

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 801**

51 Int. Cl.:

C07D 401/10 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/EP2012/057978**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12718651 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2705032**

54 Título: **Derivados de dihidroquinolina como inhibidores de bromodominio**

30 Prioridad:

04.05.2011 GB 201107325

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

16.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AMANS, DOMINIQUE;
DEMONT, EMMANUEL, HUBERT;
JONES, KATHERINE, LOUISE;
SEAL, JONATHAN, THOMAS y
WALKER, ANN, LOUISE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 589 801 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 dihidroquinolina como inhibidores de bromodominio

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos y a su uso en terapia.

Antecedentes de la Invención

Los genomas de organismos eucariotas están altamente organizados dentro del núcleo de la célula. Las largas cadenas de ADN doble están enrolladas alrededor de un octómero de proteínas de histona (comprendiendo la mayoría generalmente dos copias de histonas H2A, H2B, H3 y H4) para formar un nucleosoma. A continuación, la unidad básica se comprime más mediante la agregación y pliegue de nucleosomas para formar una estructura de cromatina altamente condensada. Es posible una variedad de diferentes estados de condensación, y la estrechez de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo muy compacta durante el proceso de división celular. La estructura de la cromatina juega un papel crítico en la regulación de la transcripción del gen, la cual no puede ocurrir eficazmente a partir de cromatina altamente condensada. La estructura de la cromatina está controlada por una serie de modificaciones postraduccionales a proteínas de histona, particularmente histonas H3 y H4, y lo más comúnmente en las colas de histona que se extienden más allá de la estructura central del nucleosoma. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación, SUMOilación. Estas marcas epigenéticas son escritas y eliminadas por enzimas específicas, las cuales colocan las etiquetas sobre residuos específicos dentro de la cola de histona, formando de ese modo un código epigenético, el cual, a continuación, es interpretado por la célula para permitir la regulación específica del gen de la estructura de cromatina y de ese modo la transcripción.

La acetilación de histona muy normalmente está asociada con la activación de la transcripción del gen, ya que la modificación afloja la interacción del ADN y el octómero de histona al cambiar las características electrostáticas. Además de este cambio físico, las proteínas específicas se unen a residuos de lisina acetilada dentro de las histonas para leer el código epigenético. Los bromodominios son distintos dominios pequeños (~110 aminoácidos) dentro de las proteínas que se unen a residuos de lisina acetilada comúnmente pero no exclusivamente en el contexto de histonas. Hay una familia de alrededor 50 proteínas conocidas que contienen bromodominios, y tienen una variedad de funciones dentro de la célula.

La familia BET de bromodominio que contiene proteínas comprende 4 proteínas (BRD2, BRD3, BRD4 y BRD-t) que contienen bromodominios en tándem capaces de unirse a dos residuos de lisina acetilada en proximidad cercana, aumentando la especificidad de la interacción. Se ha informado que BR2 y BR3 se asocian con histonas a lo largo de genes activamente transcritos y pueden estar implicados en facilitar la elongación transcripcional (Leroy y col., *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 rendimiento transcripcional aumentado (Hargreaves y col., *Cell*, 2009 138(1):129-145). También se ha informado de que BRD4 y BRD3 se pueden fusionar con NUT (proteína nuclear en testículo) formando novedosos oncogenes de fusión, BRD4-NUT o BRD3-NUT, en una forma altamente maligna de neoplasia epitelial (French y col. *Cancer Research*, 2003, 63, 304-307 y French y col. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, 22(20), 4.135-4.139). Los datos sugieren que las proteínas de fusión BRD-NUT contribuyen a carcinogénesis (*Oncogene*, 2008, 27, 2.237-2.242). BRD-t únicamente se expresa en el testículo y ovario. Se ha informado que todos los miembros de la familia tienen alguna función en controlar o ejecutar aspectos del ciclo celular, y se ha demostrado que siguen en complejo con los cromosomas durante la división celular – sugiriendo un papel 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 hospedante, como parte del proceso de replicación vírica (You y col. *Cell*, 2004 117(3):349-60).

