

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 302**

51 Int. Cl.:

C07D 215/42 (2006.01)

C07D 215/44 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/4706 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2012 E 12716378 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2699550**

54 Título: **Derivados de tetrahydroquinolina útiles como inhibidores de bromodominio**

30 Prioridad:

21.04.2011 GB 201106743

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

28.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AMANS, DOMINIQUE;
DEMONT, EMMANUEL HUBERT;
MITCHELL, DARREN JASON y
WATSON, ROBERT J**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 544 302 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

Derivados de tetrahydroquinolina útiles como inhibidores de bromodominio

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de tetrahydroquinolina, a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

10 Los genomas de los organismos eucariotas están altamente organizados dentro del núcleo de la célula. Las cadenas largas de ADN dúplex se enrollan alrededor de un octámero de proteínas histonas (lo más usualmente comprendiendo dos copias de histonas H2A, H2B, H3 y H4) para formar un nucleosoma. Esta unidad básica se comprime después adicionalmente por la agregación y pliegue de los nucleosomas para formar una estructura de cromatina muy condensada. Es posible una gama de estados diferentes de condensación y lo ajustado de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el proceso de división celular. La estructura de la cromatina desempeña una función crítica en la regulación de la transcripción génica, lo cual no puede ocurrir eficientemente a partir de la cromatina muy condensada. La estructura de la cromatina está controlada por una serie de modificaciones de postraducción de las proteínas histonas, notablemente las histonas H3 y H4 y lo más comúnmente dentro de las colas de histona que se extienden más allá de la estructura de nucleosoma de núcleo. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación, SUMOilación. Estas marcas epigenéticas se escriben y borran por enzimas específicas, que colocan las etiquetas sobre residuos específicos dentro de la cola de histona, formando así un código epigenético, el cual se interpreta después por la célula para permitir la regulación específica de gen de la estructura de la cromatina y con ello la transcripción.

15 La acetilación de la histona muy usualmente se asocia con la activación de la transcripción génica, ya que la modificación relaja la interacción del ADN y el octámero de histona cambiando la electrostática. Además de este cambio físico, proteínas específicas se unen a residuos de lisina acetilados dentro de las histonas para leer el código epigenético. Los bromodominios son pequeños dominios distintos (~110 aminoácidos) dentro de las proteínas que se unen a residuos de lisina acetilados, comúnmente pero no exclusivamente en el contexto de histonas. Existe una familia de alrededor de 50 proteínas conocidas que contienen bromodominios y tienen una gama de funciones dentro de la célula.

20 La familia BET de proteínas que contienen bromodominio comprende 4 proteínas (BRD2, BRD3, BRD4 y BRD-t) que contienen bromodominios en tándem capaces de unirse a dos residuos de lisina acetilados en estrecha proximidad, aumentando la especificidad de la interacción. Se reporta que BRD2 y BRD3 se asocian con histonas junto a genes transcritos activamente y pueden estar implicados en la facilitación del alargamiento transcripcional (Leroy *et al*, *Mol. Cell*. 2008 30(1): 51-60), mientras que BRD4 parece estar implicada en el reclutamiento del complejo pTEF-β a genes inducibles, dando como resultado la fosforilación de ARN polimerasa y mayor producción transcripcional (Hargreaves *et al*, *Cell*, 2009 138(1): 129-145). También se ha reportado que BRD4 o BRD3 se pueden fusionar con NUT (proteína nuclear de testículo) formando oncogenes de fusión novedosos, BRD4-NUT o BRD3-NUT, en una forma muy maligna de neoplasia epitelial (French *et al*, *Cancer Research*, 2003, 63, 304-307; y French *et al.*, *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). El BRD-t es expresado únicamente en testículos y ovario. Se ha reportado que todos los miembros de la familia tienen alguna función en aspectos de control o ejecución del ciclo celular y se ha mostrado que permanecen en complejo con los cromosomas durante la división celular –sugiriendo una función en el mantenimiento de la memoria epigenética. Además, algunos virus utilizan estas proteínas para atar sus genomas a la cromatina de la célula huésped, como parte del proceso de la replicación viral (You *et al.*, *Cell*, 2004, 117(3): 349-60).

25 La solicitud de patente japonesa JP2008-156311 revela un derivado de bencimidazol del cual se dice que es un agente de unión del bromodominio BRD2 que tiene utilidad con respecto a la infección/proliferación de virus.

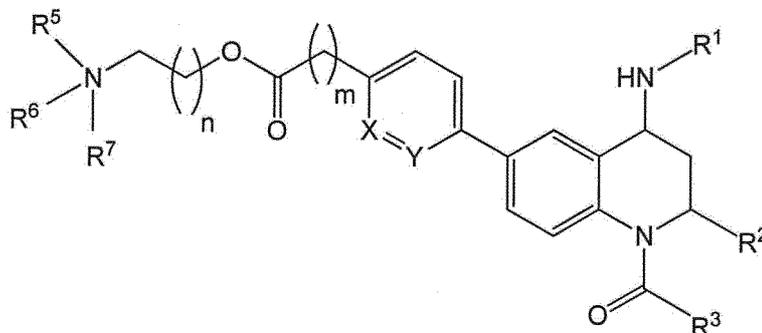
La solicitud de patente WO2009084693 revela una serie de derivados de tienotriazolodiazepina de los cuales se dice que inhiben la unión entre una histona acetilada y una proteína que contiene bromodominio de las cuales se dice que son útiles como agentes anticancerosos.

30 Las solicitudes de patente de PCT PCT/EP2010/06693 (WO2011/054841) y PCT/EP2010/066701 (WO2011/054848) revelan una serie de derivados de tetrahydroquinolina que inhiben la unión de bromodominios de la familia BET a residuos de lisina acetilados.

35 Se ha encontrado una clase novedosa de compuestos que inhiben la unión de los bromodominios con sus proteínas acetiladas cognadas, más particularmente una clase de compuestos que inhiben la unión de los bromodominios de la familia BET con residuos de lisina acetilados. Estos compuestos se referirán en adelante como “inhibidores de bromodominios”.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, más particularmente una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



5 (I)

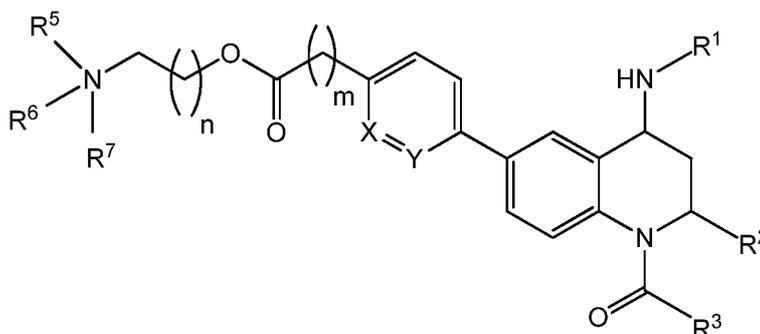
En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más vehículos, diluentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usarse en terapia, en particular en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las que está indicado un inhibidor de bromodominio.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) o una sal de los mismos:



(I)

en la cual

20 X e Y son independientemente CH o N, con la condición de que por lo menos uno de X e Y debe ser CH;

R¹ es un grupo C(O)OR⁴ en donde R⁴ es alquilo de C₁₋₄ o cicloalquilo de C₃₋₇; o

R¹ es un grupo seleccionado de fenilo, piridilo, pirazinilo y pirimidinilo estando dichos grupos sustituidos opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo de C₁₋₄ y CN;

R² es alquilo de C₁₋₄;

25 R³ es alquilo de C₁₋₄;

R⁵ y R⁶ son independientemente alquilo de C₁₋₄; o

R⁵ y R⁶ se combinan junto con el N al que están unidos para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros;

R⁷ está ausente o es alquilo de C₁₋₄;

m es 0, 1 o 2;

n es 1 o 2.

5 En una realización la invención proporciona compuestos de fórmula (I) con estereoquímica relativa *cis* a través del anillo de tetrahydroquinolina con respecto a los sustituyentes en la posición 2 y 4 del anillo. En una realización, el compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo es el enantiómero (2*S*,4*R*).

En una realización, X e Y son ambos CH. En una realización adicional X es CH e Y es N.

En una realización R¹ es un grupo C(O)OR⁴ en el cual R⁴ es isopropilo.

10 En una realización adicional, R¹ es fenilo o piridilo sustituido opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo de C₁₋₄ y CN. En una realización más, R¹ es 4-clorofenilo o R¹ es 5-cianopiridin-2-ilo.

En una realización R² es metilo.

En una realización R³ es metilo.

En una realización m es 0.

15 En una realización n es 0. En una realización adicional n es 1.

En una realización R⁵ y R⁶ son ambos metilo.

Se apreciará que cuando R⁷ es alquilo de C₁₋₄ se formará una porción de amonio cuaternizado. En una realización R⁷ está ausente.

20 Aunque anteriormente se han indicado en general las realizaciones de cada variable separadamente para cada variable, esta invención incluye todas las combinaciones de las realizaciones anteriormente descritas, incluyendo las sales de las mismas.

Compuestos particulares de acuerdo con la invención son:

4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo;

25 2-((4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletanaminio;

3-((4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminio;

4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo;

30 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)nicotinato de 3-(dimetilamino)propilo;

6-((2*R*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)nicotinato de 2-(dimetilamino)etilo;

4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxycarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo; y

35 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxycarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo;

o una sal de los mismos.

En la presente memoria, a menos que se indique de otra manera:

- el término "halógeno" se usa para describir un grupo seleccionado de flúor, cloro o bromo;
- 40 • los términos "alquilo de C₁₋₄" y "alquilo de C₁₋₆" se usan para describir un grupo o parte de un grupo que comprende un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 1 a 4 o de 1 a 6 átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos adecuados de estos grupos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo y hexilo;
- el término "cicloalquilo de C₃₋₇" se usa para describir un anillo carbocíclico no aromático que contiene por lo

menos tres y a lo más siete átomos de carbono. Ejemplos del cicloalquilo de C₃₋₇ incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo;

- el término heterociclilo de 5 o 6 miembros se refiere a un anillo saturado no aromático que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S. Ejemplos de estos grupos incluyen pirrolidinilo, morfolinilo, piperidinilo y piperazinilo.

Se apreciará que la presente invención cubre los compuestos de fórmula (I) como la base libre y como las sales de los mismos, por ejemplo como una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización la invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Debido a su uso potencial en medicina, las sales de los compuestos de fórmula (I), son deseablemente farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de adición de ácidos o bases. 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 sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el compuesto de la invención. Para una revisión sobre sales adecuadas véase Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977). Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar fácilmente usando un ácido o base deseada según sea apropiado. La sal resultante puede precipitar de la solución y se puede recoger por filtración, o se puede recuperar por evaporación del disolvente.

Una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable se puede formar por reacción de un compuesto de fórmula (I) 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 usualmente se aísla, por ejemplo, por cristalización y filtración. Las sales de bases farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de amonio, sales de metal alcalino como las sales de sodio y potasio, sales de metal alcalinotérreo como las sales de calcio y magnesio y las sales con bases orgánicas que incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina y *N*-metil-D-glucamina.

Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable se puede formar por reacción de un compuesto de fórmula (I) 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 dar la sal que usualmente se aísla por ejemplo por cristalización y filtración. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o ser por ejemplo una sal de 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 hexanoato.

Otras sales no aceptables farmacéuticamente, por ejemplo formiatos, oxalatos o trifluoroacetatos, se pueden usar, por ejemplo para el aislamiento de los compuestos de fórmula (I) y se incluyen dentro del alcance de esta invención.

La invención incluye dentro de su alcance todas las formas estequiométricas y no estequiométricas posibles de las sales de los compuestos de fórmula (I).

Se apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes en los que reaccionan o de los que precipitan o se cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como un "hidrato". Los disolventes con puntos de ebullición altos y/o capaces de formar enlaces de hidrógeno, tales como agua, xileno, *N*-metilpirrolidona, metanol y etanol se pueden usar para formar solvatos. Los procedimientos para identificar los solvatos incluyen, sin limitación, RMN y microanálisis. Los solvatos de los compuestos de fórmula (I) están dentro del alcance de la invención.

La invención incluye dentro de su alcance todas las formas estequiométricas y no estequiométricas posibles de los solvatos de los compuestos de fórmula (I).

Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma cristalina o amorfa. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos de fórmula (I) pueden existir como polimorfos, que están incluidos dentro del alcance de la presente invención. Las formas polimórficas de los compuestos de fórmula (I) se pueden caracterizar y diferenciar usando varias técnicas analíticas convencionales, que incluyen, sin limitación, patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD), espectros de infrarrojo (IR), espectros Raman, calorimetría de escaneo diferencial (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear de estado sólido (SSNMR).

Los compuestos descritos en el presente documento contienen átomos quirales, de modo que se pueden formar isómeros ópticos, por ejemplo enantiómeros o diastereómeros. Por consiguiente, la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I) ya sea como isómeros individuales aislados por ejemplo sustancialmente libres del otro isómero (es decir, puros), o como mezclas (es decir racematos y mezclas racémicas).

Un isómero individual aislado por ejemplo sustancialmente libre del otro isómero (es decir puro), puede estar aislado de manera que está presente menos del 10 % del otro isómero, particularmente menos de aproximadamente el 1 %, por ejemplo menos de aproximadamente el 0,1 %.

5 La separación de los isómeros se puede lograr mediante las técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica, por ejemplo mediante cristalización fraccionada, cromatografía o HPLC.

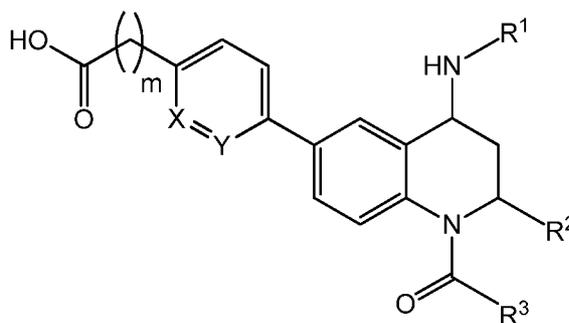
Algunos compuestos de fórmula (I) pueden existir en varias formas tautoméricas. Se entenderá que la presente invención abarca todos los tautómeros de los compuestos de fórmula (I) ya sea como tautómeros individuales o como mezclas de los mismos.

10 De lo anterior se apreciará que se incluyen dentro del alcance de la invención los solvatos, isómeros y formas polimórficas de los compuestos de fórmula (I) y sus sales.

Los compuestos de fórmula (I) y sus sales se pueden preparar mediante una diversidad de procedimientos que incluyen química estándar. Cualquier variable previamente definida continuará teniendo el significado previamente definido a menos que se indique de otra manera. Más abajo se dan procedimientos de síntesis generales ilustrativos y después se preparan compuestos específicos de fórmula (I) o sus sales en los ejemplos de trabajo.

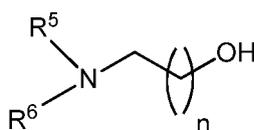
15 La presente invención proporciona además un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo que comprende un procedimiento seleccionado de (a) y (b) en el cual:

(a) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



(II)

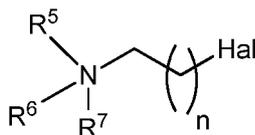
20 en el cual R¹, R², R³, X, Y y m son según se definen en la fórmula (I) con un compuesto de fórmula (III):



(III)

en el cual R⁵, R⁶ y n son según se definen en la fórmula (I).

25 (b) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo con un compuesto de fórmula (IV):



(IV)

en el cual R⁵, R⁶, R⁷ y n son según se definen en la fórmula (I) y Hal es halógeno.

Procedimiento (a)

30 La reacción entre los compuestos de fórmula (II) y (III) se puede efectuar en presencia de un agente activador adecuado (tal como dicitohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)) y un

catalizador de transferencia de acilo adecuado (tal como 4-dimetilamonopiridina), en un disolvente adecuado (tal como diclorometano o DMF).

