

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 057**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 13192666 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2722334**

54 Título: **Inhibidor de bromodominio de benzodiazepina**

30 Prioridad:

05.11.2009 GB 0919433
22.06.2010 GB 201010509

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GOSMINI, ROMAIN LUC MARIE y
MIRGUET, OLIVIER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 563 057 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

Inhibidor de bromodominio de benzodiazepina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto de benzodiazepina, a procedimientos para su preparación, a composiciones farmacéuticas que contienen tal compuesto y a su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

10 Los genomas de los organismos eucariotas están muy organizados dentro del núcleo de la célula. Las largas cadenas de ADN dúplex están enrolladas alrededor de un octámero de proteínas de histona (más normalmente comprendiendo dos copias de histonas H2A, H2B H3 y H4) para formar un nucleosoma. Esta unidad básica se comprime después adicionalmente mediante la agregación y el pliegue de los nucleosomas para formar una estructura de cromatina muy condensada. Es posible una gama de diferentes estados de condensación y la estrechez de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el procedimiento de división celular. La estructura de cromatina tiene una función crítica en la regulación de la transcripción genética, que no se puede presentar de una forma eficiente a partir de cromatina muy condensada. La estructura de cromatina está controlada por una serie de modificaciones posteriores a la traducción a las proteínas de histona, en particular las histonas H3 y H4 y más comúnmente dentro de las colas de histona que se extienden más allá de la estructura del nucleosoma del núcleo. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación y SUMOilación. Estas marcas epigenéticas se escriben y borran por enzimas específicas, que colocan las marcas sobre los residuos específicos dentro de la cola de histona, formando de esta manera un código epigenético, que después se interpreta por la célula para permitir la regulación de la estructura de cromatina específica del gen y de este modo la transcripción.

15 La acetilación de histona normalmente está más asociada a la activación de la transcripción genética, debido a que la modificación afloja la interacción del ADN y el octámero de histona mediante el cambio de la electrostática. Además de este cambio físico, las proteínas específicas se enlazan con los residuos de lisina acetilados dentro de las histonas para leer el código epigenético. Los bromodominios son dominios distintos pequeños (de aproximadamente 110 aminoácidos) dentro de las proteínas que se enlazan con los residuos de lisina acetilados comúnmente pero no exclusivamente en el contexto de las histonas. Hay una familia de alrededor de 50 proteínas que se sabe que contienen bromodominios y tienen una gama de funciones dentro de la célula.

20 La familia de proteínas Bet que contienen bromodominio comprende 4 proteínas (BRD2, BRD3, BRD4 y BRD-t) que contienen bromodominios en fila capaces de enlazarse a dos residuos de lisina acetilados en estrecha proximidad, aumentando la especificidad de la interacción. Se reseña que BRD2 y BRD3 se asocian con las histonas a lo largo de los genes activamente transcritos y pueden estar involucradas en la facilitación de la elongación de la transcripción (Leroy y colaboradores, Mol. Cell. 2008 30(1): 51-60), mientras que la BRD4 parece estar involucrada en el reclutamiento del complejo pTEF-B hacia los genes inducibles, que da como resultado la fosforilación de la polimerasa de ARN y el aumento de la producción de transcripción (Hargreaves y colaboradores, Cell, 2009 138(1): 129-145). También se ha reseñado que las BRD4 y BRD3 se fusionan con NUT (proteína nuclear en los testículos), formando un oncogén de fusión novedoso, BRD4-NUT, en una forma altamente maligna de neoplasia epitelial (French y colaboradores, Cancer Research, 2003, 63, 304-307 y French y colaboradores, Journal of Clinical Oncology, 2004, 22 (20), 4135-4139). Los datos sugieren que las proteínas de fusión BRD-NUT contribuyen a la carcinogénesis (Oncogene, 2008, 27, 2237-2242). BRD-t se expresa de una manera única en los testículos y en el ovario. Se ha reseñado que todos los miembros de la familia tienen alguna función en el control o en la ejecución de aspectos del ciclo celular y se ha demostrado que permanecen formando complejos con los cromosomas durante la división celular -sugiriendo una función en el mantenimiento de la memoria epigenética. Además algunos virus hacen uso de estas proteínas para atar sus genomas a la cromatina de la célula hospedadora, como parte del procedimiento de la réplica viral (You y colaboradores Cell, 2004 117(3): 349-60).

25 La Solicitud de Patente japonesa JP2008-156311 divulga un derivado de bencimidazol que se dice que es un agente de enlace de bromodominio BRD2 que tiene utilidad con respecto a la infección / proliferación del virus.

30 La Solicitud de Patente WO2009/084693A1 divulga una serie de derivados de tieno-triazolo-diazepina que se dice que inhiben el enlace entre una histona acetilada y una proteína que contiene bromodominio que se dice que son útiles como agentes anticancerígenos.

35 Se ha encontrado un compuesto que inhibe el enlace de los bromodominios con sus proteínas acetiladas cognadas, más particularmente que inhibe el enlace de los bromodominios de la familia Bet con los residuos de lisina acetilados. Un compuesto tal será referido de ahora en adelante como un "inhibidor de bromodominio".

Sumario de la invención

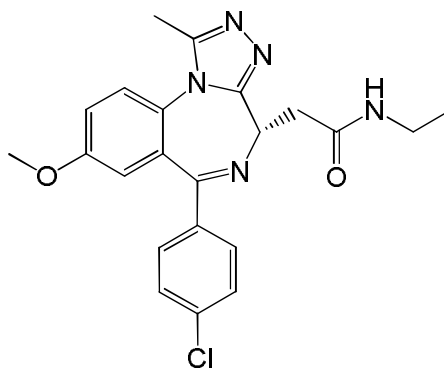
40 45 50 55 En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida para su uso en terapia.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida:



10

(I)

Debido a su uso potencial en medicina, las sales de los compuestos de fórmula (I) son deseablemente farmacéuticamente aceptables.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir las sales de adición de ácidos o de bases. Para una revisión sobre las sales adecuadas, véase Berge y colaboradores, J. Pharm. Sci., 66: 1-19, (1977). Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar fácilmente usando un ácido o una base deseada según convenga. La sal resultante se puede precipitar a partir de una solución y se puede recoger mediante filtración o se puede recuperar mediante la evaporación del disolvente.

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

25 Una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable se puede formar mediante la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un ácido orgánico u inorgánico 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 normalmente se aísla, por ejemplo, mediante cristalización y filtración. Una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o puede 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.

30 Se pueden usar otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, formiatos, oxalatos o trifluoro-acetatos, por ejemplo, en el aislamiento del compuesto de fórmula (I) y se divulgan también.

35 La invención incluye, dentro de su ámbito, todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de las sales del compuesto de fórmula (I).

40 Se apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes en los que se hacen reaccionar o a partir de los que se precipitan o se cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como un "hidrato". Se pueden usar disolventes con altos puntos de ebullición y/o capaces de formar enlaces de hidrógeno, tales como agua, xileno, N-metil-pirrolidina, metanol y

etanol para formar solvatos. Los procedimientos para la identificación de los solvatos incluyen, pero no se limitan a, RMN y microanálisis. Los solvatos del compuesto de fórmula (I) están dentro del ámbito de la invención.

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

- 5 El compuesto de fórmula (I) puede estar en una forma cristalina o amorfa. Adicionalmente, algunas de las formas cristalinas del compuesto de fórmula (I) pueden existir como polimorfos, que se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. Las formas polimórficas del compuesto de fórmula (I) se pueden caracterizar y diferenciar usando una serie de técnicas analíticas convencionales, incluyendo, pero no limitándose a, patrones de difracción en polvo de rayos-X (XRPD), espectros infrarrojos (IR), espectros Raman, calorimetría por barrido diferencial (DSC),
10 análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSRMN).

El compuesto de fórmula (I) es un isómero individual aislado de tal forma que está sustancialmente libre del otro isómero (es decir, enantioméricamente puro), de tal manera que está presente menos del 10 %, en particular menos de aproximadamente el 1 %, por ejemplo menos de aproximadamente el 0,1 % del otro enantiómero.

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

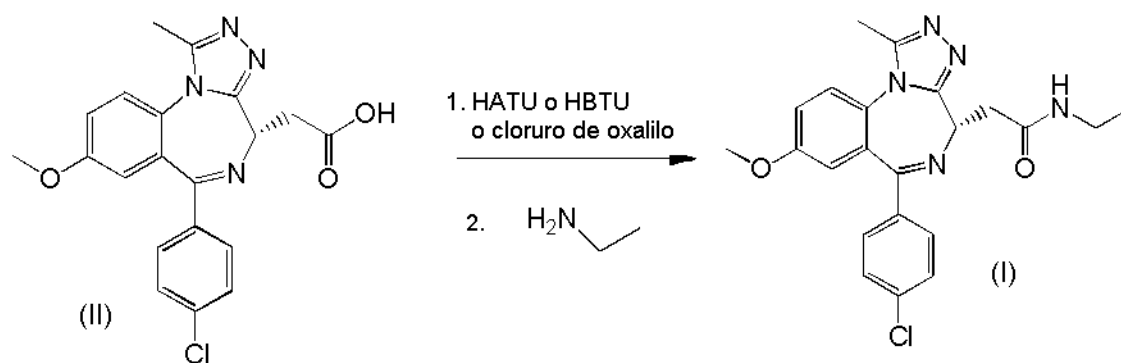
El compuesto de fórmula (I) puede existir en una de varias formas tautoméricas. Se entenderá que la presente invención abarca todos los tautómeros del compuesto de fórmula (I) ya sea como tautómeros individuales o bien como mezclas de los mismos.

- 20 Se apreciará a partir de lo anterior que dentro del ámbito de la invención se incluyen los solvatos, isómeros y formas polimórficas del compuesto de fórmula (I) y las sales de los mismos.

El compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden elaborar mediante una diversidad de procedimientos, incluyendo la química convencional. Los procedimientos sintéticos generales ilustrativos se presentan más adelante y luego se prepara el compuesto específico de fórmula (I) en los ejemplos funcionales. Estos procedimientos forman aspectos adicionales de la presente invención.