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

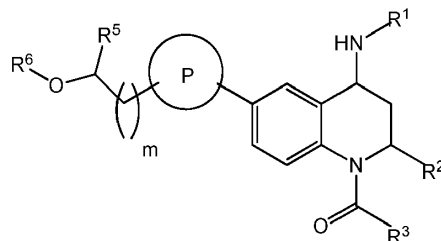
La solicitud de patente WO2009084693A1 describe una serie de derivados de tienotriazoldiazepieno que se dice que inhiben la unión entre una histona acetilada y un bromodominio que contiene proteína que se dice que son útiles como agentes anticáncer.

Las solicitudes de patente PCT/EP2010/06693 (publicada como WO2011054841) y PCT/EP2010/066701 (publicada como WO2011054848) ambas describen una serie de derivados de tetrahidroquinolina que inhiben la unión de los bromodominios de la familia BET con residuos de lisina acetilada.

Se ha encontrado una clase de compuestos que inhiben la unión de bromodominios con sus proteínas acetiladas afines, más particularmente una clase de compuestos que inhiben la unión de los bromodominios de la familia BET a residuos de lisina acetilada. Tales compuestos serán referidos a continuación como "inhibidores de bromodominio".

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 un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



(I)

- 5 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, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

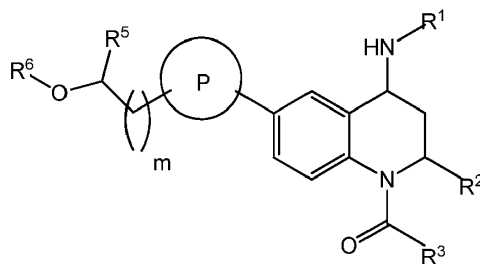
- 10 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia, en particular en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales se indica un inhibidor de bromodominio.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales se indica 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.

- 15 En un quinto 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 se indica un inhibidor de bromodominio.

Descripción detallada de la invención

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



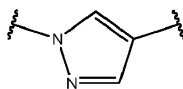
(I)

- 20 en la que

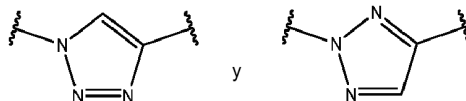
- 25 P es pirazolilo o triazolilo;
 R^1 es un grupo $C(O)OR^4$ en el que R^4 es alquilo C_{1-3} o cicloalquilo C_{3-7} ; o
 R^1 es un grupo seleccionado entre fenilo, piridilo, pirazinilo y pirimidinilo, estando dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados entre halógeno, alquilo C_{1-4} y CN;
 R^2 es alquilo C_{1-4} ;
 R^3 es alquilo C_{1-4} ;
 R^5 es H o alquilo C_{1-4} ;
 R^6 es alquilo C_{1-4} ;
 30 o R^5 y R^6 , junto con el O al que R^6 está unido, forman un anillo oxetanilo, tetrahydrofuranoílo o tetrahidropiranilo;
 m es 1 o 2.

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 una sal del mismo, es el enantiómero (2*S*, 4*R*).

- 35 En una realización P es un grupo

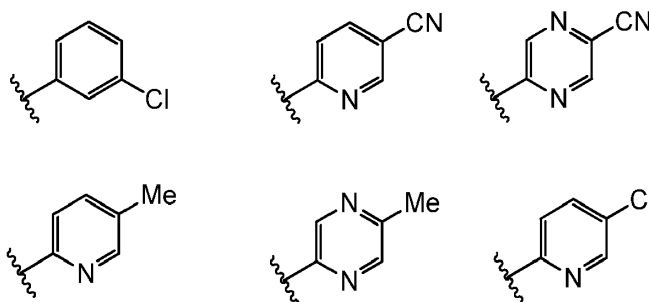


En una realización P se selecciona entre



- 5 En una realización, R^1 es un grupo $C(O)OR^4$ en el que R^4 es isopropilo.