Los compuestos de fórmula (II) se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en el presente documento o procedimientos análogos a los mismos. Los compuestos de fórmula (III) están disponibles comercialmente.

5 Procedimiento (b)

Para el procedimiento (b) un grupo Hal adecuado es el bromo. La reacción entre los compuestos de fórmula (II) y fórmula (IV) típicamente se efectúa en un disolvente adecuado (tal como DMF) en presencia de una base adecuada (tal como carbonato de potasio).

10 Los compuestos de fórmula (II) se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en el presente documento o procedimientos análogos a los mismos. Los compuestos de fórmula (IV) están disponibles comercialmente.

15 Será apreciado por los expertos en la técnica que puede ser ventajoso proteger uno o más grupos funcionales de los compuestos descritos. Ejemplos de los grupos protectores y los medios para su separación se pueden encontrar en T. W. Greene "Protective Groups in Organic Synthesis" (4ª edición, J. Wiley and Sons, 2006). Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acilo (por ejemplo, acetilo, carbamato (por ejemplo, 2',2',2'-tricloroetoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o t-butoxicarbonilo) y arilalquilo (por ejemplo, bencilo), los cuales pueden ser separados por hidrólisis (por ejemplo usando un ácido como ácido clorhídrico en dioxano o ácido trifluoroacético en diclorometano), o reductivamente (por ejemplo, hidrogenólisis de un grupo bencilo o benciloxicarbonilo o separación reductiva de un grupo 2',2',2'-tricloroetoxicarbonilo usando cinc en ácido acético), según sea apropiado. Otros grupos protectores de amina adecuados incluyen trifluoroacetilo (-COCF₃) el cual se puede separar por medio de hidrólisis catalizada por base.

20 Se apreciará que en cualquiera de los procedimientos de síntesis descritos en el presente documento, puede variar el orden preciso de las etapas de síntesis mediante los cuales se introducen los diversos grupos y porciones a la molécula. Será del dominio del profesional cualificado asegurarse de que los grupos o porciones introducidas en una fase del procedimiento no sean afectados por transformaciones y reacciones subsiguientes y seleccionar el orden de las etapas de síntesis en consecuencia.

25 Se cree que ciertos compuestos intermedios de fórmula (II) son novedosos y por lo tanto forman un aspecto aún adicional de la invención.

30 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales son inhibidores de bromodominio y por tanto se cree que tienen utilidad potencial en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio.

La presente invención proporciona así un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en terapia. El compuesto de fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable se puede usar en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio.

35 La presente invención proporciona así un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usarse en el tratamiento de cualesquiera enfermedades o afecciones para las que está indicado un inhibidor de bromodominio.

También se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio.

40 También se revela un procedimiento de tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Convenientemente el sujeto en necesidad del mismo es un mamífero, particularmente un ser humano.

45 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa aquella cantidad de fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca, por ejemplo, por un investigador o trabajador clínico. Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no recibe dicha cantidad, da como resultado un tratamiento, sanación, prevención o alivio mejorados de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal.

50 Se cree que los inhibidores de bromodominio son útiles en el tratamiento de una diversidad de enfermedades o afecciones relacionadas con la inflamación sistémica o de tejido, respuestas inflamatorias a la infección o hipoxia, activación y proliferación celular, metabolismo de lípidos, fibrosis y en la prevención y tratamiento de infecciones virales.

- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones autoinmunes y/o inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas, neumonitis, miocarditis, pericarditis, miositis,
- 5 eczema, dermatitis (tal como dermatitis atópica), alopecia, vitíligo, enfermedades bullosas de la piel, nefritis, vasculitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, depresión, síndrome de Sjögren, sialoadenitis, oclusión de la vena retinal central, oclusión de la vena retinal ramificada, síndrome de Irvine-Gass (posterior a cataratas y posquirúrgico), retinitis pigmentosa, inflamación de la pars plana, retinocoroidopatía en perdigonada, membrana epirretinal, edema macular quístico, telangiectasia parafoveal, maculopatías traccionales, síndromes de tracción
- 10 vitreomacular, desprendimiento de la retina, neurorretinitis, edema macular idiopático, retinitis, ojo seco (queratoconjuntivitis sicca), queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, uveítis anterior, panuveítis, uveítis posterior, edema macular asociado con uveítis, escleritis, retinopatía diabética, edema macular diabético, distrofia macular asociada con la edad, hepatitis, pancreatitis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad de Addison, hipofisitis, tiroiditis, diabetes de tipo I y rechazo agudo de órganos trasplantados.
- 15 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones inflamatorias agudas tales como gota aguda, arteritis de célula gigante, nefritis que incluye nefritis de lupus, vasculitis con implicación de órgano como glomerulonefritis, vasculitis que incluye arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nudosa, enfermedad de Behcet, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, pioderma gangrenoso, vasculitis con implicación de órgano y rechazo agudo de órganos trasplantados.
- 20 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones que incluyen respuestas inflamatorias a infecciones con bacterias, virus, hongos, parásitos o sus toxinas, tales como sepsis, síndrome de sepsis, choque séptico, endotoxemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de disfunción de múltiples órganos, síndrome de choque tóxico, lesión aguda del pulmón, ARDS (síndrome de dificultad respiratoria en el adulto), insuficiencia renal aguda, hepatitis fulminante, quemaduras, pancreatitis
- 25 aguda, síndromes posquirúrgicos, sarcoidosis, reacciones de Herxheimer, encefalitis, mielitis, meningitis, malaria y SIRS asociada con infecciones virales como influenza, herpes zóster, herpes simple y coronavirus.
- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de afecciones asociadas con daño por isquemia-reperusión, tales como infarto de miocardio, isquemia cerebrovascular (apoplejía), síndromes coronarios agudos, daño por reperusión renal, trasplante de órganos, injerto de derivación de arteria coronaria, procedimientos de derivación cardiopulmonares, embolia pulmonar, renal, hepática, gastrointestinal o de miembro
- 30 periférico.
- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del metabolismo de lípido mediante la regulación de APO-A1, tales como hipercolesterolemia, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer.
- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones fibróticas tales como fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, constricción postoperatoria, formación de cicatriz queloide, esclerodermia (que incluye morfea) y fibrosis cardíaca.
- 35 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención y tratamiento de infecciones virales como virus de herpes, virus de papiloma humano, adenovirus y poxvirus y otros virus de ADN.
- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, que incluye cáncer hematológico (tal como leucemia, linfoma y mieloma múltiple), epitelial (que incluye carcinomas de pulmón, mama y colon), carcinomas de línea media, tumor mesenquimático, hepático, renal y neurológico.
- 40 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de la patología dérmica, tal como melanoma no maligno (queratosis actínica y célula basal), melanoma *in situ*, carcinoma de células escamosas y linfoma cutáneo de células T.
- 45 En una realización la enfermedad o afección para la cual está indicado un inhibidor de bromodominio se selecciona de las enfermedades asociadas con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tal como sepsis, quemaduras, pancreatitis, trauma mayor, hemorragia e isquemia. En esta realización, el inhibidor de bromodominio se administraría en el momento del diagnóstico para reducir la incidencia de: SIRS, la aparición de choque, síndrome de disfunción de múltiples órganos, que incluye la aparición de lesión aguda del pulmón, ARDS, lesión aguda y
- 50 mortalidad renal, hepática, cardíaca y gastrointestinal. En otra realización el inhibidor de bromodominio se administraría antes de un procedimiento quirúrgico u otro procedimiento asociado con un alto riesgo de sepsis, hemorragia, daño extenso de tejido, SIRS o MODS (síndrome de disfunción de múltiples órganos). En una realización particular, la enfermedad o afección para la cual está indicado el inhibidor de bromodominio es la sepsis, síndrome de sepsis, choque séptico o endotoxemia. En otra realización, el inhibidor de bromodominio está indicado
- 55 para el tratamiento de la pancreatitis aguda o crónica. En otra realización el inhibidor de bromodominio está indicado para el tratamiento de quemaduras.
- En una realización la enfermedad o afección para la cual está indicado un inhibidor de bromodominio se selecciona de infecciones y reactivaciones de herpes simple, herpes labial, infecciones y reactivaciones de herpes zóster,

varicela, culebrilla, virus de papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), neoplasia cervical, infecciones de adenovirus que incluyen enfermedad respiratoria aguda, infecciones de poxvirus tales como viruela del ganado y viruela y virus de la peste porcina africana. En una realización particular un inhibidor de bromodominio está indicado para el tratamiento de infecciones del virus de papiloma humano de la piel o del epitelio cervical.

- 5 El término “enfermedades o afecciones para las cuales está indicado un inhibidor de bromodominio”, incluye todos y cada uno de los estados patológicos anteriormente mencionados.

En una realización, se proporciona un procedimiento para inhibir un bromodominio que comprende poner en contacto el bromodominio con un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 Aunque para usarse en terapia es posible administrar un compuesto de fórmula (I) y también sus sales farmacéuticamente aceptables como la sustancia química en bruto, es común presentar el ingrediente activo como una composición farmacéutica.

- 15 Por lo tanto la presente invención proporciona en un aspecto adicional una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable y uno o más vehículos, diluentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables, son como se describen anteriormente. El/los vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la composición e inocuos para el receptor del/de los mismo(s). De acuerdo con otro aspecto de la invención también se proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que incluye mezclar un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más vehículos, diluentes o excipientes farmacéuticamente
- 20 descriptas en el presente documento.

- Puesto que los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables están destinados a usarse en composiciones farmacéuticas se entenderá fácilmente que se proporcionan preferiblemente en una forma sustancialmente pura, por ejemplo por lo menos el 60 % pura, más convenientemente por lo menos el 75 % pura y preferiblemente por lo menos el 85 % pura, especialmente por lo menos el 98 % pura (% en una base de peso a peso).
- 25

- Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de ingrediente activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificaciones unitarias preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Por lo tanto estas dosis unitarias se pueden administrar más de una vez al día. Las composiciones de dosificaciones unitarias preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria (para su administración más de una vez al día), como se cita aquí anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo.
- 30

- Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para su administración mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo mediante la vía oral (que incluye bucal o sublingual), rectal, inhalada, intranasal, tópica (que incluye bucal, sublingual o transdérmica), ocular (que incluye tópica, intraocular, subconjuntival, episcleral o de subtenón), vaginal o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Estas composiciones se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en el arte de la farmacia, por ejemplo asociando el ingrediente activo con el/los vehículo(s) o excipiente(s).
- 35

- En una realización la composición farmacéutica se adapta para administración parenteral, particularmente administración intravenosa.
- 40

En una realización la composición farmacéutica se adapta para administración oral.

En una realización la composición farmacéutica se adapta para administración tópica.

- Una forma de dosificación preferida que resulta en la oclusión y modificación de la penetración de la piel, ya sea para aumentar o disminuir la exposición sistémica a los compuestos de bromodominio, incluye pero sin limitación las formas farmacéuticamente aceptables de carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona.
- 45

- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos los cuales vuelven a la composición isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales sellados y se pueden almacenar en una condición criodesecada (liofilizada) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de usarse. Se pueden preparar soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.
- 50

- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no
- 55

acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

5 Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente activo se puede combinar con un vehículo inerte inocuo farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua, etc. Polvos adecuados para incorporarse en comprimidos o cápsulas se pueden preparar reduciendo el compuesto a un tamaño fino adecuado (por ejemplo por medio de micronización) y mezclando con un vehículo farmacéutico preparado similarmente, tal como un carbohidrato comestible, por ejemplo almidón y manitol. También puede estar presente un agente aromatizante, conservante, dispersante y colorante.

10 Las cápsulas se pueden hacer preparando una mezcla de polvo, como se describe anteriormente y cargando cubiertas de gelatina formadas. Antes de la operación de carga se pueden añadir a la mezcla de polvo agentes deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido. Para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula también se puede añadir un agente desintegrador o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio.

15 Además, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, deslizantes, lubricantes, agentes edulcorantes, saborizantes, agentes desintegradores y agentes colorantes adecuados. 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. 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 desintegradores incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o formando bolitas, agregando un lubricante y desintegrador y comprimiendo en comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, pulverizado adecuadamente, con un diluyente o base como se describen anteriormente y opcionalmente con un aglutinante como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, una solución retardadora tal como parafina, un acelerador de reabsorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo se puede granular humedeciéndola con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a través de un tamiz. Como una alternativa a la granulación, la mezcla de polvo se puede pasar a través de la máquina de elaboración de comprimidos y el resultado son bolitas de forma imperfecta que se rompen en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para impedir la adherencia a las matrices formadoras de comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. Después la mezcla lubricada se comprime en comprimidos. Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables también se pueden combinar con un vehículo inerte de flujo libre y comprimirse en comprimidos directamente sin pasar a través de las etapas de granulación o formación de bolitas. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento de sellado de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento de pulido de cera. Se pueden añadir sustancias colorantes a estos recubrimientos para distinguir entre diferentes dosificaciones unitarias.

40 Los fluidos orales tales como solución, jarabes y elixires, se pueden preparar en forma de dosificación unitaria, de tal manera que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa convenientemente aromatizada, mientras que los elixires se preparan utilizando un vehículo alcohólico inocuo. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo inocuo. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietileno sorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.

45 Cuando sea apropiado, las composiciones de dosificaciones unitarias para administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación, como por ejemplo revistiendo o incrustando material en partículas en polímeros, cera o similares.

50 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables también se pueden administrar en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

55 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, emulsiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, espumas, aerosoles o aceites. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluir aditivos convencionales que incluyen, sin limitación, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, codisolventes, emolientes, propulsores, agentes modificadores de la viscosidad (agentes gelificantes), agentes tensioactivos y vehículos. En una realización se proporciona una composición farmacéutica adaptada para administración tópica que comprende 0,01-10 %, o 0,01-1 % del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en peso de la composición.

Para tratamientos del ojo y otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican

preferiblemente como una solución, suspensión, emulsión, ungüento, crema, gel, pulverización o espuma tópica. Cuando se formula en un ungüento, el ingrediente activo se puede usar bien con una base de ungüento parafínica o bien con una base de ungüento miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Cuando se formula en una espuma, el agente activo se puede formular con propulsores, tensioactivos, disolventes, codisolventes y agentes modificadores de la viscosidad.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica al ojo incluyen gotas oftálmicas en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones para administrarse al ojo tendrán pH y osmolalidad compatibles para uso oftálmico. En una composición de la invención se pueden incluir uno o más agentes ajustadores de pH y/o agentes tamponantes aceptables para uso oftálmico, que incluyen ácidos tales como ácido acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases tales como hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio y lactato de sodio; y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Tales ácidos, bases y tampones se pueden incluir en una cantidad requerida para mantener el pH de la composición en una escala aceptable para uso oftálmico. Se pueden incluir en la composición una o más sales aceptables para uso oftálmico en una cantidad suficiente para llevar la osmolalidad de la composición a una escala aceptable para uso oftálmico. Estas sales incluyen las que tienen los cationes sodio, potasio o amonio y los aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, dicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito.

Se puede diseñar un dispositivo de suministro ocular para la liberación controlada de uno o más agentes terapéuticos con múltiples velocidades de liberación y cinética y permeabilidad de dosis sostenida definidas. La liberación controlada se puede obtener mediante el diseño de matrices poliméricas que incorporan diferentes elecciones y propiedades de polímeros biodegradables/bioerosionables (por ejemplo, acetato de poli(etilenvinilo) (EVA), PVA superhidrolizado), hidroxialquilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), polianhídrido, de pesos moleculares de polímero, cristalinidad de polímero, proporciones de copolímero, condiciones de procesamiento, acabado de superficie, geometría, adición de excipientes y recubrimientos poliméricos, que incrementarán la difusión, erosión, disolución y ósmosis del fármaco.

