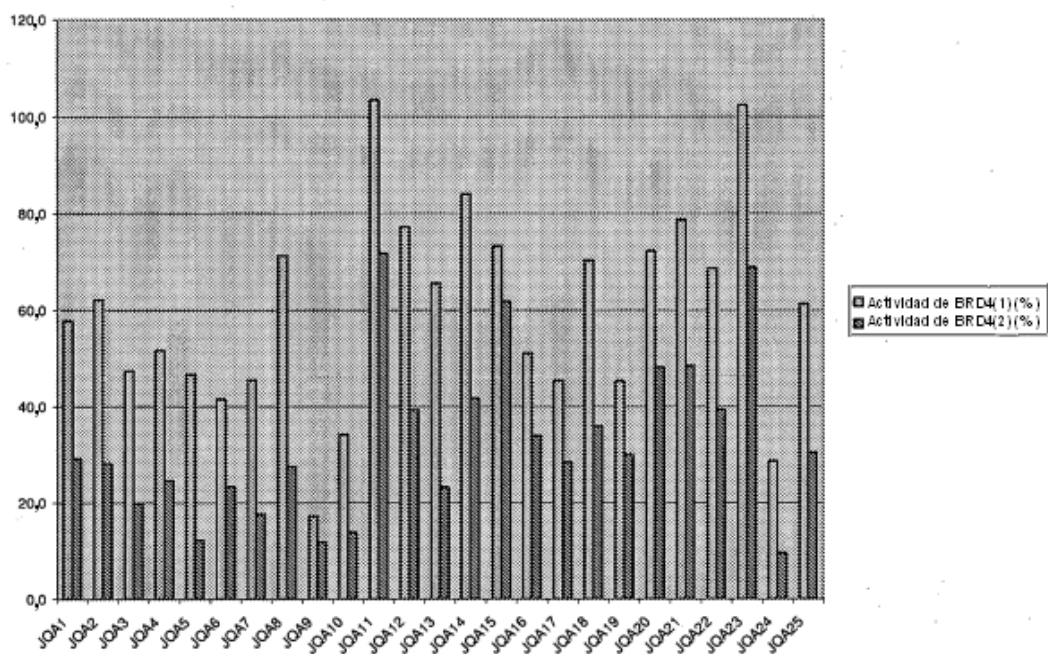
Figura 16A : Inhibición de la Actividad de Unión de BRD4(1) y BRD4(2) a compuesto 5  $\mu$ M

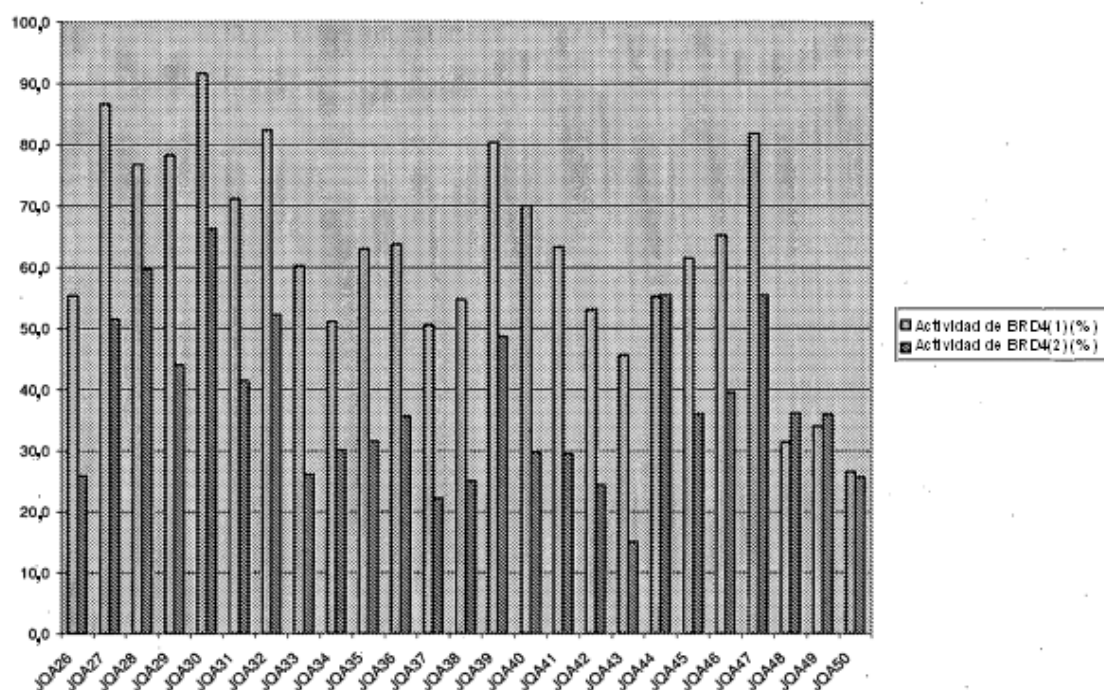
Figura 16B : Inhibición de la Actividad de Unión de BRD4(1) y BRD4(2) a compuesto 5  $\mu$ M

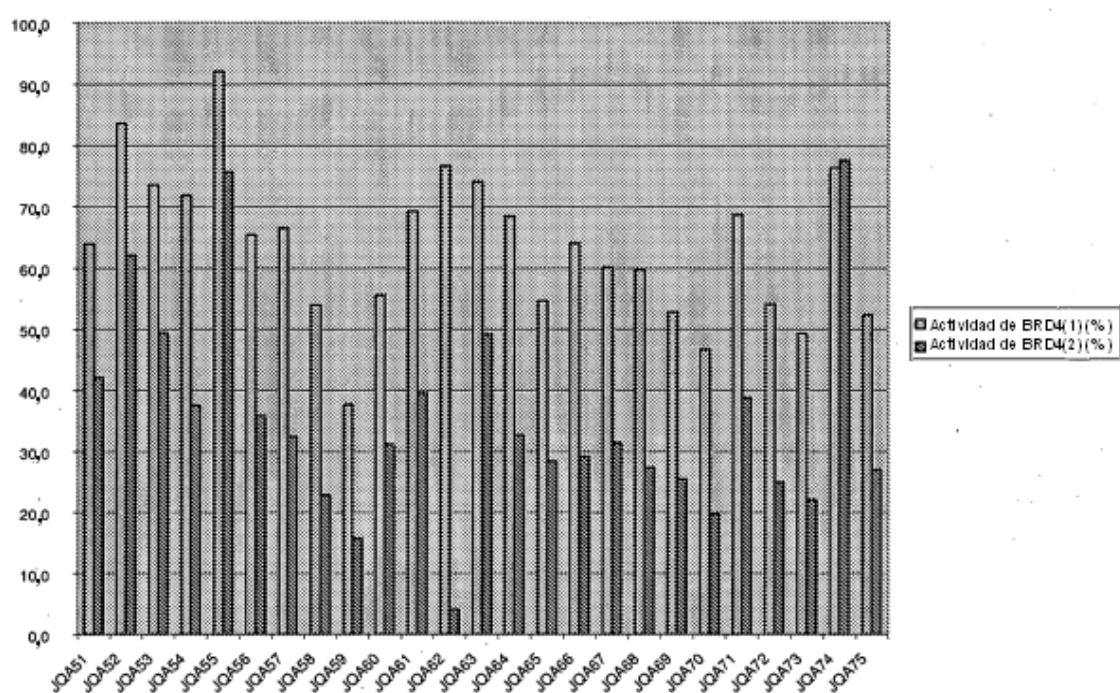
Figura 16C : Inhibición de la Actividad de Unión de BRD4(1) y BRD4(2) a compuesto 5  $\mu$ M

Figura 16D: Inhibición de la Actividad de Unión de BRD4(1) y BRD4(2) a compuesto 5  $\mu$ M

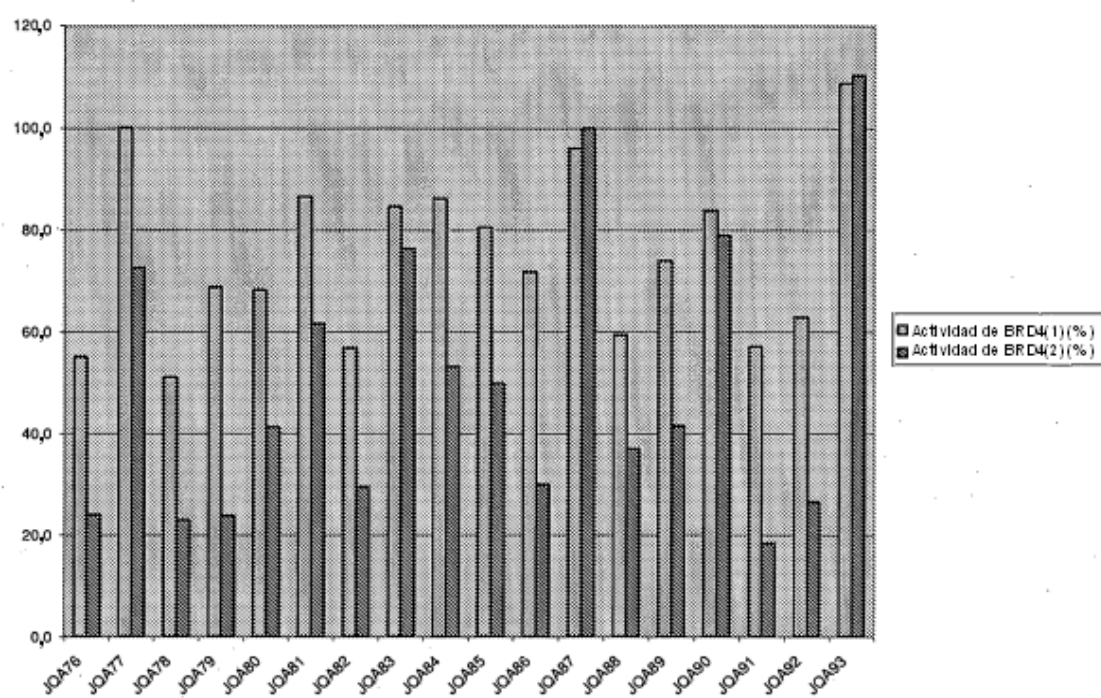


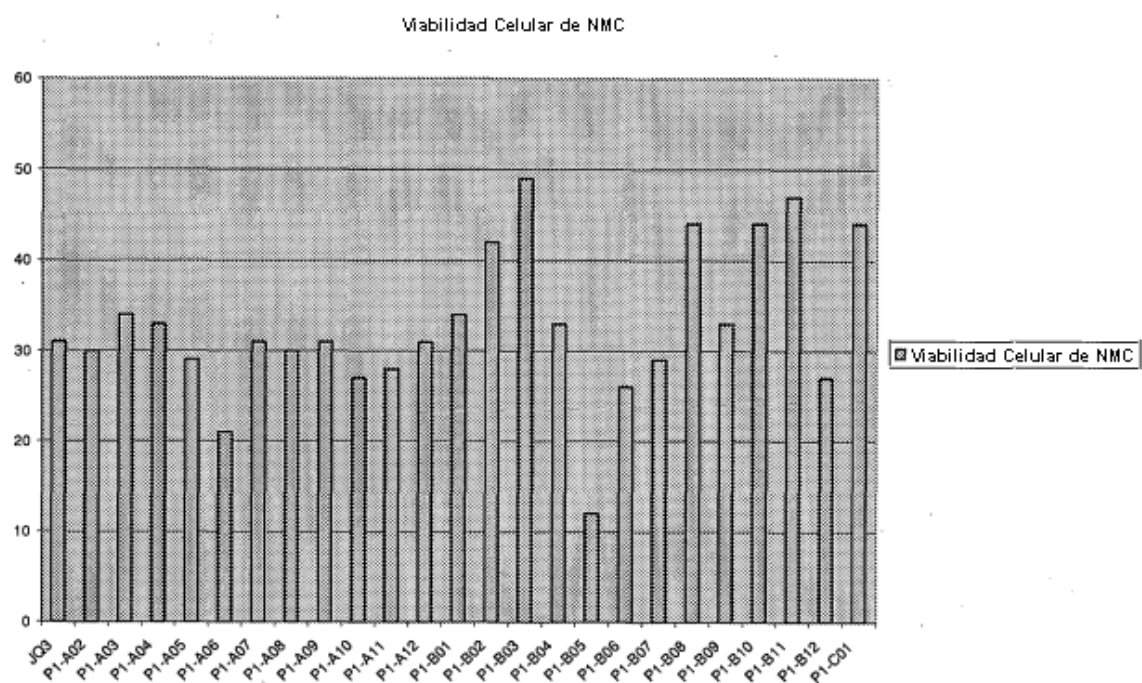
Figura 17A : % de Vialidad Celular de NMC a compuesto 2  $\mu$ M

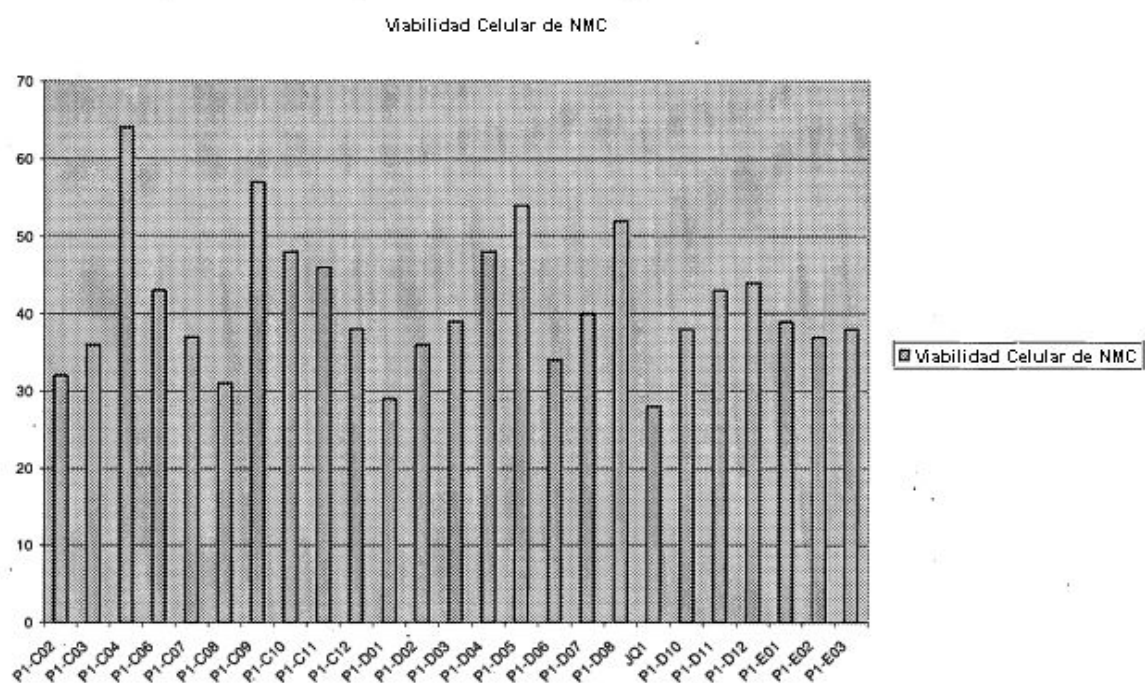
Figura 17B : % de Vialidad Celular de NMC a compuesto 2  $\mu$ M