En una realización, R^1 se selecciona entre



En una realización, R^2 es metilo.

- 10 En una realización, R^3 es metilo.

En una realización m es 1.

En una realización, R^5 es hidrógeno.

En una realización, R^6 es metilo.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "sustituido" se refiere a una sustitución con el sustituyente o sustituyentes nombrados, permitiéndose múltiples grados de sustitución a menos que se indique otra cosa. Cuando el sustituyente está en un anillo que comprende un heteroátomo, el sustituyente puede localizarse en un carbono o un heteroátomo, si éste último es apropiado.

- 20 Aunque las realizaciones para cada variable se han enumerado en general anteriormente por separado para cada variable, esta invención pretende incluir todas las combinaciones de realizaciones que se han descrito en el presente documento anteriormente, incluyendo sales de las mismas.

Los compuestos particulares de acuerdo con la invención son:

- 25 ((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-{1-[2-(metiloxi)etil]-1H-pirazol-4-il}-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)carbamato de 1-metiletilo;
 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo;
 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo;
 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(2-(2-metoxietil)-2H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo;
 30 1-((2S,4R)-4-((5-cloropiridin-2-il)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-ilo);
 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpiridin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona;
 1-((2S,4R)-4-((3-clorofenil)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-ilo); y
 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpirazin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona
 35 o una sal de los mismos.

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa:

- el término "halógeno" se usa para describir un grupo seleccionado entre flúor, cloro o bromo;

- los términos "alquilo C₁₋₃" y "alquilo C₁₋₄" se usan para describir un grupo o una parte del grupo que comprende un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 1 a 3 o de 1 a 4 átomos de carbono respectivamente. Otras referencias se interpretarán de forma similar. Los ejemplos adecuados de tales grupos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y t-butilo;
- el término "cicloalquilo C₃₋₇" se usa para describir un anillo carbocíclico no aromático que contiene al menos tres y como mucho siete átomos de carbono. Los ejemplos de cicloalquilo C₃₋₇ incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

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

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. Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I), que tras la administración al receptor es capaz de proporcionar (directa o indirectamente). En una realización, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I), que tras la administración al receptor es capaz de proporcionar (directa o indirectamente). Para una revisión sobre sales adecuadas, véase Berge y col., J. Pharm. Sci., 66: 1-19, (1977). Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse fácilmente usando un ácido o base deseada según sea apropiado. La sal resultante puede precipitar de la solución y recogerse por filtración, o puede recuperarse por evaporación del disolvente.

Una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable puede formarse por reacción de un compuesto de fórmula (I) con un ácido inorgánico u orgánico adecuado (tal como bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, succínico, maleico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, p-toluenosulfónico, benzenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico, tal como ácido 2-naftalenosulfónico o hexanoico), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico, para dar la sal que normalmente se aísla por ejemplo por cristalización y filtración. Una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o ser, por ejemplo, una sal bromhidrato, clorhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, succinato, maleato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, benzoato, salicilato, glutamato, aspartato, p-toluenosulfonato, benzenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, naftalenosulfonato (por ejemplo, 2-naftalenosulfonato) o hexanoato.

Pueden usarse otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo formiatos, oxalatos o trifluoroacetatos, por ejemplo en 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 se hacen reaccionar o a partir de los cuales se precipitan o cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como un "hidrato". Pueden usarse disolventes con altos puntos de ebullición y/o capaces de formar enlaces hidrógeno, tales como agua, xileno, N-metil pirrolidinona, metanol y etanol, para formar solvatos. Los métodos para la identificación de solvatos incluyen, pero 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 se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Las formas polimórficas de compuestos de fórmula (I) pueden caracterizarse y diferenciarse usando varias técnicas analíticas convencionales, incluyendo, pero sin limitación, patrones de difracción de polvo de rayos X (XRPD), espectros de infrarrojos (IR), espectros de Raman, calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSRMN).