Las composiciones farmacéuticas para suministro ocular también incluyen composiciones acuosas gelificables *in situ*. Tal composición comprende un agente gelificante en una concentración eficaz para promover la gelificación por contacto con el ojo o con un fluido lagrimal. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, sin limitación, polímeros de termoestabilización. El término "gelificable *in situ*", como se usa en el presente documento, incluye no solo líquidos de baja viscosidad que forman geles por contacto con el ojo o fluido lagrimal, sino que también incluye líquidos más viscosos tales como geles semifluidos y tixotrópicos que exhiben una viscosidad sustancialmente incrementada o rigidez de gel por administración al ojo; véase, por ejemplo, Ludwig (2005), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 3; 57:1595-639, que se incorpora en el presente documento como referencia para fines de sus enseñanzas de ejemplos de polímeros para usar en el suministro ocular de fármaco.

Las formas de dosificaciones para administración nasal o por inhalación se pueden formular convenientemente como aerosoles, soluciones, suspensiones, geles o polvos secos.

Para composiciones adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, se prefiere que el compuesto de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables estén en una forma de tamaño de partícula reducido, por ejemplo obtenido por micronización. El tamaño de partícula preferido del compuesto o sal de tamaño reducido (por ejemplo micronizado) se define por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo medido usando difracción de láser).

Las formulaciones de aerosol, por ejemplo para administración por inhalación, pueden comprender una solución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de aerosol se pueden presentar en cantidades individuales o de multidosis en forma estéril en un recipiente sellado, que puede tener la forma de un cartucho o recarga para usarse con un dispositivo atomizador o inhalador. Alternativamente el recipiente sellado puede ser un dispositivo dispensador unitario tal como un inhalador nasal de una sola dosis o un dispensador de aerosol equipado con una válvula dosificadora (inhalador dosificador) que está destinado al desecho una vez que se ha agotado el contenido del recipiente.

Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador de aerosol, contiene preferiblemente un propulsor adecuado sometido a presión, tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propulsor orgánico, tal como un fluorohidrocarburo (HFC). Los propulsores de HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas de dosificación de aerosol también pueden tener la forma de una bomba-atomizador. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir la incorporación de excipientes adicionales por ejemplo codisolventes y/o agentes tensioactivos para mejorar las características de dispersión y homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones de solución también pueden requerir la adición de codisolventes tales como etanol.

Para composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para administración por inhalación, la composición

- farmacéutica puede ser una composición inhalable de polvo seco. Esta composición puede comprender una base de polvo tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol o almidón, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (preferiblemente en forma de tamaño de partícula reducido, por ejemplo en forma micronizada) y opcionalmente un modificador de rendimiento como L-leucina u otras sales de ácido esteárico de aminoácido y/o metales, tales como estearato de magnesio o calcio. Preferiblemente, la composición inhalable de polvo seco comprende una mezcla de polvo seco de lactosa, por ejemplo lactosa monohidrato y el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo. Estas composiciones se pueden administrar al paciente usando un dispositivo adecuado, tal como el dispositivo DISKUS®, comercializado por GlaxoSmithKline, que se describe por ejemplo en el documento GB 2242134 A.
- 5
- 10 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden formular como una formulación fluida para su suministro desde un dispensador de fluido, por ejemplo un dispensador de fluido que tiene una boquilla dispensadora o un orificio dispensador a través del cual se dispensa una dosis medida de la formulación fluida después de la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bomba del dispensador de fluido. Estos dispensadores de fluido generalmente se proporcionan con un depósito de múltiples dosis medidas de la formulación de fluido, siendo las dosis despachables por accionamientos secuenciales de la bomba. La boquilla u
- 15 orificio de dispensación se puede configurar para su inserción en las fosas nasales del usuario para la dispensación de pulverizaciones de la formulación de fluido en la cavidad nasal. Un dispensador de fluido del tipo anteriormente mencionado se describe e ilustra en el documento WO-A-2005/044354.
- 20 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, la edad y peso del animal, la afección precisa que requiere el tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración y finalmente será a criterio del médico o veterinario a cargo. En la composición farmacéutica, cada dosificación unitaria para administración oral o parenteral contiene preferiblemente de 0,01 a 3000 mg, más preferiblemente de 0,5 a 1000 mg de un compuesto de la invención calculado como la base libre. Cada dosificación unitaria para administración nasal o inhalada contiene preferiblemente de 0,001 a 50 mg, más preferiblemente de 0,01 a 5 mg de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como la base libre.
- 25
- 30 Los compuestos farmacéuticamente aceptables de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos 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 de 0,01 a 5 mg por día del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como la base libre. Esta cantidad se puede dar como una sola dosis por día, o más usualmente en varias subdosis por día (tales como dos, tres, cuatro, cinco o seis), de tal manera que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad eficaz de una sal del mismo se puede determinar como una proporción de la cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) *per se*.
- 35
- 40 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden usar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención comprenden de esta manera la administración de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el uso de por lo menos otro agente farmacéuticamente activo. Preferiblemente, las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención comprende la administración de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y por lo menos otro agente farmacéuticamente activo. Los compuestos de la fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables y el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) se pueden administrar juntos en una sola composición farmacéutica o separadamente y cuando se administran separadamente esto puede ocurrir de manera simultánea o secuencial en cualquier orden. Las cantidades del/de los compuesto(s) de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables y de los otros agentes farmacéuticamente activos y los tiempos relativos de administración serán seleccionados para obtener el efecto terapéutico combinado deseado. De esta manera en un aspecto adicional se proporciona un producto farmacéutico de combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y por lo menos otro agente farmacéuticamente activo.
- 45
- 50 De esta manera en un aspecto, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se pueden usar en combinación con o incluir uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo seleccionados de antibióticos, antivirales, glucocorticosteroides, antagonistas muscarínicos, agonistas beta-2 y análogos de la vitamina D3. En un aspecto adicional un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la invención se puede usar en combinación con un agente terapéutico adicional el cual es adecuado para el tratamiento del cáncer.
- 55
- 60 Se apreciará que cuando el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con otros agentes terapéuticos administrados normalmente vía inhalación, intravenosa, oral o intranasal, la composición farmacéutica resultante se puede administrar por las mismas vías. Alternativamente los componentes individuales de la composición se pueden administrar por vías diferentes.
- Una realización de la invención abarca combinaciones que comprenden uno o dos de otros agentes terapéuticos.

5 Será evidente para el experto en la técnica que, cuando sea apropiado, los otros ingredientes terapéuticos se pueden usar en forma de sales, por ejemplo como sales de metal alcalino o amina, 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 estabilidad y/o características físicas, tales como solubilidad, del ingrediente terapéutico. También será evidente que, cuando sea apropiado los ingredientes terapéuticos se pueden usar en forma ópticamente pura.

10 Las combinaciones anteriormente mencionadas se pueden presentar convenientemente para usarse en forma de una composición farmacéutica y por lo tanto las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación según se define anteriormente, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, representan un aspecto adicional de la invención.

Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden preparar mediante los procedimientos que se describen más abajo o mediante procedimientos similares. De esta manera los siguientes intermedios y ejemplos sirven para ilustrar la preparación de los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables y no se consideran limitativos del alcance de la invención en modo alguno.

15 **Detalles experimentales generales**

Todas las temperaturas mencionadas son en °C.

Los nombres de los siguientes compuestos se obtuvieron usando el programa de nomenclatura de compuestos "ACD Name Pro 6.02" o Chem Draw Ultra 12.0.

Abreviaturas

- 20 AcOH se refiere a ácido acético
 BINAP se refiere a 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
 BOC se refiere a terc-butoxicarbonilo
 CV se refiere a volúmenes de columna
 DCM se refiere a diclorometano
- 25 1,2-DCE se refiere a 1,2-dicloroetano
 DCC se refiere a dicitclohexilcarbodiimida
 DIPEA se refiere a diisopropiletilamina
 DMAP se refiere a 4-dimetilaminopiridina
 DMSO se refiere a sulfóxido de dimetilo
- 30 DMF se refiere a *N,N*-dimetilformamida
 Éter se refiere a éter dietílico
 Et₂O se refiere a éter dietílico
 EtOAc se refiere a acetato de etilo
 Fmoc se refiere a 9-fluorenilmetoxicarbonilo
- 35 HATU se refiere a hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio
 HPLC se refiere a cromatografía de líquidos de alto rendimiento
 IPA se refiere a propan-2-ol
 i-Pr₂O se refiere a éter diisopropílico
 LiAlH₄ se refiere a hidruro de litio y aluminio
- 40 MDAP se refiere a HPLC preparativa dirigida a la masa
 MeCN se refiere a acetonitrilo
 MeOH se refiere a metanol

MgSO₄ se refiere sulfato de magnesio

p.f. se refiere a punto de fusión

t.a. se refiere a temperatura ambiente

t_R se refiere a tiempo de retención

5 Na₂SO₄ se refiere a sulfato de sodio

TMEDA se refiere a tetrametilendiamina

TFA se refiere a ácido trifluoroacético

THF se refiere a tetrahidrofurano

TLC se refiere a cromatografía en capa fina.

10 Metodología CL/EM (usada para algunos intermedios y compuestos de referencia)

Los detalles experimentales de los procedimientos de CL-EM A - F referidos en el presente documento son de la siguiente manera:

15 CL/EM (Procedimiento A) se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm DI, 1,7 µm de diámetro de empaquetado) a 40 grados centígrados, eluyendo con bicarbonato de amonio 10 mM en agua ajustada a pH 10 con solución de amoniaco (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-1,5 min 1-97 % de B, 1,5-1,9 min 97 % de B, 1,9 -2,0 min 100 % de B, a un caudal de 1 ml/min. La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electroaspersión positiva y negativa de escaneado alterno. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

20 CL/EM (Procedimiento B) se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1mm DI, 1,7 µm diámetro de empaquetado) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución de ácido fórmico en agua al 0,1 % v/v (disolvente A) y una solución de ácido fórmico en acetonitrilo al 0,1 % v/v (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-1,5 min 3-100 % de B, 1,5-1,9 min 100 % de B, 1,9-2,0 min 3 % de B, a un caudal de 1 ml/min. La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electroaspersión positiva y negativa de escaneado alterno. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

30 CL/EM (Procedimiento C) se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm DI, 1,7 µm de diámetro de empaquetado) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución de ácido trifluoroacético en agua al 0,1 % v/v (disolvente A) y una solución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo al 0,1 % v/v (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-1,5 min 3-100 % de B, 1,5-1,9 min 100 % de B, 1,9-2,0 min 3 % de B, a un caudal de 1 ml/min. La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electroaspersión positiva. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

35 CL/EM (Procedimiento D) se realizó en una columna Supelcosil LCABZ+PLUS (3 µm, 3,3 cm x 4,6 mm DI) eluyendo con HCO₂H al 0,1 % y acetato de amonio 0,01 M en agua (disolvente A) y 95 % de acetonitrilo y 0,05 % de HCO₂H en agua (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-0,7 minutos 3-0 % de B, 0,7-4,2 minutos 0 → 100 % de B, 4,2-5,3 minutos 100 % de B, 5,3-5,5 minutos 100 → 0 % de B, a un caudal de 3 ml/min. Los espectros de masa (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Fisons VG Platform usando los modos de ionización de electroaspersión positiva [(ES+, para dar los iones moleculares [M+H]⁺ y [M+NH₄]⁺], o ionización de electroaspersión negativa [(ES-, para dar los iones moleculares [M-H]⁻]. Los datos analíticos de este aparato se dan en el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻.

45 CL/EM (Procedimiento E) se realizó 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 100 % (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-4 minutos 0-100 % de B, 4-5 minutos 100 % de B, a un caudal de 5 ml/min. Los espectros de masa (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Platform-CL usando los modos de ionización química positiva a presión atmosférica [(AP+, para dar los iones moleculares MH⁺], o ionización química negativa a presión atmosférica [(AP-, para dar los iones moleculares (M-H)]. Los datos analíticos de este aparato se dan en el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻.

50 CL/EM (Procedimiento F). Se realizó en una columna Sunfire C18 (30 mm x 4,6 mm DI, 3,5 µm diámetro de empaquetado), a 30 grados centígrados, eluyendo con una solución de ácido trifluoroacético en agua al 0,1 % v/v (disolvente A) y una solución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo al 0,1 % v/v (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-0,1 min 3 % de B, 0,1-4,2 min 3-100 % de B, 4,2-4,8 min 100 % de B, 4,8-4,9 min 100-3 % B, 4,9-5,0 min 3 % de B, a un caudal de 3 ml/min. La detección en UV fue una señal promediada de longitud de onda

de 210 nm a 350 nm y los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas usando ionización de electroaspersión positiva. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

5 CL/EM (Procedimiento G). Se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm DI, 1,7 µm diámetro de empaquetado) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución de ácido fórmico en agua al 0,1 % v/v (disolvente A) y una solución de ácido fórmico en acetonitrilo al 0,1 % v/v (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-1,5 min 1-97 % de B, 1,5-1,9 min 97 % de B, 1,9-2,0 min 97 % a 100 % de B, a un caudal de 1 ml/min. La detección en UV fue una señal promediada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electroaspersión positiva y negativa de escaneado alterno. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

10 CL/HRMS: Se realizó HPLC analítica en una columna Uptisphere-hsc (3 µm, 33 x 3 mm DI) eluyendo con acetato de amonio 0,01 M en agua (disolvente A) y 100 % acetonitrilo (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: 0-0,5 minutos 5 % B, 0,5-3,75 minutos 5 → 100 % de B, 3,75-4,5 minutos 100 % de B, 4,5-5 minutos 100 → 5 % de B, 5-5,5 min 5 % de B, a un caudal de 1,3 ml/minuto. Los espectros de masa (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Micromass LCT usando los modos de ionización de electroaspersión positiva [ES+, para dar los iones moleculares MH⁺] o ionización de electroaspersión negativa [ES-, para dar los iones moleculares (M-H)⁻].

La TLC (cromatografía en capa fina) se refiere al uso de placas de TLC vendidas por Merck, recubiertas con gel de sílice 60 F254.

20 Se realizó "autopreparación dirigida a la masa"/"HPLC preparativa dirigida a la masa" en un sistema como: Waters FractionLynx que comprende una bomba de gradiente Waters 600, un inyector/recolector Waters 2767, un manejador Waters Reagent Manager, un recolector de desecho Gilson Aspec, un detector de UV de post-fracciones Gilson 115 y un Sistema de computación. La columna usada es típicamente una columna Supelco LCABZ++ cuyas dimensiones son 20 mm de diámetro interno por 100 mm de longitud. El tamaño de partícula de la fase estacionaria es de 5 µm. Se usó un caudal de 20 ml/min con ácido fórmico o ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua (disolvente A) y ácido fórmico o ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo (disolvente B), usando el gradiente de elución apropiado. Los espectros de masa se registraron en un espectrómetro de masas Micromass ZQ usando los modos positivo y negativo de electroaspersión, escaneado alterno. El software usado fue MassLynx 4.0 o sistemas equivalentes alternativos.

Metodología de CLEM

30 Procedimiento de formiato (modificador de ácido fórmico)

Condiciones de CL:

El análisis de UPLC se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, DI 1,7 µm diámetro de empaquetado) a 40 °C.

Los disolventes usados fueron:

35 A = solución de ácido fórmico en agua al 0,1 % v/v

B = solución de ácido fórmico en acetonitrilo al 0,1 % v/v

El gradiente usado fue.

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% A	% B
0	1	99	1
1,5	1	3	97
1,9	1	3	97
2,0	1	0	100

La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210nm a 350nm.