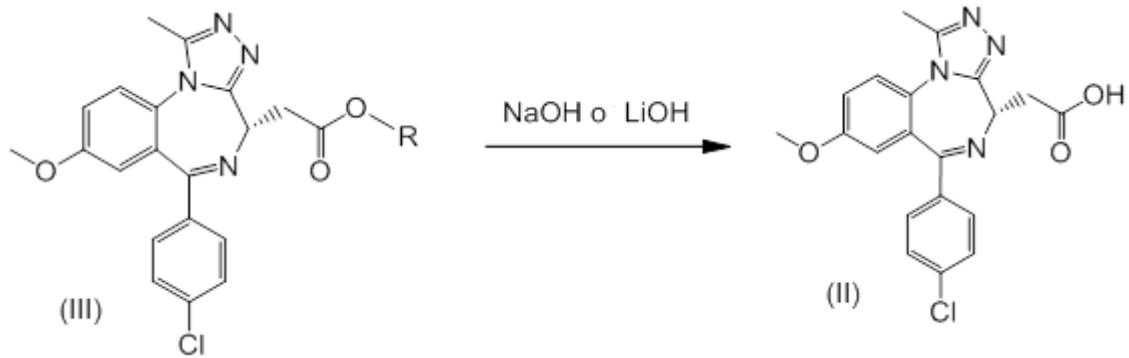
- 25 El compuesto de fórmula (I) se puede preparar de acuerdo con el esquema de reacción 1 mediante la reacción de un compuesto de fórmula (II) con EtNH₂ en presencia de HATU, o HBTU y DIEA a temperatura ambiente. De manera alternativa los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante la reacción del compuesto de fórmula (II) con cloruro de oxalilo seguida por la adición de EtNH₂ en presencia de trietilamina.

Esquema 1



El compuesto de fórmula (II) se puede preparar de acuerdo con el esquema de reacción 2. Las condiciones de reacción adecuadas comprenden hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) con hidróxido alcalino de preferencia hidróxido de sodio o hidróxido de litio.

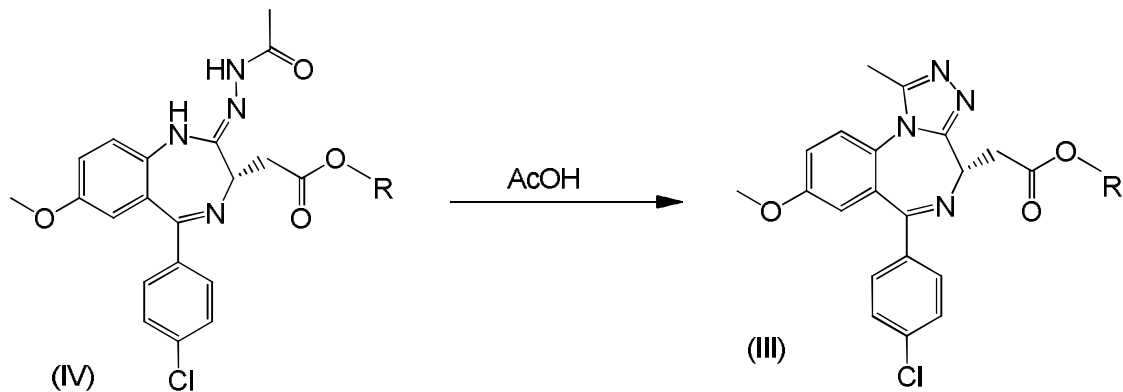
Esquema 2



en el que R representa alquilo C₁₋₆, tal como metilo.

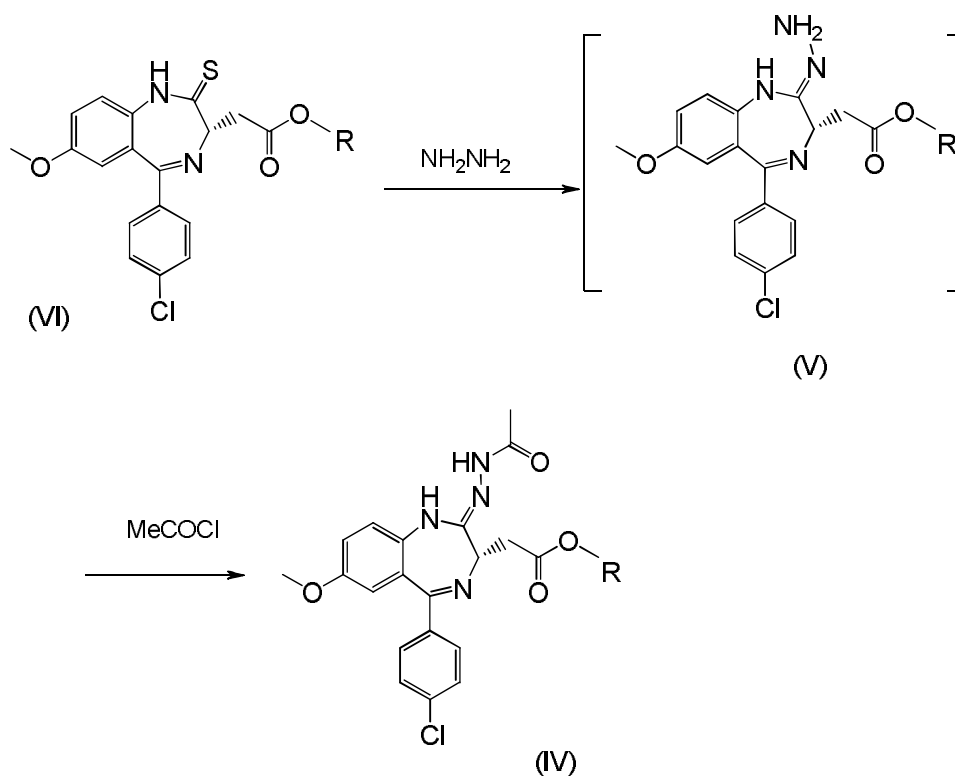
Los compuestos de fórmula (III) se pueden preparar de acuerdo con el esquema de reacción 3 mediante la reacción de los compuestos de fórmula (IV) con AcOH.

5 Esquema 3



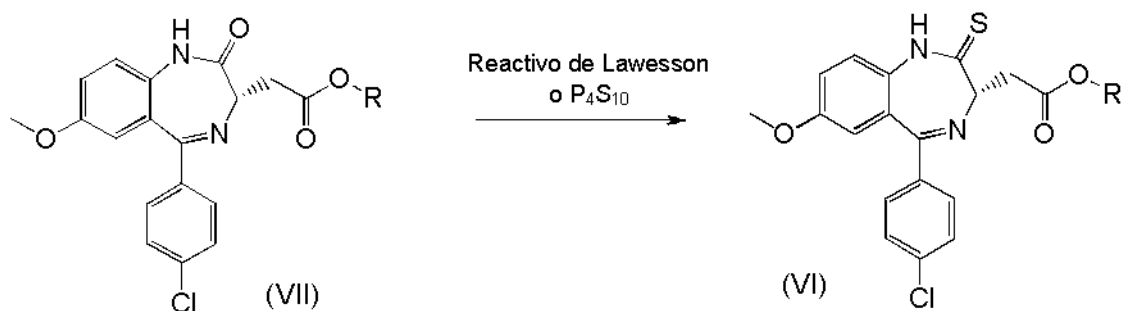
Los compuestos de fórmula (IV) se pueden preparar de acuerdo con el esquema de reacción 4 mediante la reacción de los compuestos de fórmula (VI) con hidrazina por debajo de 15 °C, seguida por la reacción de la hidrazona resultante (V) con MeCOCl a 0 °C. En términos generales la hidrazona (V) se usa sin purificación adicional y se hace reaccionar con MeCOCl, por ejemplo, a 0 °C.

Esquema 4



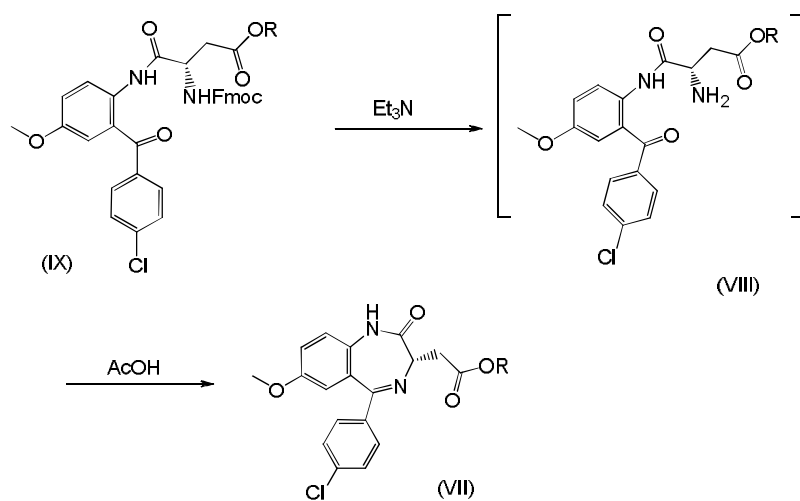
Los compuestos de fórmula (VI) en la que R es alquilo C₁₋₆ (tal como metilo) se pueden preparar de acuerdo con el esquema de reacción 5 a partir de los compuestos de fórmula (VII) mediante el tratamiento con reactivo de Lawesson o P₄S₁₀. Las condiciones de reacción adecuadas comprenden hacer reaccionar los compuestos de fórmula (VII) con P₄S₁₀ en 1,2-dicloroetano, por ejemplo, a 70°C.

Esquema 5



Los compuestos de fórmula (VII) se pueden preparar de acuerdo con el esquema de reacción 6, mediante la reacción de los compuestos de fórmula (IX) con una base orgánica tal como trietilamina seguida por la reacción de la amina resultante (VIII) con ácido acético. En términos generales, la amina (VIII) se usa sin purificación adicional y se hace reaccionar con AcOH, por ejemplo, a 60°C.