Ciertos compuestos descritos en el presente documento contienen átomos quirales, de manera que puedan formarse isómeros ópticos, por ejemplo, enantiómeros o diaestereoisómeros. Por consiguiente, la presente invención incluye todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I) ya sea como isómeros individuales aislados, tales como sustancialmente libres de otro isómero (es decir puros) o como mezclas (es decir, racematos y mezclas racémicas). Un isómero individual aislado tal como sustancialmente libre del otro isómero (es decir puro) puede aislarse de tal forma que está presente menos del 10 %, particularmente menos de aproximadamente el 1 %, por ejemplo menos de aproximadamente el 0,1 % del otro isómero.

La separación de los isómeros puede conseguirse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, por cristalización fraccionada, cromatografía o HPLC.

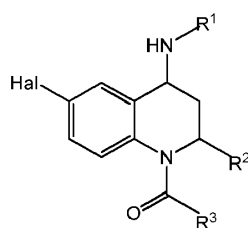
Ciertos compuestos de fórmula (I) pueden existir en una de varias formas tautómicas. Se entenderá que la presente invención incluye todos los tautómeros de los compuestos de fórmula (I), ya sean tautómeros individuales o como mezclas de los mismos.

Se apreciará a partir de lo anterior que se incluyen dentro del alcance de la invención solvatos, isómeros y formas polimorfas de los compuestos de fórmula (I) y sales de los mismos.

Los compuestos de fórmula (I), o sales de los mismos pueden hacerse mediante una diversidad de procedimientos, incluyendo la química estándar. Cualquier variable previamente definida continuará teniendo el significado que se ha definido previamente a menos que se indique otra cosa. Los procedimientos sintéticos generales ilustrativos se exponen a continuación y después, se preparan compuestos específicos de fórmula (I) y sales de los mismos, en los Ejemplos.

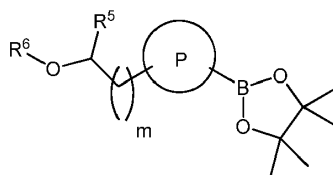
En un aspecto más se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende un proceso seleccionado entre (a), (b), (c) y (d) en el que

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



(II)

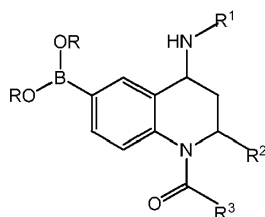
en la que R¹, R² y R³ son como se definen en la fórmula (I) y Hal es cloro, bromo o yodo, con un compuesto de fórmula (III)



(III)

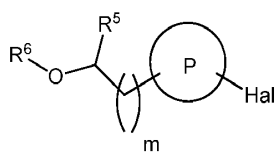
en la que P, m, R⁵ y R⁶ son como se definen en la fórmula (I).

(b) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)



(IV)

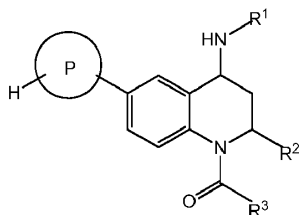
en la que R¹, R² y R³ son como se definen en la fórmula (I) y R es H o B(OR)₂ es pinacolatoborano, con un compuesto de fórmula (V)



(V)

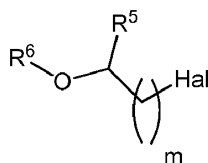
en la que P, m, R⁵ y R⁶ son como se definen en la fórmula (I) y Hal es cloro, bromo o yodo.

(c) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VI)



(VI)

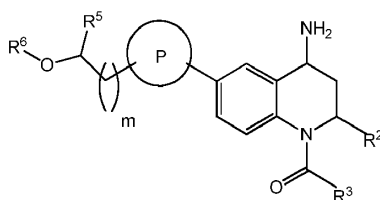
5 en la que P, R¹, R² y R³ son como se definen en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (VII)



(VII)

en la que m, R⁵ y R⁶ son como se definen en la fórmula (I) y Hal es halógeno;

(d) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VIII)



(VIII)

10 en la que m, P, R², R³, R⁵, y R⁶ son como se definen en la fórmula (I) con un compuesto de fórmula (IX)



en la que R¹ es como se define en la fórmula (I) y Hal es halógeno.

