

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 964**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2010 E 10776336 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2496945**

54 Título: **Procedimiento novedoso**

30 Prioridad:

05.11.2009 GB 0919430
22.02.2010 GB 201002974

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
Corporation Service Company, 2711 Centreville
Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US

72 Inventor/es:

BAMBOROUGH, PAUL y
CHUNG, CHUN-WA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 539 964 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

Procedimiento novedoso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de moléculas pequeñas que inhiben la unión del primer y segundo bromodominios (BD1 y 2, conocidos también como los bromodominios del extremo N y del extremo C) de las proteínas BRD-2 a 4 de la familia BET humana, a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y a su uso en terapia.

Antecedente de la invención

10 Los genomas de organismos eucariotas están muy organizados en el interior del núcleo de la célula. Las largas hebras del ADN dúplex se enrollan alrededor de un octómero de proteínas histona (que comprende más usualmente dos copias de histonas H2A, H2B H3 y H4) para formar un nucleosoma. Después, esta unidad básica se comprime adicionalmente mediante la agregación y el plegamiento de nucleosomas para formar una estructura de cromatina muy condensada. Es posible una variedad de diferentes estados de condensación, y el apretamiento de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el procedimiento de división celular. La estructura de la cromatina tiene una función crítica en la regulación de la transcripción génica, que no se puede producir eficazmente a partir de cromatina muy condensada. La estructura de cromatina está controlada por una serie de modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas histona, de forma notable en las histonas H3 y H4, y de manera más común en las colas de histonas que se extienden más allá del núcleo de la estructura del nucleosoma. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación. Estas marcas epigenéticas son escritas y borradas por enzimas específicas, que colocan las etiquetas en restos específicos de la cola de histona, formando por tanto un código epigenético que la célula interpreta a continuación para permitir la regulación específica del gen de la estructura de cromatina y de esta manera la transcripción.

15 La acetilación de la histona está asociada más normalmente con la activación de la transcripción génica, ya que la modificación suaviza la interacción del ADN y del octómero de histona cambiando las fuerzas electrostáticas. Además de este cambio físico, proteínas específicas se unen a los restos de lisina acetilados en las histonas para leer el código epigenético. Los bromodominios son dominios pequeños (-110 aminoácidos) diferentes de las proteínas que se unen a restos de lisina acetilados de forma habitual pero no exclusiva en el contexto de las histonas. Existe una familia de alrededor de 50 proteínas conocidas por contener bromodominios, y tienen una variedad de funciones en la célula.

20 La familia BET de proteínas que contienen el bromodominio comprende 4 proteínas (BRD-2, BRD-3, BRD-4 y BRD-t) que contienen bromodominios en tándem (BD1 y 2) que se pueden unir a dos restos de lisina acetilados en estrecha vecindad, aumentando la especificidad de la interacción. Se ha notificado que BRD-2 y BRD-3 se asocian a histonas junto con genes que se transcriben activamente y pueden estar implicados en el alargamiento de la transcripción (Leroy y col, Mol. Cell. 2008 30(1):51-60), mientras de BRD-4 parece estar implicado en el reclutamiento del complejo pTEF-B para los genes inducibles, dando como resultado la fosforilación de la ARN polimerasa y un resultado aumentado de la transcripción (Hargreaves y col, Cell, 2009 138(1): 129-145). Se ha notificado también que BRD4 o BRD3 pueden fusionarse con NUT (proteína nuclear del testículo) formando oncogenes de fusión novedosos, BRD4-NUT o BRD3-NUT, en formas muy malignas de neoplasias epiteliales (French y col. Cancer Research, 2003, 63, 304-307 y French y col. Journal of Clinical Oncology, 2004, 22 (20), 4135-4139). Los datos sugieren que las proteínas de fusión BRD-NUT contribuyen a la carcinogénesis (Oncogene, 2008, 27, 2237-2242). BRD-t se expresa únicamente en los testículos y los ovarios. Se ha notificado que todos los miembros de la familia ejercen alguna función de control o ejecución de aspectos del ciclo celular, y se ha mostrado que permanecen en el complejo con cromosomas durante la división celular -sugiriendo un papel en el mantenimiento de la memoria epigenética. Además, algunos virus utilizan estas proteínas para vincular sus genomas a la cromatina de la célula hospedadora como parte del procedimiento de la replicación vírica (You y col Cell, 2004 117(3):349-60).

25 Umehara y col resolvieron la estructura cristalina mediante rayos X de BD1 de BRD-2 humano cuando se une a un resto lisina con histona acetilada (Banco de datos cristalográfico de proteínas, entrada 2dvq) y demostraron que el resto lisina acetilado acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH2 de la cadena secundaria de ASN 156 y acepta también un enlace de hidrógeno procedente de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria de TYR113. Dichos autores también predijeron los restos de aminoácidos que definen la bolsa de reconocimiento de la acetil lisina del primer bromodominio (BD1) de BRD-2 humano (documento JP2008-156311, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)). Los inventores han identificado ahora moléculas pequeñas que inhiben la unión de BD1 y 2 de las proteínas BRD-2 a 4 de la familia BET humana a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas. Los estudios mediante cristalografía de rayos X de estas moléculas, cuando se unen a estos bromodominios de BET, han permitido a los inventores identificar retrospectivamente los sitios de unión clave implicados en esta interacción. Esta información se puede usar en el diseño lógico de fármacos de pequeñas moléculas adicionales que pueden inhibir la unión del primer y/o segundo bromodominio de BRD2 a 4 humano, a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la identificación de moléculas pequeñas, especialmente en compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750, que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominio de BRD-2 a 4 humano a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

- 5 a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

o

- 10 b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

- 15 c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5Å de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

A partir de una comparación de las secuencias de aminoácidos de los bromodominios de la familia BET humana (Figura 1), una persona experta en la materia apreciará que los restos que se muestran en la Tabla 1 son equivalentes. Esto puede observarse también mediante comparación de las estructuras cristalinas publicadas de los bromodominios BRD-2, BRD-3 y BRD-4, ya que todos se han resuelto. Véase Nakamura y col. (J. Biol. Chem. 2007, 282, 4193-4201) para una descripción de la estructura del bromodominio D1 de BRD-2, y también las entradas del banco de datos cristalográficos de proteínas para D1 de BRD-2 (1x0j, 2cvq, 2drv, 2dvs, 2dvq), D2 de BRD-2 (2dvv, 2e3k), D1 de BRD-3 (2nxb), D2 de BRD-3 (2oo1), D1 de BRD-4 (2oss) y D2 de BRD-4 (2ouo, 2dww).

Tabla 1

| | BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| a | TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| b | PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| c | TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |
| d | ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |
| e | ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| f | ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| g | MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

25

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Alineamiento de secuencias de los bromodominios humanos BRD-2, BRD-3 y BRD-4. Se han extraído los bromodominios de las secuencias y se han alineado entre sí. El primer resto de cada línea se numera de acuerdo con la entrada en la base de datos de secuencias Swissprot (entradas P25440, BRD-2_HUMAN; Q15059, BRD-3_HUMAN; 060885, BRD-4_HUMAN). Se marcan a continuación los restos clave: a=Trp97, b=Pro98, c=Tyr113, d=Asn156, e=Asp161, f=Ile162, g=Met165 (restos D1 de BRD-2 y numeración). Tal como se muestra, la posición a es un triptófano conservado; la posición b es una prolina conservada; la posición c es una tirosina conservada; la posición d es una asparagina conservada; la posición e es ácido aspártico o ácido glutámico; la posición f es isoleucina o valina, y la posición g es una metionina conservada.

5 SEC ID N°: 1 es BRD-2_D1

 SEC ID N°: 2 es BRD-3_D1

 SEC ID N°: 3 es BRD-4_D1

 SEC ID N°: 4 es BRD-2_D2

 SEC ID N°: 5 es BRD-3_D2

15 SEC ID N°: 6 es BRD-4_D2

Figura 2: Representación gráfica del compuesto (I) cuando se une a BD1 de BRD-2.

Figura 3: Representación gráfica del compuesto (I) cuando se une a BD1 de BRD-4.

Figura 4: Representación gráfica del compuesto (I) cuando se une a BD2 de BRD-4.

Figura 5: Representación gráfica del compuesto (II) cuando se une a BD1 de BRD-2.

20 Figura 6: Representación gráfica del compuesto (II) cuando se une a BD2 de BRD-2.

Figura 7: Superposición de estructuras cristalinas de rayos X de los compuestos (I) (representado gráficamente como bolas y bastones) y (II) (representado gráficamente como bastones) cuando se une a BD1 de BRD-2, que muestra los compuestos que aceptan un enlace de hidrógeno desde la cadena secundaria de NH₂ de ASN156 y la formación de una interacción de Van der Waals con una región lipófila en la bolsa de unión formada por los restos TRP97, PRO98, ASP161, ILE 162 y MET165 (indicados por círculos punteados).

25 Figura 8: Superposición de estructuras cristalinas mediante rayos X del compuesto (I) (representada gráficamente como bolas+bastones) cuando se une a BD2 de BRD-4 y un compuesto (II) (representado gráficamente como bastones) cuando se une a BD2 de BRD-2 que muestran los compuestos que aceptan un enlace de hidrógeno procedente de una molécula de agua que está unida a su vez a mediante un enlace de hidrógeno a un hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en la posición 386 de BD2 de BRD-2 o en la posición 390 equivalente de BD2 de BRD-4, y formando una interacción de van der Waals con una región lipófila en la bolsa de unión formada por los restos TRP370, PRO371, ASP434, VAL435 y MET438 en BD2 de BRD-2 o los restos TRP374 equivalentes, PRO375, GLU438, VAL439 y MET442 en BD2 de BRD-4 (indicado por círculos punteados).

Figura 9: Representación gráfica del compuesto (III) cuando se une a BD1 de BRD-2.

35 Figura 10: Representación gráfica del compuesto (IV) cuando se une a BD1 de BRD-2.

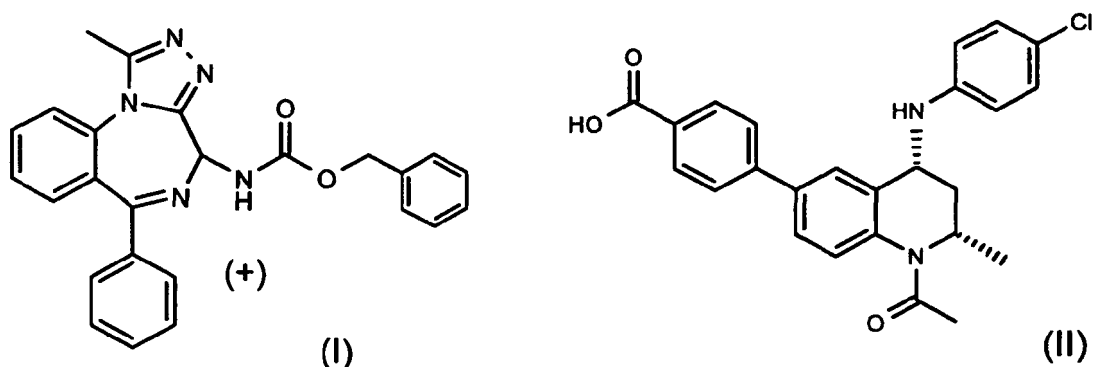
Figura 11: Superposición de estructuras cristalinas de rayos X de los compuestos (II) (representado gráficamente como bolas y bastones) y (IV) (representado gráficamente como bastones) cuando se une a BD1 de BRD-2, que muestra los compuestos que aceptan un enlace de hidrógeno desde la cadena secundaria de NH₂ de ASN156 y la formación de una interacción de Van der Waals con una región lipófila en la bolsa de unión formada por los restos TRP97, PRO98, ASP161, ILE 162 y MET165 (indicados por círculos punteados).

40

Descripción detallada de la invención

Se ha mostrado a través de estudios quimioproteómicos posteriores que un pequeño grupo de moléculas que tienen un interesante pero no explicado perfil biológico antiinflamatorio determinado mediante técnicas farmacológicas clásicas se unen a regiones de los bromodominios de las proteínas de la familia BET humana.

45 Por lo tanto, se han identificado compuestos novedosos que pertenecen a dos clases estructurales diferentes que inhiben la unión del primero y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas (denominados a partir de ahora en el presente documento, inhibidores de bromodominios). Los ejemplos de estos inhibidores de bromodominios incluyen:



5 Cuando se evalúan en un Ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia, ambos compuestos (I) y (II) anteriores demostraron una $pCI_{50} \geq 6,0$ en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4. Los análisis de las estructuras mediante cristalografía de rayos X de estos inhibidores de bromodominios, cuando se unen a estos bromodominios de BET, han permitido a los inventores identificar retrospectivamente los sitios de unión clave implicados en esta interacción.

En particular, se obtuvieron estructuras cristalinas mediante rayos X del compuesto (I) unido a BD1 de BRD-2, BD1 de BRD-4 y BD2 de BRD-4, y del compuesto (II) unido a BD1 y BD2 de BRD-2. Estas proporcionan en cada una de las Figuras 2 a 6 siguientes.

10 La comparación de estas estructuras cristalinas indicó que los compuestos (I) y (II) estructuralmente no relacionados interactúan con la bolsa de unión a la lisina acetilada clave de BRD-2 y 4 de la misma manera, imitando la red de enlaces de hidrógeno realizada normalmente por el resto lisina acetilado de los péptidos de histona en esta bolsa. Una interacción fue con el grupo NH₂ de la cadena secundaria de un resto asparagina. Los compuestos (I) y (II) interactuaron también con un hidroxilo de la cadena secundaria de un resto tirosina *mediante* una molécula de agua intermedia. Por ejemplo, ambos compuestos (I) y (II) aceptaron un enlace de hidrógeno desde el grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en la posición 156 en BD1 de BRD-2 (véanse las Figuras 2, 5 y 7). Ambos compuestos (I) y (II) aceptaron también un enlace de hidrógeno desde una molécula de agua que estaba unida a su vez mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria de un resto tirosina que se encuentra en la posición 390 de BD2 de BRD-4 y la posición 386 equivalente de BD2 de BRD-2 (véanse las Figuras 4, 6 y 8).

La comparación adicional entre las diferentes estructuras cristalinas obtenidas condujo a la identificación de una tercera interacción conservada entre los compuestos (I) y (II) estructuralmente no relacionados y las proteínas BRD-2 y 4. Se ha descubierto que cada uno de los compuestos (I) y (II) interactúan con una bolsa de unión adicional formada parcialmente por restos del bucle ZA de la proteína del bromodominio, y parcialmente por restos que se encuentran en el extremo N de la hélice αC (véase Nakamura y col., J. Biol. Chem. 2007, 282, 4193-4201 para las definiciones). La identidad de estos restos en cada bromodominio es como se relaciona en la Tabla 2.