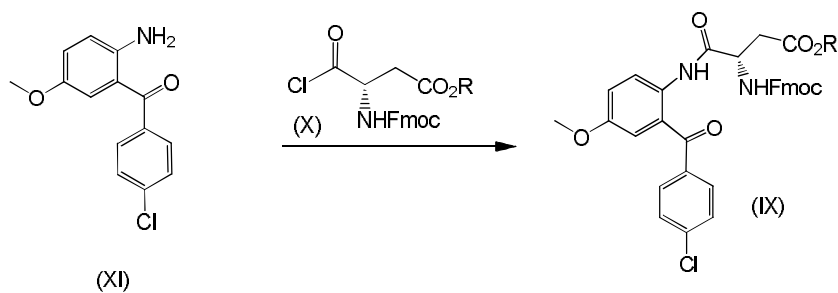
Esquema 6



Los compuestos de fórmula (IX) se pueden preparar de acuerdo con el esquema de reacción 7, mediante la reacción de los compuestos de fórmula (XI) con el cloruro de acilo (X) derivado a partir del ácido aspártico protegido.

Esquema 7

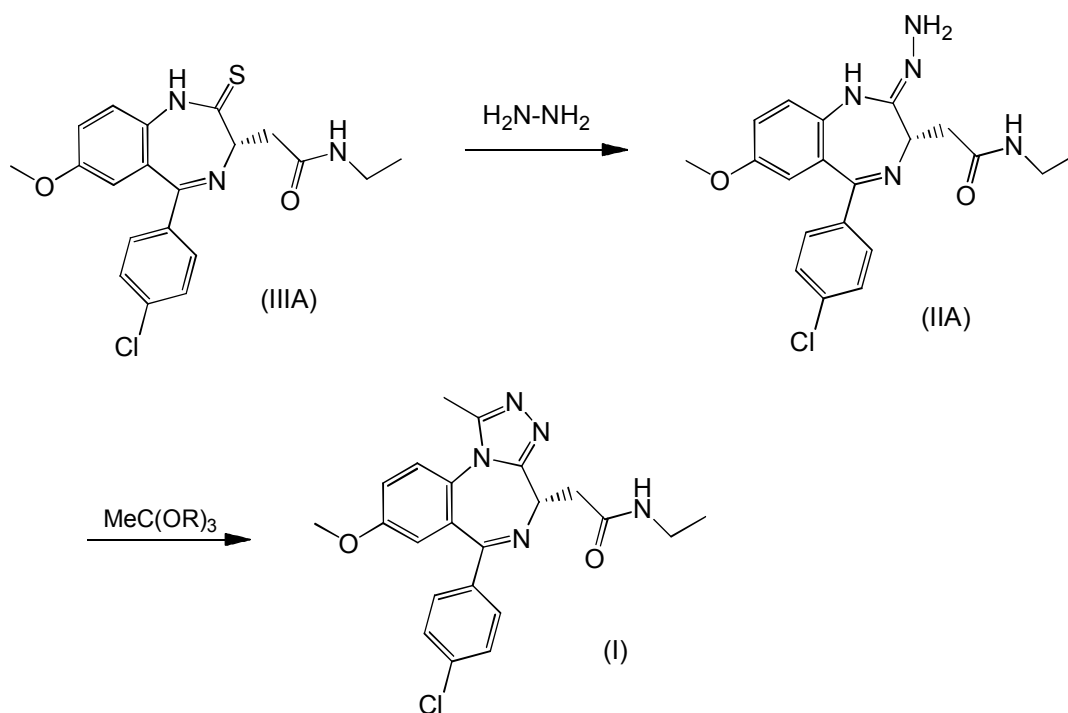
5



Los compuestos de fórmula (XI) se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en *Synthesis* 1980, 677-688. Se pueden preparar cloruros de acilo de fórmula (X) de acuerdo con los procedimientos descritos en *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 3068-3074 y *J. Chem. Soc. Perkin trans. 1*, 2001, 1673-1695.

10 De manera alternativa el compuesto de fórmula (I) se puede preparar de acuerdo con el esquema de reacción 8.

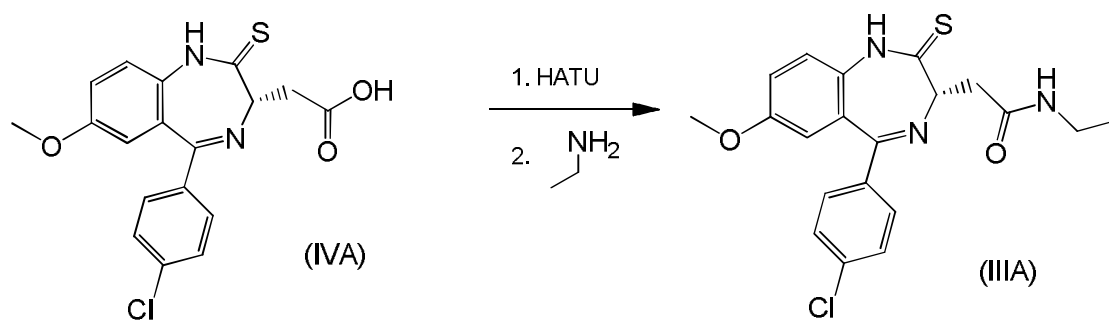
Esquema 8



en la que R representa alquilo C_{1-4} tal como metilo.

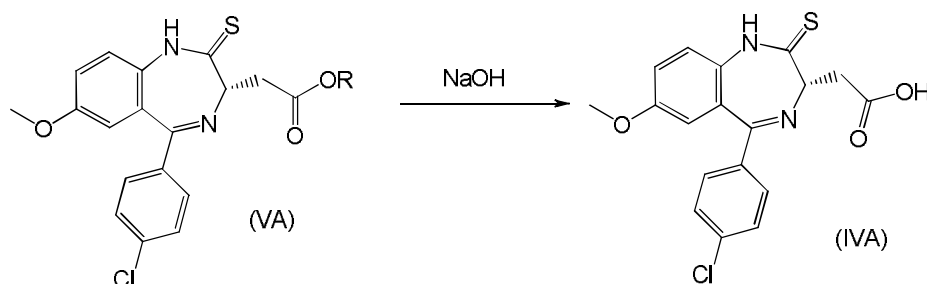
El compuesto de fórmula (III A) se puede preparar de acuerdo con el esquema de reacción 9 mediante la reacción de los compuestos de fórmula (IV A) con EtNH_2 en presencia de HATU y DIEA, por ejemplo, a temperatura ambiente.

5 Esquema 9



El compuesto de fórmula (IV A) se puede preparar de acuerdo con el esquema de reacción 10. Las condiciones de reacción adecuadas comprenden hacer reaccionar los compuestos de fórmula (V A) con hidróxido alcalino tal como hidróxido de sodio.

10 Esquema 10



Se apreciará por los expertos en la técnica que puede ser conveniente proteger uno o más grupos funcionales de los compuestos descritos en los procedimientos anteriores. Los ejemplos de los grupos protectores y los medios para su eliminación se pueden encontrar en T. W. Greene 'Protective Groups in Organic Synthesis' (4a. Edición, J. Wiley and Sons, 2006). Los grupos protectores de amina adecuados incluyen acilo (por ejemplo, acetilo, carbamato (por ejemplo, 2',2',2'-tricloroetoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o *tert*butoxicarbonilo) y arilalquilo (por ejemplo bencilo), que se pueden eliminar mediante hidrólisis (por ejemplo usando un ácido tal como ácido clorhídrico en dioxano o ácido trifluoroacético en diclorometano), o reductivamente (por ejemplo hidrogenólisis de un grupo bencilo o benciloxicarbonilo o mediante la eliminación reductiva de un grupo 2',2',2'-tricloroetoxicarbonilo usando zinc en ácido acético) según convenga. Otros grupos protectores de amina adecuados incluyen trifluoroacetilo (-COCF₃) que se puede eliminar mediante hidrólisis catalizada por bases.

Se apreciará que en cualquiera de las vías descritas anteriormente, se puede variar el orden preciso de las etapas sintéticas mediante el que se introducen los distintos grupos y restos en la molécula. Estará dentro de la experiencia del facultativo en la técnica asegurar que los grupos o restos introducidos en una etapa del procedimiento no estén afectados por las transformaciones y reacciones siguientes y por consiguiente seleccionar el orden de las etapas sintéticas.

El compuesto de fórmula (I) y las sales del mismo son inhibidores de bromodominio y por consiguiente se cree que tienen una utilidad potencial en el tratamiento de las enfermedades o afecciones para las que se indica un bromodominio.

La presente invención por consiguiente proporciona sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4*S*)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4*H*-[1,2,4]triazolo-[4,3-*a*][1,4]-benzodiazepin-4-*il*]-*N*-etilacetamida para su uso en terapia. El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia. El compuesto de fórmula (I) o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las que se indique un inhibidor de bromodominio.

Se divulga un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de las enfermedades o afecciones para las que se indique un bromodominio. También se divulga un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una afección autoinmune y/o inflamatoria crónica. También se divulga un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer tal como carcinoma de línea media.

Se divulga el uso de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones para las que se indique un inhibidor de bromodominio. En otra realización, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección autoinmune y/o inflamatoria crónica. También se divulga el uso de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, tal como carcinoma de línea media.