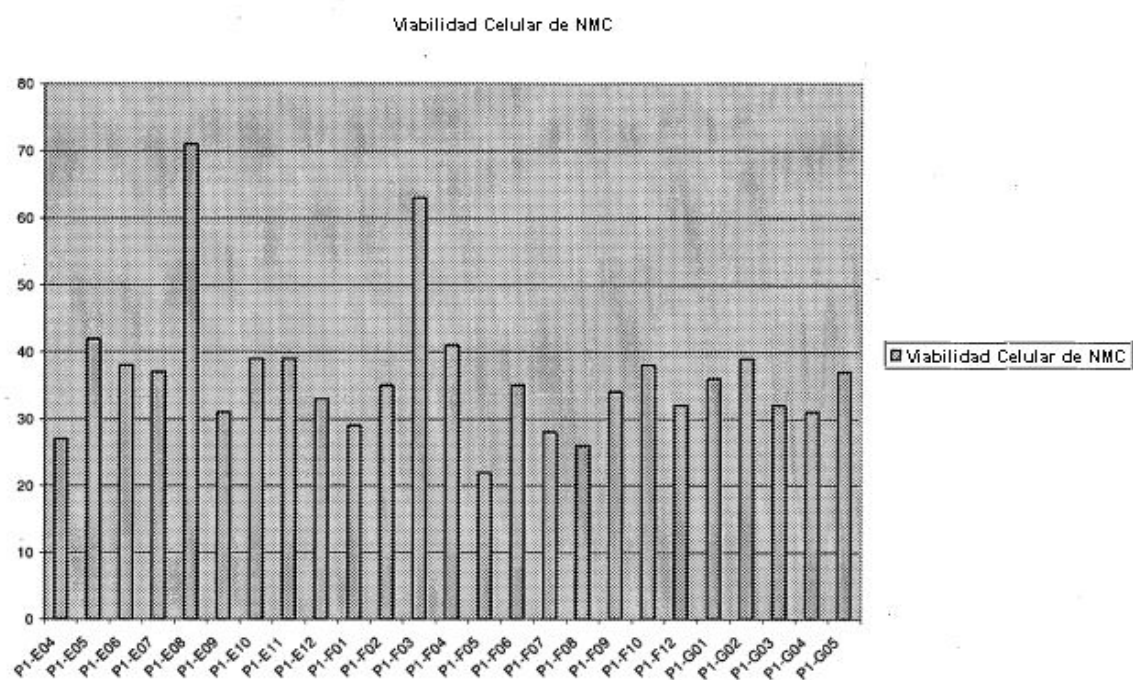
Figura 17C : % de Vialidad Celular de NMC a compuesto 2  $\mu$ M

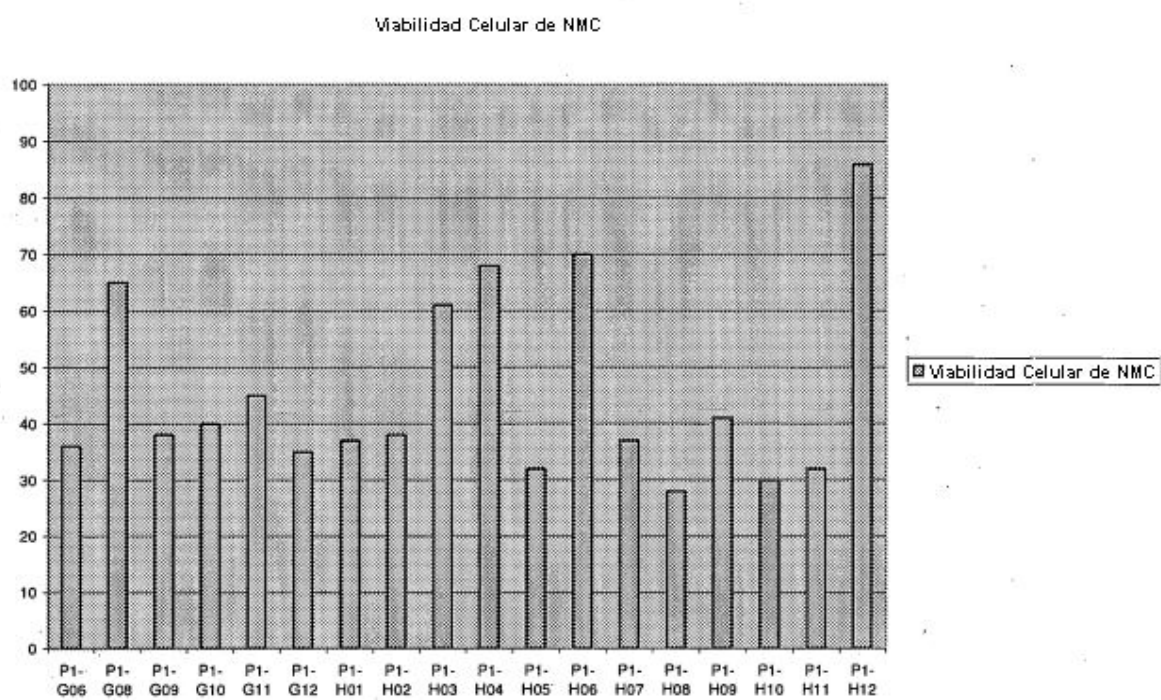
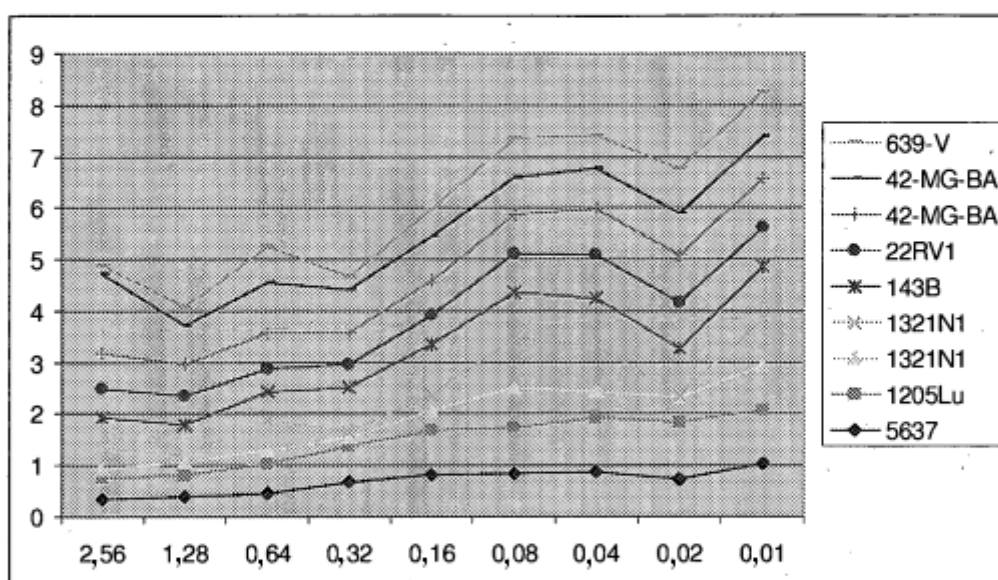
Figura 17D : % de Vialidad Celular de NMC a compuesto 2  $\mu$ M