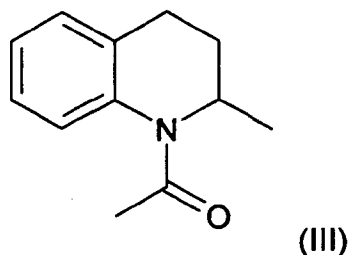
Tabla 2 - Restos que corresponden a la bolsa de unión

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

30 Por ejemplo, ambos compuestos (I) y (II) formaron una interacción de Van der Waals con una región lipófila en esta bolsa de unión en la que uno o más átomos pesados del compuesto se encuentran a una distancia de 5 Å de cualquiera de los átomos pesados de los restos TRP97 del bromodominio, PRO98, ASP161, ILE 162 o MET165 de BD1 de BRD-2 (véase la Figura 7).

35 En particular, ambos compuestos (I) y (II) formaron una interacción de Van der Waals con una región lipófila en el interior de esta bolsa de unión en la que uno o más átomos pesados del compuesto se encuentran a una distancia de 7,5 Å de al menos un átomo pesado de cada uno de PRO98, ASP161 e ILE162 de BD1 de BRD-2 (véase la Figura 7).

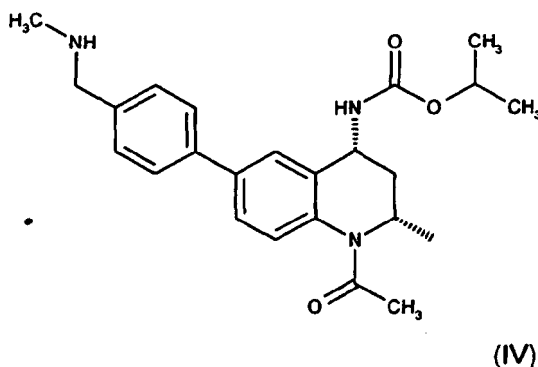
Fue notable el hecho de que no se observara esta interacción en la estructura cristalina del resto lisina con histona acetilada cuando se une a BD1 de BRD-2. Sin embargo, de manera sorprendente, la interacción con esta bolsa de unión adicional parece ser de particular importancia para conferir actividad. El compuesto (III) que se muestra a continuación presentó una marcada reducción en la $pCl50$ cuando se evaluó en el Ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia para la unión de BRD-2 a 4 cuando se comparó con el compuesto (II).



Quando se evaluó en el Ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia, el compuesto (III) anterior demostró una $pCl50 \leq 4,3$ en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4. Se observó un % de inhibición a una concentración de 200 μM del compuesto del 34 % 46 % y 45 % en los ensayos BRD-2 a 4, respectivamente, indicando que se produjo la unión, pero a un nivel bajo. Esto contrasta con el compuesto (II) que demostró una $pCl50 \geq 6,5$ en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4.

La estructura cristalina del compuesto (III) unido a BD1 de BRD-2 indica que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno desde el grupo NH_2 de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en la posición 156 en BRD-2 BD 1. El compuesto (III) acepta también un enlace de hidrógeno desde una molécula de agua que está unida a su vez mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria de un resto tirosina que se encuentra en la posición 113 en BD1 de BRD-2. Sin embargo, no existe interacción con la bolsa de unión que contiene los restos triptófano, prolina, asparagina, isoleucina y metionina (véase la Figura 9). La adición del grupo 4-cloroanilina colgante, como se observa en el compuesto (II), permite la interacción con la bolsa de unión, además de la bolsa de unión a la lisina acetilada que se muestra en las Figuras 5 y 7.

El compuesto (IV) es un inhibidor novedoso del bromodominio adicional, que cuando se evaluó en un Ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia demostró una $pCl50 > 6,0$ en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4.



La estructura cristalina del compuesto (IV) unido a BD1 de BRD-2 indica que, al igual que cada uno de los compuestos (I) a (III), el compuesto acepta un enlace de hidrógeno desde el grupo NH_2 de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en la posición 156 en BD1 de BRD-2 y acepta también un enlace de hidrógeno de una molécula de agua está unida a su vez mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria de un resto tirosina que se encuentra en la posición 113 en BD1 de BRD-2 (véase la Figura 10).

La comparación adicional de las estructuras cristalinas mediante rayos X de los compuestos (II) y (IV) unidos a BD1 de BRD-2 muestra que se conservó la interacción de Van der Waals clave con una región lipófila en la bolsa de unión definida por los restos que se muestran en la Tabla 2 incluso aunque el sustituyente de 4-cloroanilina se había sustituido con un resto carbamato de isopropilo (véase la Figura 11).

A partir de una comparación de las secuencias de aminoácidos de los bromodominios de la familia BET humana (Figura 1), una persona experta en la materia apreciará que los restos que se muestran en la Tabla 1 son equivalentes. Esto puede observarse también mediante comparación de las estructuras cristalinas publicadas de los bromodominios BRD-2, BRD-3 y BRD-4, ya que todos se han resuelto. Véase Nakamura y col. (J. Biol. Chem. 2007, 282, 4193-4201) para una descripción de la estructura del bromodominio D1 de BRD-2, y también las entradas del banco de datos cristalográficos de proteínas para D1 de BRD-2 (1x0j, 2cvq, 2drv, 2dvs), D2 de BRD-2 (2dvv, 2e3k), D1 de BRD-3 (2nxb), D2 de BRD-3 (2oo1), D1 de BRD-4 (2oss) y D2 de BRD-4 (2ouo, 2dww).

Tabla 1

| | BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| a | TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| b | PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| c | TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |
| d | ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |
| e | ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| f | ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| g | MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

- 5 a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

o

- 10 b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

- 15 c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5Å de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BRD-4BD2 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento para la identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

- 20 a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

y

b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

5

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5Å de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

10

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento en el que la etapa (c) requiere que los compuestos puedan formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos estén a una distancia de 7,5 Å de al menos un átomo pesado de cada uno de los 3 restos de lisina relacionados para un bromodominio dado

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |

15

En otro aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento en el que la etapa (a) y/o (b) se realiza en primer lugar para permitir la identificación de un fragmento del compuesto, antes de que se realice la etapa (c) para modificar el fragmento identificado en las etapas (a) y/o (b) para proporcionar un compuesto con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiba la unión del primer y/o el segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas. La persona experta en la materia reconocerá que esto es identificación y optimización de compuestos en función de sus fragmentos.

20

En un aspecto adicional, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 500 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

25

a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

o

b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

5 c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5A de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PR0371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

10 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento para la identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 500 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

15 y

b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

20 c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5A de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PRO98 | PR0371 | PRO58 | PRO333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

25 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento en el que la etapa (c) requiere que los compuestos puedan formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos estén a una distancia de 7,5 A de al menos un

átomo pesado de cada uno de los 3 restos de lisina relacionados para un bromodominio dado

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PRO98 | PRO371 | PRO58 | PR0333 | PRO82 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |

En otro aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento en el que la etapa (a) y/o (b) se realiza en primer lugar para permitir la identificación de un fragmento del compuesto, antes de que se realice la etapa (c) para modificar el fragmento identificado en las etapas (a) y/o (b) para proporcionar un compuesto con un peso molecular en el intervalo de 100 a 500 que inhiba la unión del primer y/o el segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanas a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas. La persona experta en la materia reconocerá que esto es identificación y optimización de compuestos en función de sus fragmentos.

Existen muchas formas en las que se pueden descubrir o diseñar compuestos que aprovechan las interacciones descritas anteriormente. En un procedimiento conocido como cribado virtual se pueden identificar moléculas a partir de bases de datos de compuestos reales o virtuales. Los procedimientos para hacer esto pueden usar la estructura de la proteína, (por ejemplo, acoplamiento), de la estructura 3D del ligando, (por ejemplo, investigación de farmacóforos, investigación de similitudes basadas en la forma o en el campo), o de la estructura 2D del ligando (por ejemplo, investigación de similitudes o subestructuras), o mediante combinaciones de estas soluciones. Se pueden usar también procedimientos similares para diseñar nuevos compuestos, tanto en primer lugar a partir de principios como mediante modificación de moléculas activas existentes, en un procedimiento conocido como diseño de novo. Una persona experta en la materia conocerá muchas maneras en las que se pueden realizar este tipo de actividades incluyendo, pero sin limitarse a los descritos en artículos de revisión, ejemplos recientes de los cuales incluyen Muegge & Oloff, *Drug Discovery Today: Technologies*, 2006, 3, 405-411; Kontoyianni y col. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15, 107-116; Seifert & Lang, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2007, 63-72; las secciones de la *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Vol 4: *Computer-Assisted Drug Design*, ed. Taylor & Triggler, Elsevier (2007).

Los compuestos identificados utilizando los anteriores procedimientos mencionados forman un aspecto adicional de la invención y se denominan a partir de ahora en el presente documento "compuestos de la invención".

resultante (95ue, aunque los compuestos de la invención se pueden unir a cada uno de BD1 y 2 de las proteínas BRD-2 a 4 humanas, la cinética y la afinidad de unión pueden ser diferentes en cada uno de estos sitios de unión.

Se apreciará que, cuando se sintetizan, los compuestos de la invención pueden existir en forma de base o sal o solvato libres de los mismos, por ejemplo, como una de sus sales farmacéuticamente aceptables. La presente invención incluye los compuestos de la invención en forma de base libre y como sus sales, por ejemplo, como una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una realización, la invención se refiere a compuestos de la invención o a sus sales farmacéuticamente aceptables.

Debido a su uso potencial en medicina, las sales de los compuestos de la invención son de manera deseable farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de adición de ácido o de base. Tal como se usa en el presente documento, el término 'sal farmacéuticamente aceptable' significa cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención, que tras su administración al receptor puede proporcionar (de forma directa o indirecta). Para una revisión de las sales adecuadas véase Berge y col., *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19, (1977). Normalmente, se puede preparar fácilmente una sal farmacéuticamente aceptable utilizando un ácido o base deseado según sea adecuado. La sal resultante puede precipitar de la solución y recogerse mediante filtración o se puede recuperar mediante evaporación del disolvente.

Se puede formar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable mediante la reacción de un compuesto de la invención con una base inorgánica u orgánica adecuada, (por ejemplo, trietilamina, etanolamina, trietanolamina, colina, arginina, lisina o histidina), opcionalmente en un disolvente adecuado, para dar la sal de adición de base que se aísla usualmente, por ejemplo, mediante cristalización y filtración. Las sales básicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como las de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como las de calcio y magnesio y sales con bases orgánicas, incluyendo sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexil amina y N-metil-D-glucamina.

Se puede formar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable mediante reacción de un compuesto de la invención con un ácido inorgánico u orgánico adecuado (tal como ácido bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, succínico, maleico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico tal como 2-naftalenosulfónico, o hexanoico), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico, para

- 5 dar la sal que se aísla usualmente, por ejemplo, mediante cristalización y filtración. Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención puede comprender o ser, por ejemplo, un bromhidrato, clorhidrato, sulfato, nitrato, fosfato succinato, maleato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, benzoato, salicilato, glutamato, aspartato, p-toluenosulfonato, bencenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, naftalenosulfonato (por ejemplo 2-naftalenosulfonato) o sal de hexanoato.
- Se pueden usar otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, formiatos, oxalatos o trifluoroacetatos, por ejemplo, en el aislamiento de los compuestos de la invención, y se incluyen en el alcance de la presente invención.
- 10 La invención incluye en su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de las sales de los compuestos de la invención.
- Se apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con los disolventes en los que se hacen reaccionar o de los que precipitan o cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". Se pueden usar disolventes con puntos de ebullición elevados y/o que pueden formar enlaces de hidrógeno tales como agua, xileno, N-metil pirrolidinona, metanol y etanol para formar solvatos. Los procedimientos para la identificación de solvatos incluyen, pero no se limitan a, RMN y microanálisis. Los solvatos de los compuestos de la invención están comprendidos en el alcance de la invención.
- 15 La invención incluye en su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de los solvatos de los compuestos de la invención.
- La invención abarca todos los profármacos del compuesto de la invención que tras su administración al receptor pueden proporcionar (de forma directa o indirecta) el compuesto de la invención, o un metabolito o resto activo del mismo. Los expertos en la materia saben reconocer tales derivados, sin experimentación innecesaria. Sin embargo, se hace referencia a la enseñanza de la Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5ª Edición, Vol 1: Principles and Practice, que se incorpora en el presente documento por referencia a la extensión de la enseñanza de dichos derivados.
- 20 Los compuestos de la invención pueden existir en forma cristalina o amorfa. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos de la invención pueden existir como polimorfos, que están incluidos dentro del alcance de la presente invención. Pueden caracterizarse y diferenciarse formas polimórficas de los compuestos de la invención usando una diversidad de técnicas analíticas convencionales, incluyendo, pero sin limitación, patrones de difracción de polvo de rayos X (XRPD), espectros infrarrojos (IR), espectros de Raman, calorimetría de barrido diferencial (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear de estado sólido (RMNes).
- 25 Algunos compuestos de la invención pueden existir en una o en varias formas tautómeras. Se entenderá que la presente invención abarca todos los tautómeros de los compuestos de la invención ya sean tautómeros individuales o sus mezclas.
- 30 Se apreciará a partir de lo anterior que en el alcance de la invención están incluidos solvatos, hidratos, complejos y formas polimórficas de los compuestos de la invención y sus sales.
- Los compuestos de la invención son inhibidores de bromodominios, y se cree por tanto que tienen potencial utilidad en el tratamiento de enfermedades o dolencias para las cuales está indicado un bromodominio.
- La presente invención proporciona de esta manera un compuesto de la invención para su uso en un tratamiento. El compuesto de la invención puede ser para uso en el tratamiento de enfermedades o dolencias para los cuales está indicado un inhibidor del bromodominio.
- 40 La presente invención proporciona de esta manera un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o dolencia para la cual está indicado un bromodominio.
- Se proporciona también el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o dolencias para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominios.
- 45 Se proporciona también un procedimiento para tratar enfermedades o dolencias para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio en un sujeto que lo necesita que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- De forma adecuada, el sujeto que lo necesita es un mamífero, particularmente un ser humano.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa que la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico estimulará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo investigado, por ejemplo, por un investigador o especialista clínico. Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento, curación, prevención, o mejora potenciada de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o