Se divulga un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o afección, para lo que está indicado un inhibidor de bromodominio, en un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se divulga además un procedimiento para el tratamiento de una afección autoinmune y/o inflamatoria crónica en un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se divulga adicionalmente un procedimiento para el tratamiento de cáncer, tal como carcinoma de línea media, en un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización el sujeto que lo necesita es un mamífero, en particular un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se esté buscando, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, comparándose con un sujeto correspondiente que no haya recibido esa cantidad, da como resultado un tratamiento, curación, prevención, o mitigación mejorada de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o de un trastorno. El término también incluye dentro de su ámbito cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

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

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones autoinmunes e inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, soriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis

- 5 ulcerosa), asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, neumonitis, miocarditis, pericarditis, miositis, eczema, dermatitis, alopecia, vitiligo, enfermedades vesiculares de la piel, nefritis, vasculitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, depresión, retinitis, uveítis, escleritis, hepatitis, pancreatitis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad de Addison, hipofisitis, tiroiditis, diabetes tipo I y rechazo agudo de órganos trasplantados.
- 10 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones inflamatorias agudas, tales como gota aguda, arteritis de células gigantes, nefritis, incluyendo nefritis por lupus, vasculitis con implicación de órganos tal como glomerulonefritis, vasculitis, incluyendo arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu y rechazo agudo de órganos trasplantados.
- 15 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que impliquen 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 orgánica múltiple, síndrome de choque tóxico, lesión pulmonar aguda, ARDS (síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos), insuficiencia renal aguda, hepatitis fulminante, quemaduras, pancreatitis aguda, síndromes post-quirúrgicos, sarcoidosis, reacciones de Herxheimer, encefalitis, mielitis, meningitis, malaria, infecciones virales asociadas con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), tales como gripe, herpes zóster, herpes simple y coronavirus.
- 20 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de afecciones asociadas a lesión de reperfusión por isquemia tal como infarto de miocardio, isquemia cerebrovascular (apoplejía), síndromes coronarios agudos, lesión de reperfusión renal, trasplante de órganos, trasplante de derivación de las arterias coronarias, procedimientos de derivación cardiopulmonar y embolia pulmonar, renal, hepática, gastrointestinal, o de las extremidades periféricas.
- 25 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del metabolismo de lípidos por medio de la regulación de APO-A1, tal 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, contracción post-operatoria, formación queloide, esclerodermia y fibrosis cardíaca.
- 30 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención y el tratamiento de infecciones virales tales como virus del herpes, virus del papiloma humano, adenovirus, virus de la viruela y otros virus de ADN.
- Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer, incluyendo carcinomas hematológicos (tales como leucemia), epiteliales, incluyendo de pulmón, de mama y de colon, carcinomas de línea media, tumores mesenquimales, hepáticos, renales y neurológicos.
- 35 Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de las indicaciones oftalmológicas, tales como ojo seco.
- 40 En una realización, la enfermedad o afección para la que se indique un inhibidor de bromodominio se selecciona a partir de enfermedades asociadas al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tales como sepsis, quemaduras, pancreatitis, traumatismo grave, hemorragia e isquemia. En esta realización, el inhibidor de bromodominio se administraría en el punto de diagnóstico para reducir la incidencia de: SRIS, el comienzo de choque, síndrome de disfunción orgánica múltiple, que incluye el comienzo de lesión pulmonar aguda, SDRA, lesión renal aguda, hepática, cardíaca y gastrointestinal y mortalidad. En otra realización el inhibidor de bromodominio se administraría antes de cirugía o de otros procedimientos asociados a un alto riesgo de sepsis, hemorragia, daño extenso del tejido, SRIS, o SDMO. En una realización particular, la enfermedad o afección para la que se indica un inhibidor de bromodominio es sepsis, síndrome de sepsis, choque séptico y/o endotoxemia. En otra realización, el inhibidor de bromodominio se indica para el tratamiento de pancreatitis aguda o crónica. En otra realización el bromodominio se indica para el tratamiento de quemaduras.
- 45 En una realización la enfermedad o afección para la que se indica un inhibidor de bromodominio se selecciona a partir de infecciones y reactivaciones de herpes simple, llagas frías, infecciones y reactivaciones de herpes zóster, varicela, sarampión, virus del papiloma humano, neoplasia cervical, infecciones por adenovirus, incluyendo enfermedad respiratoria aguda e infecciones por poxvirus tales como viruela vacuna y viruela y virus de la peste porcina africana. En una realización particular se indica un inhibidor de bromodominio para el tratamiento de infecciones de la piel o del epitelio cervical por el virus del papiloma humano.
- 50 La expresión “enfermedades o afecciones para las que se indica un inhibidor de bromodominio”, pretende incluir cualquiera de o todos los estados de enfermedad anteriores.

Aunque es posible que para su uso en terapia un compuesto de fórmula (I) así como las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se puedan administrar como el producto químico sin procesar, es común presentar el ingrediente activo en forma de una composición farmacéutica.

5 La presente invención por consiguiente proporciona, en un aspecto adicional una composición farmacéutica que comprende una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Por consiguiente se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de las enfermedades o afecciones en la que se indica un inhibidor de bromodominio que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 El/los vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) usado(s) en estas composiciones farmacéuticas debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial(es) 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, incluyendo mezclar un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser para su uso en el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento.

20 Debido a que se pretende que el compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, se usen en composiciones farmacéuticas se entenderá fácilmente que cada uno se proporciona de preferencia en una forma sustancialmente pura, por ejemplo, al menos el 60 % pura, de una manera más adecuada al menos el 75 % pura y de preferencia al menos el 85 % pura, en especial al menos el 98 % pura (% sobre una base de peso por peso).

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contengan una cantidad predeterminada del ingrediente activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Tales dosis unitarias por consiguiente se pueden administrar más de una vez al día. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria (para administración más de una vez al día), como se menciona anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo.

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo por la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, inhalada, intranasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, relacionando el ingrediente activo con el/los vehículo(s) o excipiente(s).

35 En una realización la composición farmacéutica está adaptada para administración oral.

En una realización la composición farmacéutica está adaptada para administración parenteral, en particular para administración intravenosa.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, que vuelven la composición isotónica con la sangre del receptor pensado; 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 unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiera solamente de la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usarse. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral se pueden presentar como unidades separadas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o batidos; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

50 Por ejemplo, para administración oral en la forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable, oral tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos adecuados para incorporarse en comprimidos o cápsulas se pueden preparar reduciendo el compuesto hasta un tamaño fino adecuado (por ejemplo, mediante micronización) y mezclando con un vehículo farmacéutico similarmente preparado, tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol.
55 También puede estar presente un agente aromatizante, conservante, dispersante y colorante.

Las cápsulas se pueden hacer mediante la preparación de una mezcla en polvo, como se describe anteriormente y rellenando las cubiertas de gelatina formadas. Se pueden agregar deslizantes y lubricantes, tales como sílice

coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, o polietilenglicol sólido a la mezcla en polvo antes de la operación de rellenado. También se puede agregar un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiera la cápsula.

5 Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, deslizantes, lubricantes, agentes edulcorantes, aromatizantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, goma de tragacanto o alginato de sodio, carboxi-metil-celulosa, 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 disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metil-celulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, mediante la preparación de una mezcla en polvo, granulación o apelmazamiento, adición de un lubricante y disgregante y compresión en comprimidos. Una mezcla en polvo se prepara mediante la mezcla del compuesto, adecuadamente desmenuzado, con un diluyente o con una base como se describe anteriormente y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboxi-metil-celulosa, un alginato, gelatina, o polivinil-pirrolidona, un retardante de solución, 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 en polvo se puede granular mediante humectación con un aglutinante, tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de goma arábica o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzando a través de un tamiz. Como una alternativa a la granulación, la mezcla en polvo se puede pasar a través de la máquina formadora de comprimidos y el resultado es el de bloques imperfectamente formados que se rompen en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar la adherencia a los troqueles formadores de comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco, o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime después en comprimidos. Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar con un vehículo inerte de flujo libre y se comprimen en comprimidos directamente sin pasar a través de las etapas de granulación o apelmazamiento. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento sellador de goma laca, un recubrimiento de azúcar o de material polimérico y un recubrimiento pulido de cera. Se pueden agregar tinciones a estos recubrimientos para distinguir unidades de dosificación diferentes.

Los fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en una forma unitaria de dosificación de tal manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los siropes se pueden preparar mediante la disolución del compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se preparan a través del uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular mediante la dispersión del compuesto en un vehículo no tóxico. También se pueden agregar solubilizantes y emulgentes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de sorbitol de polioxietileno, conservantes, aditivos de aroma, tales como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.

Cuando sea apropiado, las composiciones de unidades de dosificación para administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación como por ejemplo mediante el recubrimiento o la incrustación del material en partículas en polímeros, cera o similares.

Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden administrar en la forma de sistemas de distribución de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidil-colinas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

Para los tratamientos de los ojos o de otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones de preferencia se aplican en forma de una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo se puede emplear bien con una base para pomada parafínica o bien con una base para pomada miscible en agua. De una manera alternativa, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base para crema de aceite en agua o en una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica a los ojos incluyen gotas para los ojos en las que el ingrediente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, en especial en un disolvente acuoso.

Las formas de dosificación para administración nasal o inhalada se pueden formular de una manera conveniente en forma de aerosoles, soluciones, suspensiones, geles, o polvos secos.

Para las composiciones adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, se prefiere que el compuesto de fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo esté en una forma de tamaño de partículas reducido por ejemplo que se obtenga mediante micronización. El compuesto o la sal del tamaño de partículas preferible de

tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) se define por un valor D_{50} de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, como se mide usando difracción de láser).

Las formulaciones en aerosol, por ejemplo para administración inhalada, pueden comprender una solución o una suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol se pueden presentar en cantidades individuales o en multidosis en forma estéril en un recipiente sellado, que puede tomar la forma de un cartucho o recarga para su uso con un dispositivo atomizador o inhalador. De una manera alternativa el recipiente sellado puede ser un dispositivo dosificador unitario tal como un inhalador nasal de una sola dosis o un dosificador de aerosol equipado con una válvula medidora (inhalador de dosis medida) que está pensado para su desecho una vez que se haya agotado el contenido del recipiente.

Cuando la forma de dosificación comprende un dosificador de aerosol, de preferencia contiene un propelente adecuado a presión, tal como aire comprimido, dióxido de carbono, o un propelente orgánico, tal como un hidrofluorocarbono (HFC). Los propelentes de HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas de dosificación en aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bombeo. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir de la incorporación de excipientes adicionales por ejemplo, co-disolventes y/o tensoactivos para mejorar las características de dispersión y la homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones en solución también pueden requerir de la adición de co-disolventes, tales como etanol.

Para las composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, la composición farmacéutica puede ser una composición inhalable en polvo seco. Una composición tal puede comprender una base en polvo, tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol, o almidón, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (de preferencia en una forma de tamaño de partículas reducido, por ejemplo, en forma micronizada) y opcionalmente un modificador de la actuación, tal como L-leucina u otro aminoácido, y/o sales de metales del ácido esteárico, tales como estearato de magnesio o de calcio. De preferencia, la composición inhalable en polvo seco comprende una mezcla en polvo seco de lactosa, por ejemplo monohidrato de lactosa y el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tales composiciones se pueden administrar al paciente usando un dispositivo adecuado tal como el dispositivo DISKUS®, comercializado por GlaxoSmithKline, que por ejemplo se describe en el documento GB 2242134 A.

El compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden formular como una formulación fluida para administración desde un dispensador de fluido, por ejemplo un dosificador de fluido que tenga una boquilla de dispensación o un orificio de dispensación a través del que se dispense una dosis medida de la formulación fluida tras la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bombeo del dispensador de fluido. Tales dispensadores de fluido están provistos en general con un depósito de múltiples dosis medidas de formulación fluida, dispensándose las dosis con accionamientos de bombeo en secuencia. La boquilla o el orificio de dispensación se pueden configurar para inserción en las fosas nasales del usuario para la dispensación por pulverización de la formulación fluida dentro de la cavidad nasal. Un dispensador de fluido del tipo anteriormente mencionado se describe y se ilustra en el documento WO2005/044354 A1.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo dependerá de un número de factores incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del animal, la afección precisa que requiera del tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración y finalmente será a criterio del médico o veterinario que atienda. En la composición farmacéutica, cada unidad de dosificación para administración oral o parenteral de preferencia contiene de 0,01 a 3.000 mg, más preferiblemente de 0,5 a 1.000 mg, de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo calculado como la base libre. Cada unidad de dosificación para administración nasal o inhalada de preferencia contiene de 0,001 a 50 mg, más preferiblemente de 0,01 a 5 mg, de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como la base libre.

El compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden administrar en una dosis diaria (para un paciente adulto) de, por ejemplo, una dosis oral o parenteral de 0,01 mg a 3.000 mg al día, o de 0,5 a 1.000 mg al día, o una dosis nasal o inhalada de 0,001 a 50 mg al día, o de 0,01 a 5 mg al día, del compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como la base libre. Esta cantidad se puede dar en una sola dosis al día o más normalmente en un número (tal como dos, tres, cuatro, cinco, o seis) de subdosis al día de tal manera que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad eficaz de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede determinar como una proporción de la cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) por sí mismo.

Por consiguiente se divulga una composición farmacéutica, que comprende: (a) de 0,01 a 3.000 mg de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) de 0,1 a 2 g de uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden emplear solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención por consiguiente comprenden la administración de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo y el uso de al menos otro agente farmacéuticamente activo. De preferencia, las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos otro agente farmacéuticamente activo. El compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo y el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s), se pueden administrar juntos en una sola composición farmacéutica o por separado y cuando se administran por separado esto puede ocurrir de una manera simultánea o en secuencia en cualquier orden. Las cantidades del compuesto de fórmula (I) y de las sales farmacéuticamente aceptables del mismo y de el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) y los tiempos relativos de administración se seleccionarán con el objeto de lograr el efecto terapéutico combinado deseado. Por consiguiente hay divulgada una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente distinto farmacéuticamente activo. También se divulga un producto de combinación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con uno o más agentes terapéuticamente activos diferentes.

Por consiguiente también se divulga que el compuesto de fórmula (I) y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar en combinación con o pueden incluir uno o más agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, seleccionados a partir de antibióticos, anti-virales, glucocorticosteroides, antagonistas muscarínicos y agonistas de beta-2.

Se apreciará que cuando el compuesto de fórmula (I) y la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran en combinación con otros agentes terapéuticos normalmente administrados por la vía inhalada, intravenosa, oral o intranasal, la composición farmacéutica resultante se puede administrar por las mismas vías. De una manera alternativa, los componentes individuales de la composición se pueden administrar por diferentes vías.

También se divulgan combinaciones que comprenden uno o dos agentes terapéuticos diferentes.

Será evidente para una persona experta en la técnica que, donde sea apropiado, el/los otro(s) ingrediente(s) terapéutico(s) se puede(n) usar en forma de sales, por ejemplo como sales de metales alcalinos o de aminas, o como sales de adición de ácidos, o profármacos, o como ésteres, por ejemplo ésteres de alquilo inferiores, o como solvatos, por ejemplo, hidratos, para optimizar la actividad y/o estabilidad y/o características físicas, tales como la solubilidad, del ingrediente terapéutico. También será evidente que, donde sea apropiado, los ingredientes terapéuticos se pueden usar en forma ópticamente pura.

Las combinaciones referidas anteriormente se pueden presentar de una manera conveniente para su uso en la forma de una composición farmacéutica y por consiguiente las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación según se define anteriormente junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable se divulgan también.

El compuesto de fórmula (I) se puede preparar mediante los procedimientos descritos más adelante o mediante procedimientos similares.

35 **Detalles experimentales generales**

Todas las temperaturas referidas están en °C.

Abreviaturas

TLC	- cromatografía en capa fina
AcOH	- ácido acético
AcCl	- cloruro de acetilo
PPTS	- <i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
DCM	- diclorometano
1,2-DCE	- 1,2-dicloroetano
DIC	- di-isopropilcarbodiimida
DIEA	- <i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	- <i>N,N</i> -dimetil-formamida
DMAP	- 4-dimetilaminopiridina
Fmoc	- 9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetil)oxi]carbonilo

HATU	- hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBTU	- hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
Et ₂ O	- dietiléter
EtOAc	- acetato de etilo
i-PR ² O	- diisopropiléter
Config.	- configuración absoluta
Reactivo de Lawesson	- reactivo 2,4-bis-(4-metoxifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetan-2,4-disulfuro
MeCN	- acetonitrilo
MeOH	- metanol
Rt	- tiempo de retención
THF	- tetrahidrofurano
RT	- temperatura ambiente
Pd/C	- paladio sobre carbón

CL/EM se refiere a los análisis mediante HPLC analítica que se condujeron en dos tipos de aparatos:

- 5 a) Sobre una columna Supelcosil LCABZ+PLUS (3 µm, 3,3 cm x 4,6 mm de DI) eluyendo con HCO₂H al 0,1 % y acetato de amonio 0,01 M en agua (disolvente A) y acetonitrilo al 95 % y HCO₂H al 0,05 % en agua (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: de 0 a 0,7 minutos con el 0 % de B, de 0,7 a 4,2 minutos con 0 → 100 % de B, de 4,2 a 5,3 minutos con el 100 % de B, de 5,3 a 5,5 minutos con 100 → 0 % de B, a un caudal de 3 ml/minuto. Los espectros de masas (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Fisons VG Platform, usando los modos de ionización positiva por electropulverización [(ES+ve para dar los iones moleculares [M+H]⁺ y [M+NH₄]⁺) o ionización negativa por electropulverización [(ES-ve para dar el ion molecular [M-H]⁻). Los datos analíticos a partir de este aparato se dan con el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻.
- 10 b) Sobre una columna Cromolith Performance RP 18 (100 x 4,6 mm de DI) eluyendo con acetato de amonio 0,01 M en agua (disolvente A) y acetonitrilo al 100 % (disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: de 0 a 4 minutos con 0 → 100 % de B, de 4 a 5 minutos con el 100 % de B a un caudal de 5 ml/minuto. Los espectros de masas (EM) se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Platform-LC usando los modos de ionización positiva química a presión atmosférica [AP+ve para dar los iones moleculares MH⁺] o ionización negativa química a presión atmosférica [AP-ve para dar los iones moleculares (M-H)]. Los datos analíticos a partir de este aparato se dan con el siguiente formato: [M+H]⁺ o [M-H]⁻ precedido por el acrónimo APCI para especificar entre ambas fuentes de análisis de espectrometría de masas.

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

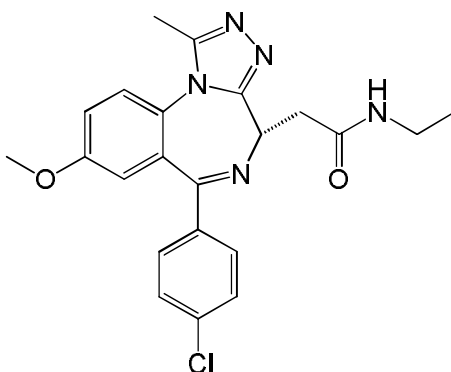
25 HPLC de auto-preparación dirigida a la masa se refiere al procedimiento en el que el material se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento sobre una columna HPLCABZ+ de 5 µm (5 cm x 10 mm de DI) con HCO₂H al 0,1 % en agua y MeCN al 95 %, agua al 5 % (HCO₂H al 0,5 %) usando las siguientes condiciones de elución en gradiente: de 0 a 1,0 minutos con el 5 % de B, de 1,0 a 8,0 minutos con 5 → 30 % de B, de 8,0 a 8,9 minutos con el 30 % de B, de 8,9 a 9,0 minutos con 30 → 95 % de B, de 9,0 a 9,9 minutos con el 95 % de B, de 9,9 a 10 minutos

con 95 → 0 % de B, a un caudal de 8 ml/minuto. El colector de fracciones Gilson 202 se disparó mediante un espectrómetro de masas VG Platform al detectar la masa de interés.

5 RMN de protones Los espectros de (RMN de ^1H) se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance 300 DPX usando un disolvente como el patrón interno y los cambios químicos de protones se expresan en ppm en el disolvente indicado. Las siguientes abreviaturas se usan para la multiplicidad de señales de RMN: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuadruplete, dd = doble doblete, m = multiplete.