Figura 18



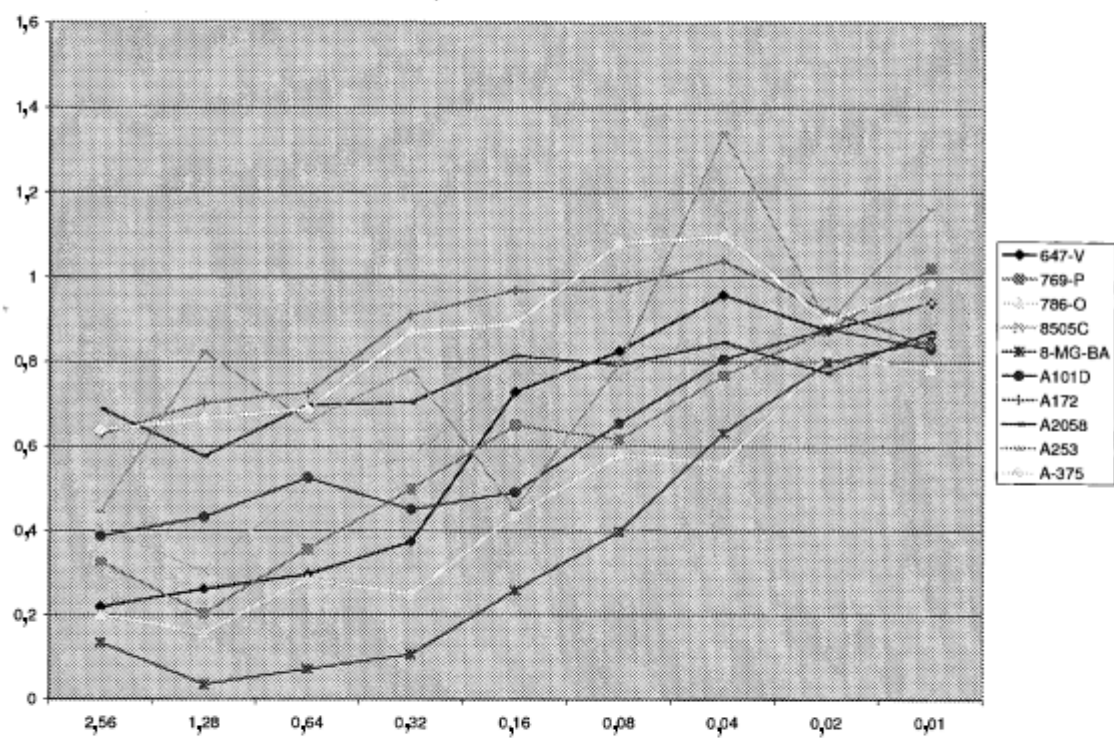


Figura 19

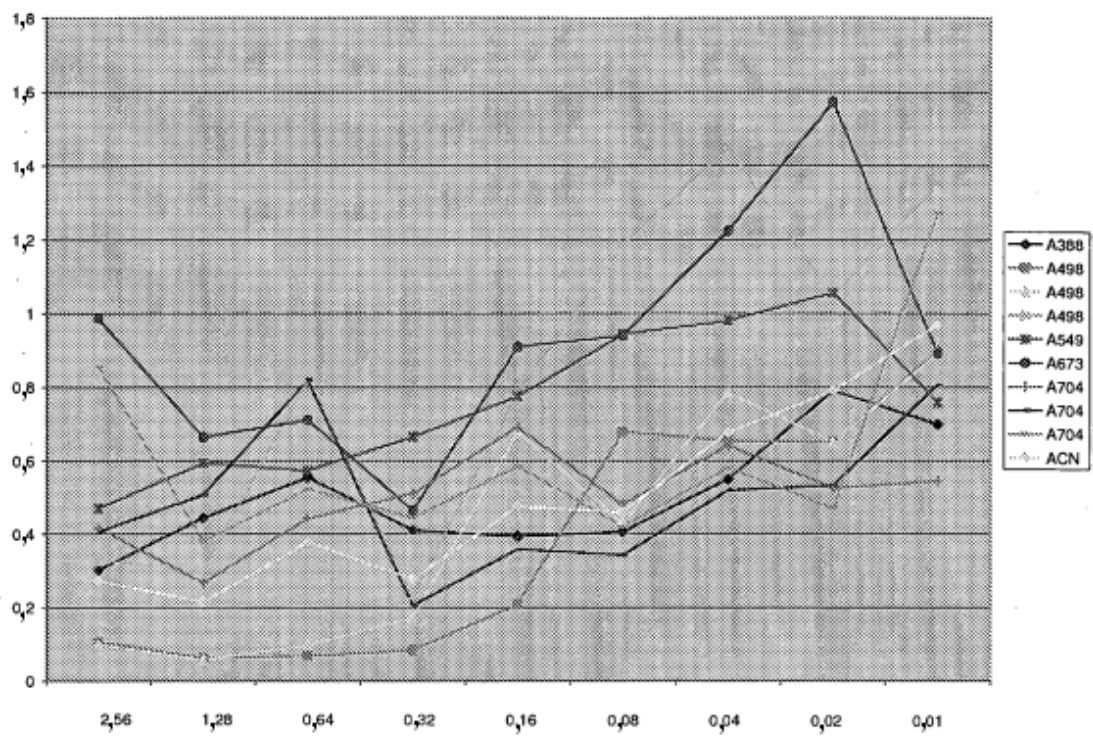


Figura 20

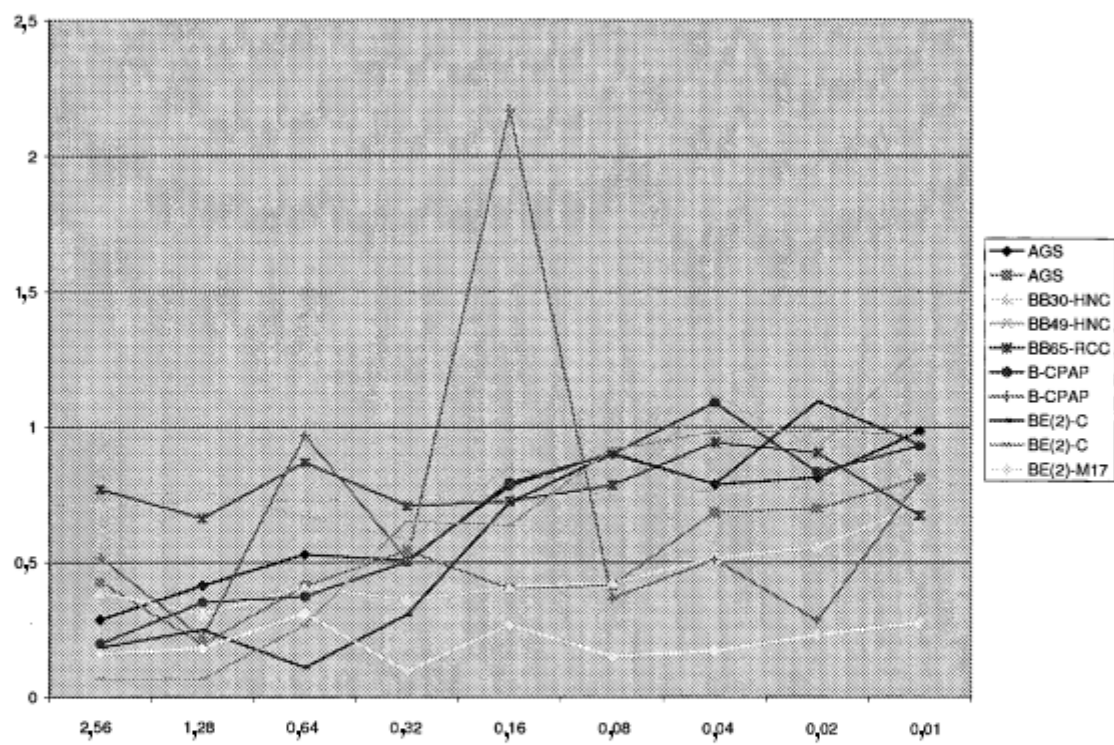


Figura 21

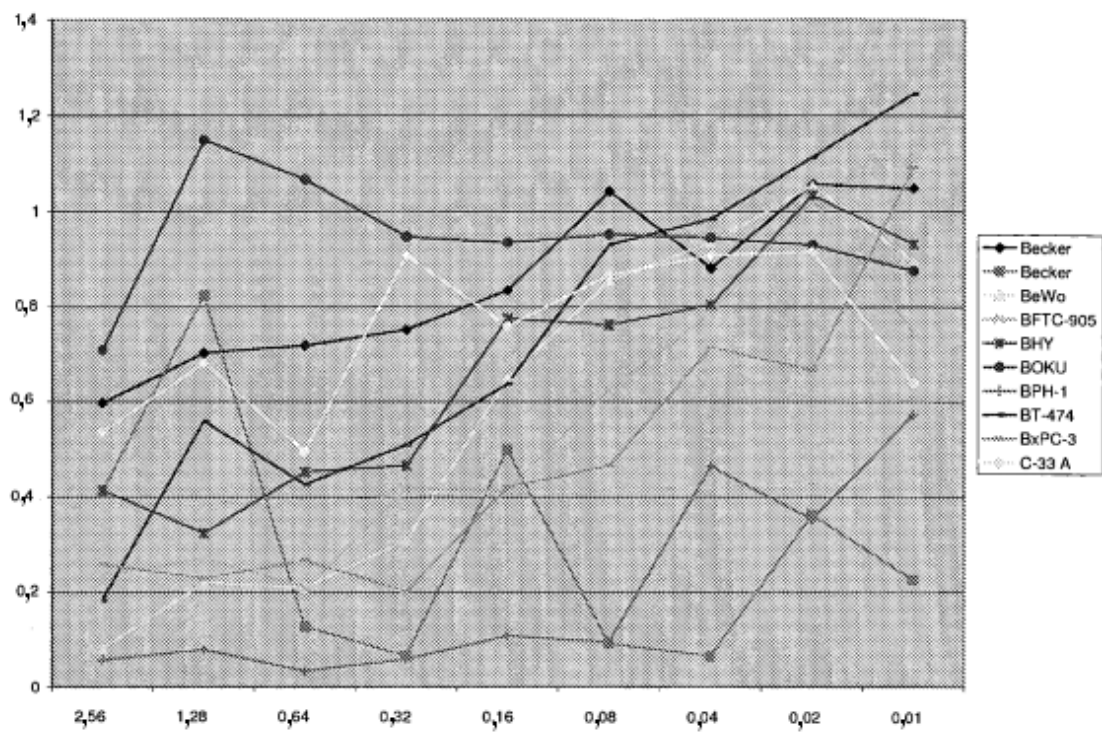


Figura 22

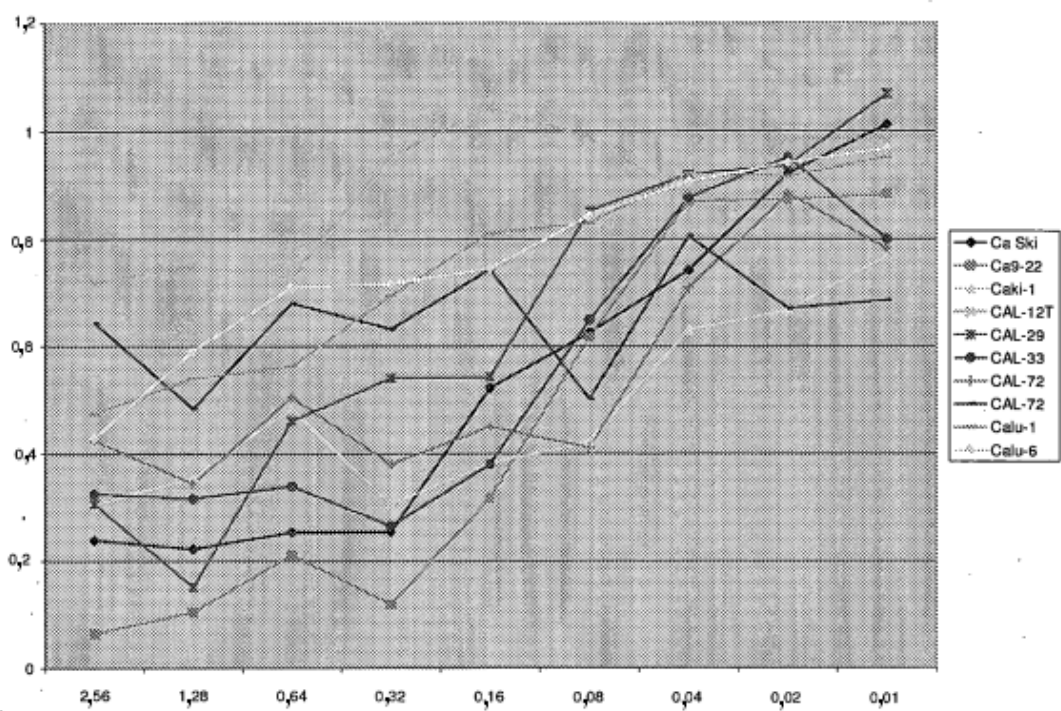


Figura 23

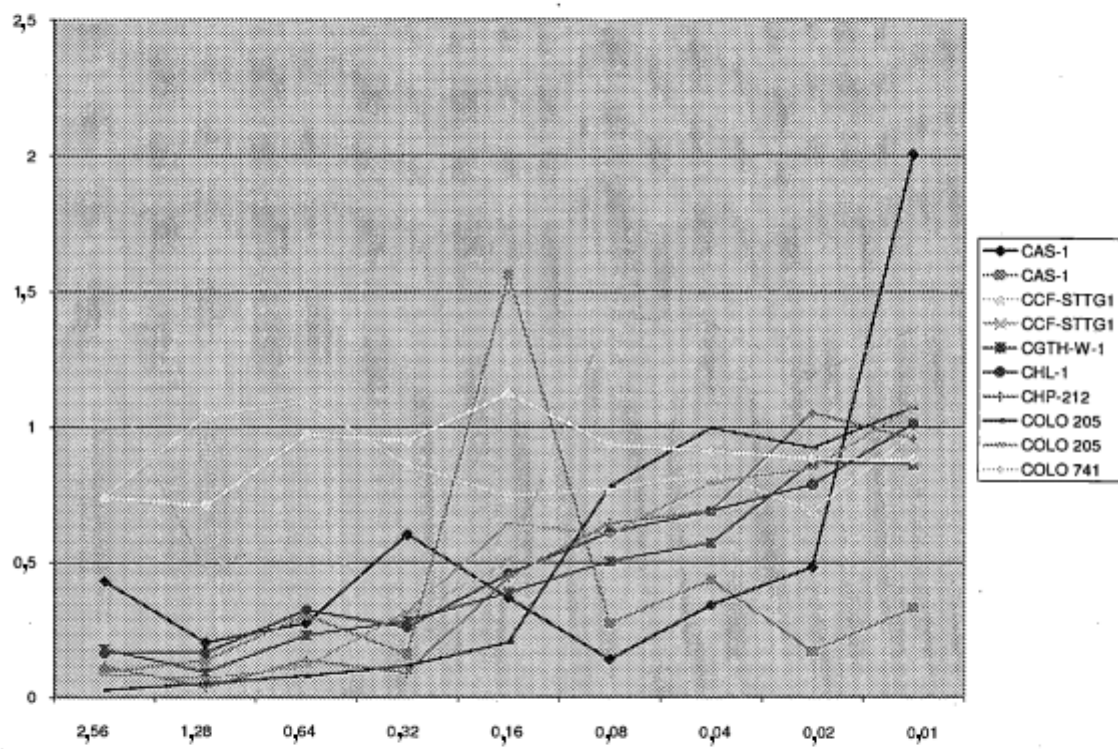


Figura 24

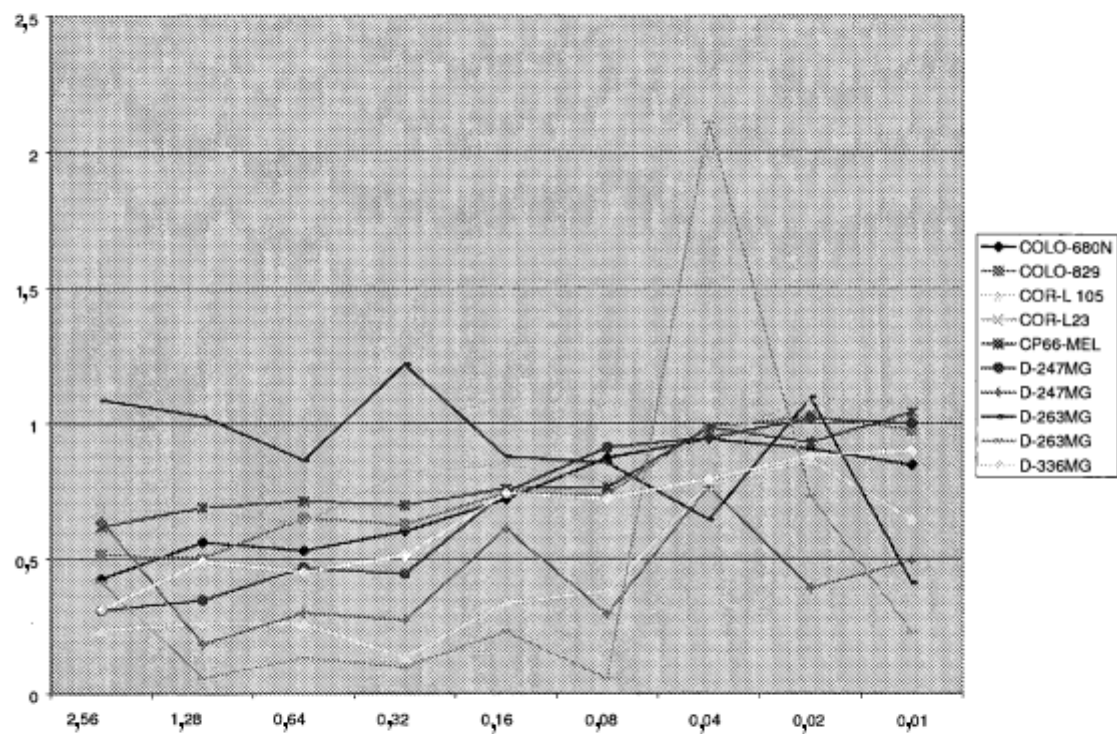