40 Condiciones de EM:

EM: Waters ZQ

Modo de ionización: Escaneado alterno de electroaspersión positiva y negativa

Escala de escaneado: 100 a 1000 AMU

Tiempo de escaneado: 0,27 s

Demora entre escaneados: 0,10 s

Procedimiento de HpH (modificador de bicarbonato de amonio)

Condiciones de CL:

- 5 El análisis de UPLC se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, DI 1,7 µm diámetro de empaquetado) a 40 °C.

Los disolventes usados fueron:

A = carbonato ácido de amonio en agua 10 mM, ajustado a pH 10 con solución de amoniaco

B = acetonitrilo

- 10 El gradiente usado fue:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% A	% B
0	1	99	1
1,5	1	3	97
1,9	1	3	97
2,0	1	0	100

La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm.

Condiciones de EM:

EM: Waters ZQ

- 15 Modo de ionización: Escaneado alterno de electroaspersión positiva y negativa
- Escala de escaneado: 100 a 1000 AMU
- Tiempo de escaneado: 0,27 s
- Demora entre escaneados: 0,10 s

Procedimiento de MDAP

- 20 **Procedimiento de formiato (modificador de ácido fórmico)**

Condiciones de CL:

El análisis de HPLC se realizó en una columna Sunfire C18 (100 mm x 19 mm DI, 5 µm diámetro de empaquetado), o en una columna Sunfire C18 (150 mm x 30 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado) a temperatura ambiente.

Los disolventes usados fueron:

- 25 A = solución de ácido fórmico en agua al 0,1 % v/v

B = solución de ácido fórmico en acetonitrilo al 0,1 % v/v

Se ejecutó como gradiente durante 15 o 25 min (ejecución extendida) con un caudal de 20 ml/min (100 mm x 19 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado), o 40 ml/min (150 mm x 30 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado).

La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm.

- 30 **Condiciones de EM:**

EM: Waters ZQ

Modo de ionización: Escaneado alterno de electroaspersión positiva y negativa

Escala de escaneado: 100 a 1000 AMU

Tiempo de escaneado: 0,50s

Demora entre escaneados: 0,20s

Procedimiento de HpH (modificador de bicarbonato de amonio)

Condiciones de CL:

- 5 El análisis de HPLC se realizó en una columna Xbridge C18 (100 mm x 19 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado), o en una columna Xbridge C18 (100 mm x 30 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado) a temperatura ambiente.

Los disolventes usados fueron:

A = bicarbonato de amonio en agua 10 mM, ajustado a pH 10 con solución de amoniaco

B = acetonitrilo

- 10 Se ejecutó como gradiente durante 15 o 25 min (ejecución extendida) con un caudal de 20 ml/min (100 mm x 19 mm DI, 5 µm diámetro de empaquetado), o 40 ml/min (100 mm x 30 mm, DI 5 µm diámetro de empaquetado).

La detección en UV fue una señal sumada de la longitud de onda de 210 nm a 350 nm.

Condiciones de EM:

EM: Waters ZQ

- 15 Modo de ionización: Escaneado alterno de electroaspersión positiva y negativa

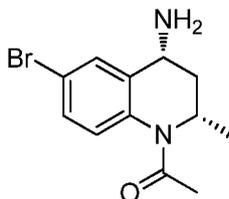
Escala de escaneado: 100 a 1000 AMU

Tiempo de escaneado: 0,50s

Demora entre escaneados: 0,20s

Intermedio 1

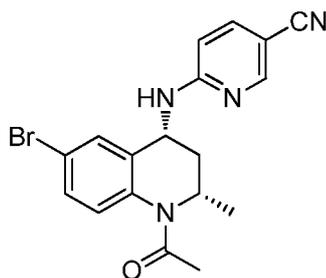
- 20 **1-((2S,4R)-4-Amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-etanona**



- Una suspensión de cloruro de amonio (41,2 g, 309 mmol) en DCM (480 ml) a 0 °C y en nitrógeno se trató con una solución de ((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)carbamato de isopropilo (30 g, 81 mmol) en DCM (80 ml) por medio de una cánula y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 30 minutos.
- 25 Después la mezcla de reacción se trató lentamente con una mezcla de trietilamina (136 ml, 975 mmol) y metanol (48 ml) mediante una cánula. La torta formada resultante se agitó en acetato de etilo (800 ml), se aisló por filtración y subsiguientemente se dividió entre DCM (800 ml) y solución acuosa saturada de NaHCO₃ (800 ml). Se le agregó tartrato de sodio y potasio (300 g) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 2 h. Las fases se separaron y la fase de DCM se filtró a través de un embudo sinterizado. El filtrado se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío
- 30 para dar una primera cosecha de 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (19,6 g, 69,2 mmol, 85 % de rendimiento) como una espuma amarilla. La fase acuosa se trató adicionalmente con DCM (800 ml) y la mezcla bifásica se agitó durante la noche. Las fases se separaron y la fase orgánica se secó (sobre MgSO₄) y se concentró al vacío para dar una segunda cosecha de 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (3,4 g, 12,01 mmol, 14,78 % de rendimiento). CLEM (HpH, 2 min), t_R = 0,77 min, MH⁺ = 283 (1 Br).

- 35 **Intermedio 2**

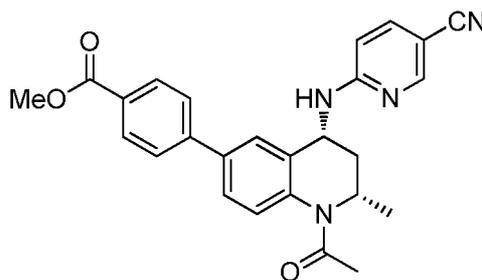
6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)-amino)nicotinonitrilo



5 A una mezcla de 1-((2*S*,4*R*)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2*H*)-il)etanona (para una preparación véase el intermedio 1) (2,28 g, 8,05 mmol) y 6-cloronicotinonitrilo (2,231 g, 16,10 mmol), se le agregó NMP (20 ml) y la mezcla se trató con DIPEA (4,22 ml, 24,16 mmol). La mezcla se dividió entre 2 matraces y cada matraz se inundó con nitrógeno, se selló y se agitó sometido a irradiación de microondas a 200 °C durante 2 h. Las mezclas de reacción se combinaron y el producto se dividió entre agua y EtOAc. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (x4) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (x3), luego salmuera y se secaron (MgSO₄) se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo sólido pardo se purificó por cromatografía (EtOAc en gradiente de hexano) para dar el 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo como una espuma amarilla pálida (1,940 g, 5,04 mmol, 62,5 % de rendimiento). CLEM (HpH, 2 min), *t_R*= 1,02 min, MH⁺ = 386 (1 Br).

Intermedio 3

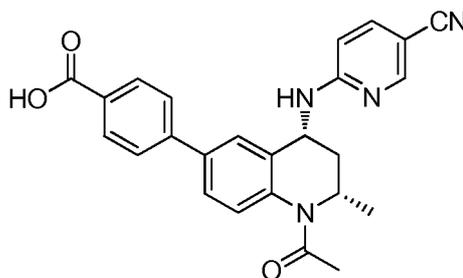
4-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de metilo



15 A un matraz cargado con 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para su preparación véase el intermedio 2) (1000 mg, 2,60 mmol), ácido (4-(metoxicarbonil)fenil)borónico (561 mg, 3,11 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (300 mg, 0,260 mmol) y carbonato de potasio (1076 mg, 7,79 mmol), se le agregó DME (20 ml) y agua (4,0 ml). La mezcla resultante se agitó a 100 °C en nitrógeno durante 1 h, luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se dividió entre EtOAc y agua y las fases se separaron. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía (columna 10 g, gradiente MeOH/DCM), para dar el 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de metilo como una espuma anaranjada (1002 mg, 2,275 mmol, 88 % de rendimiento). CLEM (HpH, 2 min), *t_R*= 1,09 min, MH⁺ = 441.

Intermedio 4

Acido 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoico

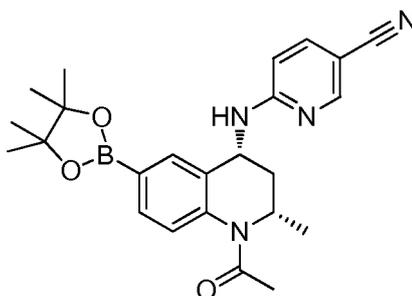


25 Una solución de 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de metilo (para su preparación véase el intermedio 3) (1,0 g, 2,270 mmol) en metanol (15 ml), a temperatura ambiente, se trató con una solución acuosa de hidróxido de sodio (2*N*, 2,27 ml, 4,54 mmol) y la mezcla resultante se agitó a

esta temperatura durante 24 h. La mayor parte del MeOH se evaporó al vacío y el residuo acuoso se trató con ácido acético (0,39 ml, 6,81 mmol), dando un precipitado el cual se aisló por filtración y se secó al vacío a 40 °C para producir el ácido 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoico como un sólido amarillo (820 mg, 1,923 mmol, 85 % de rendimiento). CLEM (HpH, 2 min), $t_R = 0,64$ min, $MH^+ = 427$.

5 Intermedio 5

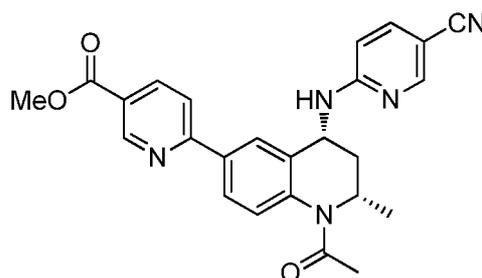
6-(((2*S*,4*R*)-1-Acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo



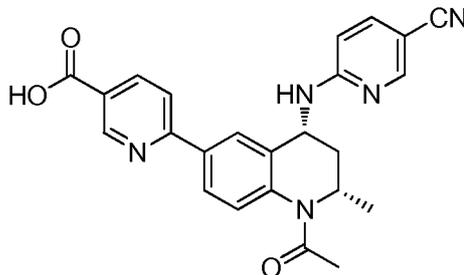
A un matraz cargado con 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para su preparación véase el intermedio 2) (847 mg, 2,199 mmol), bis(pinacolato)diboro (1228 mg, 4,84 mmol), PdCl₂ (dppf) (161 mg, 0,220 mmol) y acetato de potasio (324 mg, 3,30 mmol), se le agregó DMSO (7 ml); la mezcla se desgasificó en nitrógeno y se agitó en nitrógeno durante 1 h a 80 °C. Se le agregaron más porciones de bis(pinacolato)diboro (1 g), PdCl₂ (dppf) (100 mg) y acetato de potasio (150 mg) y la mezcla se agitó durante 45 min. Se le agregaron más porciones de bis(pinacolato)diboro (1 g), PdCl₂ (dppf) (100 mg) y acetato de potasio (150 mg) y la mezcla se agitó durante 45 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con EtOAc y agua. La fase bifásica se filtró a través de una almohadilla de Celite™ (10 g) y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (x2) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (x4), luego salmuera; se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío. La purificación del residuo por cromatografía [columna 50 g, gradiente de EtOAc/hexano] produjo el 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)-nicotinonitrilo como una goma roja (800 mg, 1,850 mmol, 84 % de rendimiento). CLEM (formiato, 2 min), $t_R = 1,08$ min, $MH^+ = 433$.

Intermedio 6

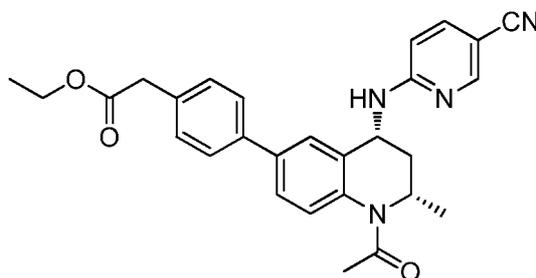
6-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de metilo



A un matraz cargado con 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)-nicotinonitrilo (para su preparación véase el intermedio 5) (800 mg, 1,850 mmol), 6-bromonicotinato de metilo (440 mg, 2,036 mmol), carbonato de potasio (767 mg, 5,55 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (214 mg, 0,185 mmol), se le agregó tolueno (8 ml) y etanol (8 ml). La mezcla resultante se agitó a 90 °C en nitrógeno durante 3 h, al final de las cuales se le agregaron porciones de carbonato de potasio (384 mg), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (107 mg) y 6-bromonicotinato de metilo (220 mg) y la mezcla de reacción se siguió agitando durante 5 h. La mezcla luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se dividió entre EtOAc y agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía [columna 25 g, gradiente de EtOAc/hexano], para dar el 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de etilo como una espuma blanca (600 mg, 1,317 mmol, 71,2 % de rendimiento). CLEM (HpH, 2 min), $t_R = 1,07$ min, $MH^+ = 456$.

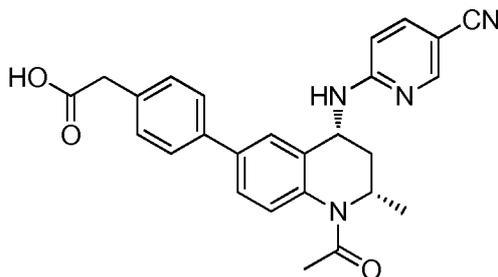
Intermedio 7**Acido 6-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotínico**

5 Una solución de 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de metilo (para su preparación véase el intermedio 6) (580 mg, 1,273 mmol) en etanol (10 ml), se trató con una solución acuosa de hidróxido de litio (1 N, 2,55 ml, 2,55 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h. La mayor parte del etanol se evaporó al vacío y el residuo se diluyó con agua (aprox. 5 ml). La mezcla turbia se trató con ácido acético (0,146 ml, 2,55 mmol) y el precipitado formado se aisló por filtración, se lavó con Et₂O y se secó a 60 °C durante 16 h para dar el ácido 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)-nicotínico como un sólido amarillo pálido (410 mg, 0,959 mmol, 75 % de rendimiento), que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. CLEM (HpH, 2 min), t_R = 0,63 min, MH⁺ = 428.

Intermedio 8**2-(4-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acetato de etilo**

15 A una solución de 6-(((2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)-nicotinonitrilo (para su preparación véase el intermedio 5) (1,67 g, 3,86 mmol), 2-(4-bromofenil)acetato de etilo (1,127 g, 4,64 mmol) y carbonato de potasio (1,602 g, 11,59 mmol) en tolueno (10 ml) y etanol (10,0 ml), se le agregó tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,446 g, 0,386 mmol) en nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 1 h, luego se dividió entre EtOAc y agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía de vaporización instantánea sobre gel de sílice (25 g), eluyendo con un gradiente de EtOAc/ciclohexano (10 a 80 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron al vacío para dar el 2-(4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acetato de etilo como un aceite viscoso incoloro (752 mg, 42 %). CLEM (formiato, 2 min), t_R = 1,10 min, MH⁺ = 469.

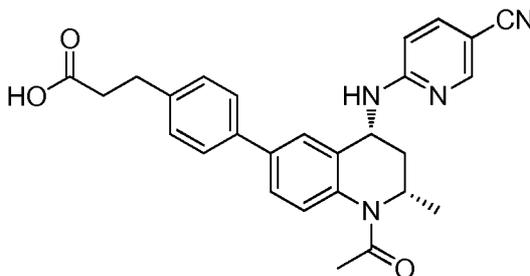
Intermedio 9**Sal de litio del ácido 2-(4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acético**



5 A una solución de 2-(4-((2S,4R)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acetato de etilo (para su preparación véase el intermedio 8) (300 mg, 0,640 mmol) en metanol (5 ml), se le agregó una solución de hidróxido de litio (0,768 ml, 0,768 mmol). La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante 2 h, después de lo cual se concentró al vacío para dar el carboxilato de litio en bruto del ácido 2-(4-((2S,4R)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acético como un sólido blanco (286 mg, 100 %), que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. CLEM (formiato, 2 min), $t_R = 1,10$ min, $MH^+ = 433$.