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

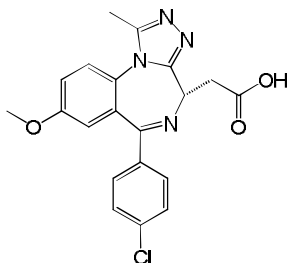
10 **Ejemplo 1: 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]-N-etil-acetamida**



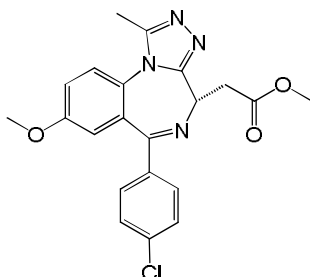
15 A una solución del ácido [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acético (para una preparación véase el Intermedio 1) (16,0 g, 40 mmol) en tetrahidrofurano a temperatura ambiente, se le agregó DIEA (14 ml, 80 mmol), seguida por HATU (30,4 g, 80 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a esta temperatura y se agregó etil-amina (40 ml, 2M en tetrahidrofurano, 80 mmol). La mezcla se agitó durante 48 horas antes de concentrarse a presión reducida. El material en bruto se suspendió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El sólido en bruto se purificó mediante cromatografía sobre SiO_2 (DCM/MeOH, 95/5) y el sólido resultante se recrystalizó en MeCN. El sólido se disolvió después en DCM y se precipitó con *i*- Pr_2O , para dar el compuesto del título (8 g, 47 % de rendimiento) en forma de un sólido blanco.

20 $R_f = 0,48$ (DCM/MeOH : 90/10). p.f. >140 °C (llega a hacerse gomoso). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,53-7,47 (m, 2H), 7,39 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 2H), 7,20 (dd, $J = 2,9$ y 8,9 Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 6,40 (m, 1H), 4,62 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,51 (dd, $J = 7,3$ y 14,1 Hz, 1H), 3,46-3,21 (m, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,19 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). CL/EM: m/z 424 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$, Rt 2,33 minutos.

25 **Intermedio 1: ácido [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acético**

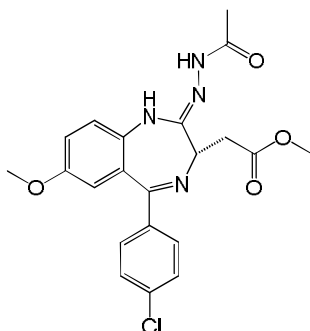


30 A una solución del [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetato de metilo (para una preparación véase el Intermedio 2) (28 g, 68 mmol) en THF (450 ml) a temperatura ambiente se le agregó NaOH 1N (136 ml, 136 mmol). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 5 horas antes de enfriarse y de interrumpirse con HCl 1N (136 ml). El THF se eliminó a presión reducida y la fase acuosa se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El sólido en bruto se recrystalizó en CH_3CN , para dar el compuesto del título (23,9 g, 89 % de rendimiento) en forma de un polvo amarillo pálido. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,55-7,48 (m, 2H), 7,41 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,38-7,31 (m, 2H), 7,22 (dd, $J = 2,9$ y 8,9 Hz, 1H), 6,90 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,59 (dd, $J = 6,9$ y 6,9 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,70 (dd, $J = 6,9$ y 25,7 Hz, 1H), 3,61 (dd, $J = 6,9$ y 25,7 Hz, 1H), 2,63 (s, 3H). CL/EM: m/z 397 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$, Rt 2,11 minutos.

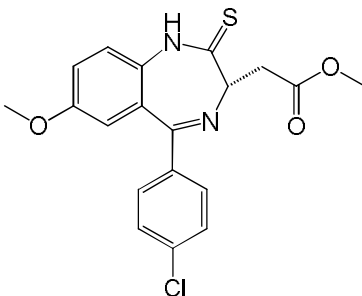
Intermedio 2: [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]acetato de metilo

5 A [(3S)-2-[(1Z)-2-acetilhidrazino]-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-3H-1,4-benzodiazepin-3-il]-acetato de metilo en bruto (para una preparación véase el Intermedio 3) (34 g, 79 mmol) se le suspendió en tetrahidrofurano (200 ml) y se agregó AcOH (200 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante la noche antes de concentrarse a sequedad. El residuo se suspendió en NaHCO₃ saturado y se extrajo con DCM. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El sólido en bruto se purificó mediante
10 cromatografía sobre SiO₂ (DCM/MeOH : 90/10), para dar el compuesto del título (28 g, 86 % de rendimiento) en forma de un polvo amarillo.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,54-7,47 (m, 2H), 7,40 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 2H), 7,22 (dd, J = 2,8 y 8,8 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 4,61 (dd, J = 6,4 y 7,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,66 (dd, J = 7,8 y 16,9 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 6,4 y 16,9 Hz, 1H), 2,62 (s, 3H). CL/EM m/z 411 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,88 minutos.

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

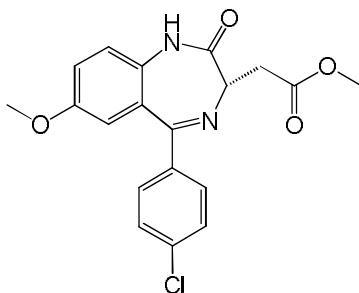
A una suspensión del [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]-acetato de metilo (para una preparación véase el Intermedio 4) (30,2 g, 77,7 mmol) en THF (800 ml) a 0 °C se le agregó monohidrato de hidrazina (11,3 ml, 233 mmol) por goteo. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas entre 0 °C y 15 °C antes de enfriarse a 0 °C. Después se agregó lentamente Et₃N (32,4 ml, 230 mmol) y se agregó por goteo AcCl (16,3 ml, 230 mmol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora después se interrumpió con agua y se concentró a presión reducida. La fase acuosa resultante se extrajo después con DCM y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar el compuesto del título en bruto (34 g, 100 % de rendimiento) que se utilizó sin purificación adicional. CL/EM: m/z 429 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,83 minutos.

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

Una suspensión de P₄S₁₀ (85,8 g, 190 mmol) y Na₂CO₃ (20,5 g, 190 mmol) en 1,2-DCE (1,5 l) a temperatura ambiente, se agitó durante 1 hora antes de agregar [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]-acetato de metilo (para una preparación véase el Intermedio 5) (40 g, 107 mmol). La mezcla

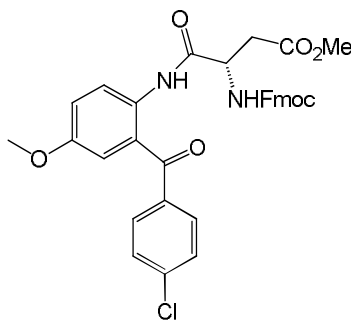
resultante se agitó a 65°C durante 4 horas antes de enfriarse y se filtró. El sólido se lavó con DCM y el filtrado se lavó con NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El compuesto del título se precipitó a partir de una mezcla de DCM/*i*-PR²O y se filtró. El filtrado se concentró después y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH : 98/2), para proporcionar otro lote del producto. Se obtuvo el compuesto del título combinando las dos fracciones (30,2 g, 73 %) en forma de un polvo amarillo. CL/EM: m/z 389 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 3,29 minutos.

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



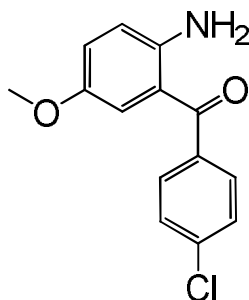
A una solución del N¹-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)-fenil]-N²-[[[(9H-fluoren-9-il-metil)-oxi]-carbonil]-L-α-asparaginato de metilo en bruto (para una preparación véase el Intermedio 6) (asumido 0,2 mol) en DCM (500 ml), se le agregó Et₃N (500 ml, 3,65 mol) y la mezcla resultante se sometió a reflujo durante 24 horas antes de concentrarse. La amina en bruto resultante se disolvió en 1,2-DCE (1,5 l) y se agregó cuidadosamente AcOH (104 ml, 1,8 mol). La mezcla de reacción después se agitó a 60 °C durante 2 horas antes de concentrarse al vacío y se disolvió en DCM. La fase orgánica se lavó con HCl 1N y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El sólido en bruto se recristalizó en MeCN conduciendo al compuesto del título (51 g) en forma de un sólido amarillo pálido. El filtrado se pudo concentrar y recristalizar en MeCN para dar otros 10 g del Intermedio 9 (total: 61 g, 69 % de rendimiento basándose en el Intermedio 12 recuperado). R_f = 0,34 (DCM/MeOH : 95/5). CL/EM m/z 373 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,76 minutos.

Intermedio 6: N¹-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)-fenil]-N²-[[[(9H-fluoren-9-il-metil)oxi]carbonil]-L-α-asparaginato de metilo



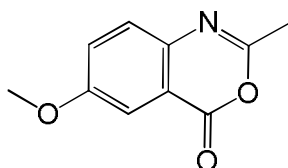
Una mezcla del N-[[[(9H-fluoren-9-il-metil)-oxi]-carbonil]-L-α-aspartil-cloruro de metilo (preparado a partir de *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3068-3074 y *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2001, 1673-1695) (221 g, 0,57 mol) y [2-amino-5-(metiloxi)-fenil](4-clorofenil)-metanona (para una preparación véase el Intermedio 7) (133 g, 0,5 mol) en CHCl₃ (410 ml), se agitó a 60°C durante 1,5 horas antes de enfriarse y de concentrarse a presión reducida y se utilizó sin purificación adicional. CL/EM: m/z 613 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt = 3,89 minutos.

Intermedio 7: [2-amino-5-(metiloxi)-fenil](4-clorofenil)metanona



A una solución de la 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona (para una preparación véase el Intermedio 8) (40,0 g, 0,21 mol) en una mezcla de tolueno (560 ml)/éter (200 ml) a 0°C, se le agregó por goteo una solución de bromuro de 4-clorofenilmagnesio (170 ml, 1M en Et₂O, 0,17 mol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora antes de interrumpirse con HCl 1N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto en bruto se disolvió después en EtOH (400 ml) y se agregó HCl 6 N (160 ml). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas antes de concentrarse a presión reducida. El sólido resultante se filtró y se lavó dos veces con éter antes de suspenderse en EtOAc y se neutralizó con NaOH 1N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (39 g, 88 % de rendimiento) que se utilizó sin purificación adicional.

Intermedio 8: 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona



Una solución del ácido 5-metoxi-antranílico (7,8 g, 46,5 mmol) se sometió a reflujo en anhídrido acético (60 ml) durante 2 horas y 15 minutos, antes de enfriarse y de concentrarse a presión reducida. El residuo en bruto se concentró después dos veces en presencia de tolueno antes de filtrarse y se lavó con éter para proporcionar al compuesto del título (6,8 g, 77 % de rendimiento) en forma de un sólido color beige; CL/EM: m/z 192 [M+H]⁺, Rt 1,69 minutos.