Figura 25

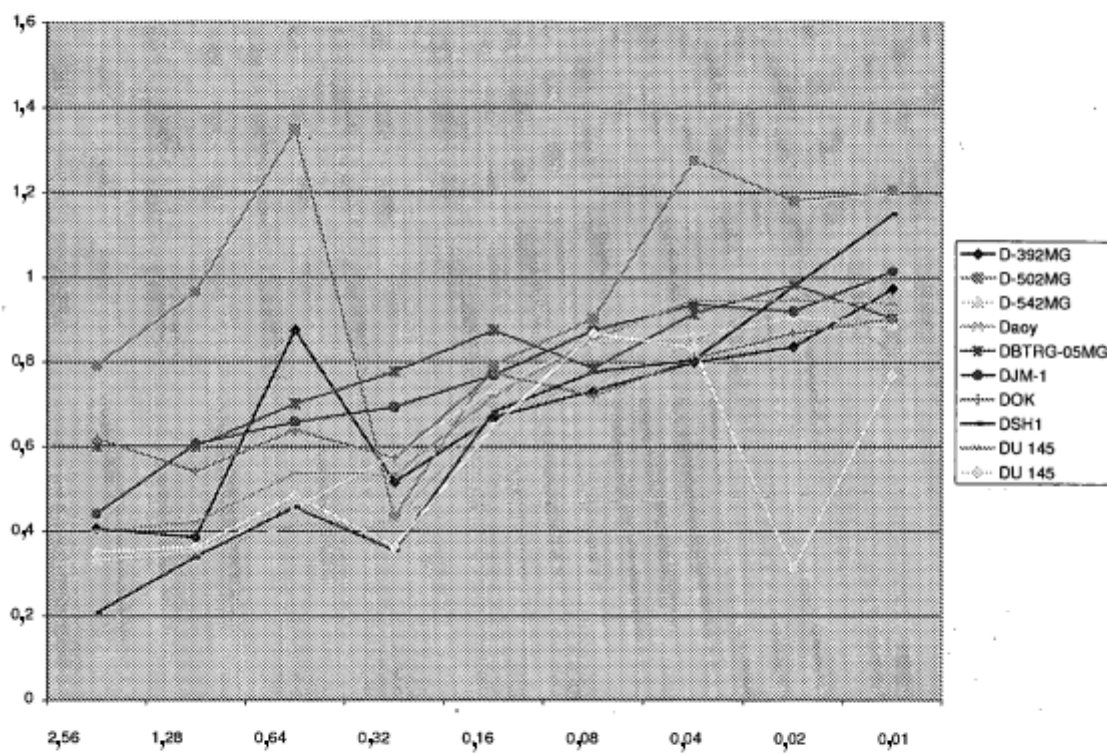


Figura 26

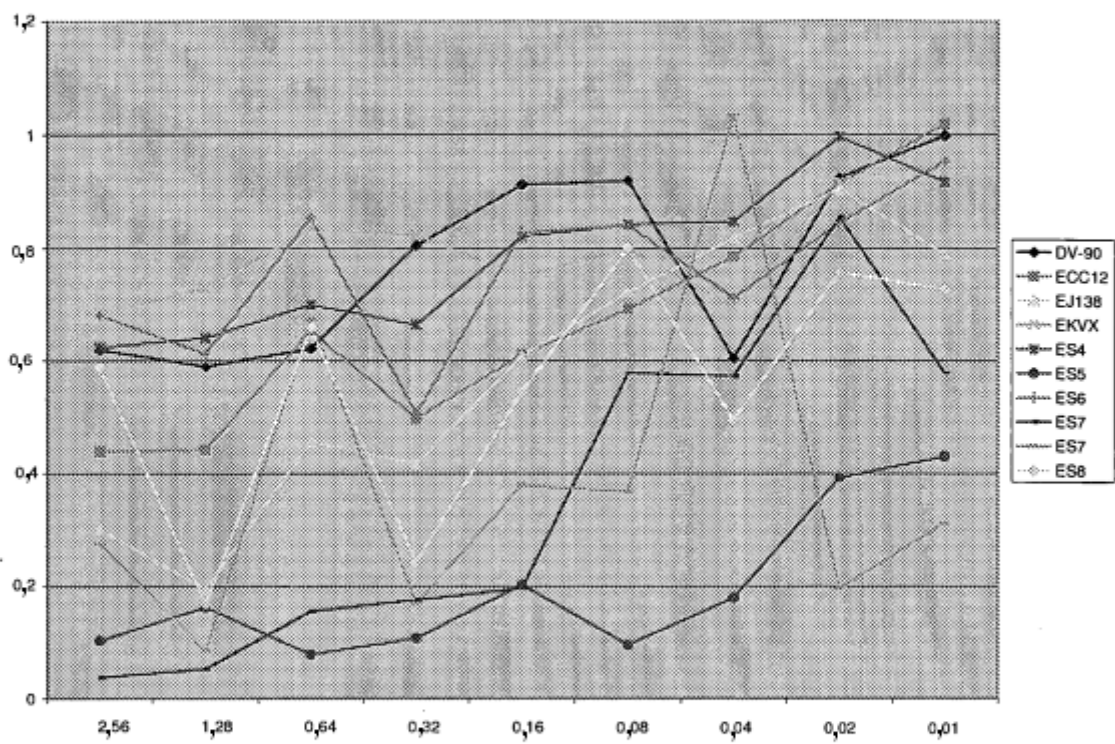


Figura 27

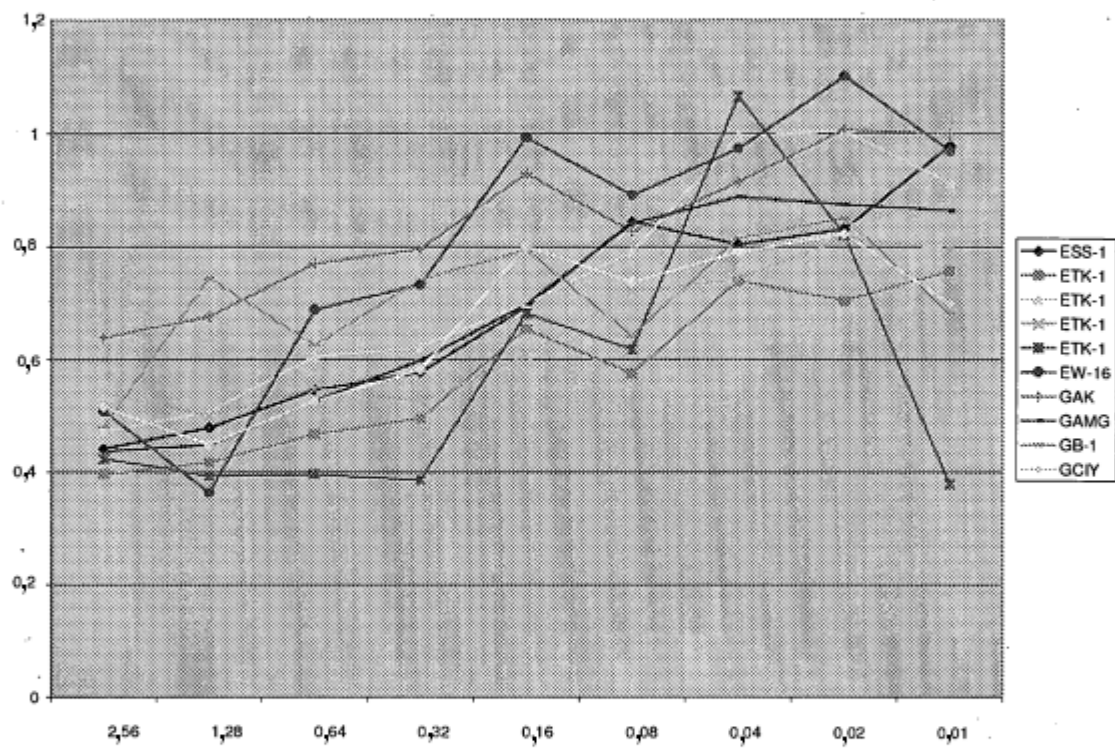


Figura 28

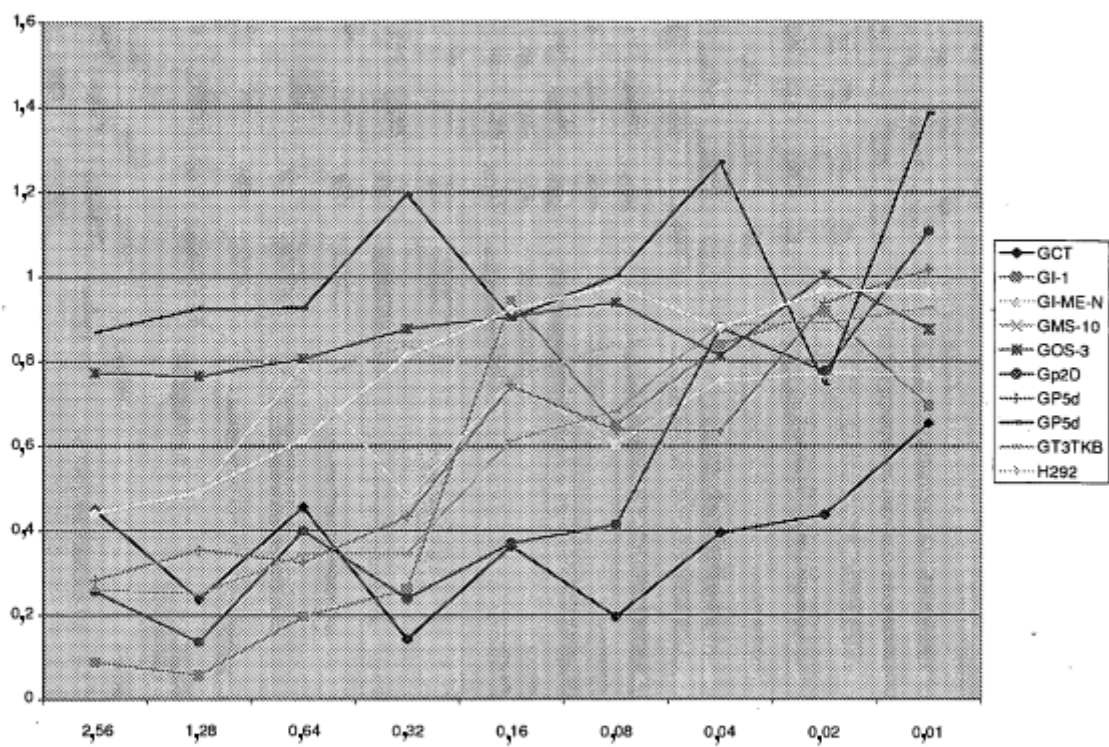


Figura 29

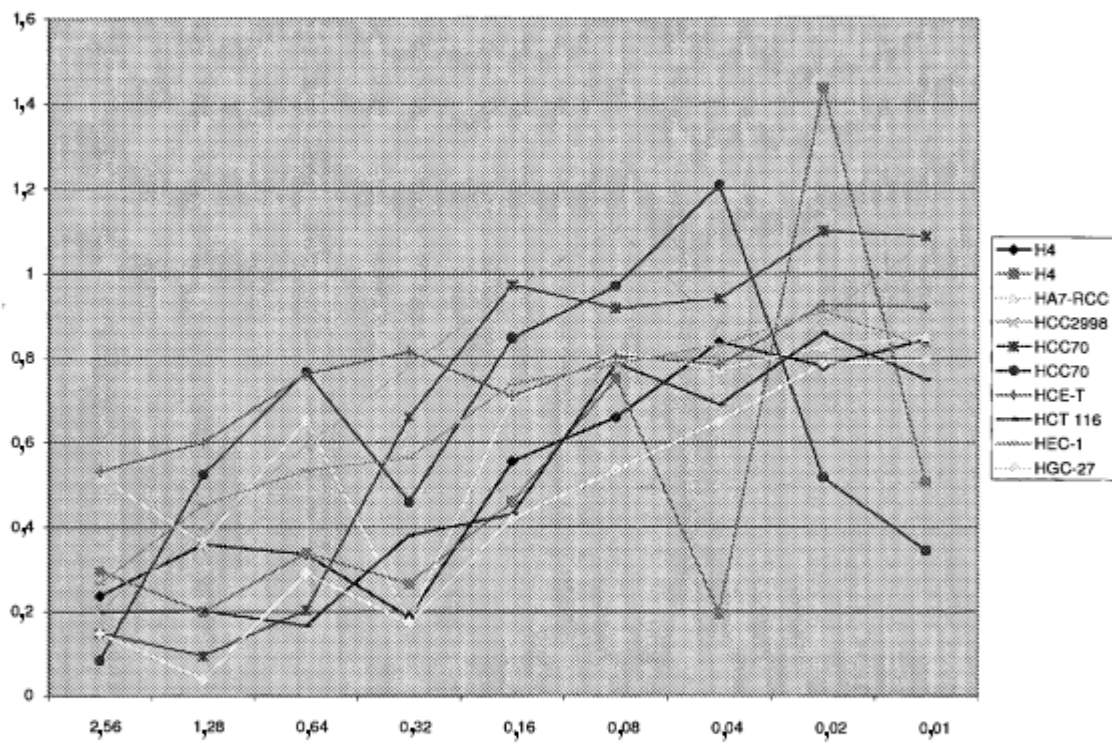


Figura 30

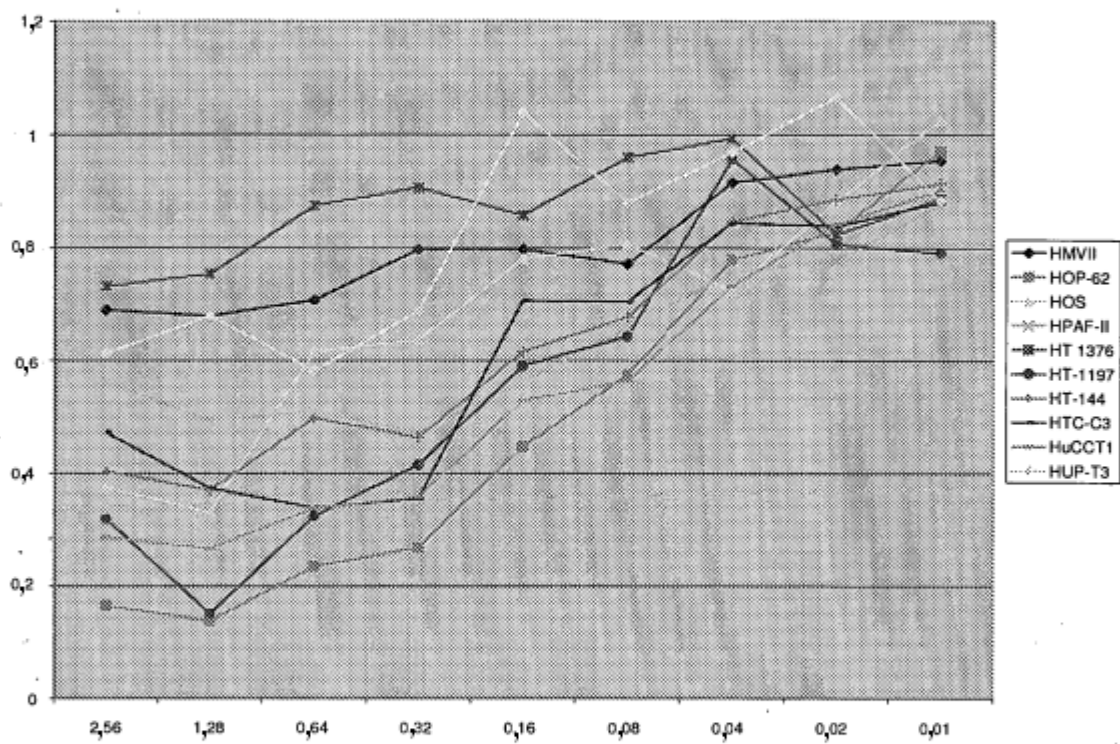


Figura 31

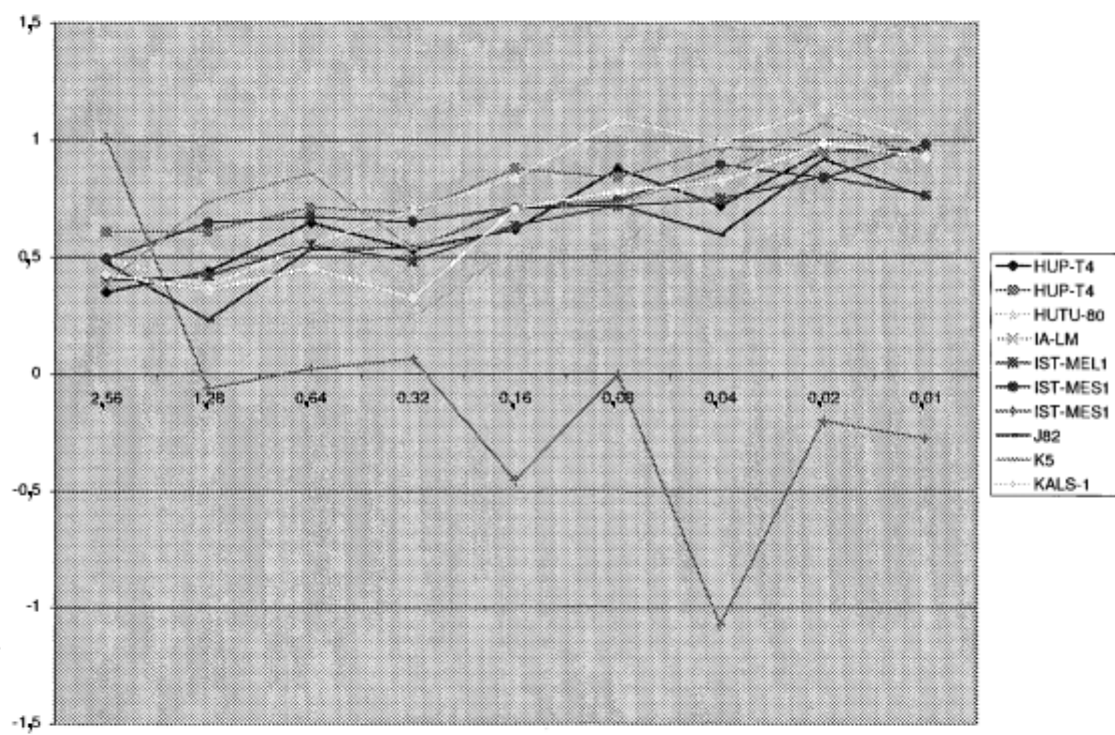