Intermedio 10

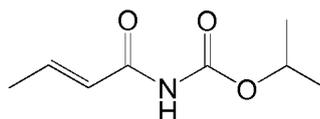
10 **Acido 3-(4-((2S,4R)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)propanoico**



15 A una solución de 6-(((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)-nicotinonitrilo (para su preparación véase el intermedio 5) (382 mg, 0,884 mmol) y ácido 3-(4-bromofenil)propanoico (243 mg, 1,060 mmol) en tolueno (6 ml) y etanol (6 ml), se le agregó sucesivamente tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (102 mg, 0,088 mmol) y carbonato de potasio (366 mg, 2,65 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 2 h, luego se dividió entre agua y EtOAc. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía de vaporización instantánea sobre gel de sílice (25 g), eluyendo con EtOAc en ciclohexano (10-70 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y el producto se concentró sometido a presión reducida para dar el ácido 3-(4-((2S,4R)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)propanoico como un sólido blanco (209 mg, 52 %). CLEM (formiato, 2 min): $t_R = 0,91$ min; $MH^+ = 455$.

Intermedio 11

Carbamato de 1-metiletil (2E)-2-butenilo

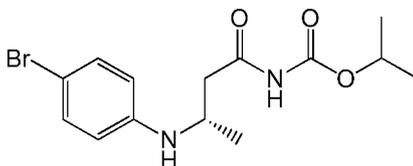


25 En un recipiente Lara de 3 l se cargó carbamato de isopropilo (30 g, 291 mmol, disponible de TCI) y se le agregó tetrahidrofurano (THF) seco (150 ml). Se le agregó en nitrógeno cloruro de (2E)-2-butenilo (31,2 ml, 326 mmol, disponible de Aldrich) y la camisa se enfrió a -30 °C. Cuando la temperatura de la solución alcanzó -17 °C, se le agregó terc-butóxido de litio (1 M, 655 ml, 655 mmol) por medio de una bomba peristáltica durante 2 h, manteniendo la temperatura de la reacción entre -10 °C y -18 °C. Una vez que se terminó la adición, la mezcla se agitó 30 min y se llevó a 0 °C. Se le agregó éter dietílico (450 ml) y ácido clorhídrico (1M, 375 ml) y la mezcla se llevó a 20 °C con agitación vigorosa. La agitación se detuvo, las fases se dejaron separar y la fase acuosa se vació. Se le agregó salmuera (375 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente. La agitación se detuvo, las fases se dejaron separar y la fase acuosa se vació. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó hasta dejar un aceite pardo (60 g). Este se

aplicó a una columna de sílice (40+M Biotage) y se eluyó con DCM/acetato de etilo (1:1 a 0:1, 10CV). Las fracciones que contenían producto se evaporaron hasta sequedad y se cargaron en una columna de sílice Redisep Isco (1500 g) y se eluyeron con un gradiente de acetato de etilo en ciclohexano (0-40 %). Las fracciones limpias que contenían producto se evaporaron hasta dejar un sólido blanquecino (15,41 g). CLEM (Procedimiento C): $t_R = 0,68$, $MH^+ = 172$.

5 Intermedio 12

{{(3S)-3-[(4-Bromofenil)amino]butanoil}carbamato de 1-metiletilo

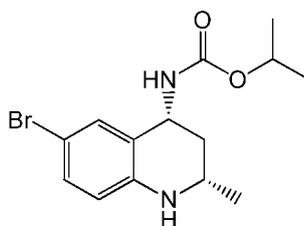


El (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (para su preparación véase el intermedio 11) (9,38 g, 54,8 mmol) se agitó en tolueno (281 ml) en nitrógeno y se le agregó (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II) (intermedio 24, 3,35 g, 3,01 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se volvió una mezcla amarilla opaca y se agitó durante 20 min. Se le agregó 4-bromoanilina (14,14 g, 82 mmol); la solución se volvió de color pardo claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió más. La mezcla se agitó durante 16 h. Similarmente, un segundo lote de (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (intermedio 11, 8,51 g, 49,7 mmol) se agitó en tolueno (255 ml) en nitrógeno y se le agregó (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II) (3,04 g, 2,73 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se convirtió en una mezcla amarilla opaca y se agitó durante 20 min. Se le agregó 4-bromoanilina (12,83 g, 74,6 mmol); la solución se volvió de color pardo claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió más. La mezcla se agitó durante 16 h. Las dos mezclas de reacción se combinaron y el producto se cargó en una columna Isco Redisep de sílice de 1,5 kg. La columna se eluyó con DCM/MeOH (0 % → 0,5 %, 19 CV). Las fracciones limpias que contenían producto se evaporaron hasta dejar un aceite pardo pálido. La mezcla se secó en un horno de vacío durante la noche a 40 °C para dar un sólido blanco (24,2 g, 67 % en total).

CLEM (Procedimiento C): $t_R = 0,91$, $MH^+ = 343$; ee = 92 %.

Intermedio 13

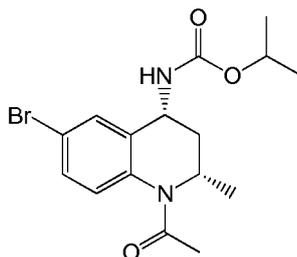
[(2S,4R)-6-Bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo



El {(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanoil}carbamato de 1-metiletilo (para su preparación véase el intermedio 12) (17,9 g, 52,2 mmol) se tomó en etanol (150 ml) y se enfrió a menos de -10 °C (temperatura interna) en un baño de CO₂/acetona. Se le agregó NaBH₄ (1,381 g, 36,5 mmol) seguido por cloruro de magnesio hexahidrato (11,35 g, 55,8 mmol) en agua (25 ml), manteniendo la temperatura por debajo de -5 °C. La mezcla se dejó agitando a < 0 °C durante 1 h y luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La suspensión espesa resultante se vació en una mezcla de ácido cítrico (25,05 g, 130 mmol), HCl (1M en agua, 205 ml, 205 mmol) y DCM (205 ml). La mezcla bifásica se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Las fases se separaron y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para producir el producto como un sólido pardo claro (14,1 g). CLEM (Procedimiento B): $t_R = 1,13$, $MH^+ = 327$.

Intermedio 14

35 [(2S,4R)-1-Acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo



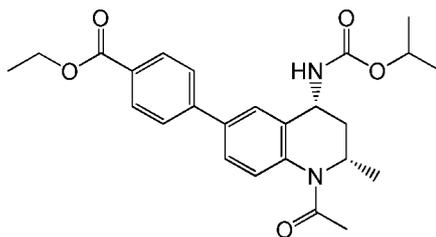
5 El [(2*S*,4*R*)-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]-carbamato de 1-metiletilo (para su preparación véase el intermedio 13) (14,1 g, 43,1 mmol) se tomó en DCM (400 ml) en nitrógeno a temperatura ambiente. Se le agregó piridina (10,46 ml, 129 mmol), luego cloruro de acetilo (4,60 ml, 64,6 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h; luego se dividió entre EtOAc (2000 ml) y una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (800 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con agua, luego salmuera (1500 ml cada una) y luego se secó con Na₂SO₄ y se concentró al vacío para producir un sólido púrpura. El producto en bruto se tomó en un mínimo de DCM y se aplicó a una columna Companion XL de 330g y se eluyó con un gradiente de acetato de etilo 12-63 % en ciclohexano para dar el producto como un sólido blanquecino (12,37 g).

10 CLEM (Procedimiento B): t_R = 1,03, MH⁺ = 369.

[alfa]D = +281,1025° (T = 20,7 °C, celda 10mm, c = 0,508 g/100 ml, etanol).

Intermedio 15

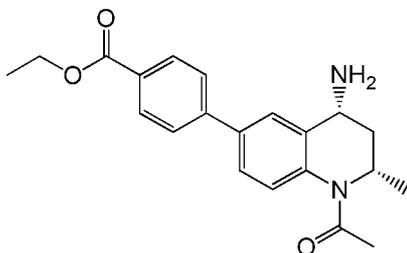
4-[(2*S*,4*R*)-1-Acetil-2-metil-4-({[(1-metiletil)oxi]carbonil}amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo



15 El [(2*S*,4*R*)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (para su preparación véase el intermedio 14) (39,0 g, 106 mmol), ácido {4-[(etilo)oxi]carbonil}fenil}-borónico (22,5 g, 116 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (1,83 g, 1,58 mmol) se mezclaron en DME (430 ml) y la mezcla resultante se trató con Na₂CO₃ acuoso (2N, 210 ml, 420 mmol). La mezcla se desgasificó sometida al vacío del laboratorio con varios enfriamientos rápidos con nitrógeno y luego se agitó a 105 °C en nitrógeno durante aproximadamente 6 h, antes de dejar enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se dividió entre EtOAc y agua y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera. La fase orgánica se filtró entonces a través de un cartucho de sílice de 70 g, lavando el cartucho con EtOAc. El filtrado y los lavados combinados se concentraron al vacío. El residuo se trituró con Et₂O y luego se separó por filtración. El sólido obtenido se secó al aire para dar el 4-[(2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-4-({[(1-metiletil)oxi]carbonil}-amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo como un sólido gris (35,2 g, 80,2 mmol, 76 %). El filtrado se concentró al vacío y el residuo obtenido se trituró con Et₂O (aproximadamente 30 ml). El sólido formado se aisló por filtración y se secó al aire para dar el 4-[(2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-4-({[(1-metiletil)oxi]carbonil}amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo como un sólido gris (5,96 g, 13,5 mmol, 13 %). CLEM (formiato, 2 min), tiempo de retención: 1,16 min; MH⁺ = 439.

30 **Intermedio 16**

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

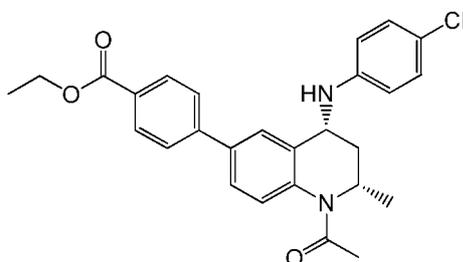


5 A una suspensión de cloruro de aluminio (10,3 g, 77 mmol) en DCM (160 ml) enfriada con un baño de hielo/agua, se le agregó 4-[(2S,4R)-1-acetil-2-metil-4-(((1-metiletil)oxi)carbonil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo (para su preparación véase el intermedio 15) (8,90 g, 20,30 mmol). La temperatura se elevó de 0 °C a aproximadamente 6 °C después de la adición. La mezcla resultante se agitó a aproximadamente 0 °C durante 20 min y luego se trató con una solución de metanol (18 ml) y trietilamina (34 ml, 245 mmol) durante ~30 s. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante ~30 min y luego se dividió entre EtOAc y una solución acuosa saturada de NaHCO₃.

10 La misma reacción se realizó en paralelo usando 4-[(2S,4R)-1-acetil-2-metil-4-(((1-metiletil)oxi)carbonil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo (para su preparación véase el intermedio 15) (0,89 g 2,030 mmol), cloruro de aluminio (1,03 g, 7,72 mmol), trietilamina (3,4 ml, 24,53 mmol), DCM (16 ml) y MeOH (1,3 ml). Los productos de las dos reacciones se combinaron en esta fase y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min (volumen total: aproximadamente 1 l). La mezcla se filtró a través de Celite™, el residuo insoluble se lavó con EtOAc y una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (frita hidrófoba) y se concentraron al vacío, para dar el 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-amino-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo como un sólido de color crema (6,6 g, 84 % -tomando en cuenta la adición del experimento paralelo). CLEM (formiato, 2 min), tiempo de retención 0,73 min; [M-NH₂]⁺ = 336.

Intermedio 17

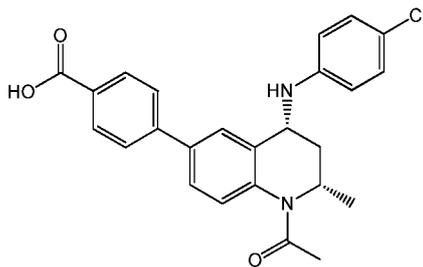
20 **4-[(2S,4R)-1-Acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo**



25 El 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-amino-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo (para su preparación véase el intermedio 16) (6,6 g, 18,73 mmol), 1-bromo-4-clorobenceno (3,94 g, 20,60 mmol), bis(dibencilidenacetona)paladio(0) (690 mg, 1,2 mmol) y [2'-(diciclohexilfosfanil)-2-bifenilil]dimetilamina (Dave-phos) (590 mg, 1,499 mmol) se mezclaron en tolueno (120 ml) y la mezcla resultante se trató con t-butoxido de sodio (2,52 g, 26,2 mmol). La reacción se desgasificó sometida al vacío del laboratorio con varios enfriamientos rápidos con nitrógeno, se calentó a 70 °C en nitrógeno durante 16 h, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró. El residuo insoluble se lavó con tolueno y luego Et₂O. El filtrado y los lavados combinados se lavaron con agua (x2) y luego se sometieron a extracción con ácido clorhídrico (2N, x 20), dando como resultado la precipitación de un aceite anaranjado que se recolectó con las fases acuosas ácidas. Los extractos ácidos se lavaron con Et₂O y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (frita hidrófoba) y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre un cartucho de sílice (330 g), eluyendo con un gradiente de EtOAc/ciclohexano (5-45 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se redujeron hasta sequedad al vacío para dar una espuma amarilla pálida. Esta espuma se disolvió en EtOAc (50 ml) y se trató con sílice tiourea funcional (0,56 g, aceptor de paladio). La mezcla se agitó a temperatura ambiente (aire atmosférico) durante ~20 min y después se dejó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se filtró y el residuo insoluble se lavó con EtOAc. El filtrado y los lavados combinados se concentraron al vacío para dar el 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoato de etilo como un aceite amarillo (3,7 g, 8,0 mmol, 32 %).

Intermedio 18

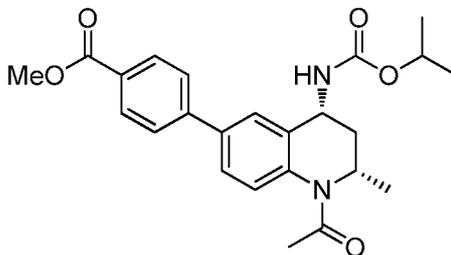
40 **Acido 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]benzoico**



5 El 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoato de etilo (para su preparación véase el intermedio 17) (5,41 g, 11,69 mmol) se disolvió en etanol (100 ml) y la solución se trató con una solución acuosa de NaOH (2M, 50 ml, 100 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente (aire atmosférico) durante aproximadamente 2 h luego la mayor parte del etanol se eliminó al vacío. La solución amarilla resultante se diluyó con agua (dando como resultado la formación de un precipitado oleoso amarillo). La fase acuosa se lavó dos veces con DCM (que no disuelve el precipitado previamente formado), luego se acidificó con ácido clorhídrico (2N) hasta pH 1 y se extrajo con EtOAc (x2). La fase combinada de EtOAc se lavó con salmuera, se secó (frita hidrófoba) y se concentró al vacío. La espuma amarilla residual se trituró con Et₂O durante aproximadamente 1 h. El sólido resultante se aisló por filtración, se lavó con Et₂O y se secó al aire, para dar el ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico como un sólido de color crema (4,41 g, 10,1 mmol, 87 %). CLEM (HpH), tiempo de retención 1,08 min, [M-H]⁻ = 433.