- 5 trastorno. El término incluye también en su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal. Se cree que los inhibidores de bromodominios son útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades o dolencias relacionadas con la inflamación sistémica o tisular, respuestas inflamatorias a la infección o a la hipoxia, activación y proliferación celular, metabolismo de los lípidos, fibrosis y en la prevención y el tratamiento de infecciones víricas.
- 10 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de dolencias autoinmunes y antiinflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide, artrosis, gota aguda, psoriasis, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del intestino, (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, neumonitis, miocarditis, pericarditis, miositis, eczema, dermatitis, alopecia, vitiligo, enfermedades bullosas de la piel, nefritis, vasculitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, depresión, retinitis, uveítis, escleritis; hepatitis, pancreatitis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerotizante, enfermedad de Addison, hipofisitis, tiroiditis, diabetes tipo I y rechazo agudo de órganos transplantados.
- 15 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de dolencias inflamatorias agudas tales como gota aguda, arteritis de células gigantes, nefritis que incluye nefritis debida a lupus, vasculitis con implicación de órganos tal como glomerulonefritis, vasculitis que incluye arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, vasculitis con implicación de órganos, rechazo agudo de órganos transplantados.
- 20 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o dolencias que implican respuestas inflamatorias a infecciones con bacterias, virus, hongos, parásitos o sus toxinas, tales como sepsia, síndrome séptico, choque séptico, endotoxemia, síndrome sistémico de respuesta inflamatoria (SIRS), síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de choque tóxico, lesión pulmonar aguda, ARDS (síndrome de dificultad respiratoria en adultos), insuficiencia renal aguda, hepatitis fulminante, quemaduras, pancreatitis aguda, síndromes post-quirúrgicos, sarcoidosis, reacciones de Herxheimer, encefalitis, mielitis, meningitis, malaria y SIRS asociados con infecciones víricas tales como gripe, herpes zoster, herpes simple y coronavirus.
- 25 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de dolencias asociadas con lesión por isquemia-reperusión tales como infarto de miocardio, isquemia cerebrovascular (ictus), síndromes coronarios agudos, lesión renal por reperusión, trasplante de órganos, injerto por derivación de la arteria coronaria, procedimientos de derivación cardiopulmonares, embolismo pulmonar, renal, hepático, gastrointestinal o de las extremidades periféricas.
- 30 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del metabolismo de los lípidos mediante la regulación de APO-A1 tales como hipercolesterolemia, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer.
- 35 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en el tratamiento de dolencias fibróticas tales como fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, constricción post-operatoria, formación de queloides, escleroderma y fibrosis cardiaca.
- Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en la prevención y el tratamiento de infecciones víricas tales como el virus del herpes, el virus del papiloma humano, adenovirus y poxvirus y otros virus de ADN.
- 40 Los inhibidores de bromodominios pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención del cáncer, incluyendo carcinomas hematológicos, epiteliales incluyendo carcinoma de pulmón, carcinomas de mama y colon, carcinomas de la línea media del cuerpo, tumores mesenquimáticos, hepáticos, renales y neurológicos.
- El término "enfermedades o dolencias para los cuales está indicado un inhibidor de bromodominios" está previsto para incluir cualquiera o todas las patologías anteriores.
- 45 En una realización, la enfermedad o dolencia para la cual está indicado un inhibidor de bromodominios se selecciona entre enfermedades asociadas con el síndrome sistémico de respuesta inflamatoria tales como sepsia, quemaduras, pancreatitis, traumatismo mayor, hemorragias e isquemia. En esta realización, el inhibidor de bromodominios se administraría en el momento del diagnóstico para reducir la incidencia de: SIRS, el inicio de choque, síndrome de disfunción multiorgánica, que incluye el inicio de lesión pulmonar aguda, SRDA, lesión renal aguda, hepática, cardiaca y gastrointestinal y mortalidad. En otra realización, el inhibidor de bromodominios se administraría antes de procedimientos quirúrgicos u otros procedimientos asociados con un alto riesgo de sepsia, hemorragias, daño tisular extenso, SIRS o MODS (síndrome de disfunción orgánica múltiple). En una realización concreta, la enfermedad o dolencia para la cual está indicado un inhibidor de bromodominios es sepsia, síndrome séptico, choque séptico o endotoxemia. En otra realización, el inhibidor de bromodominios está indicado para el tratamiento de la pancreatitis aguda o crónica. En otra realización, el bromodominio está indicado para el tratamiento de quemaduras.
- 50
- 55 En una realización, la enfermedad o dolencia para la cual está indicado un inhibidor de bromodominios se selecciona entre infecciones y reactivaciones del herpes simple, herpes labial, infecciones y reactivaciones por herpes simple, viruela aviar, herpes, virus del papiloma humano, neoplasia de cuello de útero, infecciones de adenovirus, incluyendo enfermedad respiratoria aguda, infecciones de poxvirus tales como el virus de la viruela bovina y de la

viruela y el virus de la fiebre porcina africana. En una realización concreta, un inhibidor de bromodominios está indicado en el tratamiento de infecciones de la piel o del epitelio del cuello del útero por el virus del papiloma humano.

5 Aunque es posible que para su uso en tratamientos se pueda administrar un compuesto de la invención así como sus sales farmacéuticamente aceptables como un compuesto químico bruto, es habitual presentar el principio activo como una composición farmacéutica.

10 La presente invención proporciona por tanto en un aspecto adicional una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable y uno o más transportadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables, son como se ha descrito anteriormente. El(los) transportador(es), o diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la composición y no perjudiciales para su destinatario. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que incluye premezclar un compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser para su uso en el tratamiento de cualquiera de las dolencias descritas en el presente documento.

20 Como los compuestos de la invención están previstos para su uso en composiciones farmacéuticas, se entenderá fácilmente que se proporcionan preferentemente cada uno en forma sustancialmente pura, por ejemplo, al menos con una pureza del 60 %, de forma más adecuada al menos con una pureza del 75% y preferentemente al menos con una pureza del 85%, especialmente al menos con una pureza del 98% (% en peso para la base en peso).

25 Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Las composiciones preferentes de dosis unitarias son aquellas que contienen una dosis o sub-dosis diaria, o una fracción adecuada de las mismas, de un principio activo. Dichas dosis unitarias pueden por tanto administrarse más de una vez al día. Las composiciones farmacéuticas unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria (para la administración más de una vez al día), tal como se ha citado anteriormente en el presente documento, o una fracción adecuada de las mismas, de un principio activo.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración por cualquier ruta adecuada, por ejemplo por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, inhalada, intranasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), ruta vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica) Dichas composiciones pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo poniendo asociando el principio activo con el(los) transportador(es) o excipiente(s).

En una realización, la composición farmacéutica se adapta para la administración parenteral, particularmente la administración intravenosa.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles para inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hagan que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) requiriendo únicamente la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse en unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos, polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o como emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

45 Por ejemplo, para administración oral en forma de comprimido o cápsula, el principio activo del fármaco puede combinarse con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable como etanol, glicerol, agua y similares. Se pueden preparar polvos adecuados para incorporar en comprimidos o cápsulas reduciendo el compuesto a un tamaño fino adecuado (por ejemplo, mediante micronización) y mezclándolo con un transportador farmacéutico preparado de manera similar tal como un hidrato de carbono comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. Pueden estar también presentes agentes aromatizantes, conservantes, dispersantes y colorantes.

50 Se pueden preparar cápsulas preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente, y rellenando vainas de gelatina preformadas. Pueden añadirse emolientes y lubricantes como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido a la mezcla de polvo antes del procedimiento de rellenado. También puede añadirse un agente disgregante o solubilizante como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

- Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes adecuados, emolientes, lubricantes, agentes edulcorantes, aromas, y agentes colorantes a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares.
- 5 Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o aplastando, añadiendo un lubricante y un desintegrante y comprimiendo en comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, triturado adecuadamente,
- 10 con un diluyente o base como se describe anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinilpirrolidona, un retardante de la solución como parafina, un acelerador de la resorción como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo puede granularse mediante humectación con un aglutinante como jarabe, pasta de almidón, mucílagos de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándolos a través de una membrana. Como alternativa al granulado, la mezcla de polvo puede hacerse pasar por la máquina de comprimidos
- 15 y el resultado es pastillas formadas imperfectamente rotas en gránulos. Los gránulos pueden lubricarse para evitar que se adhieran a los troqueles de formación de comprimidos por medio de adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime a continuación en comprimidos. Los compuestos de la presente invención también pueden combinarse con un transportador inerte de flujo libre y comprimirse en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulado o aplastado. Se puede proporcionar un revestimiento protector transparente u opaco que consiste en un revestimiento de sellado de shellac, un revestimiento de material azucarado o polimérico y un revestimiento de cera pulida. Pueden añadirse colorantes a estos recubrimientos para distinguir las diferentes dosis unitarias.
- Pueden prepararse fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires en una forma farmacéutica unitaria de tal forma que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes pueden prepararse
- 25 disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Se pueden formular suspensiones dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. Se pueden añadir también solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos aromáticos tales como aceites de menta piperita o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.
- 30 En los casos donde sea adecuado, las composiciones farmacéuticas unitarias para administración oral pueden microencapsularse. La formulación también puede prepararse para prolongar o mantener la liberación, por ejemplo, recubriendo o embebiendo el material particulado en polímeros, ceras o similares.
- Se pueden administrar también los compuestos de la invención en la forma de sistemas de administración de liposomas, como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.
- 35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.
- 40 Para el tratamiento del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, los principios activos pueden emplearse ya sea con una base de pomada parafínica o con una base de pomada miscible con agua. Como alternativa, los principios activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de crema de agua en aceite.
- 45 Las composiciones adecuadas adaptadas para administraciones tópicas en el ojo incluyen gotas oculares en las que el principio activo se disuelve o suspende en un transportador adecuado, especialmente un disolvente acuoso.
- Pueden formularse convenientemente las formas farmacéuticas para la administración nasal o inhalada como aerosoles, disoluciones, suspensiones, geles o polvos en seco.
- 50 Para composiciones adecuadas y/o adaptadas para la administración inhalada, se prefiere que el compuesto de la invención esté en forma de partículas de tamaño reducido, por ejemplo, obtenidas mediante micronización. El tamaño de partículas preferible del compuesto o sal de tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) se define por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (tal como se midió, por ejemplo, utilizando la difracción láser).
- 55 Las formulaciones en aerosol, por ejemplo, para la administración inhalada, pueden comprender una solución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Se pueden presentar formulaciones en aerosol en cantidades individuales o multidosis en forma estéril en un recipiente precintado, que pueden tomar la forma de un cartucho o recarga para uso con un dispositivo atomizador o inhalador. Alternativamente, el recipiente precintado puede ser un dispositivo de dispensación unitario tal como un inhalador

nasal para una única dosis o un dispensador en aerosol configurado con una válvula de medida (inhalador de dosis medida) que se pretende para desechar una vez que los contenidos del recipiente se han agotado.

En el que la forma farmacéutica comprende un dispensador en aerosol, este contiene preferentemente un propulsor adecuado a presión tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propulsor orgánico tal como hidrofluorocarbono (HFC). Los propulsores de HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas farmacéuticas en aerosol pueden tomar la forma de un atomizador provisto de bomba. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir la incorporación de excipientes adicionales, por ejemplo, cosolventes y/o tensioactivos para aumentar las características de dispersión y la homogeneidad de las formulaciones para suspensión. Las formulaciones para solución pueden requerir también la adición de cosolventes tales como etanol.

Para las composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para la administración inhalada, la composición farmacéutica puede ser una composición inhalable de polvo seco. Dicha composición puede comprender una base de polvo tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol o almidón, el compuesto de la invención o una de sus sales (preferentemente en forma de tamaño reducido de partículas, por ejemplo, en forma micronizada), y opcionalmente un modificador del comportamiento tal como L-leucina u otro aminoácido y/o las sales metálicas del ácido esteárico tales como estearato de magnesio o de calcio. Preferentemente, la composición inhalable en forma de polvo seco comprende una mezcla de lactosa en forma de polvo seco, por ejemplo, lactosa monohidratada y el compuesto de la invención o una de sus sales. Se pueden administrar dichas composiciones al paciente utilizando un dispositivo adecuado tal como el dispositivo DISKUS® comercializado por GlaxoSmithKline que se describe, por ejemplo en el documento GB 2242134 A

Se pueden formular los compuestos de la invención de los mismos como una formulación fluida para la administración a un dispensador de fluidos, por ejemplo, un dispensador de fluidos que tenga una boquilla dispensadora o un orificio dispensador a través del cual se dispensa una dosis medida de formulación fluida tras la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bomba del dispensador de fluidos. Dichos dispensadores de fluidos se proporcionan generalmente con un depósito de múltiples dosis medidas de la formulación del fluido, dispensándose las dosis tras las actuaciones secuenciales de la bomba. La boquilla u orificio dispensador puede configurarse para su inserción en las fosas nasales del usuario para la dispensación mediante pulverización de la formulación fluida en la cavidad nasal. Se describe e ilustra un dispensador de fluidos del tipo anteriormente mencionado en el documento WO-A-2005/044354.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de numerosos factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del animal, la dolencia precisa que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación, y la ruta de administración, y será en última instancia a criterio del médico o veterinario a cargo del tratamiento. En la composición farmacéutica, cada unidad de dosificación para la administración oral o parenteral contiene preferentemente de 0,01 a 3000 mg, más preferentemente de 0,5 a 1000 mg, de un compuesto de la invención calculado como base libre. Cada unidad de dosificación para la administración nasal o inhalada contiene preferentemente de 0,001 a 50 mg, más preferentemente de 0,01 a 5 mg, de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como base libre.

Los compuestos farmacéuticamente aceptables de la invención se pueden administrar en una dosis diaria (para un paciente adulto) de, por ejemplo, una dosis oral o parenteral de 0,01 mg a 3000 mg por día o de 0,5 a 1000 mg por día, o una dosis nasal o inhalada de 0,001 a 50 mg por día o 0,01 a 5 mg por día, del compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como base libre. Esta cantidad puede administrarse en una dosis única por día o más usualmente en numerosas (tales como dos, tres, cuatro, cinco o seis) subdosis cada día de manera que la dosis diaria total sea la misma. Se puede determinar una cantidad eficaz de una de sus sales como una proporción de la cantidad eficaz del compuesto de la invención *per se*.

Los compuestos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los tratamientos combinados de acuerdo con la presente invención comprenden por tanto la administración de al menos un compuesto de la invención o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y el uso de al menos un agente farmacéuticamente activo diferente. Preferentemente, los tratamientos combinados de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de al menos un compuesto de la invención o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un principio activo farmacológico adicional. El(los) compuesto(s) de la invención y el(los) principio(s) farmacéuticamente activo(s) adicional(es) puede(n) administrarse juntos o por separado y, si se administran de forma independiente esto puede tener lugar secuencialmente o secuencialmente en cualquier orden. Las cantidades de compuesto(s) de la invención y el resto de agente(s) quimioterapéutico(s) farmacéuticamente activo(s) y los calendarios de administración relativos se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico combinado deseado. De esta manera, en un aspecto adicional, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de la invención y al menos un agente farmacéuticamente activo adicional.

De esta manera, en un aspecto, el compuesto y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar en combinación o incluyen uno o más agentes terapéuticos, seleccionados por ejemplo entre antibióticos, antivíricos, glucocorticoesteroides, antagonistas muscarínicos y agonistas beta-2.