Figura 32

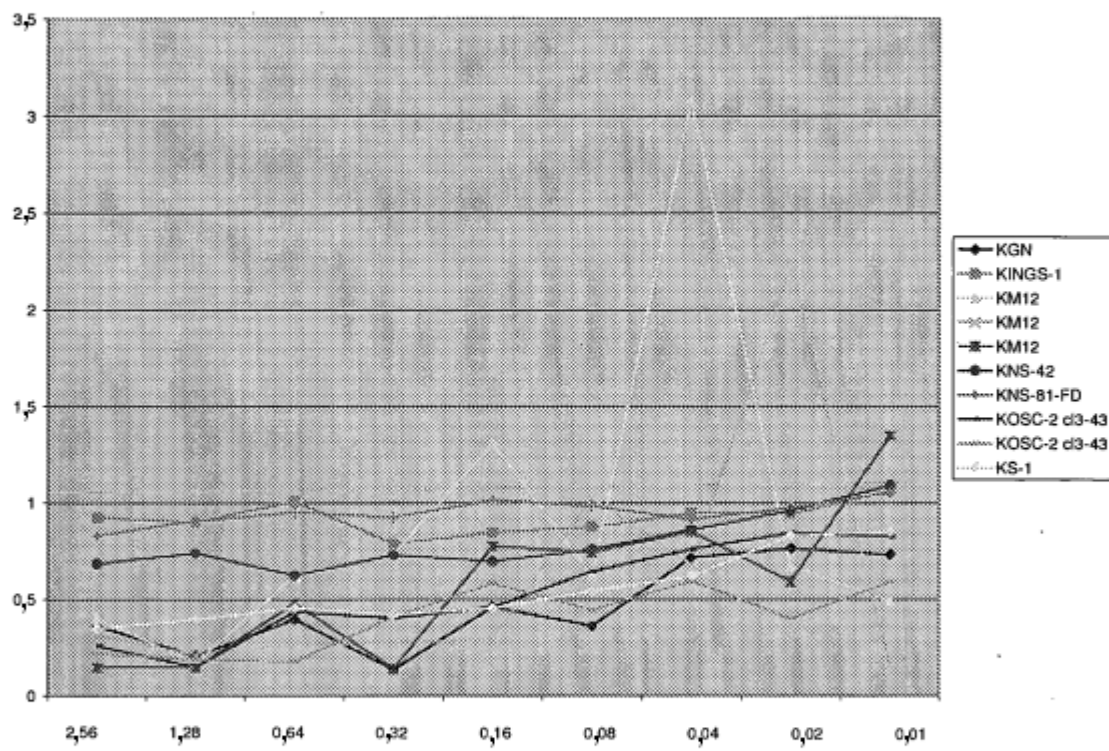


Figura 33

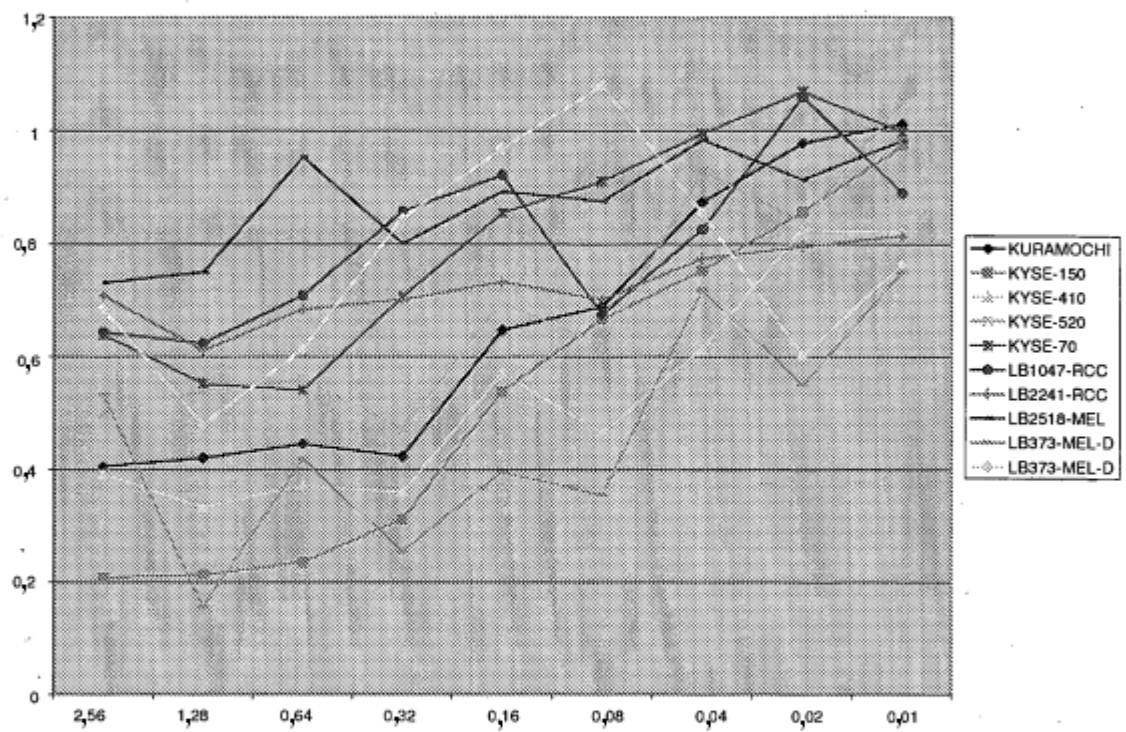


Figura 34

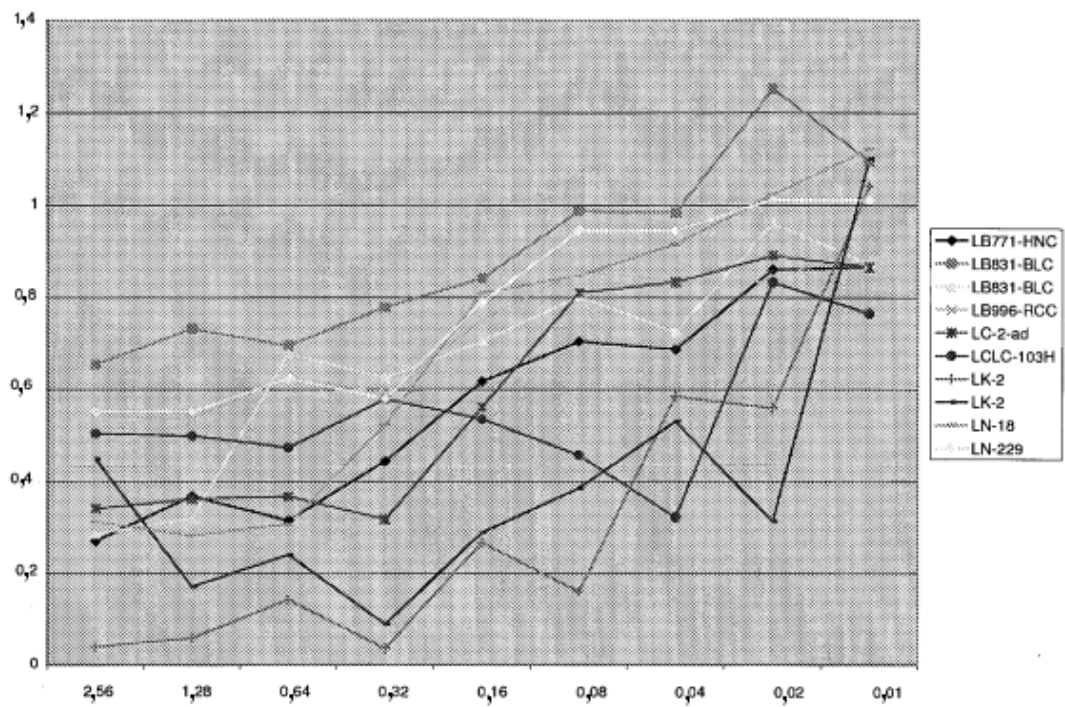


Figura 35

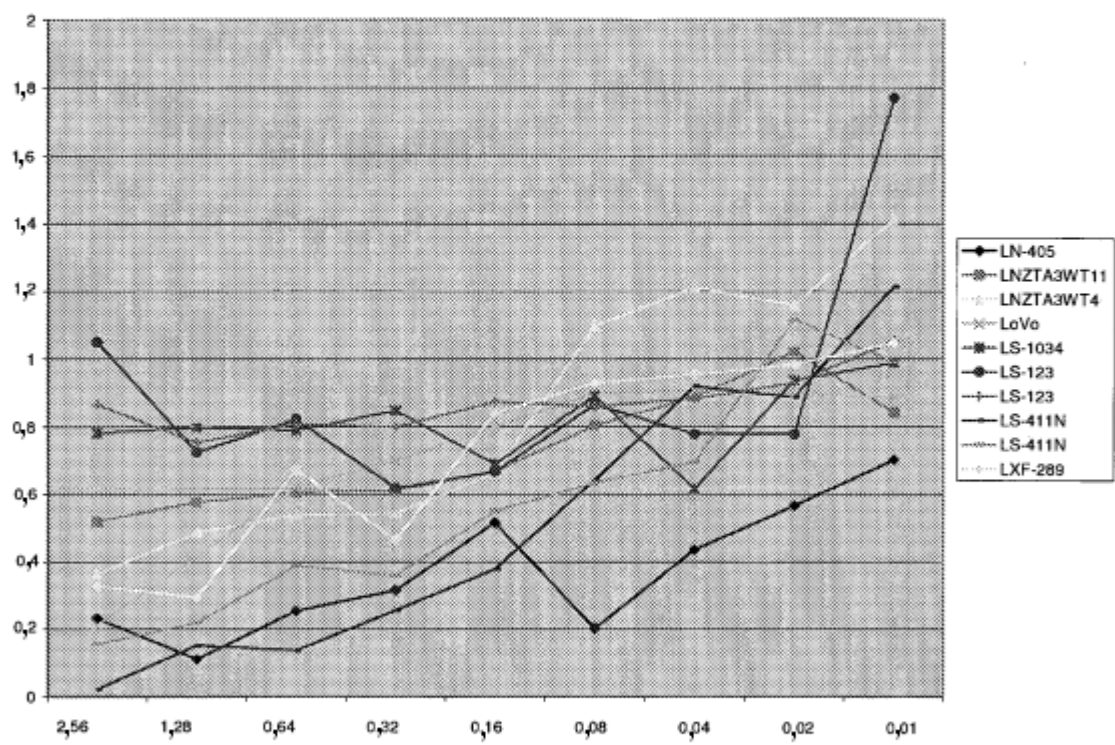


Figura 36

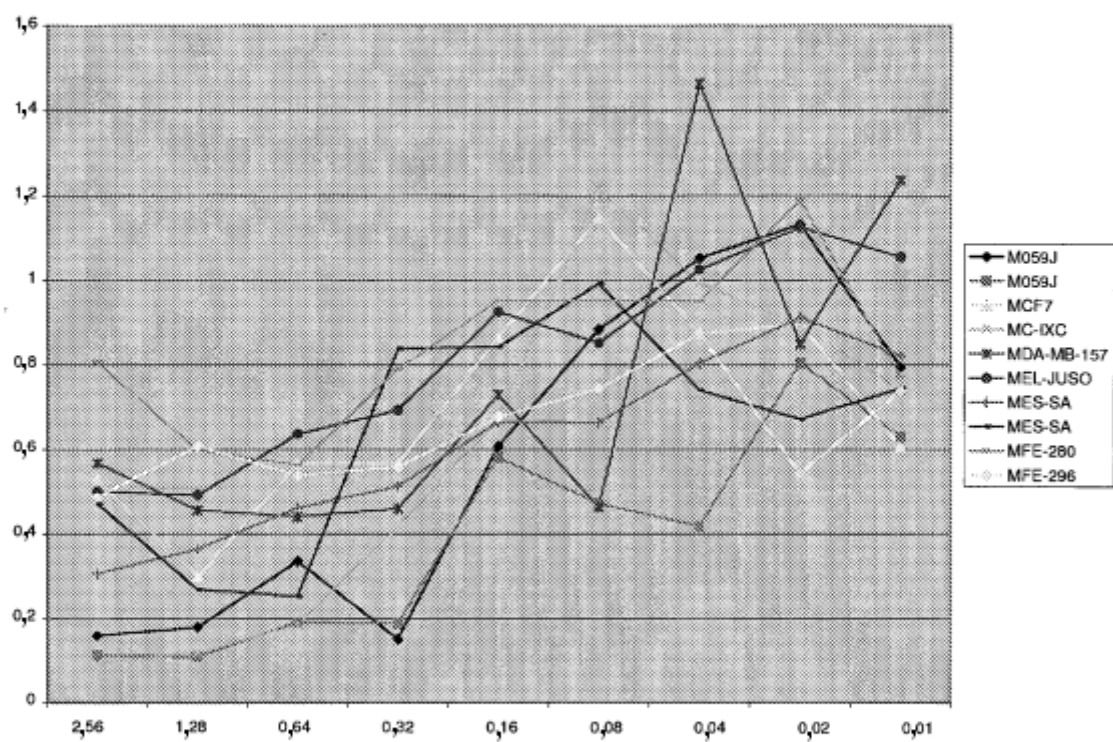


Figura 37

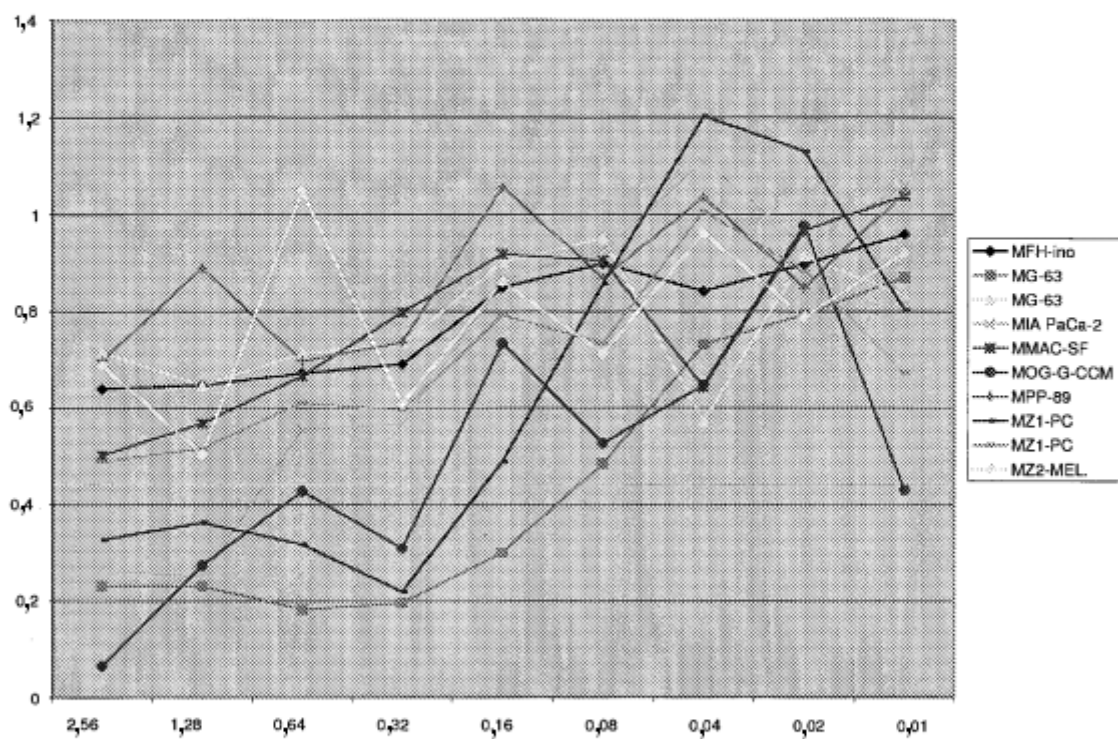


Figura 38

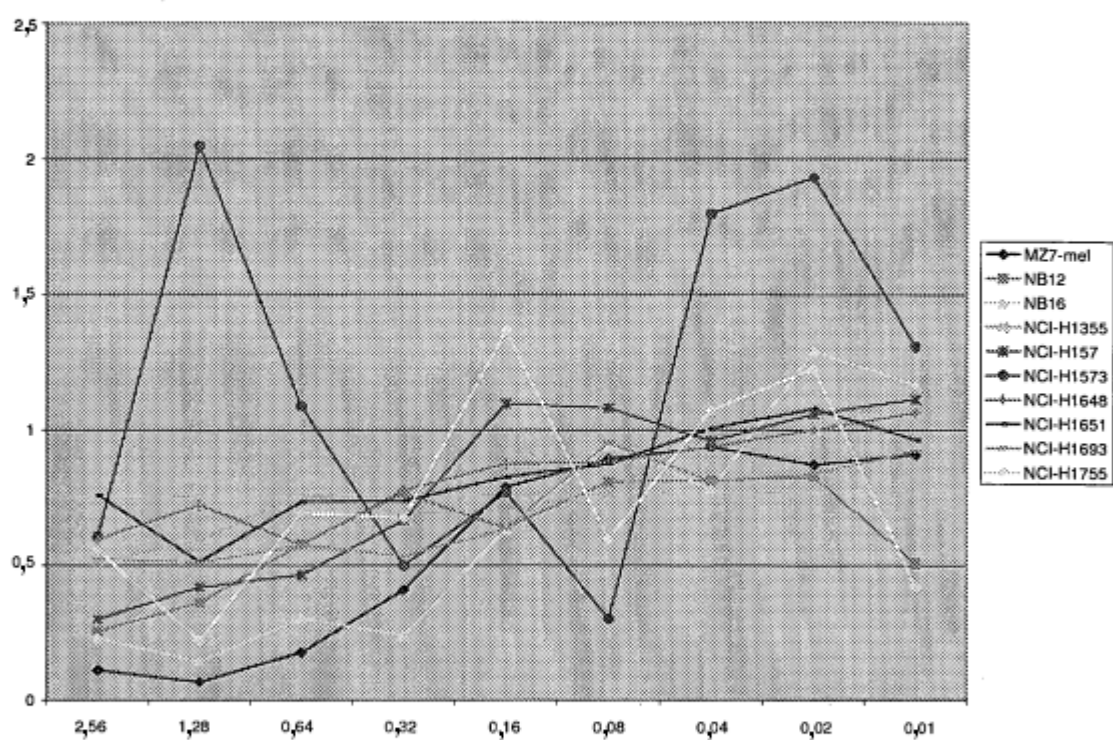