Intermedio 19

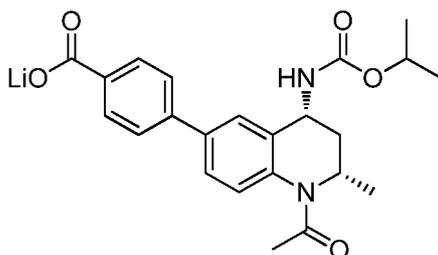
4-((2S,4R)-1-Acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de metilo



15 A una solución de ((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)carbamato de isopropilo (5 g, 13,54 mmol) y 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoato de metilo (3,90 g, 14,89 mmol) en DME (50 ml) y agua (10,0 ml) se le agregó sucesivamente paladio tetraquis(trifenilfosfina) (1,565 g, 1,354 mmol) y carbonato de potasio (5,61 g, 40,6 mmol). La mezcla resultante se agitó a 100 °C durante 1 hora, después de lo cual se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite™. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se dividió entre EtOAc y agua. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (x3) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El compuesto en bruto se purificó por cromatografía de vaporización instantánea sobre un cartucho de gel de sílice (50 g), eluyendo con EtOAc en ciclohexano (5-60 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y concentraron sometidas a presión reducida para dar el 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de metilo como una goma blanca (4,64 g, 81 %). CLEM (formiato, 2 min), t_R = 1,09 min, MH⁺ = 425.

Intermedio 20

4-((2S,4R)-1-Acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de litio

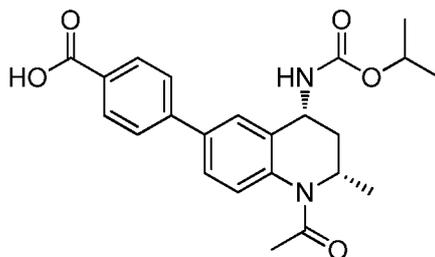


30 A una solución de 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato

de metilo (para su preparación véase el intermedio 19) (1,63 g, 3,84 mmol) en metanol (20 ml) se le agregó hidróxido de litio (4,61 ml, 4,61 mmol). La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante 6 horas, después de lo cual se concentró sometida a presión reducida para dar el 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de litio (1,65 g, 100 %), que no se purificó y se usó directamente en la etapa subsiguiente. CLEM (formiato, 2 min), $t_R = 0,87$, $MH^+ = 411$.

Intermedio 21

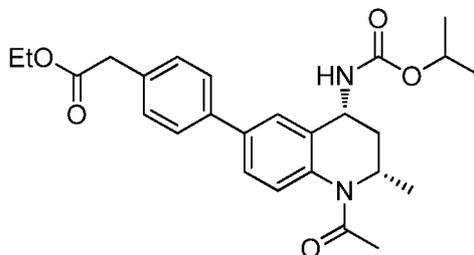
Acido 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoico



El 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de litio (1,05 g, 2,52 mmol) (para su preparación véase el intermedio 20) se dividió entre EtOAc y ácido clorhídrico (2*M*). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron al vacío, para dar el ácido 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoico como un sólido blanco (898 mg, 87 %). CLEM (formiato, 2 min), $t_R = 0,87$, $MH^+ = 411$.

15 Intermedio 22

2-(4-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acetato de etilo

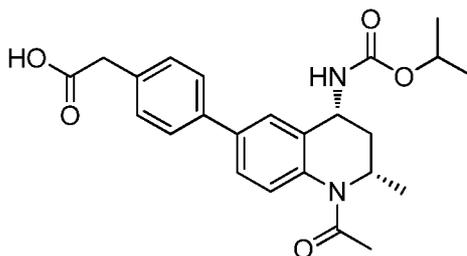


A un matraz cargado con (4-bromofenil)acetato de etilo (0,174 ml, 1,000 mmol), [(2*S*,4*R*)-1-acetil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (416 mg, 1 mmol), carbonato de potasio (415 mg, 3,00 mmol) y $PdCl_2(dppf)$ (73,2 mg, 0,100 mmol), se le agregó 1,4-dioxano (6 ml) y agua (2,0 ml) y el matraz se inundó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó sometida a irradiación de microondas a 120 °C durante 30 min, luego se enfrió a temperatura ambiente. La mayor parte del dioxano se eliminó al vacío y el residuo se dividió entre EtOAc y agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía (columna 25 g, MeOH/DCM) para dar el 2-(4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acetato de etilo (270 mg, 59,7 % de rendimiento). Este compuesto se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

CLEM (HpH, 2 min): $t_R = 1,16$; $MH^+ = 453$.

Intermedio 23

30 **Acido 2-(4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)fenil)acético**

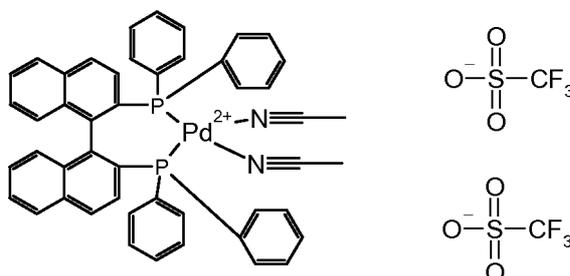


A una solución de {4-[(2S,4R)-1-acetil-2-metil-4-(((1-metiletil)oxi)carbonil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]fenil]acetato de etilo (para su preparación véase el intermedio 22) (270 mg, 0,597 mmol) en metanol (6 ml) y agua (2,0 ml), se le agregó hidróxido de sodio acuoso (2N, 0,597 ml, 1,193 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante 6 h. Se le agregó hidróxido de sodio acuoso (2 N, 0,5 ml) y la mezcla se dejó reposar durante la noche. La mayor parte del metanol se eliminó al vacío y el residuo resultante se dividió entre agua y Et₂O y las fases se separaron. La fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico (2N, 2 ml) y se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron al vacío para dar el ácido {4-[(2S,4R)-1-acetil-2-metil-4-(((1-metiletil)oxi)carbonil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil]fenil]acético como una espuma parda (200 mg, 0,471 mmol, 79 % de rendimiento). Este compuesto se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

CLEM (HpH, 2 min): t_R = 0,65, MH⁺ = 425.

Intermedio 24

(R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio(II)

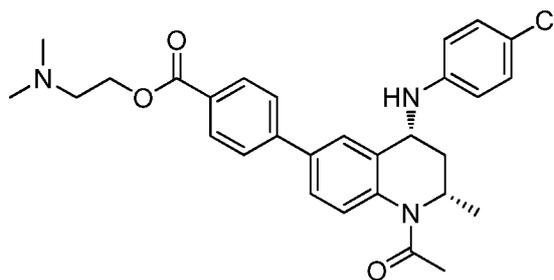


El R-(+)-BINAP (6,08 g, 9,76 mmol, disponible de Avocado) se agitó en DCM (626 ml) y se le agregó diclorobis(acetonitrilo)paladio (II) (2,5 g, 9,64 mmol, disponible de Aldrich). La mezcla se agitó en nitrógeno durante 30 min; la suspensión no llegó a ser una solución y se le agregó más DCM (100 ml). La mezcla se agitó 30 min más y se le agregó triflato de plata (5,00 g, 19,47 mmol, disponible de Aldrich) disuelto en acetonitrilo (250 ml). La mezcla cambió de una suspensión turbia anaranjada a una suspensión amarilla. La mezcla se agitó 1 h, se filtró a través de Celite™ y se evaporó hasta dejar un sólido anaranjado. El residuo se secó al vacío (a aproximadamente 14 mbar) a temperatura ambiente durante el fin de semana, para dar el producto deseado (10,69 g).

RMN de ¹H (400 MHz, MeCN-*d*₃) 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).

Ejemplo 1

Clorhidrato de 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo

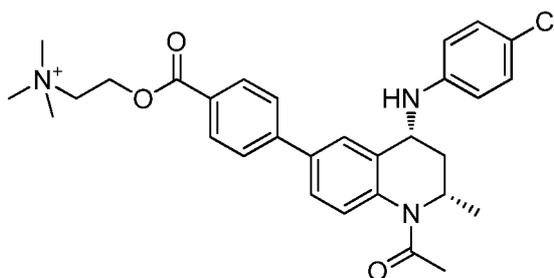


El ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico (para una preparación véase el intermedio 18 (100 mg, 0,230 mmol) se suspendió en DCM (1 ml). Se agregaron DMAP (33,7 mg, 0,276 mmol) y DCC (52,2 mg, 0,253 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos produciendo una solución amarilla clara. Subsiguientemente se le agregó 2-(dimetilamino)etanol (20,5 mg, 0,230 mmol) en DCM (0,5 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (8,5 ml) y se lavó con NaOH (2N), agua y salmuera (10 ml de cada una); luego se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para producir un semisólido blanquecino. El producto en bruto se disolvió en un volumen mínimo de DCM (con unas pocas gotas de MeOH para ayudar a la solubilidad) y se aplicó a un cartucho de 25 g. El cartucho se secó al vacío a 40 °C durante 1 h, luego se eluyó con NH₃ 2 M en metanol 1 %/DCM por 2CV luego NH₃ 2 M en metanol 1-5 % en DCM por 10CV, luego se mantuvo a 5 % por 5CV. Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto de amina libre (18,8 mg) como un aceite transparente. El último se tomó en un mínimo de DCM y se le agregó HCl en Et₂O (1N, 0,19 ml, 0,190 mmol) y el disolvente se evaporó sometido a una corriente de nitrógeno. Se le agregó una cantidad pequeña de Et₂O (~1 ml) y se evaporó en nitrógeno para producir clorhidrato de 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo como un sólido blanco (76,7 mg, 0,135 mmol, 58,6 % de rendimiento). CLEM (formiato, 2 min): t_R = 0,91 min; MH⁺ = 506.

RMN de ¹H (DMSO-d₆): δ 1,16 (3H, d), 1,30 (1 H, m), 2,21 (3H, s), 2,65-2,74 (7H, m), 3,24 (2H, m), 4,36 (1H, m), 4,56 (2H, m), 4,76 (1 H, m), 6,38 (1 H, d), 6,80 (2H, d), 7,19 (2H, d), 7,52 (1H, s), 7,54 (1H, d), 7,72 (1H, dd), 7,77 (2H, d), 8,13 (2H, d), 9,92 (1 H, bs).

20 Ejemplo 2

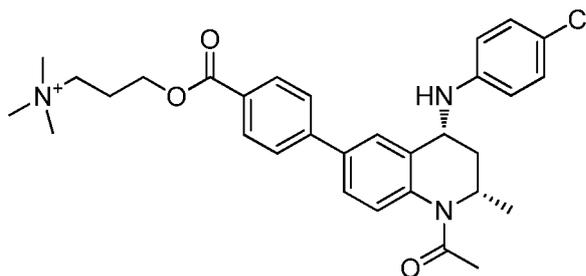
Formiato de 2-((4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-N,N,N-trimetiletanamio



A una solución de ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico (para su preparación véase el intermedio 18) (200 mg, 0,460 mmol) en DMF (5 ml), se le agregó sucesivamente K₂CO₃ (95 mg, 0,690 mmol) y bromuro de (2-bromoetil)trimetilamonio (170 mg, 0,690 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después de lo cual se concentró sometida a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (formiato). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron al vacío para dar formiato de 2-((4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-N,N,N-trimetiletanamio (133 mg, 51 %) como un sólido blanquecino. CLEM (formiato, 2 min): t_R = 0,89 min; MH⁺ = 520.

Ejemplo 3

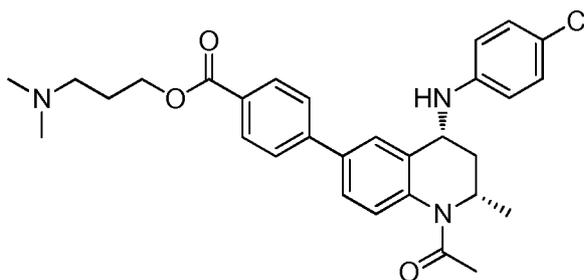
Formiato de 3-((4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-N,N,N-trimetilpropan-1-amio



5 El ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico (para su preparación véase el intermedio 18) (150 mg, 0,345 mmol), se disolvió en DMF (3 ml) y se le agregó K₂CO₃ (47,7 mg, 0,345 mmol) y luego bromuro de 3-bromo-*N,N,N*-trimetil-1-propanaminio (90 mg, 0,345 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después de lo cual la mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó por medio de MDAP (formiato) para dar formiato de 3-[[4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)fenil]carbonil]oxi-*N,N,N*-trimetil-1-propanaminio (41 mg, 0,064 mmol, 19 % de rendimiento) como un aceite amarillo. CLEM (formiato, 2 min): t_R= 0,86 min; MH⁺ = 534.

Ejemplo 4

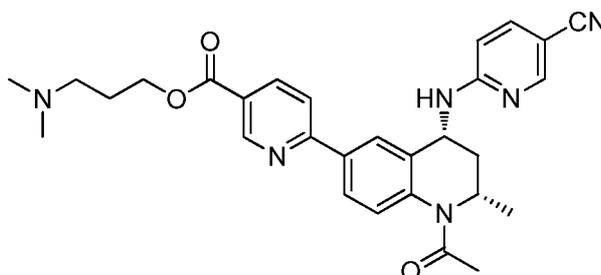
10 **4-((2S,4R)-1-Acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo**



15 A una solución de ácido 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil)benzoico (para su preparación véase el intermedio 18) (250 mg, 0,575 mmol) en DMF (10 ml) se le agregó sucesivamente 3-(dimetilamino)-1-propanol (71,2 mg, 0,690 mmol), EDC (220 mg, 1,150 mmol) y DMAP (7,0 mg, 0,057 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, luego se concentró al vacío, se disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (HpH). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron sometidas a presión reducida para dar 4-((2S,4R)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo (41 mg, 17 %) como un aceite viscoso incoloro. CLEM (formiato, 2 min): t_R= 0,94 min; MH⁺ = 520.

Ejemplo 5

6-((2S,4R)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de 3-(dimetilamino)propilo

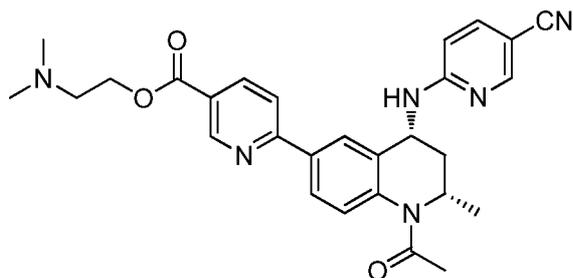


25 A una solución de ácido 6-((2S,4R)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotínico (para su preparación véase el intermedio 7) (100 mg, 0,234 mmol) en DMF (5 ml), se le agregó 3-(dimetilamino)-1-propanol (121 mg, 1,170 mmol), EDC (90 mg, 0,468 mmol) y DMAP (2,86 mg, 0,023 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche; la mezcla de reacción se concentró al vacío, se

disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (HpH). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron sometidas a presión reducida para dar 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de 3-(dimetilamino)propilo (23 mg, 19 %) como un aceite incoloro. CLEM (formiato, 2 min): $t_R = 0,70$ min; $MH^+ = 513$.

5 Ejemplo 6

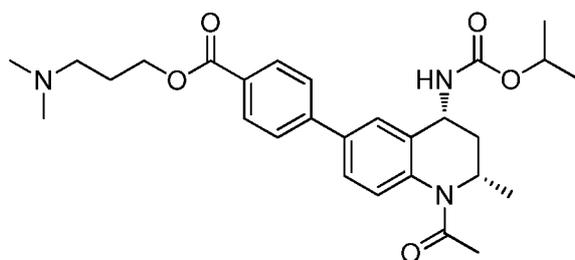
6-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de 2-(dimetilamino)etilo



A una solución de ácido 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotínico (para su preparación véase el intermedio 7) (54 mg, 0,126 mmol) en DMF (5 ml), se le agregó K_2CO_3 (26,2 mg, 0,189 mmol) y 2-bromo-*N,N*-dimetiletanamina (28,8 mg, 0,189 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h; la mezcla de reacción se concentró sometida a presión reducida y el residuo se disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (formiato). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron al vacío para dar 6-((2*R*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)nicotinato de 2-(dimetilamino)etilo (16,5 mg, al 24 %) como un aceite viscoso incoloro. CLEM (formiato, 2 min): $t_R = 0,69$ min; $MH^+ = 499$.