Se apreciará que cuando el compuesto de la presente invención se administra en combinación con agentes terapéuticos adicionales, administrados normalmente mediante una ruta inhalada, intravenosa, oral o intranasal, la composición resultante se puede administrar mediante las mismas rutas. Alternativamente, los componentes individuales de la composición se pueden administrar por diferentes rutas.

5 Una realización de la invención abarca combinaciones que comprenden uno o dos agentes terapéuticos adicionales.

Será evidente para una persona experta en la materia que, cuando sea adecuado, el(los) ingrediente(s) terapéutico(s) adicional(es) se puede(n) usar en forma de sales, por ejemplo como sales de metales alcalinos o sales de aminas o como sales de adición de ácido, o profármacos, o como ésteres, por ejemplo, ésteres de alquilo inferior, o como solvatos, por ejemplo hidratos, para optimizar la actividad y/o la estabilidad y/o las características físicas, tales como la solubilidad, del principio terapéutico. Será evidente también que, cuando sea adecuado, se pueden usar ingredientes terapéuticos en forma ópticamente pura.

Las combinaciones referidas anteriormente pueden presentarse convenientemente para su uso en forma de una composición farmacéutica y, de esta manera, las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación como se ha definido anteriormente junto con un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable representan un aspecto adicional de la invención.

Antecedente experimental

Procedimientos de CLEM:

Procedimiento B

El CL/EM (Procedimiento B) se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i. diámetro de empaquetamiento 1,7 µm) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución al 0,1 % v/v de ácido fórmico en agua (Disolvente A) y solución al 0,1 % v/v de ácido fórmico en acetonitrilo (Disolvente B) usando el siguiente gradiente de elución 0-1,5 min 3 - 100 % B, 1,5-1,9 min 100 % B, 1,9 - 2,0 min 3 % B a un caudal de 1 ml/min. La detección UV fue mediante una señal sumatorio de las longitudes de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masas se registraron en un equipo Waters ZQ Mass Spectrometer barrido con electropulverización alternante de signo positivo a signo negativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

Procedimiento D

El CL-EM (Procedimiento D) se llevó a cabo en una columna Supelcosil LCABZ+PLUS (3 µm, 3,3 cm x 4,6 mm DI) eluyendo con HCO₂H al 0,1 % 0,1 M de acetato de amonio en agua (disolvente A), y acetonitrilo al 95 % y HCO₂H al 0,05 % en agua (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución 0-0,7 minutos 0 %B, 0,7-4,2 minutos 0→100 %B, 4,2-5,3 minutos 100 %B, 5,3-5,5 minutos 100→0 %B a un caudal de 3 ml/minuto. Los espectros de masas (MS) se registraron en un espectrómetro de masas Fisons VG Platform usando los modos de ionización positiva mediante electropulverización [(ES+ve para obtener los iones moleculares [M+H]⁺ y [M+NH₄]⁺) o ionización negativa mediante electropulverización [(ES-ve para obtener el ion molecular [M-H]⁻). Los datos analíticos de este equipo se proporcionan en el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻.

Procedimiento E

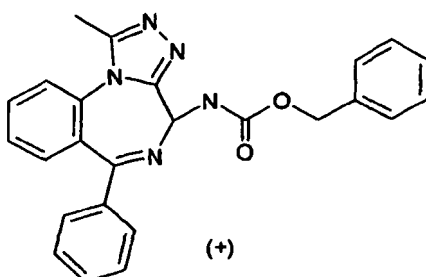
El CL-EM (Procedimiento E) se llevó a cabo en una columna Chromolith Performance RP 18 (100 x 4,6 mm di) eluyendo con acetato de amonio 0,01 M en agua (disolvente A) y acetonitrilo al 100 % (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución 0-4 minutos 0 %100 % B, 4-5 minutos 100 % B a un caudal de 5 ml/minuto. Los espectros de masas (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Platform-LC usando modos de ionización química positiva a presión atmosférica [AP+ve para obtener los iones moleculares MH⁺] o ionización química negativa a presión atmosférica [AP-ve para obtener los iones moleculares (M-H)⁻]. Los datos analíticos de este equipo se proporcionan en el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻.

Procedimiento F

El CL-EM (Procedimiento F) se realizó en una columna Sunfire C18 (30 mm x 4,6 mm d.i. diámetro de empaquetamiento 3,5 µm) a 30 grados centígrados, eluyendo con una solución al 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en agua (Disolvente A) y solución al 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (Disolvente B) usando el siguiente gradiente de elución 0-0,1 min 3 % B, 0,1- 4,2 min 3 - 100 % B, 4,2-4,8 min 100 % B, 4,8-4,9 min 100-3 %B, 4,9 - 5,0 min 3 % B a un caudal de 3 ml/min. La detección UV fue una señal promediada entre las longitudes de onda de 210 nm a 350 nm y los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas que usaba ionización positiva mediante electropulverización. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

Compuesto (I)

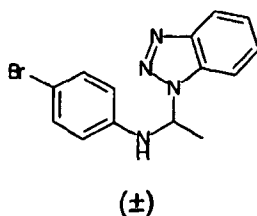
(+)-(1-Metil-6-fenil-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il)carbamato de fenilmetilo



Una mezcla racémica de (1-metil-6-fenil-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzo diazepin-4-il)carbamato de fenilmetilo [preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en J. Med. Chem., (1988, 31(1), 176-181)] se separó mediante HPLC usando una columna (R,R) Whel-01 con hexano/EtOH como la fase móvil. La muestra se preparó en una
 5 mezcla 80/20 de EtOH /Hexano (Nota: la muestra requirió calentamiento y filtración antes de añadirse a la columna). El sistema usado en la separación preparativa fue el siguiente: Columna: Columna (R,R) Whel-01 51x250 mm columnas de 2 pulgadas (5 cm); fase móvil: 50/50, Hexano / EtOH; Caudal: 45,0 ml/min; Longitud de onda UV: 254 nm. El compuesto del título se eluyó a los 49 min con primer pico. $[\alpha]_D = + 44,7$ c = 1,0525 (g/100 ml) / MeOH. El otro enantiómero llegó a los 58 minutos.

10 Compuesto intermedio 1

[1-(1H-1,2,3-benzotriazol-1-il)etil](4-bromofenil)amina

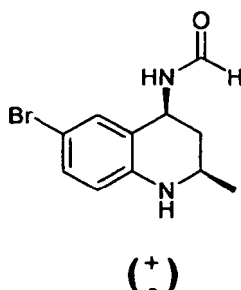


A una suspensión de benzotriazol (139 g, 1,16 mol) en tolueno (2 l) en un matraz de cuatro bocas de 3 l bajo atmósfera de nitrógeno se añadió, a temperatura ambiente, una solución de 4-bromoanilina (200 g, 1,16 mol) en tolueno (300 ml). Después, mediante un embudo de adición, se añadió gota a gota acetaldehído (64,7 ml, 1,17 mol) en solución en tolueno (200 ml). La mezcla de reacción se volvió progresivamente homogénea, y a continuación proporcionó un precipitado. La mezcla resultante se agitó durante 12 horas bajo atmósfera de nitrógeno y a continuación se filtró. El precipitado se recrystalizó en tolueno para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (304 g, 82 %).

20 RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,1 (m, 3H) 4,9 (m, 0,66 H) 5,15 (m, 0,33 H) 6,5-6,9 (m, 3 H) 7,2-8,2 (m, 7H)

Compuesto intermedio 2

(6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)formamida

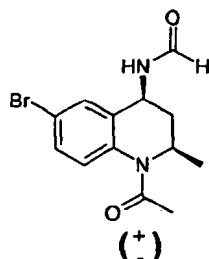


25 Un matraz de cuatro bocas de 3 l bajo atmósfera de nitrógeno se llenó con N-vinil formamida (66,2 g, 0,946 mol) y THF seco (400 ml). Se añadieron gota a gota $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (239 ml, 1,9 mol) a -5°C a la mezcla lechosa. Después de 15 minutos se añadió el Intermedio 1 (150 g, 0,473 mol) en solución en THF (1 l) a -5°C . Después de 2 h, la mezcla se añadió lenta y cuidadosamente sobre una saturada de NaHCO_3 (5 l). Se añadió acetato de etilo (2 l), y la mezcla se transfirió a un embudo de separación. La capa orgánica se separó y se lavó con 1 x 200 ml de H_2O , 1 x 200 de salmuera y se secó (Na_2SO_4). La mezcla se filtró y el sólido y se lavó con 1 x 50 ml de acetato de etilo. El filtrado se concentró progresivamente hasta que apareció un precipitado, y la mezcla se enfrió en un baño de hielo durante 2 h. El precipitado se filtró a través de un embudo Buchner, y se lavó con 2 x 100 ml de $i\text{-Pr}_2\text{O}$ para suministrar el compuesto del título en forma de un sólido (71 g, 56 %).

CL/EM: (Procedimiento E), m/z 269 y 271 [M+H]⁺. T_R = 2,29 min;
 RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,98 (d, 3H) 1,24 (q, 1H) 2,04 (ddd, 1H) 3,33 (m, 1H) 5,17 (m, 1H)
 5,45 (m, 1H) 6,15 (d, 1H) 6,88 (dd, 1H) 7,00 (d, 1H) 8,11 (s, 1H)

Compuesto intermedio 3

5 [1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]formamida

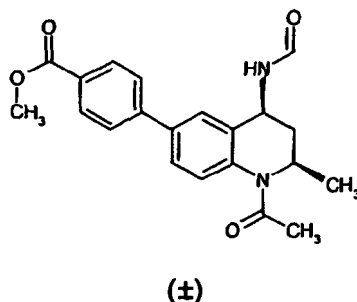


Se añadió cloruro de acetilo (21 ml, 0,29 mol) gota a gota a 0 °C a una solución del Compuesto intermedio 2 (71 g, 0,26 mol) en una mezcla de DCM (1 l) y piridina (350 ml). Tras agitar durante 2 horas a 0 °C, la mezcla se vertió sobre una mezcla de hielo triturado (2 kg) y HCl concentrado (450 ml). El producto se extrajo con DCM (1 l), se lavó con salmuera y se secó con Na₂SO₄. La concentración al vacío dio como resultado el producto esperado en forma de un sólido de color blanco (82 g, 100 %).

RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,98 (d, 3 H) 1,15 (m, 1 H) 1,95 (s, 3 H) 2,4 (m, 1 H) 4,7 (m, 1 H) 4,85 (m, 1 H) 5,8 (d a, 1 H) 6,85 (d, 1 H) 7,15 (s, 1 H) 7,25 (d, 1 H) 8,2 (s, 1 H)

Compuesto intermedio 4

15 4-[1-Acetil-4-(formlamino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de metilo

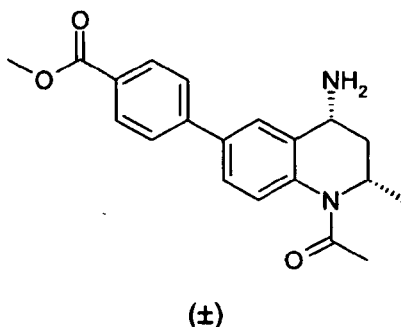


A una suspensión del compuesto intermedio 3 (1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]formamida (62,24 g) en DME (600 ml) se añadió tetraquis paladio (11,56 g) a temperatura ambiente. Después de 10 min de agitación, los autores añadieron ácido {4-[(metiloxi)carbonil]fenil}borónico (54 g) y una solución 2 N de Na₂CO₃ (300 ml) y la mezcla se agitó con calentamiento a temperatura de reflujo durante 16 h. La mezcla se concentró a presión reducida. Tras adición de 200 ml de DCM al residuo, el producto precipitó, se filtró y se lavó con agua (3*100 ml). Para eliminar el resto de agua, el sólido se lavó con isopropil éter (100 ml), a continuación, el sólido se añadió a 220 ml de isopropil éter templado, y la mezcla resultante se dejó en el sonicador. El sólido se eliminó por filtración y después se secó para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color beige (64,7 g).

25 CLEM (Procedimiento E) Tr 2,58 MH+ 367

Compuesto intermedio 5

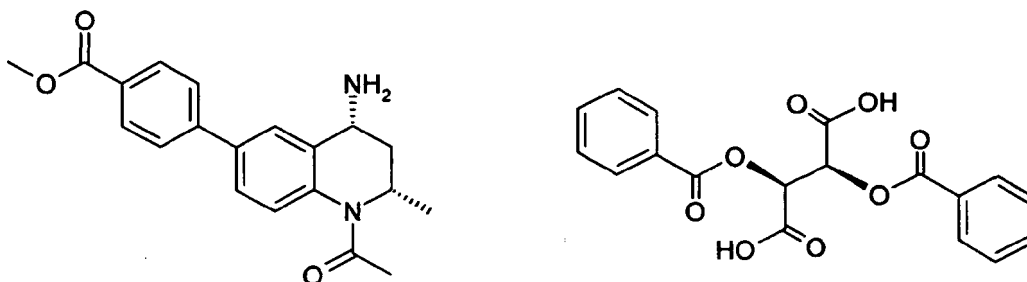
4-(1-Acetil-4-amino-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoato de metilo



Una suspensión del Compuesto intermedio 4 (20,0 g) en metanol (400 ml) se calentó a temperatura de reflujo, después se trató con HCl 6 N (18 ml). La mezcla resultante se calentó a temperatura de reflujo durante 2 h. La suspensión se filtró en un aparato whatman y el filtrado se concentró a sequedad. Se añadió acetona (70 ml) al residuo, el sólido se eliminó por filtración y se secó. La sal resultante en acetato de etilo (300 ml) se trató con NaOH 1 N (100 ml). Las capas orgánicas y acuosas se separaron. La capa acuosa se extrajo con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (300 ml). Las capas orgánicas se combinaron y la combinación se secó y se concentró a sequedad para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (13,83 g). CLEM (Procedimiento E) Tr 2,51 MH+ 339

Compuesto intermedio 6

10 (2S,3S)-2,3-bis[(fenilcarbonil)oxil]butanodioico - 4-(1-acetil-4-amino-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoato de metilo (1:2)



15 Una mezcla de la amina racémica que constituye el Compuesto intermedio 5 (185 g.) en EtOH (600 ml) y ácido L-(+)-láctico (20 % en agua, 450 ml) se calentó a temperatura de reflujo durante 30 minutos. Después de concentrar a presión reducida, se añadió hexano (300 ml) al residuo, y la mezcla resultante se calentó a temperatura de reflujo durante 10 min. La mezcla se dejó sedimentar, y la fase hexano se descartó. La pasta remanente se capturó con Et₂O (300 ml), se calentó a temperatura de reflujo durante 10 minutos y se dejó sedimentar. La fase Et₂O se descartó, la pasta resultante se volvió a tratar con hexano (200 ml), se calentó a temperatura de reflujo y se dejó sedimentar.