Proceso (a)

15 Para el proceso (a), un halógeno adecuado es bromo. Esta reacción puede realizarse agitando un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III) en presencia de un catalizador de paladio adecuado, tal como Pd(PPh₃)₄, una base, tal como carbonato sódico o potásico acuoso en un disolvente orgánico adecuado, tal como etanol o tolueno, o una combinación de los mismos.

Los compuestos de fórmula (II) y (III) pueden prepararse por procedimientos descritos en el presente documento o mediante procedimientos análogos a los mismos.

20 **Proceso (b)**

Para el proceso (a), un halógeno adecuado es bromo. Esta reacción puede realizarse agitando un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V) en presencia de un catalizador de paladio adecuado, tal como Pd(PPh₃)₄, una base, tal como carbonato sódico o potásico acuoso en un disolvente orgánico adecuado, tal como

etanol o tolueno, o una combinación de los mismos.

Proceso (c)

Para el proceso (c), un halógeno adecuado es bromo. La reacción entre el compuesto de fórmula (VI) y fórmula (VII) puede realizarse en un disolvente orgánico adecuado, tal como DMF, en presencia de una base, tal como carbonato potásico.

Los compuestos de fórmula (VI) y (VII) pueden prepararse mediante procedimientos descritos en el presente documento o mediante procedimientos análogos a los mismos.

Proceso (d)

Para el proceso (d), un halógeno adecuado es bromo. La reacción entre el compuesto de fórmula (VIII) y fórmula (IX) puede realizarse en un disolvente orgánico adecuado, tal como dioxano, en presencia de un catalizador de paladio, tal como tris(dibencilidienoacetona)dipaladio (0), un ligando fosfina y una base, tal como terc-butóxido sódico.

Los compuestos de fórmula (VIII) pueden prepararse por procedimientos descritos en el presente documento o mediante procedimientos análogos a los mismos. Los compuestos de fórmula (IX) están disponibles en el mercado.

Se apreciará por los expertos en la técnica que puede ser ventajoso proteger uno o más grupos funcionales de los compuestos que se han descrito anteriormente. Los ejemplos de grupos protectores y los medios para su eliminación pueden encontrarse 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 t-butoxicarbonilo) y arilalquilo (por ejemplo, bencilo), que pueden eliminarse por hidrólisis (por ejemplo, usando un ácido tal como ácido clorhídrico en dioxano o ácido trifluoroacético en diclorometano) o de forma reductora (por ejemplo, hidrogenólisis de un grupo bencilo o benciloxicarbonilo o eliminación reductora de un grupo 2',2',2'-tricloroetoxicarbonilo usando cinc en ácido acético) según sea apropiado. Otros grupos protectores de amina adecuados incluyen trifluoroacetilo ($-\text{COCF}_3$), que puede eliminarse por hidrólisis catalizada por base.

Se apreciará que, en cualquiera de las rutas anteriormente descritas, el orden preciso de las etapas sintéticas mediante el cual se introducen los diversos grupos y restos en la molécula puede variar. Estará dentro de la habilidad del profesional en la técnica asegurar que los grupos o restos introducidos en una fase del proceso no estará afectado por transformaciones y reacciones posteriores y, por consiguiente, seleccionar el orden de las etapas sintéticas.

Ciertos compuestos intermedios descritos anteriormente forman incluso un aspecto más de la invención.

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 se indica un inhibidor de bromodominio.

Por tanto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia. El compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar en el tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales se indica un inhibidor de bromodominio.

Por tanto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección para la cual se indica un inhibidor de bromodominio. En otra realización se proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de afecciones autoinmunes y/o inflamatorias crónicas. En una realización adicional se proporciona un compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de cáncer.