Ejemplo 7

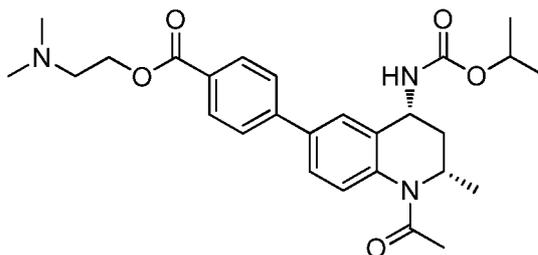
4-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo



A una solución de ácido 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoico (para su preparación véase el intermedio 21) (164 mg, 0,400 mmol) y 3-(dimetilamino)propan-1-ol (206 mg, 1,998 mmol) en DMF (3 ml), se le agregó clorhidrato de *N*1-((etilimino)metileno)-*N*3,*N*3-dimetilpropano-1,3-diamina (153 mg, 0,799 mmol) y *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (4,88 mg, 0,040 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h; la mezcla de reacción se diluyó con agua y se le agregó EtOAc. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (HpH). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron sometidas a presión reducida para dar 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo (29,3 mg, 15 %) como un aceite viscoso incoloro. CLEM (formiato, 2 min): $t_R = 0,75$ min; $MH^+ = 476$.

Ejemplo 8

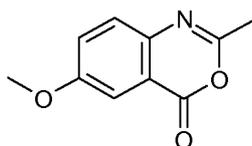
4-((2*S*,4*R*)-1-Acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo



A una solución de 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxycarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)-benzoato de litio (para su preparación véase el intermedio 20) (246 mg, 0,591 mmol) y 2-bromo-*N,N*-dimetiletanamina (135 mg, 0,886 mmol) en DMF (5 ml) se le agregó carbonato de potasio (122 mg, 0,886 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h; la mezcla de reacción se concentró sometida a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de MeOH/DMSO 1:1 y se purificó por medio de MDAP (formiato). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron al vacío para dar 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxycarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)-benzoato de 2-(dimetilamino)etilo (14,5 mg, 5 %) como un aceite viscoso incoloro. CLEM (formiato, 2 min): $t_R = 0,72$ min; $MH^+ = 482$.

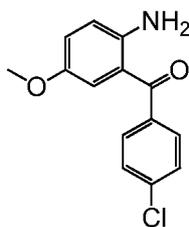
10 Compuestos de referencia

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



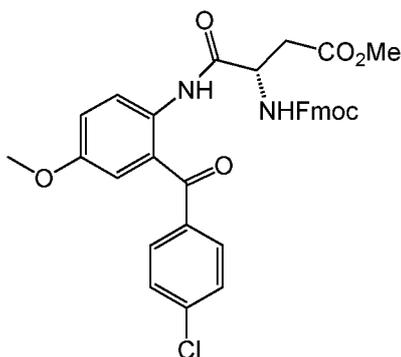
Una solución de ácido 5-metoxiantranílico (Lancaster) (41,8 g, 0,25 mol) se puso a reflujo en anhídrido acético (230 ml) durante 3,5 h antes de concentrarse sometida a presión reducida. Después el compuesto en bruto se concentró dos veces en presencia de tolueno antes de filtrarse y lavarse dos veces con éter, para producir el compuesto del título como un sólido pardo (33,7 g, 71 % de rendimiento). CL/EM (Procedimiento D): m/z 192 $[M+H]^+$; $t_R = 1,69$ min.

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



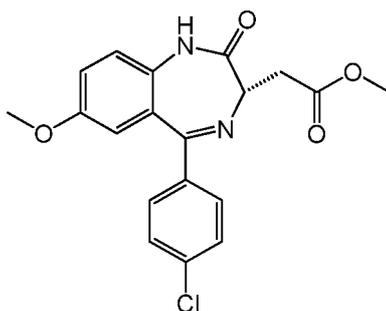
A una solución de 2-metil-6-(metiloxi)-4*H*-3,1-benzoxazin-4-ona (para su preparación véase el compuesto de referencia A) (40,0 g, 0,21 mol) en una mezcla de tolueno/éter (2/1) (760 ml) a 0 °C se le agregó gota a gota una solución de bromuro de 4-clorofenilmagnesio (170 ml, 1 M en Et₂O, 0,17 mol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó 1 h antes de apagar con HCl 1 N (200 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron sometidas a presión reducida. Después el compuesto en bruto se disolvió en EtOH (400 ml) y se le agregó HCl 6 N (160 ml). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 h antes de concentrarse hasta su tercera parte en 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 fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron sometidas a presión reducida. El compuesto del título se obtuvo como un sólido amarillo (39 g, 88 % de rendimiento); CL/EM (Procedimiento D): m/z 262 $[M+H]^+$; $t_R = 2,57$ min.

Compuesto de referencia C: *N*¹-[2-(4-Clorofenil)carbonil]4-(metiloxi)fenil]-*N*²-[[9*H*-fluoren-9-ilmetil]oxi]carbonil]-L- α -asparaginato de metilo



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

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

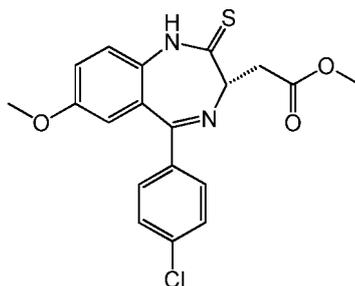


10 A una solución de *N*1-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)fenil]-*N*2-{[(9*H*-fluoren-9-ilmetil)oxi]carbonil}-*L*- α -asparaginato de metilo (para su preparación véase el compuesto de referencia C) (0,2 mol supuestos) en DCM (500 ml) se le agregó Et_3N (500 ml, 3,65 mol) y la mezcla resultante se sometió a reflujo durante 24 h antes de concentrarse. La amina en bruto resultante se disolvió en 1,2-DCE (1,5 l) y se le agregó cuidadosamente AcOH (104 ml, 1,8 mol). La mezcla de reacción se agitó entonces a 60 °C durante 2 h antes de concentrarse al vacío y disolverse en DCM. La fase orgánica se lavó con HCl 1*N* y la fase acuosa se extrajo con DCM (x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera; se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron sometidas a presión reducida. El sólido en bruto se recristalizó en MeCN produciendo el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (51 g). El filtrado se pudo concentrar y recristalizar en MeCN para dar otros 10 g del producto deseado.

20 $R_f = 0,34$ (DCM/MeOH : 95/5).

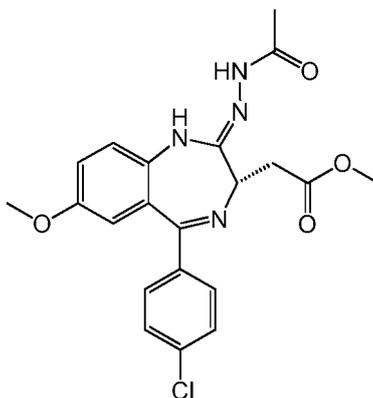
HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_4$ 373,0955; encontrada 373,0957.

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



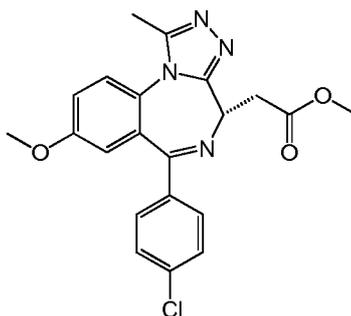
- Una suspensión de P_4S_{10} (36,1 g, 81,1 mmol) y Na_2CO_3 (8,6 g, 81,1 mmol) en 1,2-DCE (700 ml) a temperatura ambiente se agitó durante 2 h antes de agregarle [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo (para su preparación véase el compuesto de referencia D) (16,8 g, 45,1 mmol).
- 5 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 solución saturada de $NaHCO_3$ y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró sometida a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía de vaporización instantánea sobre gel de sílice (DCM/MeOH: 99/1), para producir el compuesto del título como un sólido amarillento (17,2 g, 98 % de rendimiento). CL/EM (Procedimiento D): m/z 389 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; $t_R = 2,64$ min.
- 10 HRMS $(M+H)^+$ calculada para $C_{19}H_{18}^{35}ClN_2O_3S$ 389,0727; encontrada 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



- 15 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 le agregó gota a gota hidrazina monohidrato (3,4 ml, 69,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h entre 5 °C y 15 °C antes de enfriarse a 0 °C. Después se le agregó lentamente Et_3N (9,7 ml, 69,6 mmol) y se le agregó cloruro de acetilo (7,95 ml, 69,6 mmol) gota a gota. Luego la mezcla se dejó calentar a la temperatura ambiente durante 16 h antes de concentrarse sometida a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en DCM y se lavó con agua.
- 20 La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío, para dar el compuesto del título en bruto (9,7 g, 98 % de rendimiento) que se usó sin más purificación. $R_f = 0,49$ (DCM/MeOH : 90/10).

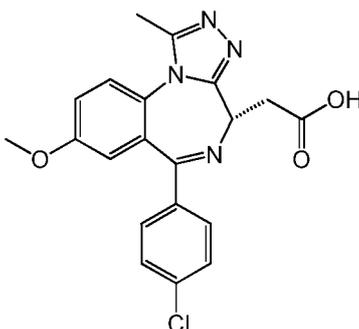
Compuesto de referencia G: [(4S)-6-(4-Clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetato de metilo



5 El [(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) (9,7 g supuestos) se suspendió en THF (100 ml) y se le agregó AcOH (60 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 2 días antes de concentrarse sometida a presión reducida. El sólido en bruto se trituró en *i*-Pr₂O y se filtró para dar el compuesto del título (8,7 g, 91 % durante las 3 etapas) como un sólido blanquecino .

HRMS (M+H)⁺ calculada para C₂₁H₂₀ClN₄O₃ 411,1229; encontrada 411,1245.

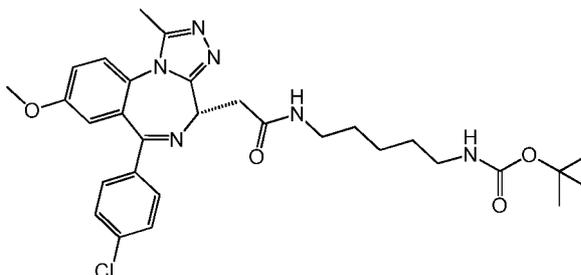
Compuesto de referencia H: Acido [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acético



10 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 una preparación véase el compuesto de referencia G) (7,4 g, 18,1 mmol) en THF (130 ml), a temperatura ambiente, se le agregó NaOH 1N (36,2 ml, 36,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 5 h antes de apagarse con HCl 1N (36,2 ml) y se concentró al vacío. Después se le agregó
15 agua y la fase acuosa se extrajo con DCM (x3) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron sometidas a presión reducida, para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (7 g, 98 % de rendimiento).

CL/EM (Procedimiento D): m/z 397 [M+H]⁺.

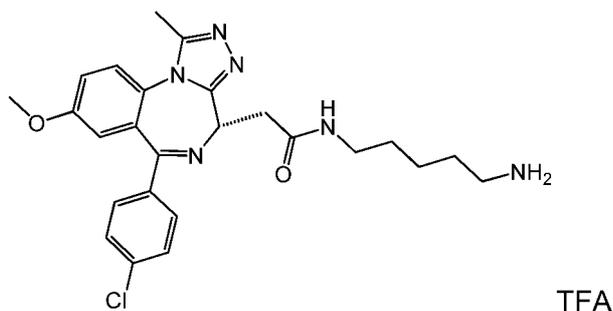
20 **Compuesto de referencia I: [5-([(4S)-6-(4-Clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetil)amino)pentil]carbamato de 1,1-dimetiletilo**



Una mezcla de ácido [(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 esto se le agregó (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 concentrarla. El residuo se tomó en diclorometano y se lavó con HCl 1 N. La fase acuosa se extrajo con diclorometano dos veces. La fase orgánica se lavó con hidróxido de sodio 1 N, seguido por una solución saturada de cloruro de sodio; se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de vaporización instantánea sobre sílice usando diclorometano/metanol 95/5 para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (1,2 g). CL/EM (Procedimiento D): $t_R = 3,04$ min.

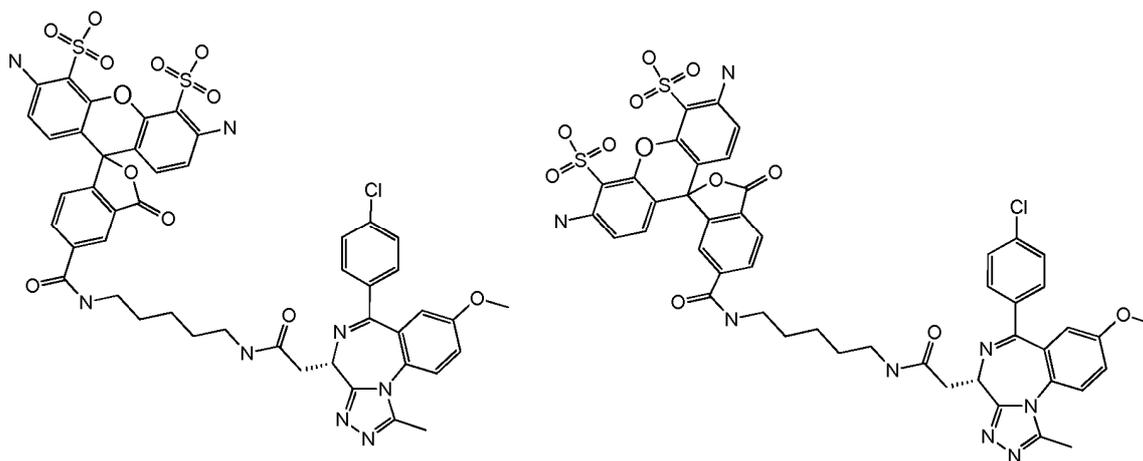
Compuesto de referencia J: Trifluoroacetato de N-(5-aminopentil)-2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetamida



- 10 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 le agregó, gota a gota a 0 °C, ácido trifluoroacético (0,053 ml, 0,68 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h de 0 °C a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad para producir el compuesto del título como un aceite amarillo higroscópico (200mg).
- 15 CL/EM (Procedimiento D): $t_R = 2,33$ min.

HRMS (M+H)⁺ calculada para C₂₅H₂₉ClN₆O₂ 481,2119; encontrada 481,2162.

Compuesto de referencia K: Mezcla de isómeros 5 y 6 de Alexa Flúor 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



- 20 Se disolvió 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) en N,N-dimetilformamida (DMF) (300 μ l) y esto se agregó al éster succinimidilo de Alexa Flúor 488 ácido carboxílico (5 mg, 7,77 μ mol, mezcla de los isómeros 5 y 6, disponible de Invitrogen, número de producto A-20100) en un tubo de Eppendorf de centrifuga. Se le agregó base de Hunig (7,0 μ l, 0,040 mmol) y la mezcla se agitó con vórtice durante la noche. Después de 18 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se volvió a disolver en DMSO/agua (50 %, <1 ml total), se aplicó a una columna preparativa Fenomenex Jupiter C18 y se eluyó con un gradiente de 95 % A: 5 % B a 100 % B (A = ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua, B= TFA 0,1 % /90 % acetonitrilo/10 % agua) a un caudal de 10 ml/min durante 150 minutos. Las fracciones impuras se combinaron y se volvieron a purificar usando el mismo sistema. Las fracciones se combinaron y se evaporaron para producir el producto del título (2,8 mg) como una mezcla de los 2 regioisómeros mostrados.
- 25
- 30

CL/EM (Procedimiento F): MH+ = 999; t_R = 1,88 min.