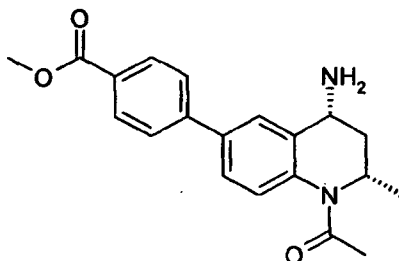
20 La fase hexano se descartó, y se añadió EtOAc (2,3 l) a la pasta resultante. La mezcla se calentó a temperatura de reflujo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16 horas. El precipitado se filtró y se lavó con EtOAc (200 ml). El filtrado se basificó con adición de Na₂CO₃ y el amino libre resultante se extrajo con EtOAc (3 x 1000 ml), se lavó con agua, se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El amino libre resultante (95 g) en solución en THF (950 ml) se trató con ácido L(-)-dibenzotartárico (50,3 g, 0,14 mol) y se calentó a temperatura de reflujo durante 30 minutos. El precipitado resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16 horas y después se filtró y se lavó con THF (200 ml). Un control por HPLC de una alícuota neutralizada indicó un ee de 95,6 % del enantiómero esperado de la amina. La recrystalización de la sal tartárica en EtOH (1 l) dio como resultado el compuesto del título (95 g) en forma de una única sal diastereómera.

pf: 196 °C

30 RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,95 (d, 3 H) 1,15 (m, 1H) 2,05 (s, 3 H) 2,55 (m,1H) 3,85 (s,3H) 4,0 (m, 1 H) 4,55 (m,1H) 5,7 (s,1H, CH tartárico) 7,4 (m, 3 H) 7,6 (m, 2H) 7,85 (m, 3 H), 7,95 (m, 4H).

Compuesto intermedio 7

4-[(2S,4R)-1-Acetil-4-amino-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de metilo



35 Una mezcla del Compuesto intermedio 6 (121 g) en DCM (3 l) se basificó con adición de una solución acuosa de Na₂CO₃. La amina libre resultante se extrajo con DCM (2 l), se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄ para suministrar el compuesto del título en forma de un sólido de color crema (79 g).

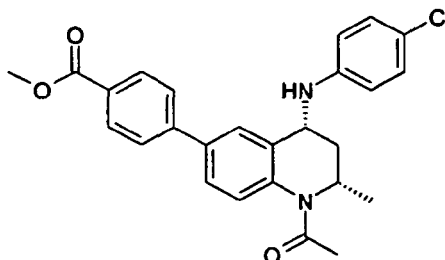
RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,15 (m, 4 H) 1,7 (m, 2H) 2,15 (s, 3 H) 2,6 (m, 1H) 3,8 (dd, 1 H), 3,95 (s, 3H), 4,85 (m, 1 H) 7,2 (d, 1 H) 7,55 (d, 1 H), 7,7 (d, 2H), 7,8 (s, 1H), 8,1 (d, 2 H)

40 [α]_D = + 333,8 (c = 0,985 g/cl, EtOH).

El compuesto del título se eluyó a 18,57 min mediante HPLC como segundo pico en una columna CHIRACEL OD (250 x 4,6 mm 10µm) usando hexano/etanol 80/20 como la fase móvil. Se aplicó una caudal de 1 ml/min y se inyectó una muestra de 10µl preparada por dilución de 1 mg del compuesto del título en 1 ml de eluyente. La detección del compuesto se realizó a dos longitudes de onda UV, 210 y 254 nM. El otro enantiómero llegó a los 12,8 min.

5 Compuesto intermedio 8

4-((2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoato de metilo



A una matraz que contenía el Compuesto intermedio 7 (800 mg, 2,4 mmol) en tolueno (20 ml) se añadió 4-clorobromobenceno (501 mg, 2,6 mmol), Pd₂(dba)₃ (87 mg, 0,09 mmol), NaO^tBu (319 mg, 3,3 mmol) y 2'-(d ciclohexilfosfanil)-N,N-dimetil-2-bifenilamina (74 mg, 0,19 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 16 horas y 3 horas más a temperatura de reflujo. La mezcla se vertió en agua y se acidificó por adición de HCl 1 N. La extracción se realizó con EtOAc (2 x 75 ml) y las capas orgánicas se lavaron con agua y se secaron con Na₂SO₄. Tras la filtración, la concentración a presión reducida y la purificación mediante cromatografía en columna eluyendo con C₆H₁₂/EtOAc:80/20, se obtuvo el compuesto del título en forma de sólido de color blanco (350 mg).

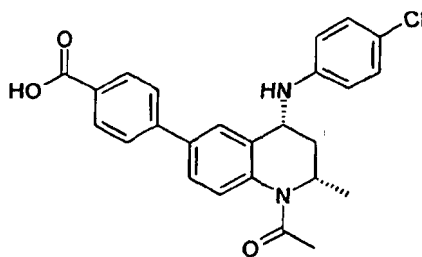
RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,2 (d, 3 H) 1,35 (m, 1 H) 2,25 (s, 3 H) 2,7 (m, 1 H) 3,95 (s, 3 H), 4,25 (m, 1 H) 4,95 (m, 1 H) 6,6 (d, 2 H) 7,15 (d, 2 H) 7,25 (s, 1 H) 7,55 (m, 4 H), 8,1(d, 2 H)

CL/EM (Procedimiento D): m/z 449 [M+H]⁺ y 447 [M-H]⁻ Tr = 3,67 min. [α]_D = + 326 (c= 0,98 g/cl, EtOH)

El compuesto del título se eluyó a 22,58 min mediante HPLC como segundo pico en una columna CHIRACEL OD (250 x 4,6 mm 10µm) usando hexano/etanol 90/10 como la fase móvil. Se aplicó una caudal de 1 ml/mn y se inyectó una muestra de 10µl preparada por dilución de 1 mg del compuesto del título en 1 ml de eluyente. La detección del compuesto se realizó a dos longitudes de onda UV, 210 y 254 nM. El otro enantiómero llegó a los 15,46 min.

Compuesto (II)

Ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico



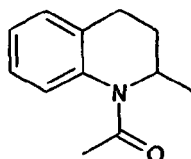
Una solución del Compuesto intermedio (8) (320 mg, 0,73 mmol) en EtOH (10 ml) y NaOH 1 N (1,5 ml, 1,5 mmol) se calentó a temperatura de reflujo. Después de 1 hora, un control mediante tlc indicó la finalización de la reacción. La mezcla en bruto se evaporó a sequedad y el residuo se capturó en agua (10 ml). La acidificación de la mezcla a pH=3 se llevó a cabo mediante la adición de una solución 1 N. Los materiales orgánicos se extrajeron con EtOAc (3x 25 ml) y la fase orgánica se combinó y se lavó con salmuera y se secó con Na₂SO₄. Tras concentrar al vacío, el residuo se capturó en una mezcla de DCM/ hexano para obtener un sólido de color rojo después de la filtración. El compuesto se recrystalizó en EtOAc, se filtró y se lavó con i-Pr₂O. El polvo de color blanco resultante se solubilizó en MeOH/H₂O, se concentró a sequedad y se capturó en H₂O. Finalmente, la filtración del precipitado dio como resultado el compuesto del título en forma de un polvo de color blanco (147 mg), pf: 275 °C.

EMAR calc. para C₂₅H₂₃N₂O₃ (M+H⁺) 433,1319, encontrado: 433,1299. Tr: 2,21 min.

RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,2 (d, 3 H) 1,35 (m, 1 H) 2,3 (s, 3 H) 2,7 (m, 1 H) 4,25 (dd, 1 H) 4,95 (m, 1 H) 6,65 (d, 2 H) 7,15 (d, 2 H) 7,25 (s, 1 H) 7,55 (m, 4 H), 8,15(d, 2 H)

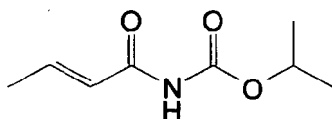
[α]_D = + 395 (c= 0,96 g/cl, EtOH) medida en la etapa de recrystalización de EtOAc.

El compuesto del título se eluyó a 4,51 min mediante HPLC como el primer pico usando una columna a Chiralpak IA (250 x 4,6 mm 5µm) con óxido de terc-butil metilo (MTBE) + TFA al 0,1 % en etanol: 90/10 como fase móvil. Se aplicó una caudal de 1 ml/mn y se inyectó una muestra de 10µl preparada por dilución de 1 mg del compuesto del título en 1 ml de eluyente. La detección del compuesto se realizó a dos longitudes de onda UV, 210 y 254 nM. El otro enantiómero llegó a los 5,92 min.

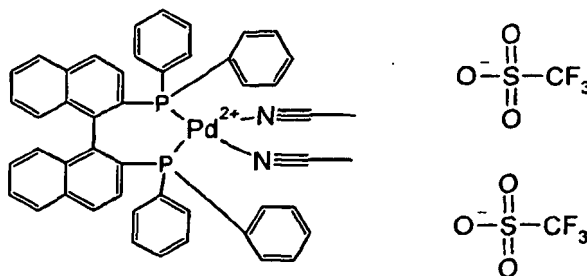
Compuesto (III)1-Acetil-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina

35

5 2-Metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (216 mg, 1,469 mmol, disponible de TCI) se midió en un tubo de ensayo y se añadió anhídrido acético (0,139 ml, 1,469 mmol) y se dejó en agitación durante una noche. El análisis mediante CLEM mostró que la reacción se había completado. El producto en bruto se purificó por MDAP para obtener el compuesto deseado (677 mg) CLEM (Procedimiento B). Tr = 0,93, MH+ 190

Compuesto intermedio 9(2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo

10 Carbamato de isopropilo (30 g, 291 mmol, disponible de TCI) se introdujo en un recipiente La ra de 3 l y se añadió tetrahidrofurano (THF) seco (150 ml). Se añadió cloruro de (2E)-2-butenilo (31,2 ml, 326 mmol, disponible de Aldrich) bajo atmósfera de nitrógeno y la camisa se enfrió a -30 °C. Cuando la temperatura de la solución alcanzó -17 °C se añadió terc-butóxido de litio 1 M (655 ml, 655 mmol) mediante una bomba peristáltica durante 2 horas, manteniendo la temperatura de reacción entre -10 °C y -18 °C. Una vez que se completó la adición, la mezcla se agitó durante 30 min y se llevó a 0 °C. Se añadieron dietil éter (450 ml) y HCl 1 M (375 ml) y la mezcla se llevó a 20 °C con agitación intensa. La agitación se detuvo, se dejó que las capas se separaran, y la capa acuosa se descartó. Se añadió salmuera (375 ml), y la mezcla se agitó intensamente. La agitación se detuvo, se dejó que las capas se separaran, y la capa acuosa se descartó. La capa orgánica se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se evaporó para dar un aceite de color marrón (60 g). La mezcla se llevó a una columna de sílice 40+M Biotage y se eluyó con una mezcla DCM:acetato de etilo (1:1 a 0:1, 10CV). Las fracciones que contenían producto se evaporaron a sequedad y se llevaron a una columna de sílice Redisep Isco de 1500 g que se eluyó con un gradiente de 0 a 40 % de acetato de etilo en ciclohexano. Las fracciones limpias que contenían producto se evaporaron para dar un sólido de color crema (15,41 g). CLEM (Procedimiento C): Tr = 0,68, MH+ = 172

25 Compuesto intermedio 10(R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II)

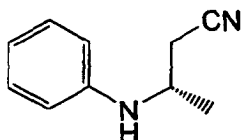
30 R-(+)-BINAP (6,08 g, 9,76 mmol, disponible de Avocado) se agitó en diclorometano (DCM) (626 ml) y se añadió diclorobis(acetonitrilo)paladio(II) (2.5 g, 9,64 mmol, disponible de Aldrich). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 min, la suspensión no se convirtió en una solución y se añadió más cantidad de DCM (100 ml). La mezcla se agitó durante 30 min más y se añadió triflato de plata (5,00 g, 19,47 mmol, disponible de Aldrich) disuelto en acetonitrilo (250 ml). La mezcla cambió de una suspensión turbia de color naranja a una suspensión de color amarillo. La mezcla se agitó durante 1 hora, se filtró a través de Celite y se evaporó para dar un sólido de color

beige. El residuo se secaron al vacío (a aproximadamente 14 mbar [1400 Pa]) a temperatura ambiente durante el fin de semana para obtener el producto deseado (10,69 g).

RMN ¹H (400 MHz, MeCN-d₃) δ ppm 2,0 (s, 6 H), 6,7 (d, 2H), 6,9 (m a, 4H), 7,1 (t a, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,5 - 7,9 (m, 22H)

5 Compuesto intermedio 11

(3S)-3-(fenilamino)butanonitrilo

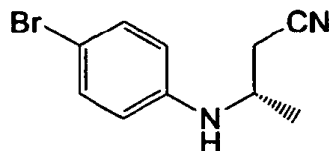


10 El (3S)-3-aminobutanonitrilo (8,6 g, 102 mmol, se puede preparar como se describe en la solicitud int. PCT 2005100321), bromobenceno (16,16 ml, 153 mmol) y carbonato de cesio (50,0 g, 153 mmol) se combinaron en tolueno (100 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitaron durante 45 min. Ácido fenilborónico (0,187 g, 1,534 mmol, Aldrich), acetato de paladio(II) (0,188 g, 0,837 mmol, disponible de Aldrich) y 2-diciclohexilfosfino-2'-(N,N-dimetilamino)bifenilo (0,443 g, 1,125 mmol, disponible de Aldrich) se combinaron en tetrahidrofurano (THF) (6,67 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitaron durante 45 min. La solución de THF se añadió a la solución de tolueno y la reacción se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió y se repartió entre EtOAc (500 ml) y agua (300 ml). La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc (200 ml). La combinación de capas orgánicas se lavó con agua y salmuera (500 ml cada) y después se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite de color naranja. EL producto en bruto se capturó en la mínima cantidad de DCM, se aplicó a una columna Companion XL de 330 g y se eluyó con acetato de etilo al 5 % en ciclohexano durante 1 CV y después con acetato de etilo al 5-30 % durante 12CV después se mantuvo a 30 % durante 3CV; recogida UV; fracciones de 450 ml. El producto se aisló en forma de un sólido de color crema (11,3526 g).

20 CLEM (Procedimiento B): Tr = 0,87, MH⁺ = 161

Compuesto intermedio 12

(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanonitrilo

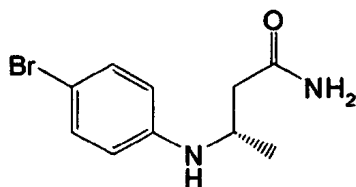


25 (3S)-3-(fenilamino)butanonitrilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 11) (11,3526 g, 70,9 mmol) se capturó en N,N-dimetilformamida (DMF) (200 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió NBS (12,61 g, 70,9 mmol) y la reacción se agitó. Después de 20 min, la reacción se repartió entre EtOAc (1000 ml) y agua (500 ml). La capa orgánica se lavó con NaOH 2 M x 2, agua y salmuera (500 ml cada una) y después se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar el producto en forma de un sólido cremoso (17,3 g).