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 se indica un inhibidor de bromodominio.

También se proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedades o afecciones para las cuales se indica un inhibidor de bromodominio en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Adecuadamente el sujeto en necesidad del mismo es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que suscitará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un correspondiente sujeto que no ha recibido tal cantidad, da como resultado mejorado tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o un descenso en el índice de progreso de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su

ámbito cantidades eficaces para aumentar 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 la inflamación sistémica o de tejido, respuestas inflamatorias a infección o hipoxia, activación y proliferación celular, metabolismo lipídico, fibrosis y en la prevención y tratamiento de infecciones víricas.

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, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, neumonitis, miocarditis, pericarditis, miositis, eccema, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica), alopecia, vitiligo, enfermedades de la piel bullosa, nefritis, vasculitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, depresión, síndrome de Sjögren, sialoadenitis, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de la vena lateral de la retina, síndrome de Irvine-Gass (post catarata y post cirugía), retinitis pigmentosa, pars planitis, retinocloroidopatía en perdigonada (birdshot), membrana epirretiana, edema macular quístico, telangiectasis parafoveal, maculopatías traccionales, síndromes de tracción vitreomacular, desprendimiento retinal, neuroretinitis, edema macular idiopático, retinitis, ojo seco (queratoconjuntivitis sicca), queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, uveitis anterior, pan uveitis, uveitis posterior, edema macular asociado a uveitis, escleritis, retinopatía diabética, edema macular diabético, distrofia macular relacionada con la edad, hepatitis, pancreatitis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad de Addison, hipofisitis, tiroiditis, diabetes tipo I y rechazo agudo de órganos trasplantados.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones inflamatorias agudas tales como gota aguda, arteritis de célula gigante, nefritis incluyendo nefritis lúpica, vasculitis relacionada con órgano tal como glomerulonefritis, vasculitis incluyendo arteritis de célula gigante, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, pioderma gangrenoso, vasculitis relacionada con órgano y rechazo agudo de órganos trasplantados.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones que implican respuestas inflamatorias a infecciones con bacterias, virus, hongos, parásitos o sus toxinas, tales como sepsis, síndrome por sepsis, shock séptico, endotoxemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de shock tóxico, lesión pulmonar aguda, SDRA (síndrome de dificultad respiratoria en adulta), fallo renal agudo, hepatitis fulminante, quemaduras, pancreatitis aguda, síndromes post cirugía, sarcoidosis, reacciones Herxheimer, encefalitis, mielitis, meningitis, malaria y SRIS asociado con infecciones víricas tales como gripe, herpes zoster, herpes simplex y coronavirus.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de afecciones asociadas con lesión de reperfusión de isquemia tal como infarto de miocardio, isquemia cerebro-vascular (apoplejía), síndromes coronarios agudos, lesión de reperfusión renal, trasplante de órgano, injerto bypass de arteria coronaria, procedimientos bypass cardio-pulmonar, embolismo pulmonar, renal, hepático, gastro-intestinal o de limbo periférico.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del metabolismo lipídico vía 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, constricción post operativa, formación de cicatriz queloide, esclerodermia (incluyendo morfea) y fibrosis cardíacas.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en la prevención y tratamiento de infecciones víricas tales 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, incluyendo hematológico (tal como leucemia, linfoma y mieloma múltiple), epitelial (incluyendo carcinomas de pulmón, pecho y colon), carcinomas de línea media, tumores mesenquimales, hepáticos, renales y neurológicos. En una realización el cáncer es NUT-carcinoma de línea media.

Los inhibidores de bromodominio pueden ser útiles en el tratamiento de patología dérmica tal como melanoma no maligno (queratosis actínica y célula basal), melanoma *in situ*, carcinoma celular escamoso y linfoma de linfocito T cutáneo.