Figura 39

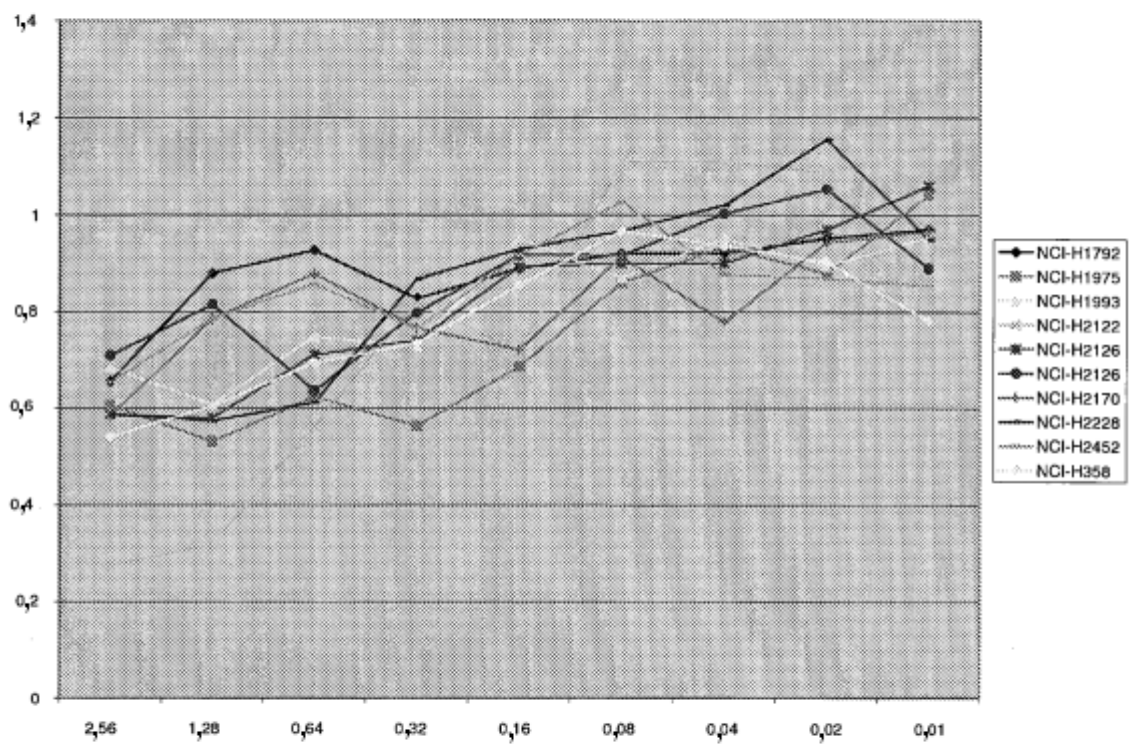


Figura 40

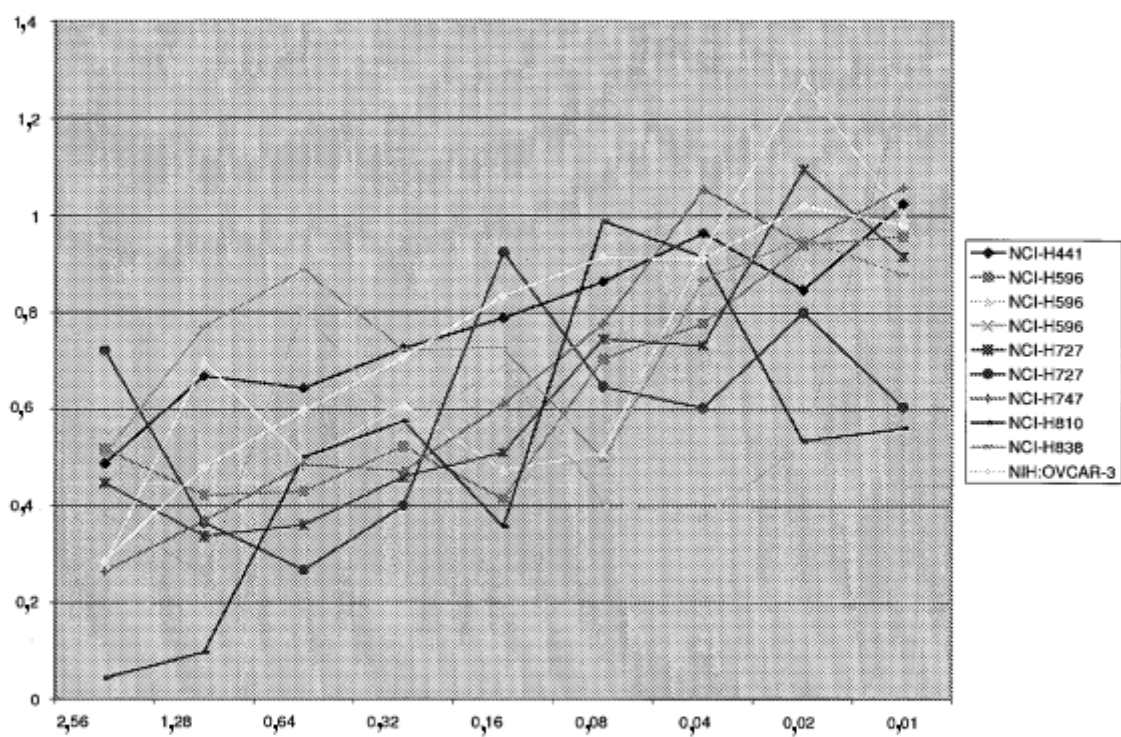


Figura 41

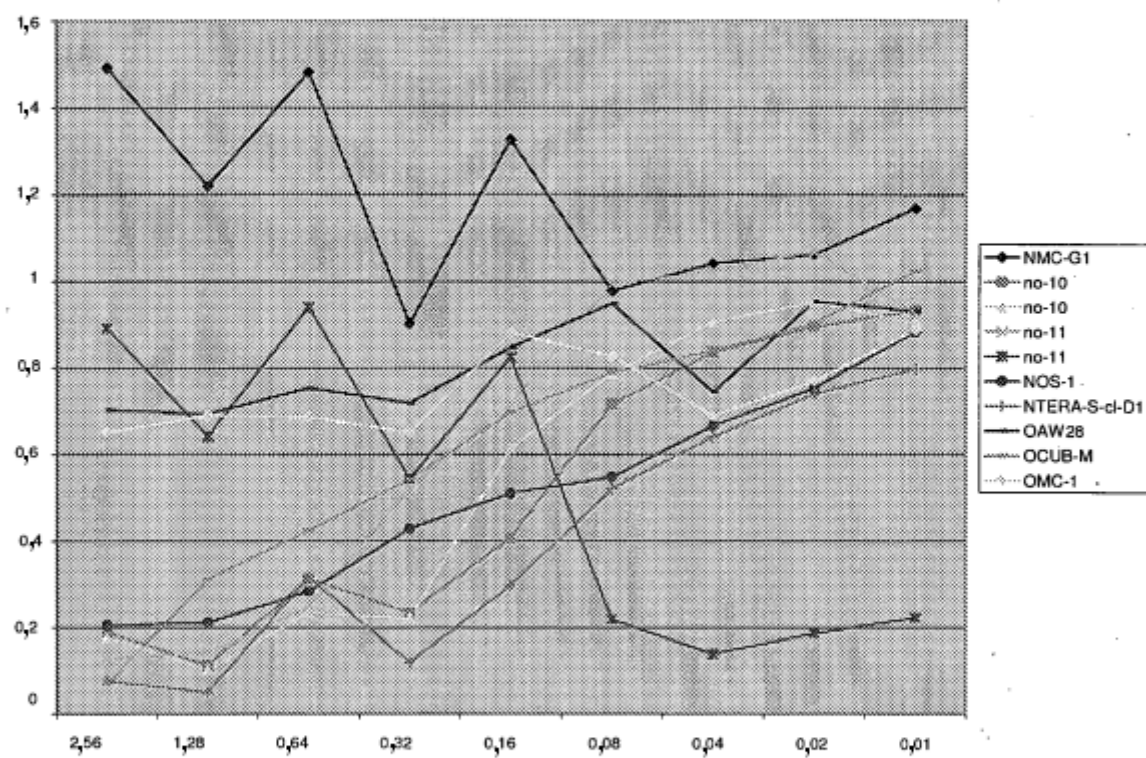


Figura 42

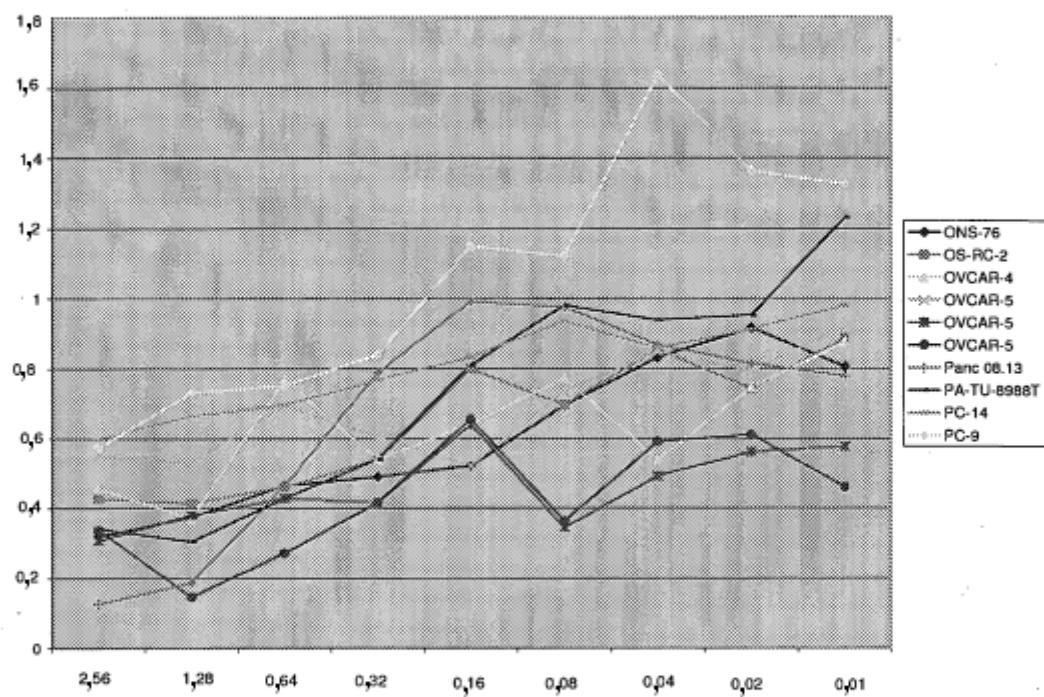


Figura 43

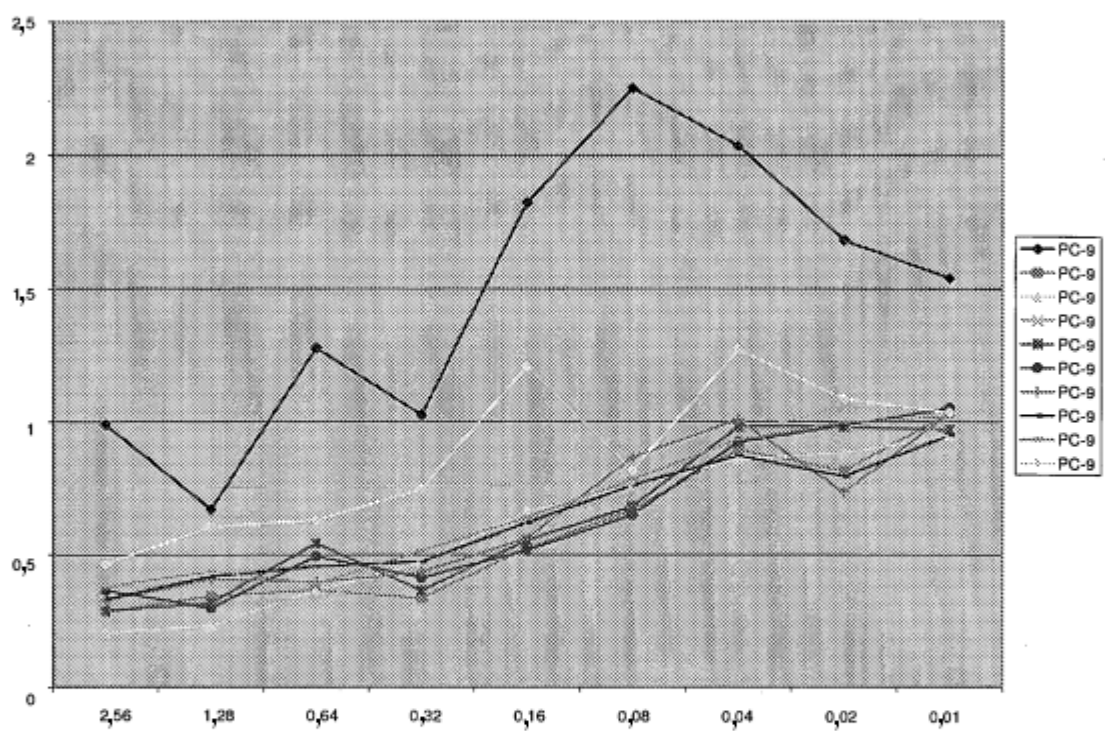


Figura 44

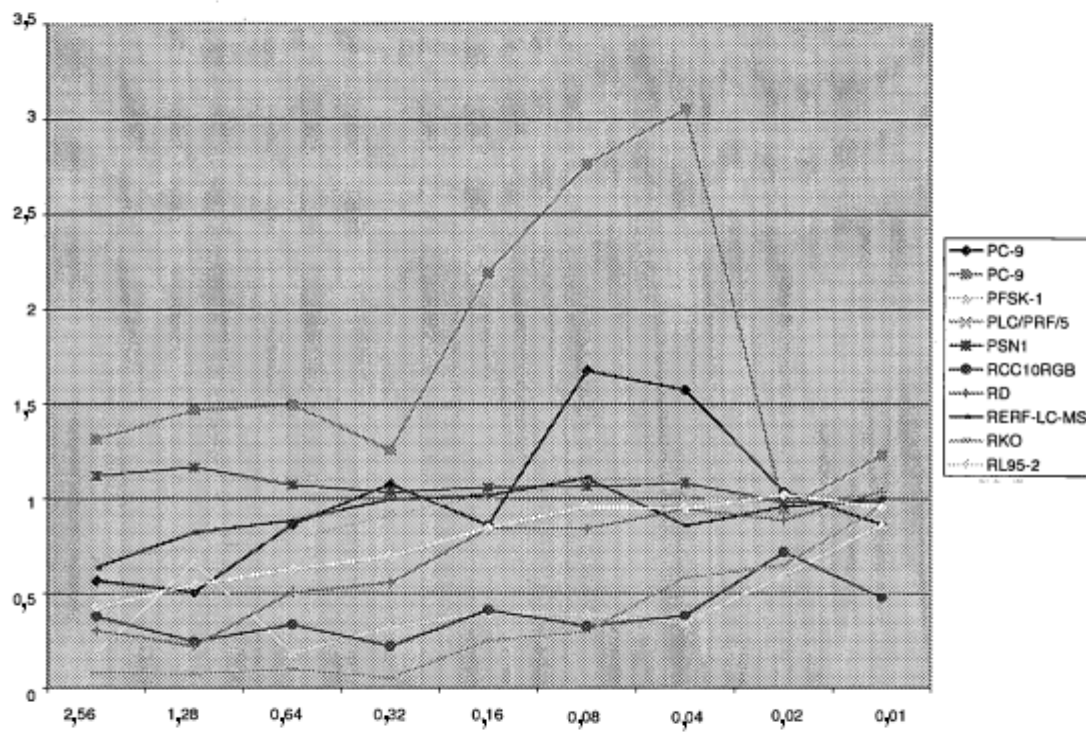


Figura 45

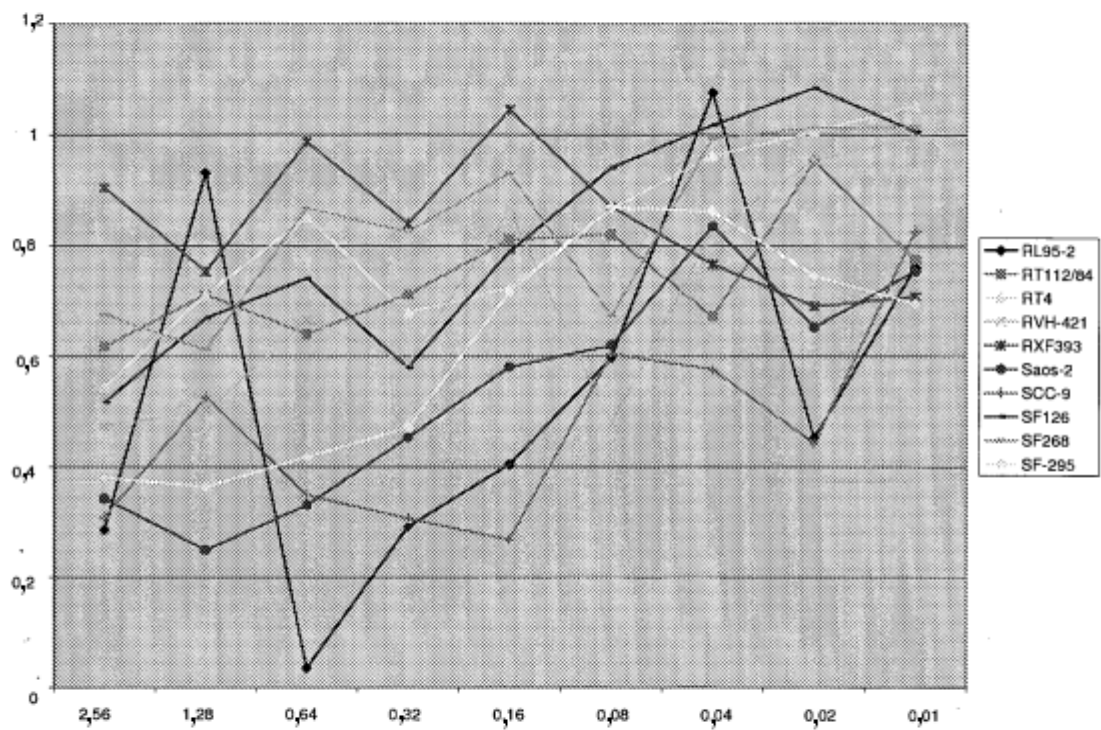