30 CLEM (Procedimiento B): Tr = 1,05, MH⁺ = 239

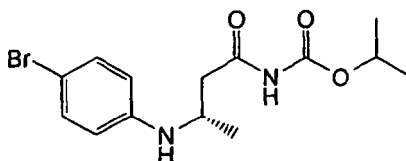
Compuesto intermedio 13

(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanamida



35 (3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanonitrilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 12) (17,3 g, 72,4 mmol) se capturó en tolueno (500 ml) y se añadió H₂SO₄ (19,28 ml, 362 mmol). La mezcla bifásica se agitó a 60 °C. Después de dos horas, solamente permanecía un poco de SM, según el análisis de CLEM, por lo la reacción se diluyó con agua (500 ml) y las fases se separaron. La fase acuosa se basificó con NaOH 10 N y se extrajo con EtOAc(2 x 750 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron con Na₂SO₄, y la combinación se filtró y se concentró para dar el producto en forma de un sólido cremoso (17,5 g). CLEM (Procedimiento B): Tr = 0,77, MH⁺ = 257

40

Compuesto intermedio 14((3S)-3-[(4-Bromofenil)aminobutanoil]carbamato de 1-metiletilo

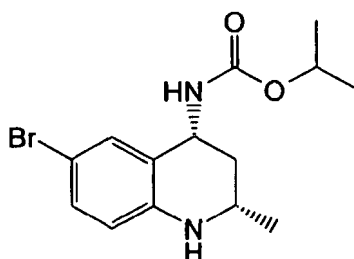
5 (3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanamida (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 13, 24,9 g, 97 mmol) se disolvió en acetato de etilo (850 ml) y se enfrió a <-9 °C (interna). Se añadió cloroformiato de bencilo (116 ml, 116 mmol, Aldrich) seguido por la adición lenta de terc-butóxido de litio (18,61 g, 232 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (232 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C. La reacción se agitó durante 30 min y después se comprobó mediante CLEM, que mostró una reacción completa. La mezcla se repartió entre EtOAc (1000 ml) y HCl 2 N (2000 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera (2000 ml) y después secó con Na₂SO₄, se filtró y se
10 concentró para obtener el producir en forma de un aceite de color marrón (17,9 g)
CLEM (Procedimiento B): Tr = 1,09, MH+ = 343

Procedimiento alternativo

15 (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (Compuesto intermedio 9, 9,38 g, 54,8 mmol) se agitó en tolueno (281 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II) (Compuesto intermedio 10, 3,35 g, 3,01 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se volvió una mezcla de color amarillo opaco que se agitó durante 20 min. Se añadió 4-bromoanilina (14,14 g, 82 mmol), la solución se volvió de color marrón claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió en mayor cantidad. La mezcla se agitó durante la noche.
Análogamente, un segundo lote de (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (Compuesto intermedio 9, 8,51 g, 49,7 mmol) se agitó en tolueno (255 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II) (3,04 g, 2,73 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se volvió una mezcla de color amarillo opaco que se agitó durante 20 min. Se añadió 4-bromoanilina (12,83 g, 74,6 mmol), la solución se volvió de color marrón claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió en mayor
20 cantidad. La mezcla se agitó durante la noche.
Las dos mezclas de reacción se combinaron y cargaron en una columna de sílice Isco Redisep de 1,5 kg. La columna se eluyó con DCM:MeOH (0 %->0,5 %, 19CV). Las fracciones limpias que contenían el producto se evaporaron para dar un aceite de color marrón pálido. La mezcla se secó en un horno de vacío durante la noche a 40 °C para dar un sólido de color blanco (24,2 g, 67 % global).
25 CLEM (Procedimiento C): Tr = 0,91, MH+ = 343. ee = 92 %.

Compuesto intermedio 15

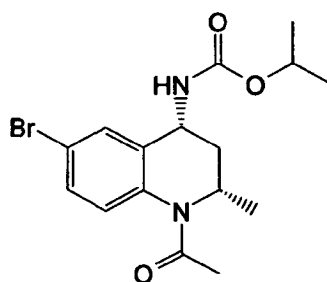
30 [(2S,4R)-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo



35 {(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanoil]carbamato de 1-metiletilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 14) (17,9 g, 52,2 mmol) se capturó en etanol (150 ml) y se enfrió por debajo de -10 °C (interna) en un baño de CO₂/acetona. Se añadió NaBH₄ (1,381 g, 36,5 mmol) seguido por cloruro de magnesio hexahidratado (11,35 g, 55,8 mmol) en agua (25 ml) manteniendo la temperatura por debajo de -5 °C. La mezcla se dejó agitar a <0 °C durante 1 h y a continuación se calentó a TA y se agitó durante 1 hora. La suspensión espesa resultante se vertió en una mezcla de ácido cítrico (25,05 g, 130 mmol). HCl (205 ml, 205 mmol) y diclorometano (DCM) (205 ml). La mezcla bifásica se agitó a TA durante 1 h. El análisis de CLEM mostró que no quedaba SM de tal manera que la capa orgánica se extrajo y se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar como resultado el producto en
40 forma de un sólido de color marrón claro (14,1 g). CLEM (Procedimiento B): Tr=1,13. MH+ = 327

Compuesto intermedio 16

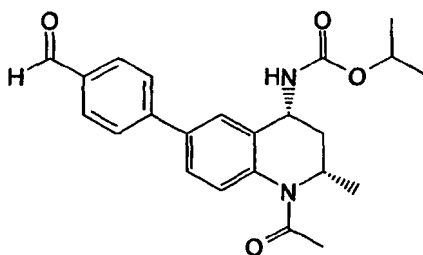
[(2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo



5 [(2S,4R)-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 15) (14,1 g, 43,1 mmol) se capturó en diclorometano (DCM) (400 ml) con nitrógeno a TA. Se añadieron piridina (10,46 ml, 129 mmol) y a continuación cloruro de acetilo (4,60 ml, 64,6 mmol) y la reacción se agitó durante la noche. El análisis de CLEM mostró una reacción completa de tal manera que se repartió entre EtOAc (2000 ml) y una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (800 ml). Se extrajo la capa orgánica y se lavó con agua y salmuera (1500 ml de cada una) y a continuación se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar como resultado un sólido de color púrpura. El producto bruto se capturó en la mínima cantidad de DCM y se aplicó a una columna Companion XL 330 g y se eluyó con un gradiente de 12-63 % de acetato de etilo en ciclohexano. Se recogieron las fracciones que contenían el producto en forma de un sólido de color crema (12,37 g). CLEM (Procedimiento B): Tr=1,03. MH+ = 369 [alfa]D = +281,1025° (T = 20,7 °C. celda de 10mm, c=0,508 g/100 ml de etanol).

Compuesto intermedio 17

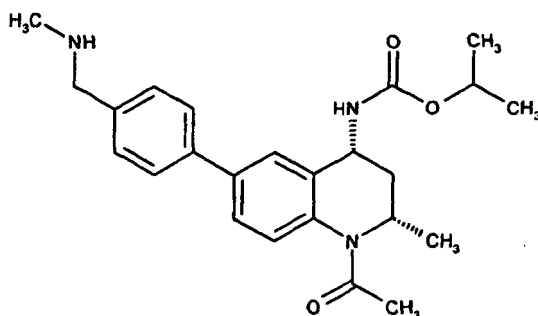
[(2S,4R)-1-acetil-6-(4-formilfenil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo



15 [(2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil] carbamato de 1-metiletilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 16) (1 g, 2,71 mmol), ácido (4-formilfenil)borónico (0,487 g, 3,25 mmol. disponible de Aldrich), Pd(Ph₃P)₄, (0,156 g, 0,135 mmol) y carbonato de potasio (0,487 g, 3,52 mmol) se combinaron en etanol seco (7 ml) y tolueno seco (7,00 ml) y la mezcla de reacción se desgasificó durante 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante la noche. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a t.a. y se concentró. La mezcla de reacción en bruto se repartió entre agua (15 ml) y acetato de etilo (5 ml) y se agitó a t.a. durante 30 min. Precipitó un sólido de color gris claro que se eliminó mediante filtración, se lavó con agua (5 ml) y se secó en un horno de vacío para dar 854 mg de un sólido de color gris. CLEM (Procedimiento B): Tr=1,00. MH+ = 395

Compuesto (IV)

25 1-metiletil ((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-{4-[(metilamino)metil]fenil}-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)carbamate de 1-metiletilo



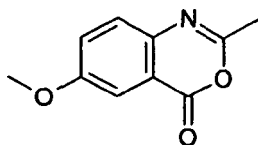
30 [(2S,4R)-1-acetil-6-(4-formilfenil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (para su preparación, véase el Compuesto intermedio 17) (100 mg, 0,254 mmol) se disolvió en metanol (3 ml) y se añadió metilamina 2 M en THF (0,254 ml, 0,507 mmol). La solución de color amarillo se agitó con nitrógeno a temperatura ambiente durante 135 minutos, momento en el que se añadió borohidruro de sodio (15,35 mg, 0,406 mmol). La

reacción se agitó durante 1 h, a continuación se dejó sedimentar durante la noche. La reacción se inactivó rápidamente con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (1 ml) y se añadió EtOAc (8 ml). Se eliminó mediante filtración un sólido de color blanco (depósito *bond elut*) y se encontró que era el producto deseado (34 mg). El filtrado se repartió y se secó la capa orgánica. La concentración de la capa orgánica proporcionó 67 mg de un residuo incoloro que se aplicó a una columna de sílice 12+S Biotage y se purificó eluyendo con un gradiente de amoníaco metanólico 1-5% en DCM. La concentración del producto que contenía las fracciones proporcionó otro lote del producto deseado (52 mg).

CLEM (Procedimiento C): Tr=0,71, MH+ = 410

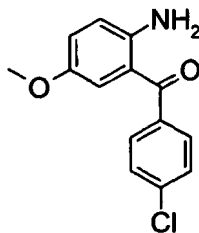
10 RMN 1 H (CLOROFORMO-d, 600MHz): δ (ppm) 7,55 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,49 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,45 (s a, 1H), 7,41 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,52 - 5,08 (m, 4H), 3,81 (s, 2H), 2,62 (ddd, J = 12,5, 8,3, 4,5 Hz, 1H), 2,50 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 1,21 - 1,37 (m, 7H), 1,18 (d, J = 6,4 Hz, 3H)

Compuesto de referencia A: 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona



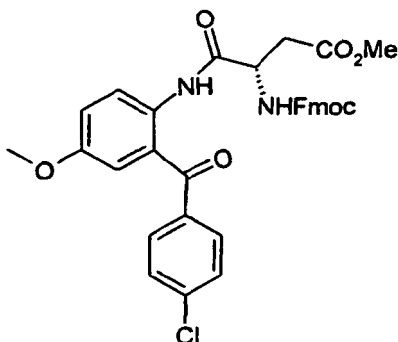
15 Una solución de ácido 5-metoxiantranílico (Lancaster) (41,8 g, 0,25 mol) se calentó a temperatura de reflujo en anhídrido acético (230 ml) durante 3,5 h antes de concentrarse a presión reducida. A continuación, se concentró el compuesto bruto dos veces en presencia de tolueno antes de filtrarse y lavarse dos veces con éter para dar como resultado el compuesto del título (33,7 g, rendimiento del 71 %) en forma de un sólido de color marrón; CL/EM (Procedimiento D): m/z 192 [M+H]⁺, Tr 1,69 min.

20 Compuesto de referencia B: [2-amino-5-(metiloxi)fenil](4-clorofenil)metanona



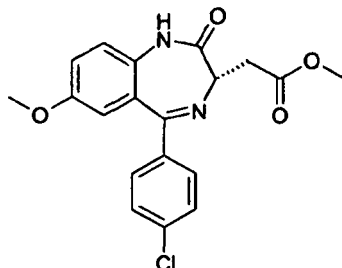
A una solución de 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona (para su preparación, véase el Compuesto de referencia A) (40,0 g, 0,21 mol) en una mezcla de tolueno/éter (2/1) (760 ml) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de bromuro de 4-clorofenil-magnesio (170 ml, 1 M en Et₂O, 0,17 mol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h antes de inactivarse rápidamente con HCl 1 N (200 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y la combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera (100 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. A continuación el compuesto bruto se disolvió en EtOH (400 ml) y se añadió HCl 6 N (160 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo durante 2 h antes de concentrarse a un tercio de su volumen. El sólido resultante se filtró y se lavó dos veces con éter antes de suspenderse en EtOAc y neutralizarse con NaOH 1 N. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y la combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera (150 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo (39 g, rendimiento de 88 %). CL/EM (Procedimiento D): m/z 262 [M+H]⁺, Tr 2,57 min.

35 Compuesto de referencia C: N¹-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)fenil]-N²-[[9H-fluoren-9-il-metil]oxi]carbonil]-L-asparaginato de metilo



Cloruro de metil *N*-[[[9H-fluoren-9-ilmetil]oxi]carbonil]-L- α -aspartilo (Int. J. Peptide Protein Res. 1992, 40, 13-18) (93 g, 0,24 mol) se disolvió en CHCl_3 (270 ml) y se añadió [2-amino-5-(metiloxi)fenil](4-clorofenil)metanona (53 g, 0,2 mol) (para su preparación, véase el Compuesto de referencia B). La mezcla resultante se agitó a 60 °C durante 1 h antes de enfriarse y concentrarse al 60 % en volumen. Se añadió éter a 0 °C y el precipitado resultante se filtró y descartó. El filtrado se concentró a presión reducida y se usó sin purificación adicional.

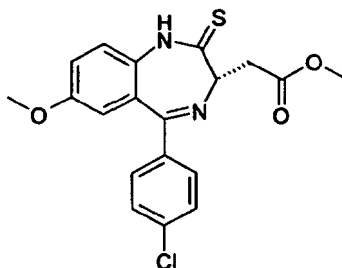
Compuesto de referencia D: [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo



A una solución de N1-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)fenil]-N2-[[[9H-fluoren-9-ilmetil]oxi]carbonil]-L- α -asparaginato de metilo (para su preparación, véase el Compuesto de referencia C) (asumido 0,2 mol) en DCM (500 ml) se añadió Et_3N (500 ml, 3,65 mol) y la mezcla resultante se calentó a temperatura de reflujo durante 24 horas antes de concentrarse. La amina bruta resultante se disolvió en 1,2-DCE (1,5 l) y se añadió cuidadosamente AcOH (104 ml, 1,8 mol). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h antes de concentrarse a vacío y se disolvió en DCM. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N y la capa acuosa se extrajo con DCM (x3). La combinación de capas orgánicas se lavó dos veces con agua, y salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El sólido bruto resultante se recrystalizó en MeCN conduciendo al compuesto del título (51 g) en forma de un sólido de color amarillo pálido. El filtrado se pudo concentrar y recrystalizar en MeCN para dar otros 10 g del producto deseado $T_a = 0,34$ (DCM/MeOH: 95/5).