En una realización la enfermedad o afección para la cual se indica un inhibidor de bromodominio se selecciona entre enfermedades asociadas con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tal como sepsis, quemaduras, pancreatitis, trauma grave, hemorragia e isquemia. En esta realización, el inhibidor de bromodominio se administrará en el momento de diagnóstico para reducir la incidencia de: SRIS, el inicio del shock, síndrome de disfunción multiorgánica, el cual incluye el inicio de lesión pulmonar aguda, SDRA, lesión renal, hepática, cardíaca y gastrointestinal aguda y mortalidad. En otra realización el inhibidor de bromodominio se administrará antes de cirugía u otros procedimientos asociados con un alto riesgo de sepsis, hemorragia, extenso daño de tejido, SRIS o SDMO (síndrome de disfunción multiorgánica). En una realización particular la enfermedad o afección para la cual

se indica un inhibidor de bromodominio es sepsis, síndrome de sepsis, shock séptico y endotoxemia. En otra realización, el inhibidor de bromodominio está indicado para el tratamiento de pancreatitis aguda o crónica. En otra realización el bromodominio está indicado para el tratamiento de quemaduras.

En una realización la enfermedad o afección para la cual se indica un inhibidor de bromodominio se selecciona entre infecciones y reactivaciones de herpes simplex, calenturas, infecciones y reactivaciones de herpes zoster, varicela, herpes, virus del papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humano (VIH), neoplasia cervical, infecciones de adenovirus, incluyendo enfermedad respiratoria aguda, infecciones de poxvirus tales como viruela bovina 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 del papiloma humano de piel o epitelio cervical. En una realización adicional el inhibidor del bromodominio está indicado para el tratamiento de infección por VIH latente.

El término "enfermedades o afecciones para las cuales se indica un inhibidor de bromodominio", intenta incluir cada uno o todos los anteriores estados de enfermedad.

La invención proporciona además compuestos para su uso en 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.

Mientras que sea posible su uso en terapia, un compuesto de fórmula (I) así como sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar como compuesto químico en bruto, es común presentar el principio activo como una composición farmacéutica.

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, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables, son tal como se han descrito anteriormente. El(los) vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales a su recipiente. De acuerdo con otro aspecto de la invención también se proporciona un proceso 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, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica se puede usar en el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento.

Puesto que los compuestos de fórmula (I) están destinados a su uso en composiciones farmacéuticas será fácil entender que cada uno se proporciona preferentemente en forma sustancialmente pura, por ejemplo, al menos puro al 60%, más adecuadamente al menos puro al 75% y preferentemente al menos puro al 85%, especialmente al menos puro al 98% (% en peso por base en peso).

Las composiciones farmacéuticas pueden estar presentes en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o subdosis, o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo. Por lo tanto, tales dosis unitarias se pueden administrar más de una vez al día. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o subdosis (para la administración más de una vez al día), tal como se ha relatado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas, de un principio activo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo, mediante vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, inhalado, intranasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), ocular (incluyendo tópica, intraocular, subconjuntiva, epiescleral, sub-Tenon), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, asociando el principio activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s).

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

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

En una realización la composición farmacéutica está adaptada para la administración tópica.

Una forma de dosificación preferida que da como resultado la oclusión y modificación de la permeación de la piel para o bien aumentar o disminuir la exposición sistémica de los compuestos de bromodominio, que incluyen, pero no se limitan, a las formas farmacéuticas aceptables de carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona.

Composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que vuelven la composición isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas

que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden estar presentes en recipientes de dosis unitaria o dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición de secado por congelación (liofilización) que solamente requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para las inyecciones, inmediatamente antes de usar. Se pueden preparar soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Composiciones farmacéuticas adaptadas para la 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 o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

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

Las cápsulas se pueden fabricar preparando una mezcla en polvo, tal como se ha descrito anteriormente, y rellenando fundas de gelatina formadas. Se pueden añadir 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 relleno. También se puede añadir un agente desintegrador o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingesta la cápsula.