20 Preparación del compuesto de referencia para su uso en ensayos biológicos

Los detalles experimentales de los procedimientos de CL-EM A y B, como se refieren en el presente documento, son como sigue:

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

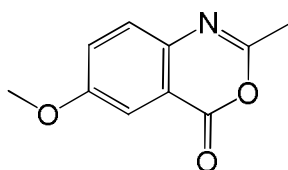
La CL/EM (Procedimiento B) se llevó a cabo sobre una columna Sunfire C18 (30 mm x 4,6 mm de DI 3,5 µm de diámetro de empaque) a 30 °C, eluyendo con una solución al 0,1 % en volumen/volumen de ácido trifluoroacético en agua (Disolvente A) y una solución al 0,1 % en volumen/volumen de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (Disolvente B), usando el siguiente gradiente de elución: de 0 a 0,1 minutos con el 3 % de B, de 0,1 a 4,2 minutos con el 3 al 100 % de B, de 4,2 a 4,8 minutos con el 100 % de B, de 4,8 a 4,9 minutos con el 100 al 3 % de B, de 4,9 a 5,0 minutos con el 3 % de B a un caudal de 3 ml/min. La detección UV fue una señal promediada a partir de una longitud de onda de 210 nm a 350 nm y los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas usando ionización positiva por electropulverización. Los datos de ionización se redondearon hasta el entero más cercano.

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

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

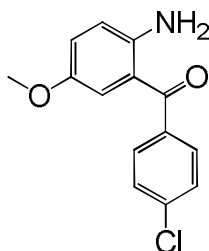
Las técnicas de cromatografía en sílice incluyen bien las técnicas automatizadas (Flashmaster o Biotage SP4) o bien la cromatografía manual sobre cartuchos previamente empacados (SPE) o bien columnas ultrarrápidas manualmente empacadas.

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



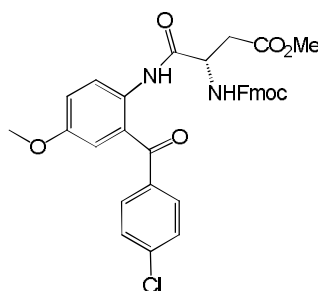
Una solución del ácido 5-metoxiantranílico (Lancaster) (41,8 g, 0,25 mol) se sometió a reflujo en anhídrido acético (230 ml) durante 3,5 horas antes de concentrarse a presión reducida. El compuesto en bruto se concentró después dos veces en presencia de tolueno antes de filtrarse y se lavó dos veces con éter, para proporcionar al compuesto del título (33,7 g, 71 % de rendimiento) en forma de un sólido color café; CL/EM (Procedimiento A): m/z 192 [M+H]⁺, Rt 1,69 minutos.

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



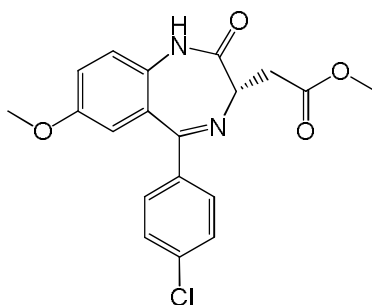
A una solución de la 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona (para una preparación véase el compuesto de referencia A) (40,0 g, 0,21 mol) en una mezcla de tolueno/éter (2/1) (760 ml) a 0 °C, se le agregó por goteo una solución de bromuro de 4-clorofenil-magnesio (170 ml, 1M en Et₂O, 0,17 mol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora antes de interrumpirse con HCl 1N (200 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (150 ml, 3 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto en bruto se disolvió después en EtOH (400 ml) y se agregó HCl 6 N (160 ml). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas antes de concentrarse hasta una tercera parte del volumen. El sólido resultante se filtró y se lavó dos veces con éter antes de suspenderse en EtOAc y se neutralizó con NaOH 1N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (150 ml, 3 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (39 g, 88 % de rendimiento); CL/EM (Procedimiento A): m/z 262 [M+H]⁺, Rt 2,57 minutos.

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



El N-[[[(9H-fluoren-9-il-metil)-oxi]-carbonil]-L-α-aspartil-cloruro de metilo (*Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 13-18) (93 g, 0,24 mol) se disolvió en CHCl₃ (270 ml) y se agregó la [2-amino-5-(metiloxi)-fenil](4-clorofenil)-metanona (para una preparación véase el compuesto de referencia B) (53 g, 0,2 mol). La mezcla resultante se agitó a 60°C durante 1 hora antes de enfriarse y de concentrarse al 60 % del volumen. Se agregó éter a 0°C y el precipitado resultante se filtró y se desechó. El filtrado se concentró a presión reducida y se utilizó sin purificación adicional.

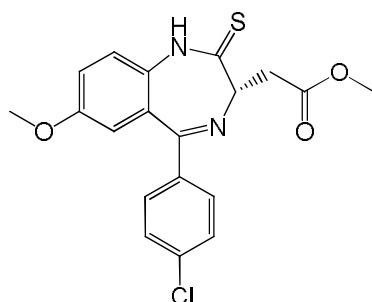
Compuesto de referencia D: [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo



5 A una solución del N1-[2-[(4-clorofenil)-carbonil]-4-(metiloxi)-fenil]-N2-[[9H-fluoren-9-il-metil]-oxi]-carbonil]-L-α-asparaginato de metilo (para una preparación véase el compuesto de referencia C) (asumido 0,2 mol) en DCM (500 ml) se le agregó Et₃N (500 ml, 3,65 mol) y la mezcla resultante se sometió a reflujo durante 24 horas antes de concentrarse. La amina en bruto resultante se disolvió en 1,2-DCE (1,5 l) y se agregó cuidadosamente AcOH (104 ml, 1,8 mol). La mezcla de reacción después se agitó a 60°C durante 2 horas antes de concentrarse al vacío y se disolvió en DCM. La fase orgánica se lavó con HCl 1N y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 veces). Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El sólido en bruto se recristalizó en MeCN conduciendo al compuesto del título (51 g) en forma de un sólido amarillo pálido. El filtrado se pudo concentrar y recristalizar en MeCN para dar otros 10 g del producto deseado; R_f = 0,34 (DCM/MeOH : 95/5).

HRMS (M+H)⁺ calculado para C₁₉H₁₈³⁵ClN₂O₄ 373,0955; encontrado 373,0957.

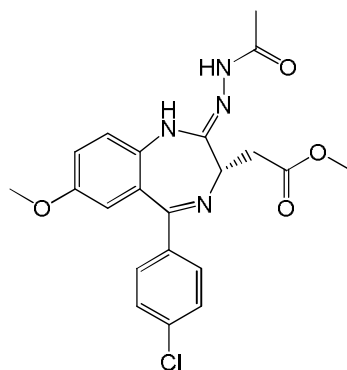
Compuesto de referencia E: [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo



15 Una suspensión de P₄S₁₀ (36,1 g, 81,1 mmol) y Na₂CO₃ (8,6 g, 81,1 mmol) en 1,2-DCE (700 ml) a temperatura ambiente se agitó durante 2 horas antes de agregarse el [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]-acetato de metilo (para una preparación véase el compuesto de referencia D) (16,8 g, 45,1 mmol). La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 2 horas antes de enfriarse y se filtró. El sólido se lavó dos veces con DCM y el filtrado se lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH : 99/1), para proporcionar el compuesto del título (17,2 g, 98 % de rendimiento) en forma de un sólido amarillento. CL/EM (Procedimiento A): m/z 389 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,64 minutos.

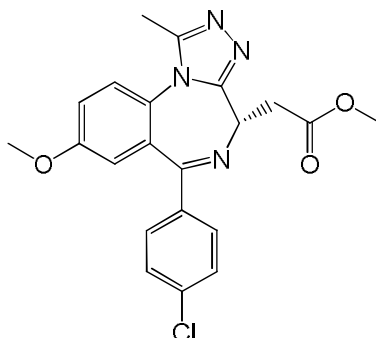
HRMS (M+H)⁺ calculado para C₁₉H₁₈³⁵ClN₂O₃S 389,0727; encontrado 389,0714.

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



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

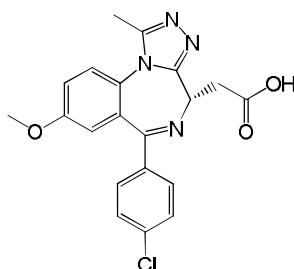
10 **Compuesto de referencia G:** [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]acetato de metilo



15 El [(3S)-2-[(1Z)-2-acetil-hidrazino]-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-3H-1,4-benzodiazepin-3-il]-acetato de metilo en bruto (para una preparación véase el compuesto de referencia F) (asumido 9,7 g) se suspendió en THF (100 ml) y se agregó AcOH (60 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 2 días antes de concentrarse 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 % en 3 pasos) en forma de un sólido blanquecino.

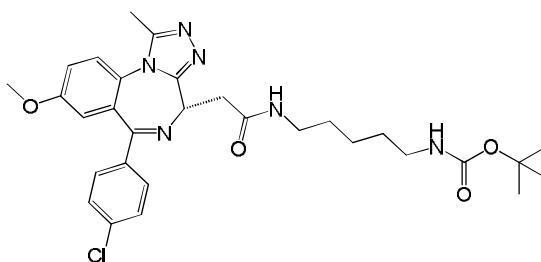
HRMS (M+H)⁺ calculado para C₂₁H₂₀ClN₄O₃ 411,1229; encontrado 411,1245.

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



20 A una solución del [(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 horas antes de interrumpirse con HCl 1N (36,2 ml) y se concentró al vacío. Después se agregó agua y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 veces) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, para dar el compuesto del título (7 g, 98 % de rendimiento) en forma de un sólido amarillo pálido.