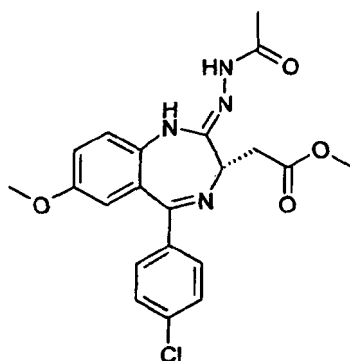
EMAR (M+H)⁺ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_4$ 373,0955; encontrado 373,0957.

Compuesto de referencia E: [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo



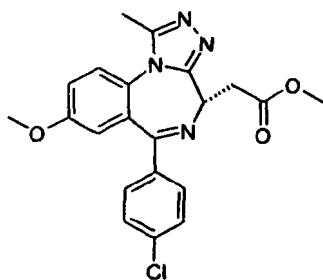
Una suspensión de P_4S_{10} (36,1 g, 81,1 mmol) y Na_2CO_3 (8,6 g, 81,1 mmol) en 1,2-DCE (700 ml) a temperatura ambiente se agitó durante 2 h antes de añadir [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo (para su preparación, véase el Compuesto de referencia D) (16,8 g, 45,1 mmol). La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 2 h antes de enfriarse y filtrarse. El sólido se lavó dos veces con DCM y el filtrado se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 y salmuera. La capa orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con gel de sílice (DCM/MeOH : 99/1) para dar el compuesto del título (17,2 g, rendimiento del 98 %) en forma de un sólido amarillento. CL/EM (Procedimiento D): m/z 389 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Tr 2,64 min EMAR (M+H)⁺ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ 389,0727; encontrado 389,0714.

Compuesto de referencia F: [(3S)-2-[(1Z)-2-acetilhidrazino]-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-3H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo



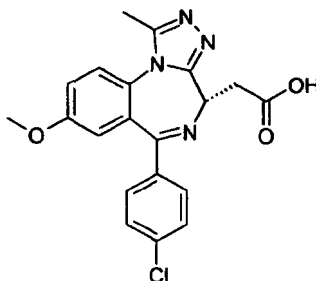
A una suspensión de [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo (para su preparación, véase el compuesto de referencia E (9,0 g, 23,2 mmol) en THF (300 ml) a 0 °C se añadió monohidrato de hidrazina (3,4 ml, 69,6 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó durante 5 h entre 5 °C y 15 °C antes de enfriarse a 0 °C. A continuación se añadió lentamente Et₃N (9,7 ml, 69,6 mmol) y se añadió gota a gota cloruro de acetilo (7,95 ml, 69,6 mmol). A continuación se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h antes de concentrarse a presión reducida. El producto bruto se disolvió en DCM y se lavó con agua. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró *a vacío* para dar el compuesto del título en bruto (9,7 g, rendimiento del 98 %) que se usó sin purificación adicional. R_f = 0,49 (DCM/MeOH : 90/10).

10 Compuesto de referencia G: [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]acetato de metilo



15 [(3S)-2-[(1Z)-2-acetilhidrazino]-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-3H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo en bruto (para su preparación véase el Compuesto de referencia F) (supuestamente 9,7 g) se suspendió en THF (100 ml) y se añadió AcOH (60 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 2 días antes de concentrarse a presión reducida. Se trituró el sólido bruto en i-Pr₂O y se filtró para dar el compuesto del título (8,7 g, 91 % en 3 etapas) en forma de un sólido de color crema. EMAR (M+H)⁺ calculado para C₂₁H₂₀ClN₄O₃ 411,1229; encontrado 411,1245.

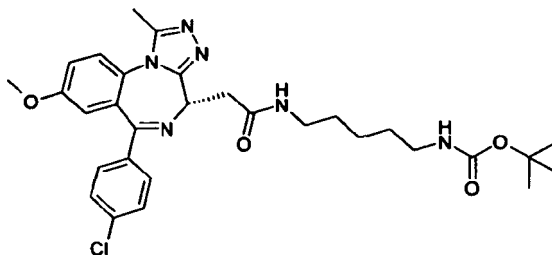
20 Compuesto de referencia H: Ácido [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acético



A una solución de [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetato de metilo (para su preparación véase el Compuesto de referencia G) (7,4 g, 18,1 mmol) en THF (130 ml) a temperatura ambiente se añadió NaOH 1 N (36,2 ml, 36,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 5 h inactivándose rápidamente con HCl 1 N HCl (36,2 ml) y se concentró *a vacío*. A continuación se añadió agua y la capa acuosa se extrajo con DCM (x3) y la combinación de capas orgánicas se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (7 g, rendimiento del 98 %) como un sólido de color amarillo claro.

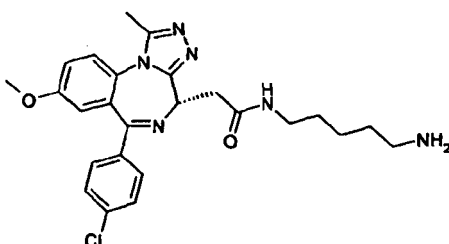
Compuesto de referencia I: [5-(((4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-

4-il]acetil]amino)pentil]carbamato de 1,1 dimetilo



Una mezcla de [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acético (para su preparación, véase el Compuesto de referencia H) (1,0 g, 2,5 mmol), HATU (1,9 g, 5 mmol) y DIPEA (0,88 ml, 5 mmol) se agitó durante 80 minutos a temperatura ambiente, a esta mezcla se añadió (4-aminobutil)carbamato de 1,1-dimetiletilo (1,05 ml, 5,0 mmol, disponible de Aldrich). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h antes de concentrarse. El residuo se capturó en diclorometano y se lavó con HCl 1 N. La capa acuosa se extrajo con diclorometano dos veces. La capa orgánica se lavó con hidróxido de sodio 1 N, seguido por una solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando diclorometano / metanol 95/5 para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,2 g). CL/EM (Procedimiento D): Tr = 3,04 min.

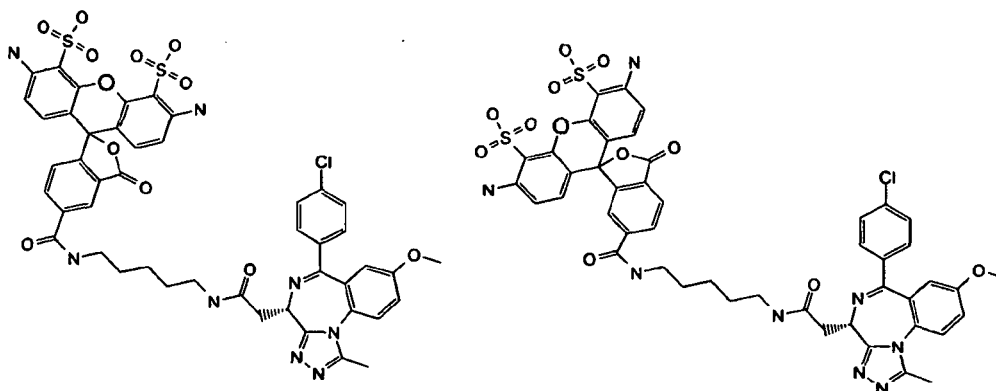
Compuesto de referencia J: Trifluoroacetato de N-(5-amiopentil)-2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetamida



.TFA

A una solución de [5-([(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetil]amino)pentil]carbamato de 1,1-dimetiletilo (para su preparación, véase el Compuesto de referencia I) (0,2 g, 0,34 mmol) en diclorometano (3 ml) se añadió ácido trifluoroacético (0,053 ml, 0,68 mmol) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h desde 0 °C a temperatura ambiente. La reacción se concentró a sequedad para obtener el compuesto del título en forma de un sólido higroscópico color amarillo (200 mg) CL/EM (Procedimiento D): Tr = 2,33 min. EMAR (M+H)⁺ calculado para C₂₅H₂₉ClN₆O₂ 481,2119; encontrado 481,2162.

Compuesto de referencia K: Mezcla de isómeros 5 y 6 de Alexa Fluor 488-N-(5-aminopentil)-2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetamida



Trifluoroacetato de N-(5-aminopentil)-2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetamida (para su preparación, véase el Compuesto de referencia J) (7,65 mg, 0,013 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (DMF) (300 µl) y se añadió al éster de succinimido de Alexa Fluor 488 ácido carboxílico (5 mg, 7,77 µmol, mezcla de isómeros 5 y 6, disponible de Invitrogen, número de producto A-20100) en un tubo de centrifuga Eppendorf. Se añadió base de Hunig (7,0 µl, 0,040 mmol) y la mezcla se sometió a vortización durante la noche. Después de 18 h la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se

redisolvió en DMSO/agua (50 %, <1 ml total), se aplicó a una columna Phenomenex Jupiter C18 preparativa y se eluyó con un gradiente de 95 % de A: 5 % de B a 100 % de B (A = 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua, B= 0,1 % de TFA/90 % de acetonitrilo/10 % de agua) a un caudal de 10 ml/min durante 150 minutos. Se combinaron las fracciones impuras que se volvieron a purificar usando el mismo sistema. Se combinaron las fracciones y se evaporaron para dar como resultado el producto del título (2,8 mg) como una mezcla de los 2 regioisómeros mostrados. CL/EM (Procedimiento F): [MH]⁺ = 999, Tr = 1,88 min.

Procedimientos de ensayo biológicos

Ensayo de unión mediante anisotropía de fluorescencia

Se evaluó la unión de los compuestos (I) a (IV) a los bromodominios BRD-2, BRD-3 y BRD-4 utilizando un Ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia.

La proteína del bromodominio, el ligando fluorescente (compuesto de referencia K, véase anteriormente) y una concentración variable del compuesto de ensayo se incubaron juntos para alcanzar el equilibrio termodinámico en condiciones tales que, en ausencia del compuesto de ensayo, el ligando fluorescente se une significativamente (>50 %) y en presencia de una concentración suficiente de un inhibidor potente, la anisotropía del ligando fluorescente no unido se puede medir de forma diferenciada al valor en la unión.

Se normalizaron todos los datos al promedio de 16 pocillos de control alto y 16 pocillos de control bajo en cada placa. A continuación se aplicó un ajuste de una curva de cuatro parámetros a la siguiente forma:

$$y = a + ((b - a) / (1 + (10^x / 10^c)^d))$$

En la que 'a' es el mínimo, 'b' es la pendiente de Hill, 'c' es la pCl₅₀ y 'd' es el máximo.

Se expresaron los bromodominios humanos recombinantes (BRD-2 (1-473), BRD-3 (1-435) y BRD-4 (1-477)) en células de *E. Coli* (en el vector pET15b) con seis etiquetas His en el extremo N. Se extrajo el bromodominio etiquetado con His de células de *E. Coli* utilizando 0,1 mg/ml de lisozima y sonicación. A continuación se purificó el bromodominio mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTRAP HP, eluyendo con un gradiente lineal de imidazol 10-500mM, sobre 20 Cv. Se completó la purificación adicional mediante una columna de exclusión por tamaños Superdex 200 de calidad prep. La proteína purificada se almacenó a -80C en HEPES 20mM pH 7,5 y NaCl 100 mM.

Protocolo para el bromodominio BRD-2: Se disolvieron todos los componentes en una composición tampón de HEPES 50 mM pH7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales para BRD-2 de 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 µl de esta mezcla de reacción utilizando un micro multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de ensayo o del vehículo de DMSO (1 % final) en una placa de microvaloración de 384 pocillos de color de volumen bajo y se equilibró en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Se leyó la anisotropía de fluorescencia en Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico - 505 nM).

Protocolo para el bromodominio BRD-3: Se disolvieron todos los componentes en tampón de composición HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales para 75 nM de BRD-3 ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 µl de esta mezcla de reacción utilizando un micro multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de ensayo o del vehículo de DMSO (1 % final) en una placa de microvaloración de 384 pocillos de color de volumen bajo y se equilibró en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Se leyó la anisotropía de fluorescencia en Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico - 505 nM).

Protocolo para el bromodominio BRD-4: Se disolvieron todos los componentes en tampón de composición HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales para 75 nM de BRD-4 ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 µl de esta mezcla de reacción utilizando un micro multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de ensayo o del vehículo de DMSO (1 % final) en una placa de microvaloración de 384 pocillos de color de volumen bajo y se equilibró en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Se leyó la anisotropía de fluorescencia en Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico - 505 nM).

Los compuestos (I), (II) y (IV) tuvieron una pCl₅₀ ≥ 6,0 en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4 descritos anteriormente. El compuesto (III) tuvo una pCl₅₀ ≤ 4,3 en cada uno de los ensayos BRD-2, BRD-3 y BRD-4 descritos anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

- 5 a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

o

- 10 b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

y

c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5Å de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PR098 | PR0371 | PR058 | PR0333 | PR082 | PRO375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

15

2. Un procedimiento de identificación de compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiben la unión del primer y/o segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas que comprende seleccionar aquellos compuestos que pueden:

- 20 a) formar una interacción de tipo enlace de hidrógeno en la que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno procedente del grupo NH₂ de la cadena secundaria del resto asparagina que se encuentra en:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ASN156 | ASN429 | ASN116 | ASN391 | ASN140 | ASN433 |

y

b) acepta un enlace de hidrógeno mediado por agua en el que el compuesto acepta un enlace de hidrógeno que procede de una molécula de agua que está a su vez unida mediante un enlace de hidrógeno al hidroxilo de la cadena secundaria del resto tirosina que se encuentra en

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TYR113 | TYR386 | TYR73 | TYR348 | TYR97 | TYR390 |

25

y

c) que también pueden formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos se encuentran a una distancia de 5Å

de cualquiera de los átomos pesados de los siguientes restos del bromodominio que definen la bolsa de unión:

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TRP97 | TRP370 | TRP57 | TRP332 | TRP81 | TRP374 |
| PR098 | PR0371 | PR058 | PR0333 | PR082 | PR0375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |
| MET165 | MET438 | MET125 | MET400 | MET149 | MET442 |

- 5 3. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la etapa (c) requiere que los compuestos puedan formar una interacción de Van der Waals con una región de unión lipófila de una bolsa de unión de tal manera que uno o más átomos pesados de dichos compuestos estén a una distancia de 7,5 Å de al menos un átomo pesado de cada uno de los 3 restos de lisina relacionados para un bromodominio dado

| BD1 de BRD-2 | BD2 de BRD-2 | BD1 de BRD-3 | BD2 de BRD-3 | BD1 de BRD-4 | BD2 de BRD-4 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PR098 | PR0371 | PR058 | PR0333 | PRO82 | PR0375 |
| ASP161 | ASP434 | ASP121 | GLU396 | ASP145 | GLU438 |
| ILE162 | VAL435 | ILE122 | VAL397 | ILE146 | VAL439 |

- 10 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la etapa (a) y/o (b) se realiza en primer lugar para permitir la identificación de un fragmento del compuesto, antes de que se realice la etapa (c) para modificar el fragmento identificado en las etapas (a) y/o (b) para proporcionar un compuesto con un peso molecular en el intervalo de 100 a 750 que inhiba la unión del primer y/o el segundo bromodominios de BRD-2 a 4 humanos a restos de lisina acetilados de sus proteínas fisiológicas asociadas.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la identificación de los compuestos con un peso molecular en el intervalo de 100 a 500.