Procedimientos de prueba biológicos

Ensayo de unión por anisotropía fluorescente

5 La unión de los compuestos de fórmula (I) a los bromodominios BRD2, BRD3 y BRD4 se puede evaluar usando un ensayo de unión por anisotropía fluorescente.

La proteína de bromodominio, el ligando fluorescente (compuesto de referencia K, véase anteriormente) y una concentración variable del compuesto de prueba se incuban juntos para alcanzar el equilibrio termodinámico según condiciones tales que, en ausencia del compuesto de prueba, el ligando fluorescente se enlaza significativamente (>50 %) y en presencia de una concentración suficiente de un inhibidor potente, la anisotropía del ligando fluorescente no enlazado es mensurablemente diferente del valor del ligando enlazado.

Todos los datos se normalizaron con respecto a la media de 16 pocillos de control alto y 16 de control bajo en cada placa. Después se aplicó un ajuste de curva de cuatro parámetros de la siguiente forma:

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

en donde 'a' es el mínimo, 'b' es la pendiente de Hill, 'c' es el pCI50 y 'd' es el máximo.

15 Los bromodominios humanos recombinantes (BRD2 (1-473), BRD3 (1-435) y BRD4 (1-477)) se expresaron en células de *E. coli* (en el vector pET15b) con una etiqueta de seis histidinas en el extremo N. El bromodominio etiquetado con histidina se extrajo de las células de *E. coli* usando lisozima a 0,1 mg/ml y sonicación. Después el bromodominio se purificó por cromatografía de afinidad sobre una columna HisTRAP HP, eluyendo con un gradiente lineal de imidazol 10-500 mM, por 20 CV. Se realizó purificación adicional por medio de una columna de exclusión de tamaño grado preparativo Superdex 200. La proteína purificada se guardó a -80 °C en HEPES 20 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM.

25 Protocolo para el bromodominio BRD2: Todos los componentes se disolvieron en una composición amortiguadora de HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM, con concentraciones finales de BRD2, 75 nM, ligando fluorescente, 5 nM. Se agregaron 10 µl de esta mezcla de reacción usando una Micro Multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de prueba o vehículo de DMSO (1 % final) en una placa negra de microtitulación de volumen bajo de 384 pocillos Greiner y se equilibraron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. La anisotropía fluorescente se leyó en Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{EM} = 530 nm; Dicroico -505 nM).

30 Protocolo para el bromodominio BRD3: Todos los componentes se disolvieron en una composición amortiguadora de HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM, con concentraciones finales de BRD3, 75 nM, ligando fluorescente, 5 nM. Se agregaron 10 µl de esta mezcla de reacción usando una Micro Multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de prueba o vehículo de DMSO (1 % final) en una placa negra de microtitulación de volumen bajo de 384 pocillos Greiner y se equilibraron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. La anisotropía fluorescente se leyó en Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{EM} = 530 nm; Dicroico -505 nM).

35 Protocolo para el bromodominio BRD4: Todos los componentes se disolvieron en una composición amortiguadora de HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM, con concentraciones finales de BRD4, 75 nM, ligando fluorescente, 5 nM. Se agregaron 10 µl de esta mezcla de reacción usando una Micro Multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de prueba o vehículo de DMSO (1 % final) en una placa negra de microtitulación de volumen bajo de 384 pocillos Greiner y se equilibraron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. La anisotropía fluorescente se leyó en Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{EM} = 530 nm; Dicroico -505 nM).

Ensayo de transferencia de energía por resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET)

45 La unión de los compuestos de fórmula (I) a los bromodominios BRD2, BRD3 y BRD4 se evaluó usando un ensayo de unión por medio de transferencia de energía por resonancia fluorescente resuelta en el tiempo, que mide la unión de un péptido de histona acetilada a la proteína de bromodominio.

La proteína de bromodominio, el péptido de histona y una concentración variable del compuesto de prueba se incuban juntos para alcanzar el equilibrio termodinámico. La prueba se configura de tal manera que, en ausencia del compuesto de prueba, el bromodominio y el péptido se enlazan significativamente (~30 %) y en presencia de una concentración suficiente de un inhibidor potente esta interacción es interrumpida produciendo una caída mensurable en la transferencia de energía de resonancia fluorescente.

Péptido de histona:

H-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys(Ac)-Gly-Gly-Lys(Ac)-Gly-Leu-Gly-Lys(Ac)-Gly-Gly-Ala-Lys(Ac)-Arg-His-Gly-Ser-Gly-Ser-

Lys(Biotina)-OH. 35FA

El péptido protegido se ensambló en un sintetizador de fase sólida usando resina de Wang previamente cargada y utilizando los protocolos estándares de síntesis de Fmoc. La lisina C-terminal se protegió por medio de un grupo hipersensible al ácido, permitiendo su separación selectiva al final del ensamble y unión de la biotina. El péptido en bruto se obtuvo después de la escisión de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano y agua (95:2,5:2,5) durante 3 h a temperatura ambiente y después se purificó usando una columna C18 de fase inversa utilizando un gradiente de amortiguador acuoso-TFA 0,1 %/acetonitrilo. Las fracciones resultantes se analizaron y las fracciones que eran > 95 % puras, según una HPLC analítica y que dan el PM correcto (por medio de espectroscopía de masa MALDI-TOF), se reunieron y se criodesecaron. El material final se analizó por HPLC para confirmar la pureza.

Producción de proteína: Los bromodominios humanos recombinantes (BRD2 (1-473), BRD3 (1-435) y BRD4 (1-477)) se expresaron en células de *E. coli* (en el vector pET15b) con una etiqueta de seis histidinas en el extremo N. El bromodominio etiquetado con histidina se extrajo de las células de *E. coli* usando sonicación y se purificó usando una columna de níquel Sefarosa 6FF; las proteínas se lavaron y luego se eluyeron con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 1 mM e imidazol 20 mM. Se realizó una purificación adicional por cromatografía de afinidad en una columna HisTRAP HP, eluyendo con un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-500 mM, por 20 volúmenes de columna. La purificación final se completó por medio de una columna de exclusión de tamaño grado preparativo Superdex 200. La proteína purificada se guardó a -80 °C en HEPES 20 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM. La identidad de la proteína se confirmó por medio de análisis de huella peptídica de la masa del péptido y el peso molecular pronosticado se confirmó por espectroscopía de masas.

Protocolo para los ensayos de bromodominio BRD2, 3 y 4: Todos los componentes del ensayo se disolvieron en una composición amortiguadora de HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM y CHAPS 0,5 mM. La concentración final de las proteínas de bromodominio era de 100 nM y del péptido de histona de 300 nM; estos componentes se mezclaron previamente y se dejaron equilibrando una hora en la oscuridad. Se agregaron 8 µl de esta mezcla de reacción a todos los pocillos que contenían 50 nl de diversas concentraciones del compuesto de prueba o vehículo de DMSO (final al 0,5 %) en placas negras de microtitulación de volumen bajo de 384 pocillos Greiner y se incubaron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. A todos los pocillos se les agregaron 2 µl de la mezcla de detección que contenía anticuerpo anti-6his XL665 marcado y estreptavidina marcada con criptato de europio y se realizó una incubación adicional en la oscuridad de por lo menos 30 minutos. Después, las placas se leyeron en la lectora de placas Envision (λ_{ex} = 317 nm, λ_{EM} donador = 615 nm; λ_{EM} aceptor = 665 nm; dióico LANCE DUAL). Las mediciones de la intensidad de fluorescencia resuelta en el tiempo se hicieron a ambas longitudes de onda de emisión y se calculó la relación de aceptor/donador y se usó para el análisis de los datos. Todos los datos se normalizaron con respecto a la media de 16 pocillos de control alto y 16 de control bajo en cada placa. Después se aplicó un ajuste de curva de cuatro parámetros de la siguiente forma:

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

en donde 'a' es el mínimo, 'b' es la pendiente de Hill, 'c' es el pCI50 y 'd' es el máximo.

Los compuestos de los ejemplos 1-8 se probaron en cada uno de los ensayos anteriores y se encontró que tenían un pCI50 en la escala de 6,3-7,2.

Medición de la secreción de IL-6 inducida por LPS en sangre completa

La activación de las células monocíticas por agonistas de receptores de tipo Toll, tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), resulta en la producción de mediadores inflamatorios clave que incluyen IL-6. Estas rutas se consideran ampliamente centrales para la patofisiología de una gama de trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Los compuestos por probar se diluyen para dar una gama de concentraciones apropiadas de las cuales se añade 1 µl de las reservas diluidas a una placa de 96 pocillos. Después de la adición de sangre completa (130 µl), las placas se incuban a 37 grados (CO₂ al 5 %) durante 30 minutos antes de la adición de 10 µl de LPS 2,8 µg/ml, diluido en RPMI 1640 completo (concentración final = 200 ng/ml), para dar un volumen total de 140 µl por pocillo. Después de una incubación adicional durante 24 horas a 37 grados, se agregan 140 µl de PBS a cada pocillo. Las placas se sellan, se agitan durante 10 minutos y luego se centrifugan (2500 rpm x 10 min). Se retiran 100 µl del sobrenadante y se determina la concentración de IL-6 por medio de un inmunoensayo (típicamente por medio de tecnología MesoScale Discovery), ya sea inmediatamente o después de almacenamiento a -20 grados. Se generaron curvas de concentración-respuesta de cada compuesto a partir de los datos y se calculó un valor de CI₅₀.

Los compuestos de los ejemplos 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 se probaron en el ensayo anterior y se encontró que tenían un pCI50 en la escala de 5,5-6,7.

Estos datos demuestran que los inhibidores de bromodominio probados en los ensayos anteriores de sangre completa inhibieron la producción del mediador inflamatorio clave IL-6.

Modelo de endotoxemia de ratón *in vivo*

Dosis altas de endotoxina (lipopolisacárido bacteriano) administradas a animales producen un síndrome de choque profundo que incluye una respuesta inflamatoria fuerte, desequilibrio de la función cardiovascular, insuficiencia orgánica y finalmente la muerte. Este patrón de respuesta es muy similar a la sepsis humana y choque séptico, en donde la respuesta del cuerpo a una infección bacteriana significativa puede ser similarmente una amenaza para la vida.

5 Para probar los compuestos para usarse en la invención, a grupos de ocho ratones Balb/c machos se les administró una dosis letal de LPS a 15 mg/kg por inyección intraperitoneal. Noventa minutos después los animales recibieron intravenosamente vehículo (20 % de ciclodextrina, 1 % de etanol, en agua libre de pirógenos) o compuesto (10 mg/kg). La supervivencia de los animales se sometió a seguimiento a los 4 días.

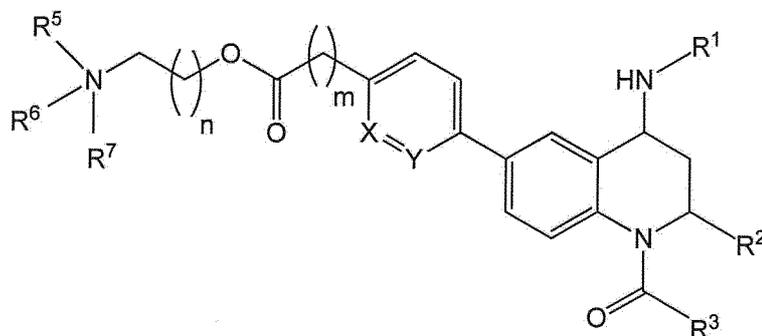
10 **Ensayo de crecimiento de células de oncología**

Se cultivaron líneas celulares humanas (n = 33, que comprenden 15 líneas celulares hemo, 14 líneas celulares de mama y otras 4 líneas celulares) en RPMI-1640 que contenía 10 % de suero fetal bovino; se sembraron 1000 células viables por pocillo en placas negras de poliestireno de fondo plano de 384 pocillos (Greiner n.º: 781086) en 48 µl de medio de cultivo. Todas las placas se pusieron a 5 % de CO₂, 37 °C, durante la noche. Al día siguiente una placa fue cosechada con CellTiter-Glo (CTG, Promega n.º: G7573) durante un tiempo igual a medición 0 (T0) y a las placas que quedan se les agregó el compuesto (titulación de 20 puntos de 14,7 µM a 7 pM). La concentración final de DMSO en todos los pocillos era de 0,15 %. Las células se incubaron 72 horas o el tiempo indicado y cada placa se desarrolló con el reactivo de CellTiter-Glo usando un volumen equivalente al volumen de cultivo celular en los pocillos. Las placas se agitaron durante aproximadamente 2 minutos y la señal quimioluminiscente se leyó en la lectora de placa Analyst GT (Molecular Devices) o EnVision Plate Reader (Perkin Elmer).

25 Los resultados se expresan como el porcentaje del T0 y se graficaron contra la concentración del compuesto. El valor de T0 se normalizó al 100 % y representa el número de células en el momento de la adición de compuesto y los datos de concentración-respuesta se ajustaron con un ajuste de curva de 4 parámetros usando el software XLfit (modelo 205). La concentración que inhibió el crecimiento celular en 50 % (gCl₅₀) es el punto medio de la "ventana de crecimiento" (entre el T0 y el control de DMSO). El valor Ymin-T0 se determina restando el valor de T0 (100 %) del valor Ymin (%) determinado del ajuste de la curva de concentración-respuesta. Los valores de los pocillos sin células se restaron de todas las muestras para corrección del fondo.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo



(I)

5 en la cual

X e Y son independientemente CH o N con la condición de que por lo menos uno de X e Y debe ser CH;

R¹ es un grupo C(O)OR⁴ en el cual R⁴ es alquilo de C₁₋₄ o cicloalquilo de C₃₋₇; o

R¹ es un grupo seleccionado de fenilo, piridilo, pirazinilo y pirimidinilo estando dichos grupos sustituidos opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo de C₁₋₄ y CN;

10 R² es alquilo de C₁₋₄;

R³ es alquilo de C₁₋₄;

R⁵ y R⁶ son independientemente alquilo de C₁₋₄; o

R⁵ y R⁶ se combinan junto con el N al que están unidos para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros;

R⁷ está ausente o es alquilo de C₁₋₄;

15 m es 0, 1 o 2;

n es 1 o 2.

2.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con la reivindicación 1 en el cual X e Y son ambos CH o en el cual X es CH e Y es N.

20 3.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el cual R¹ es un grupo C(O)OR⁴ en el cual R⁴ es isopropilo.

4.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el cual R¹ es fenilo o piridilo sustituido opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo de C₁₋₄ y CN.

25 5.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con la reivindicación 4 en el cual R¹ es 4-clorofenilo o 5-cianopiridin-2-ilo.

6.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con solo una de las reivindicaciones 1-5 en el cual R² es metilo.

7.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con solo una de las reivindicaciones 1-6 en el cual R³ es metilo.

30 8.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el cual R⁵ y R⁶ son ambos metilo.

9.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el cual R⁷ está ausente.

35 10.- Un compuesto o una sal del mismo de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el cual el compuesto de fórmula (I) es el enantiómero (2S,4R).

- 11.- Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 que está seleccionado de
- 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo;
- 2-((4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletanaminio;
- 5 3-((4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminio;
- 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((4-clorofenil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo;
- 6-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)nicotinato de 3-(dimetilamino)propilo;
- 10 6-((2*R*,4*R*)-1-acetil-4-((5-cianopiridin-2-il)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)nicotinato de 2-(dimetilamino)etilo;
- 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 3-(dimetilamino)propilo; y
- 15 4-((2*S*,4*R*)-1-acetil-4-((isopropoxicarbonil)amino)-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)benzoato de 2-(dimetilamino)etilo;
- o una sal del mismo.
- 12.- Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 13.- Una composición farmacéutica la cual comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se definen en la reivindicación 12 y uno o más vehículos, diluentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 14.- Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se definen en la reivindicación 12 para uso en terapia.
- 25 15.- Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se definen en la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de cáncer o de una afección autoinmune y/o inflamatoria crónica.