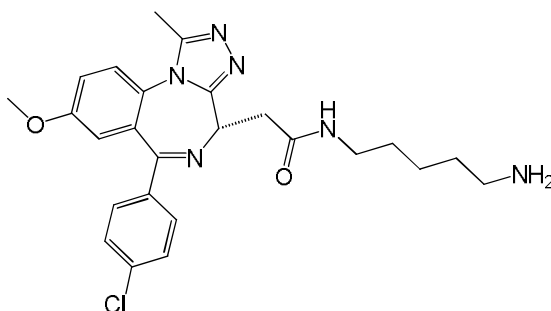
Compuesto de referencia I: [5-({[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-acetil}-amino)-pentil]-carbamato de 1,1-dimetiletilo



30

Una mezcla del ácido [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-acético (para una 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 agregó (4-amino-butil)-carbamato de 1,1-dimetil-etilo (1,05 ml, 5,0 mmol, disponible en Aldrich). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas antes de concentrarse. El residuo se recogió en diclorometano y se lavó con HCl 1N. La fase acuosa se extrajo con diclorometano dos veces. La fase orgánica se lavó con hidróxido de sodio 1N, seguido por una solución saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando diclorometano / metanol 95/5 para dar el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (1,2 g). CL/EM (Procedimiento A): $t_r = 3,04$ minutos.

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

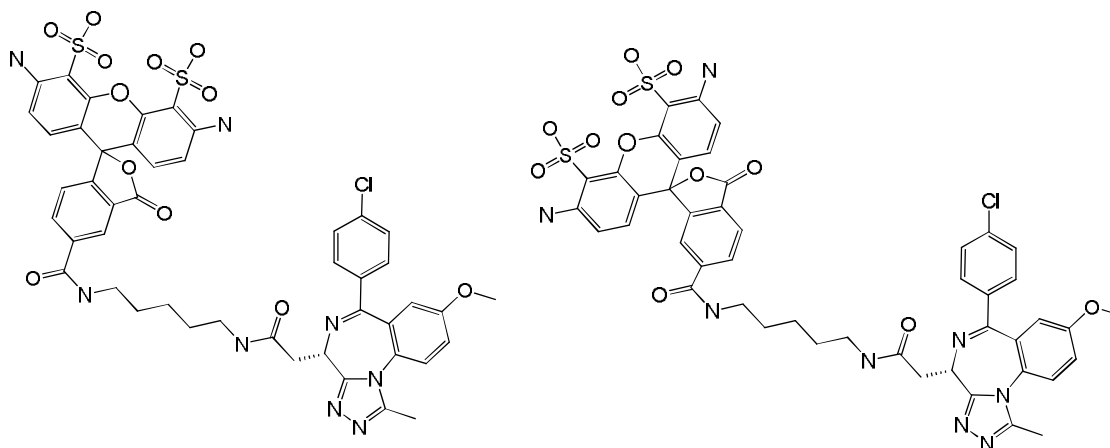


15 A una solución del [5-(((4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-acetil)-amino)-pentil]-carbamato de 1,1-dimetil-etilo (para una preparación véase el compuesto de referencia H) (0,2 g, 0,34 mmol) en diclorometano (3 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (0,053 ml, 0,68 mmol) por goteo a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas desde 0 °C hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite amarillo higroscópico (200 mg)

CL/EM (Procedimiento A): $t_r = 2,33$ minutos.

20 HRMS (M+H)⁺ calculado para C₂₅H₂₉ClN₆O₂ 481,2119; encontrado 481,2162.

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



25 El trifluoroacetato de N-(5-amino-pentil)-2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]acetamida (para una preparación véase el compuesto de referencia J) (7,65 mg, 0,013 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (DMF) (300 μ l) y se agregó a Alexa Fluor 488 succinimidil-éster de ácido carboxílico (5 mg, 7,77 μ mol, mezcla de isómeros 5 y 6, disponible en Invitrogen, producto número A-20100) en un tubo centrífugo Eppendorf. Se agregó base de Hunig (7,0 μ l, 0,040 mmol) y la mezcla se agitó en un aparato vórtex durante la noche. Después de 18 horas la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se volvió a disolver en DMSO/agua (50 %, <1 ml en total), se aplicó a una columna de preparación Phenomenex Jupiter C18 y se eluyó con un gradiente del 95 % de A : 5 % de B hasta el 100 % de B (A = ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua, B = ácido trifluoroacético al 0,1 % / 90 % de acetonitrilo / 10 % de 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 proporcionar el producto del título (2,8 mg) en forma de una mezcla de los 2 regioisómeros mostrados. CL/EM (Procedimiento B): MH+ = 999, rt = 1,88 minutos.

Procedimientos de prueba biológicos

5 Ensayo de enlace de anisotropía de fluorescencia

Se evaluó el enlace del compuesto de fórmula (I) con el Bromodominio 2, 3 y 4 usando un ensayo de enlace de anisotropía de fluorescencia.

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

Todos los datos se normalizaron al promedio de 16 pocillos de control altos y 16 pocillos de control bajos en cada placa. Después se aplicó un ajuste de curva de cuatro parámetros de la siguiente forma:

$$15 \quad y = a + ((b - a) / (1 + (10^x / 10^c)^d))$$

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

20 Los Bromodominios Humanos Recombinantes Bromodominio 2 (1-473), el Bromodominio 3 (1-435) y el Bromodominio 4 (1-477) se expresaron en células de *E.coli* (en el vector pET15b) con una marca de seis-His en el término N. El Bromodominio marcado con His se extrajo a partir de las células de *E.coli* usando 0,1 mg/ml de lisozima y sonicación. El Bromodominio después se purificó mediante cromatografía por afinidad sobre una columna HisTRAP HP, eluyendo con un gradiente lineal de imidazol de 10 a 500 mM, sobre 20 Cv. La purificación adicional se llevó a cabo mediante una columna de exclusión de tamaños de grado de preparación Superdex 200. La proteína purificada se almacenó a -80°C en HEPES 20 mM, pH de 7,5 y NaCl 100 mM.

25 Protocolo para el Bromodominio 2: todos los componentes se disolvieron en una composición de tampón de HEPES 50 mM pH de 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales del Bromodominio 2 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se agregaron 10 µl de esta mezcla de reacción usando un micro-multigoteo a pocillos que contenían 100 nl de diferentes concentraciones del compuesto de prueba o del vehículo DMSO (1 % final) en una placa de microtitulación de bajo volumen Greiner negra de 384 pocillos y se equilibraron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. La anisotropía de fluorescencia se leyó en un Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico -505 nm).

35 Protocolo para el Bromodominio 3: todos los componentes se disolvieron en una composición de tampón de HEPES 50 mM pH de 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales del Bromodominio 3 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se agregaron 10 µl de esta mezcla de reacción usando un micro-multigoteo a pocillos que contenían 100 nl de diferentes concentraciones del compuesto de prueba o del vehículo de DMSO (1 % final) en una placa de microtitulación de bajo volumen Greiner negra de 384 pocillos y se equilibraron en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. La anisotropía de fluorescencia se leyó en un Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico -505 nm).

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

45 El Ejemplo 1 tuvo una pCl₅₀ ≥ 6,0 en cada uno de los ensayos de BRD2, BRD3 y BRD4 descritos anteriormente.

Ensayo de sangre entera estimulada por LPS que mide los niveles de TNFα

50 La activación de las células monocíticas mediante los agonistas de los receptores tipo-Toll tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) da como resultado la producción de los mediadores inflamatorios clave incluyendo TNFα. Se considera ampliamente que tales rutas son centrales para la patofisiología de una variedad de trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Los compuestos a probar se diluyen para dar un intervalo de concentraciones apropiadas y se agrega 1 µl de las diluciones madre a una placa de 96 pocillos. Después de la adición de sangre entera (130 µl) las placas se incuban a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 30 minutos antes de la adición de 10 µl de 2,8 µg/ml de LPS, diluido en RPMI 1640 completo (concentración final = 200 ng/ml), para dar un volumen total de 140 µl por pocillo. Después de una

5 incubación adicional durante 24 horas a 37 °C, se agregan 140 ul de PBS a cada pocillo. Las placas se sellan, se agitan durante 10 minutos y después se centrifugan (2500 revoluciones por minuto x 10 minutos). Se retiran 100 ul del sobrenadante y se ensayan los niveles de TNF α mediante un inmunoensayo (típicamente mediante la tecnología MesoScale Discovery) bien inmediatamente o bien después del almacenamiento a -20°C. Las curvas de respuesta a la dosis para cada compuesto se generaron a partir de los datos y se calculó un valor CI₅₀.

Se descubrió que el Ejemplo 1 tiene una pCI₅₀ > 6,0 en el ensayo anterior.

Estos datos demuestran que el Ejemplo 1 probado en el ensayo anterior inhibió la producción del TNF α mediador inflamatorio clave. Esto sugiere que este compuesto tiene un perfil anti-inflamatorio fuerte, que tiene probabilidades de traducirse en un beneficio clínico en los trastornos inflamatorios.

10 **Modelo de endotoxemia de ratón *in vivo***

15 Las dosis altas de la Endotoxina (lipopolisacárido bacteriano) administrada a los animales producen un síndrome de choque profundo que incluye una fuerte respuesta inflamatoria, mala regulación de la función cardiovascular, fallo de órganos y por último mortalidad. Este patrón de respuesta es muy similar a la sepsis humana y al choque séptico, donde la respuesta del cuerpo a una infección bacteriana significativa puede ser de forma similar amenazante para la vida.

Para probar el compuesto de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo a los grupos de ocho ratones Balb/c machos se les dio una dosis letal de 15 mg/kg de LPS mediante inyección intraperitoneal. Noventa minutos más tarde, los animales se dosificaron intravenosamente con el vehículo (ciclodextrina al 20 %, etanol al 1 % en agua sin pirógeno) o el compuesto (10 mg/kg). La supervivencia de los animales se controló a los 4 días.

20 Números de animales sobrevivientes a los 4 días (sumados a través de múltiples experimentos repetidos):

Vehículo	4/66	(6 %)
Ejemplo 1	24/56	(52 %)

25 Estos datos demuestran que el Ejemplo 1 probado en el modelo anterior dio lugar a un efecto de supervivencia animal significativo después de la administración intravenosa. Esto sugiere que el compuesto de fórmula (I) tiene el potencial para un efecto profundo sobre las respuestas inflamatorias en los seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
3. Una sal de ácido bencensulfónico de 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo-[4,3-a][1,4]-benzodiazepin-4-il]-N-etilacetamida para su uso en terapia.