Figura 1

Alineamiento de secuencia de los bromodominios humanos BRD-2, BRD-3 y BRD-4

```

BRD-2_D1  58  PANPPPPEVS  NPKKPGRVTN  QLQYLHKVVM  KALWKHQ..F  AWPFRQPVDA
BRD-3_D1  18  PVNPPPPEVS  NPSKPGRKTN  QLQYMQNVVV  KTLWKHQ..F  AWPFYQPVDA
BRD-4_D1  42  STNPPPPEVS  NPNKPKRQTN  QLQYLLRVVL  KTLWKHQ..F  AWPFYQPVDA
BRD-2_D2  339  .....    QSSKKGKLSE  QLKHCNGILK  ELLSKKHAAY  AWPFYKPVDA
BRD-3_D2  301  .....    HAGKKGKLSE  HLRYCDSILR  EMLSKKHAAY  AWPFYKPVDA
BRD-4_D2  343  .....    APEKSSKVSE  QLKCCSGILK  EMFAKKHAAY  AWPFYKPVDA

```

ab

```

BRD-2_D1  106  VKLGLPDYHK  IIKQPMDMGT  IKRRENNYY  WAASECMQDF  NTMFTNCYIY
BRD-3_D1   66  IKLNLDPYHK  IIKNPMDMGT  IKRRENNYY  WSASECMQDF  NTMFTNCYIY
BRD-4_D1   90  VKLNLDPYHK  IIKTPMDMGT  IKRRENNYY  WNAQECIQDF  NTMFTNCYIY
BRD-2_D2  379  SALGLHDYHD  IIKHPMDLST  VKRKMENRDY  RDAQEFAADV  RLMFSNCYKY
BRD-3_D2  341  EALELHDYHD  IIKHPMDLST  VKRKMDGREY  PDAQGFADV   RLMFSNCYKY
BRD-4_D2  383  EALGLHDYCD  IIKHPMDMST  IKSKLEAREY  RDAQEFGADV  RLMFSNCYKY

```

c

```

BRD-2 D1  156  NKPTDDIVLM  AQTLEKIFLQ  KVASMPQEEQ  ELVVTIPKNS  .....
BRD-3 D1  116  NKPTDDIVLM  AQALEKIFLQ  KVAQMPQEEV  ELLPPAPK GK  GRK..
BRD-4 D1  140  NKPGDDIVLM  AEALEKLFLO  KINELPTEET  EIMIVQAKGR  GRGRK
BRD-2 D2  429  NPPDHDVVAM  ARKLQDVFEF  RYAKMPDEPL  EPGPLP....  .....
BRD-3 D2  391  NPPDHEVVAM  ARKLQDVFEM  RFAKMPDEPV  EAPALP....  .....
BRD-4 D2  433  NPPDHEVVAM  ARKLQDVFEM  RFAKMPDEPE  EPVVAV....  .....

```

d ef g

Figura 2 - Representación gráfica del compuesto (I) unido a BD1 de BRD-2

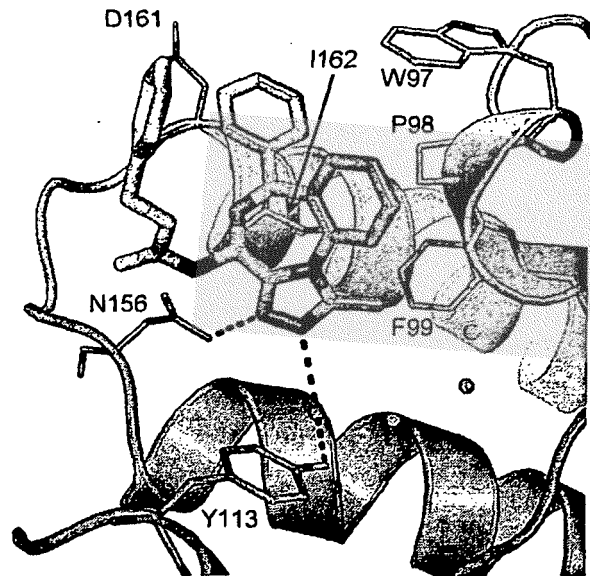


Figura 3 - Representación gráfica del compuesto (I) unido a BD1 de BRD-4

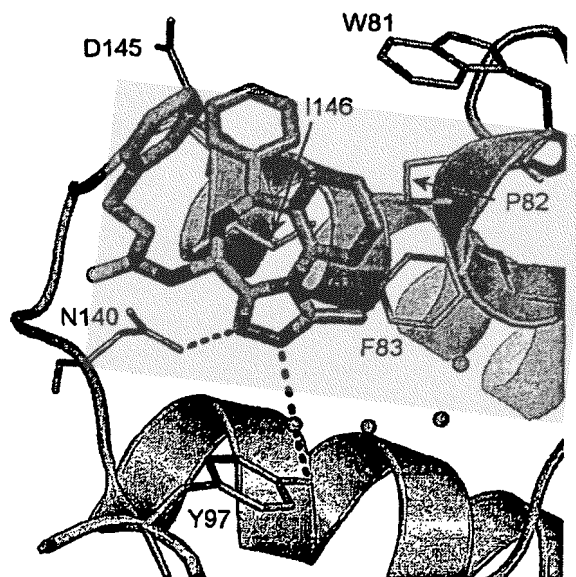


Figura 4 - Representación gráfica del compuesto (I) unido a BD2 de BRD-4

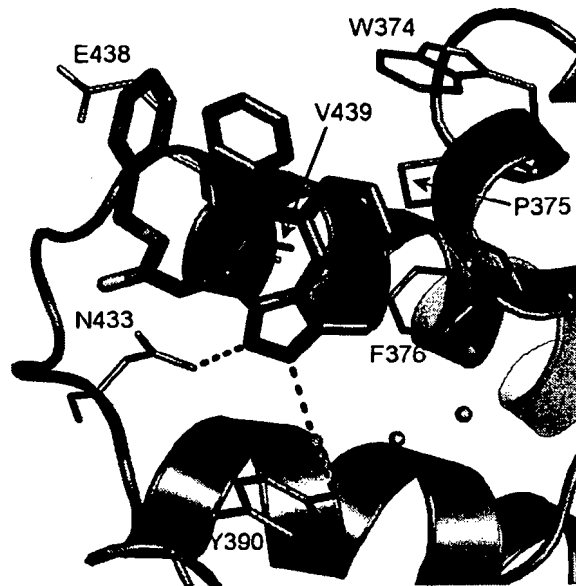


Figura 5 - Representación gráfica del compuesto (II) unido a BD1 de BRD-2

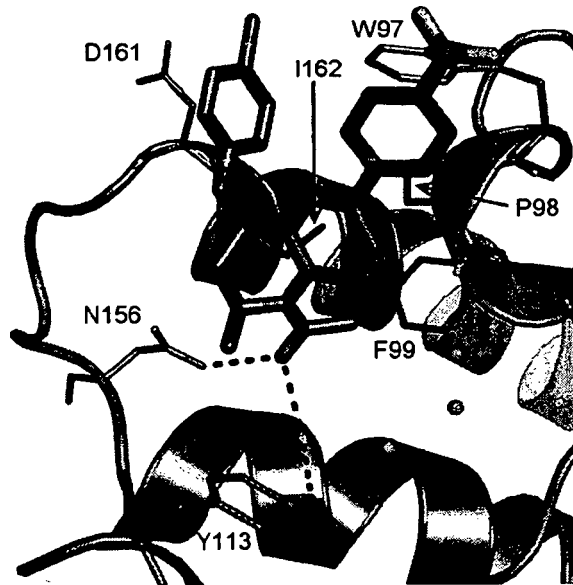


Figura 6 - Representación gráfica del compuesto (II) unido a BD2 de BRD-2

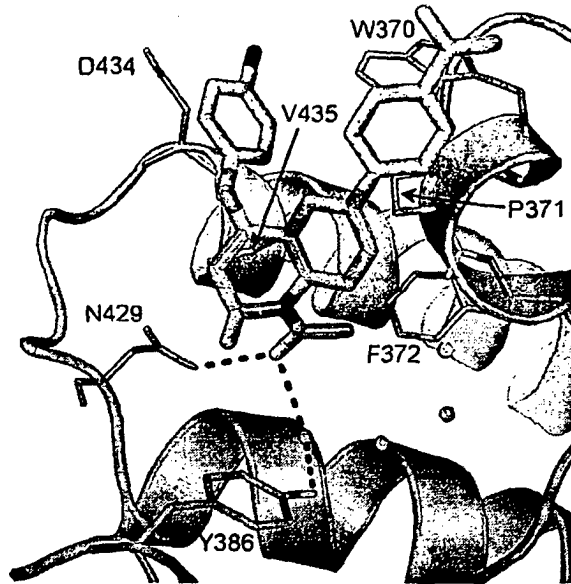


Figura 7 - Representación gráfica del compuesto (I) (bolas y bastones) y del compuesto (II) (bastones) unidos a BD1 de BRD-2.

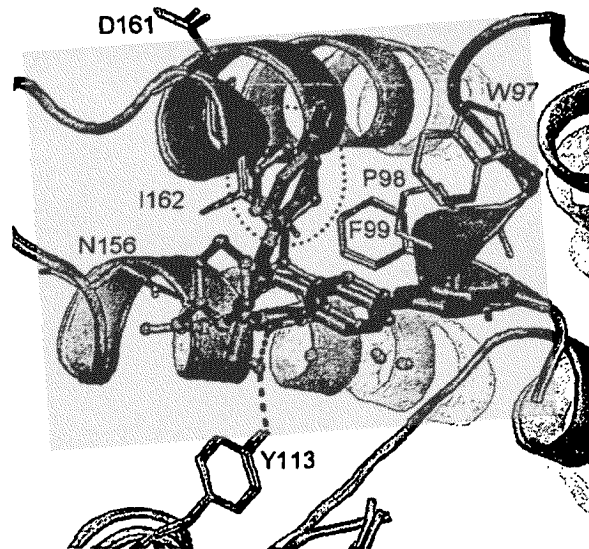


Figura 8 - Representación gráfica del compuesto (I) (bolas y bastones) unido a BD2 de BRD-4, y el compuesto (II) (bastones) unido a BD2 de BRD-2.

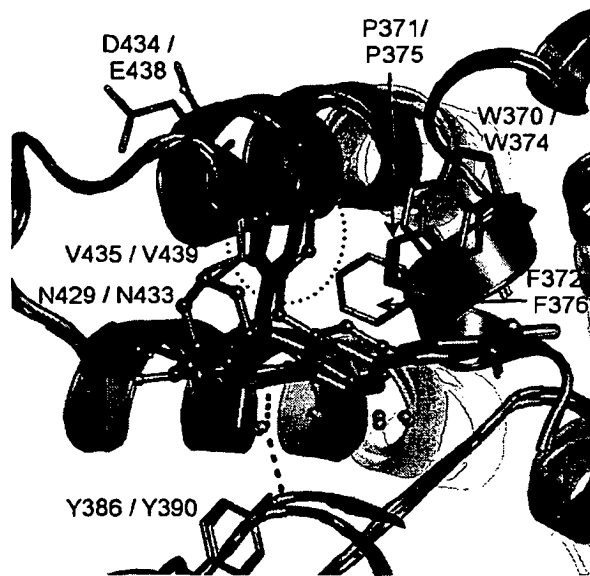


Figura 9 - Representación gráfica del compuesto (III) unido a BD1 de BRD-2

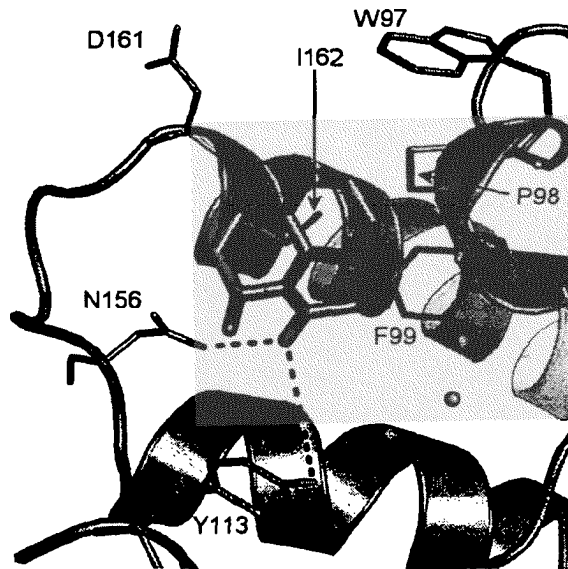


Figura 10 Representación gráfica del compuesto (IV) unido a BD1 de BRD-2

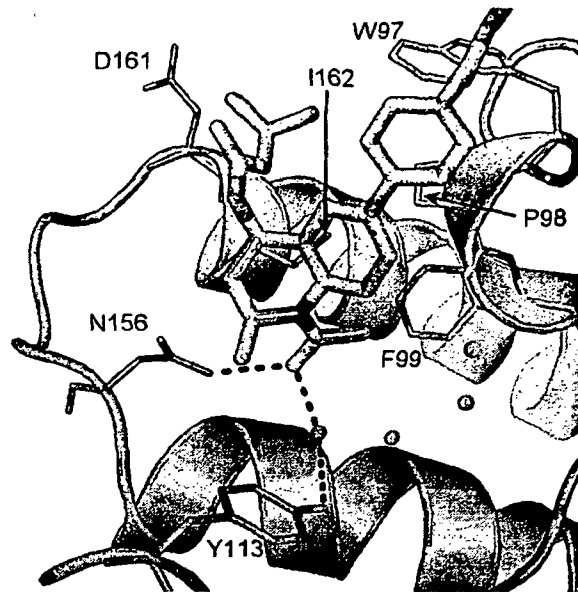


Figura 11:- Representación gráfica del compuesto (I) (bolas y bastones) y del compuesto (IV) (bastones) unidos a BD1 de BRD-2