Figura 46

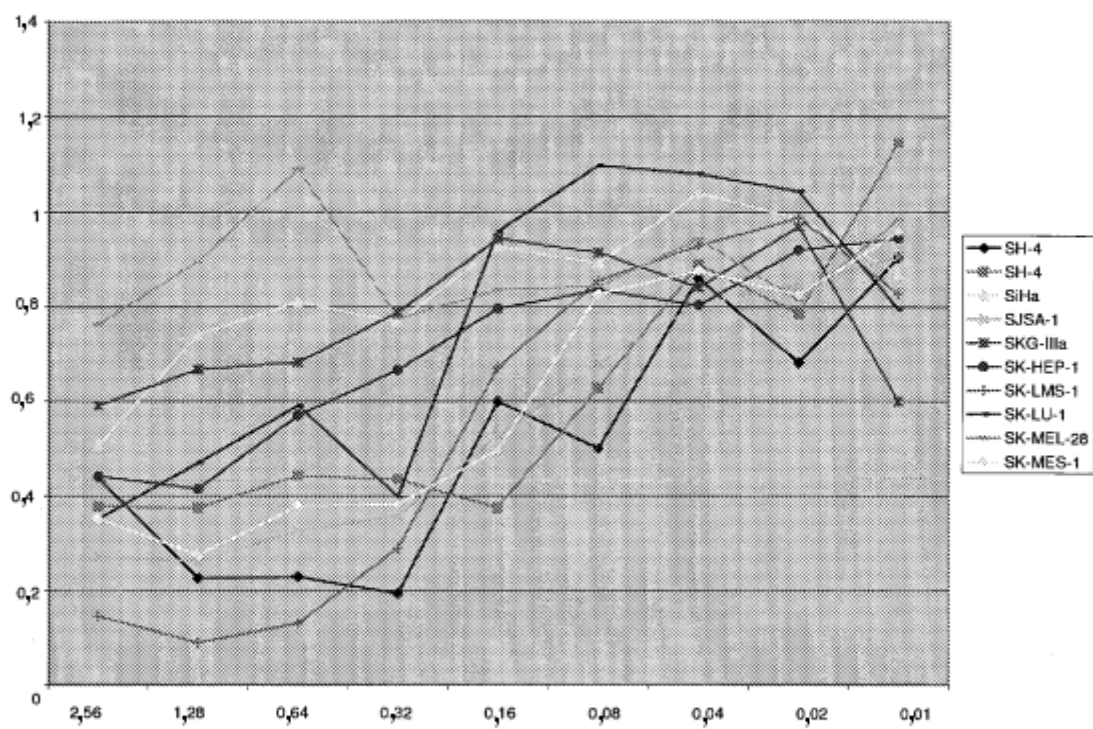


Figura 47

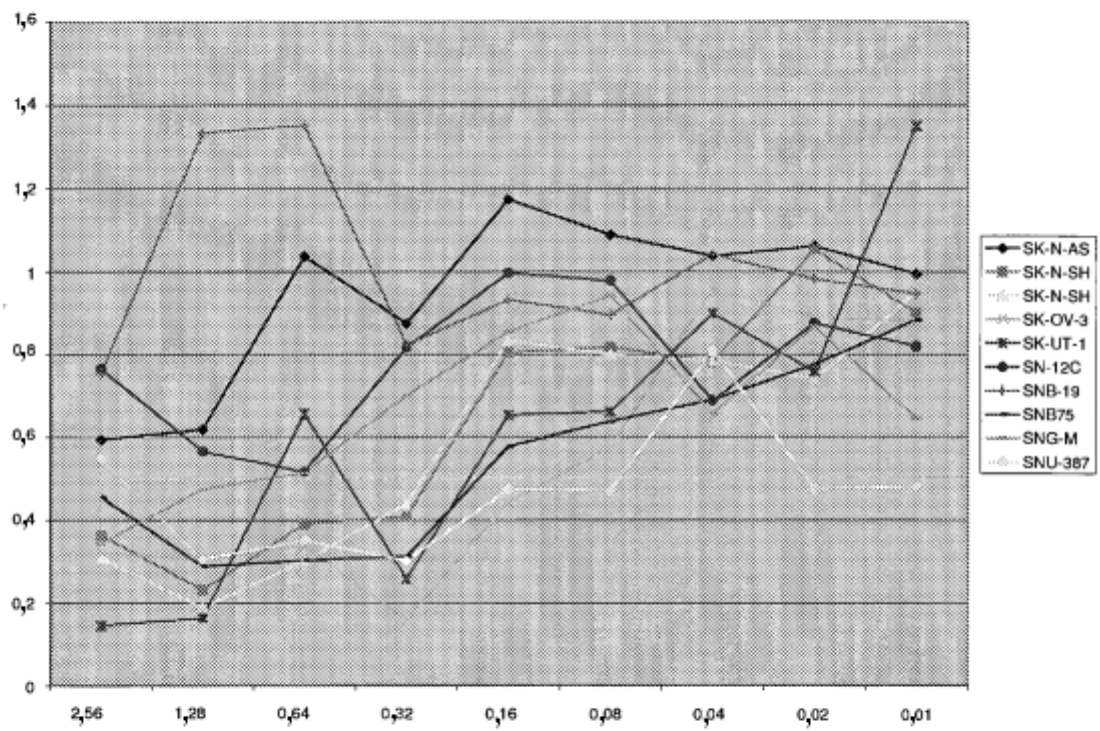


Figura 48

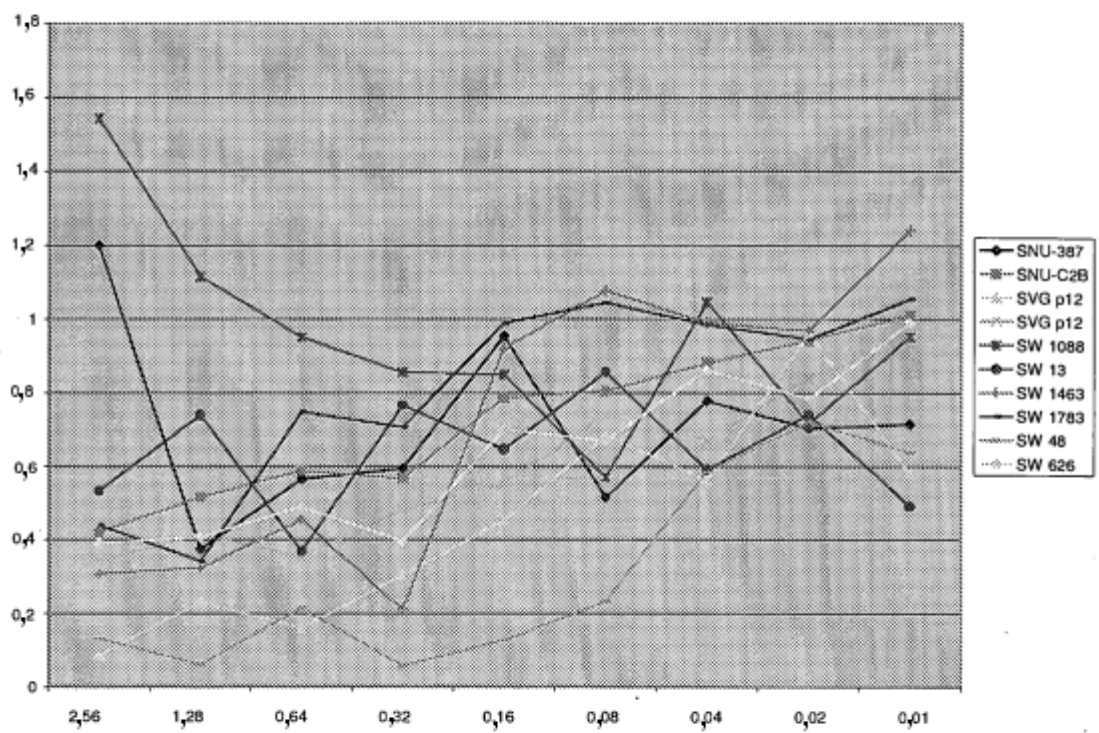


Figura 49

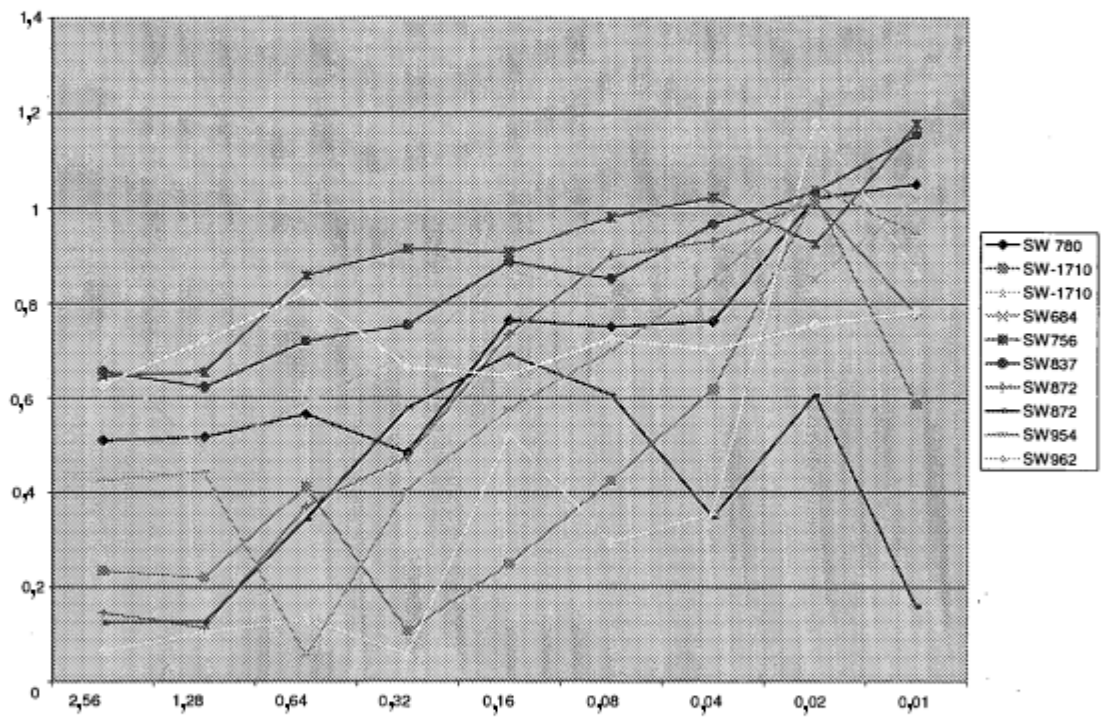


Figura 50

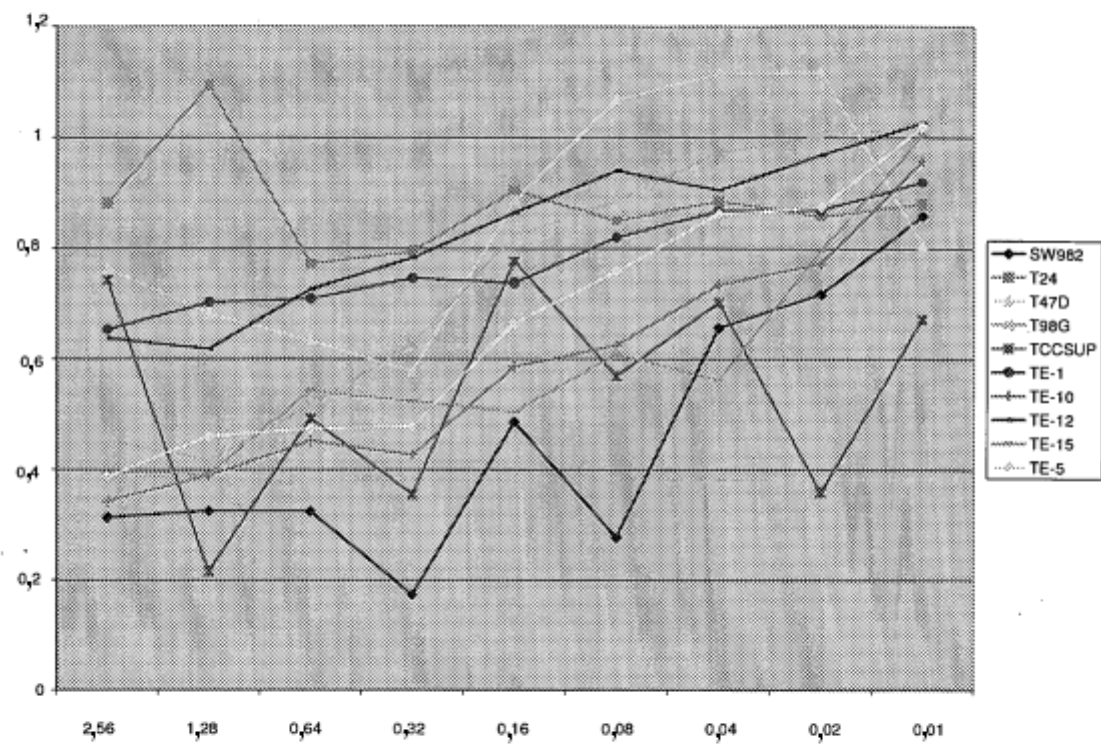


Figura 51

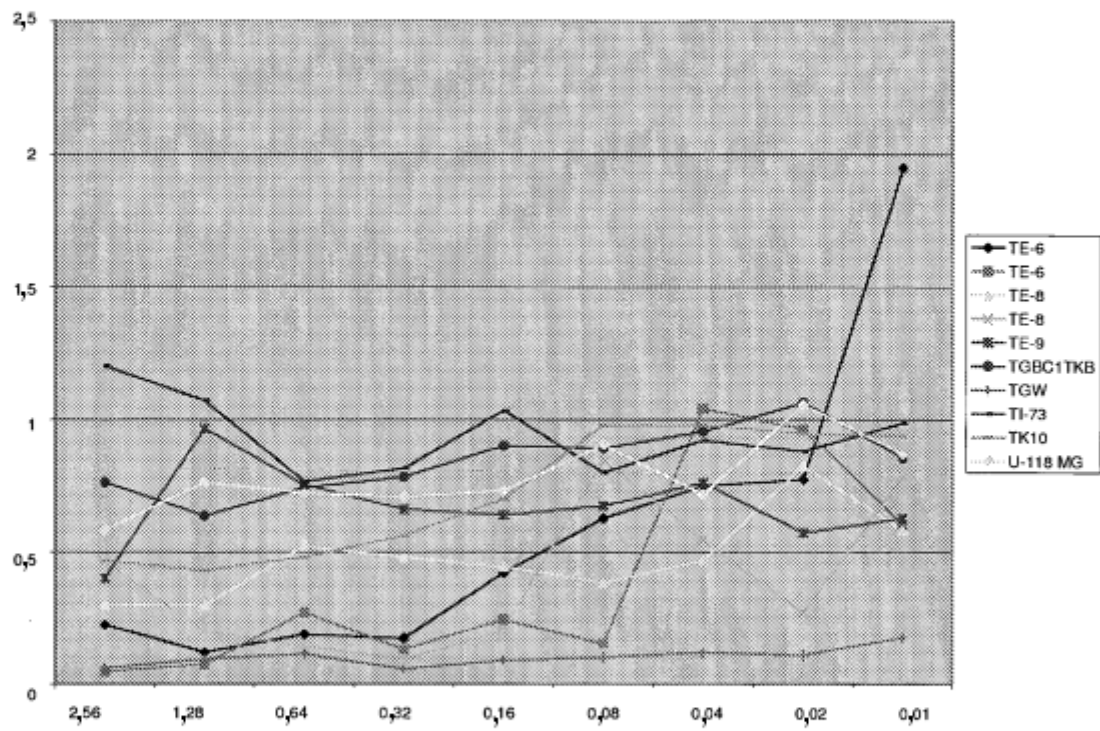


Figura 52

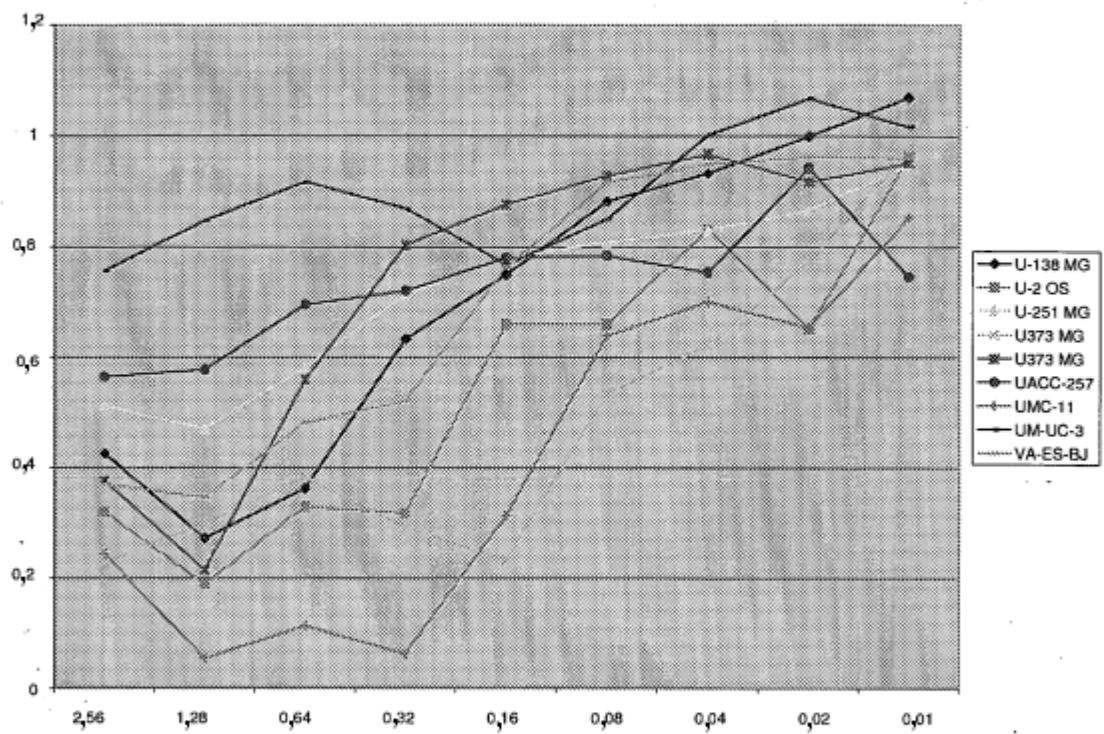


Figura 53

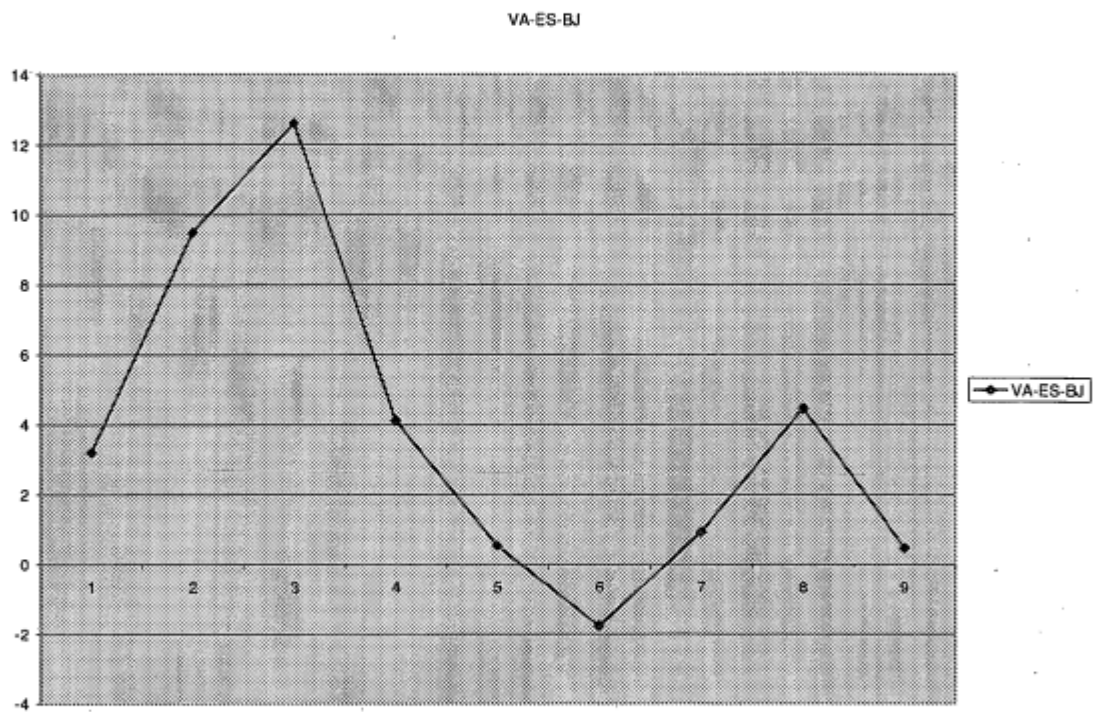


Figura 54

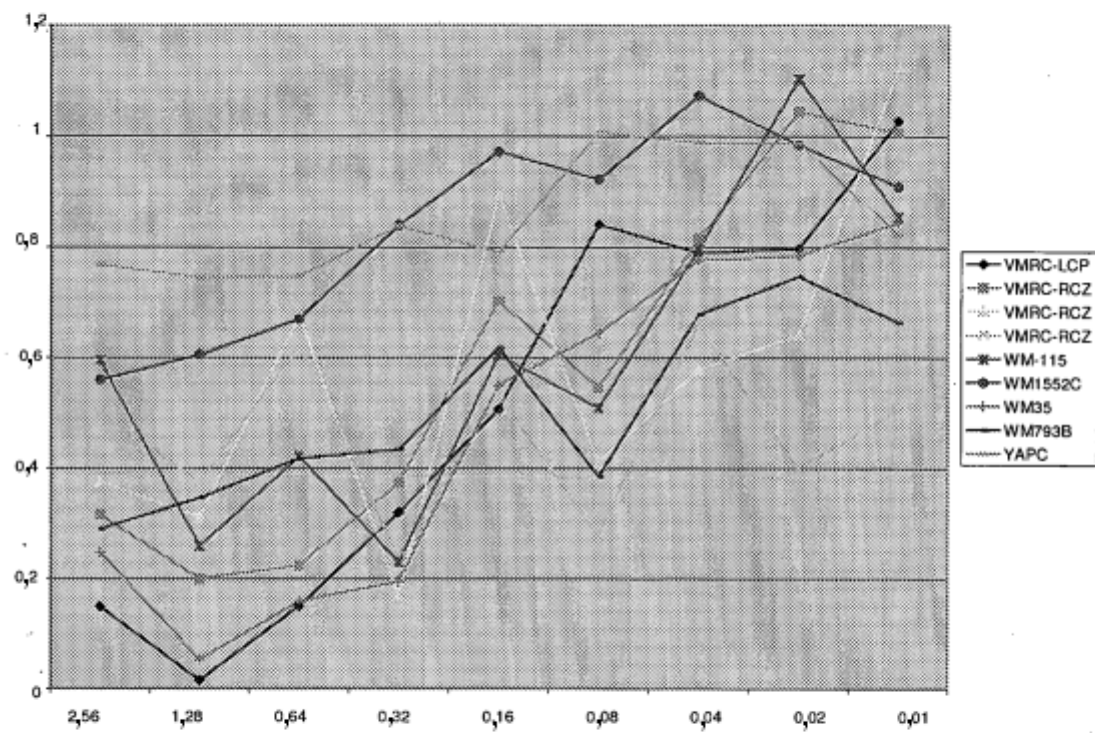


Figura 55

Figura 56A

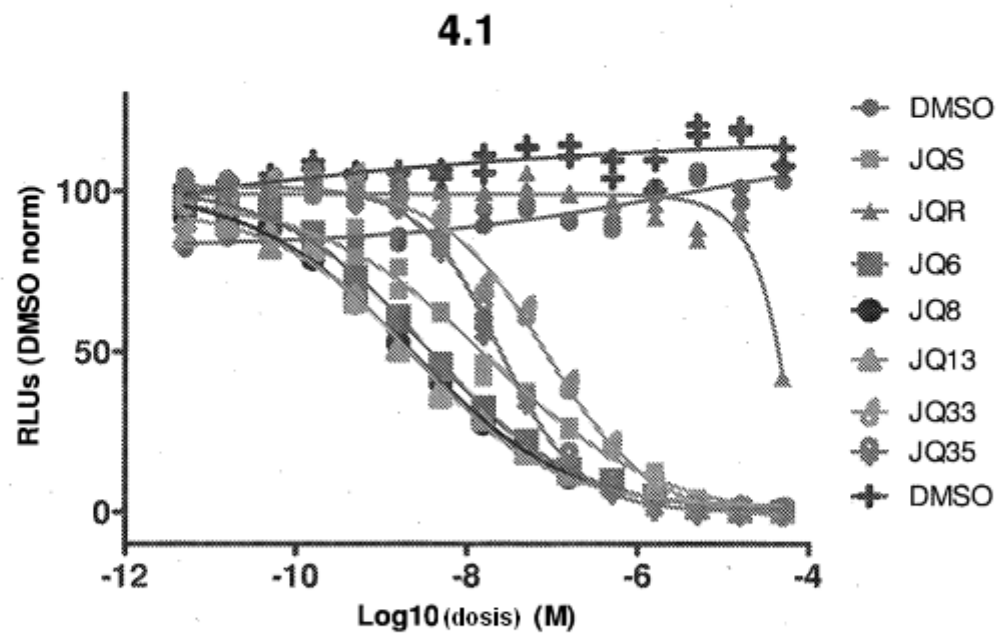
*Con BRD4.1*

Figura 56B

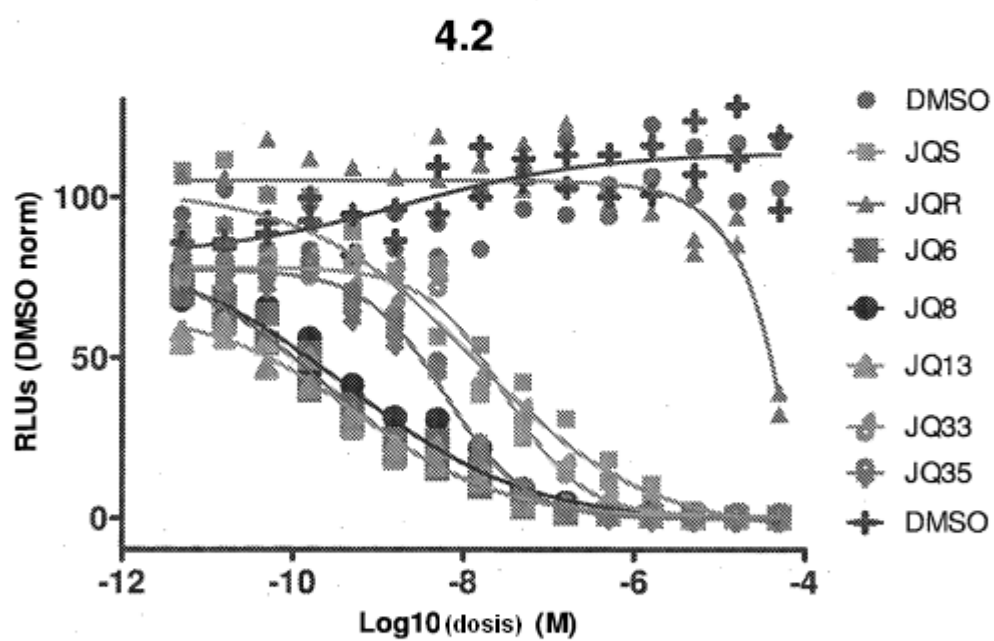
*Con BRD4.2*

Figura 56C

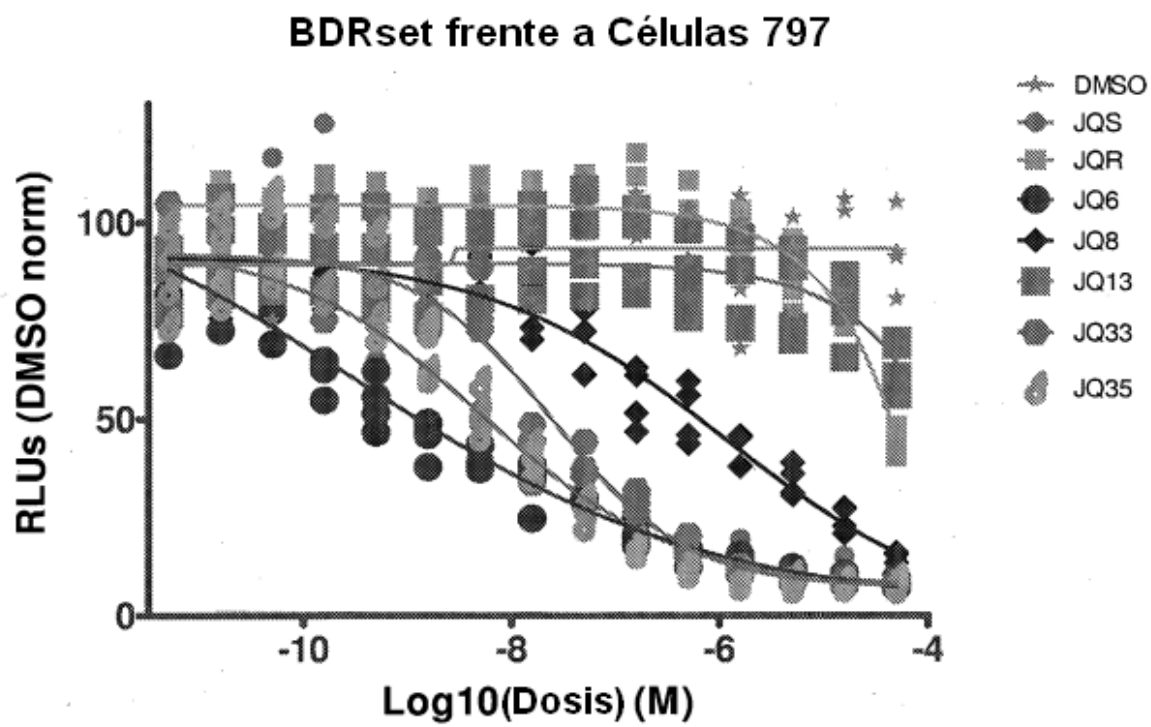
*Con Línea Celular 797*

Figura 56D

*Con Línea Celular 10326*