Además, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, deslizantes, lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes desintegradores y agentes colorantes adecuados. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como de acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. 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. Desintegradores incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulación o doble compresión (slugging), añadiendo un lubricante y desintegrador y presionando en comprimidos. Una mezcla en polvo se prepara mezclando el compuesto, adecuadamente desmenuzado, con un diluyente o base tal como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinilpirrolidona, una solución retardante tal como parafina, un acelerador de resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato de dicalcio. La mezcla en polvo se puede granular mojando con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzando a través de un filtro. Como alternativa a la granulación, la mezcla en polvo puede atravesar la máquina de comprimido y el resultado son lingotes (slugs) formados de manera imperfecta rotos en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para prevenir el pegado al comprimido formando dados por medio de la adición de ácido estárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación, se comprime la mezcla lubricada en comprimidos. Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, también se pueden combinar con un vehículo inerte que fluye libre y comprimir en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o doble compresión. Se puede proporcionar un revestimiento protector claro u opaco que consiste en una capa de sellado de goma laca, un revestimiento de azúcar o material polimérico y un revestimiento de brillo de cera. Se pueden añadir tintes a estos revestimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Se pueden preparar fluidos orales tales como solución, jarabes y elixires en forma de unidad de dosificación para que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se preparan a través del uso de un vehiculizante no tóxico alcohólico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehiculizante no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isostearílicos etoxilados y polioxi etilen sorbitol éteres, conservantes, aditivo de sabor tal como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Donde sea apropiado, las composiciones de unidad de dosificación para la administración oral pueden estar microencapsuladas. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación como, por ejemplo, mediante revestimiento o incrustación de material particulado en polímeros, cera o similares.

Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, también se pueden administrar en la forma de sistemas de liberación de liposoma, tal como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden estar formados a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden estar formuladas como pomadas, cremas, suspensiones, emulsiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, espumas, pulverizadores, aerosoles

o aceites. Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir aditivos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, codisolventes, emolientes, propulsores, agentes modificadores de la viscosidad (agentes gelificantes), tensioactivos y vehículos. En una realización se proporciona una composición farmacéutica adaptada para la administración tópica que comprende entre 0,01-10 %, o entre 0,01-1 % del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en peso de la composición.

Para tratamientos de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las composiciones preferentemente se aplican como una solución, suspensión, emulsión, pomada, crema, gel, pulverizador o espuma tópica. Cuando se formula en una pomada, el principio activo se puede emplear con o bien una base de pomada miscible en agua o una parafínica. Alternativamente, el principio activo puede estar formulado en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Composiciones farmacéuticas adaptadas para las administraciones tópicas a los ojos incluyen gotas para los ojos en las que el principio activo está disuelto o suspendido en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones para ser administradas a los ojos tendrán pH y presión osmótica oftálmicamente compatible. Uno o más agentes de ajuste de pH oftálmicamente aceptables y/o agentes tampón pueden estar incluidos en una composición de la invención, incluyendo ácidos tales como ácidos 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 pueden estar incluidos en una cantidad requerida para mantener el pH de la composición en un intervalo oftálmicamente aceptable. Una o más sales oftálmicamente aceptables pueden estar incluidas en la composición en una cantidad suficiente para traer la presión osmótica de la composición dentro de un intervalo oftálmicamente aceptable. Tales sales incluyen aquellas que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones de cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito.

El dispositivo de liberación ocular puede estar diseñado para la liberación controlada de uno o más agentes terapéuticos con múltiples índices de liberación definidos y cinéticas y permeabilidad de dosis sostenida. La liberación controlada se puede obtener a través del diseño de matrices poliméricas que incorporan diferentes elecciones y propiedades de polímeros biodegradables/bioerosionables (por ejemplo, acetato de poli(etileno vinil) (EVA), PVA superhidrolizado), hidroxialquil celulosa (HPC), metilcelulosa (MC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC), policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), polianhídrido, de pesos moleculares de polímero, cristalinidad de polímero, proporciones de copolímero, condiciones de procesamiento, terminado de superficie, geometría, adición de excipiente y revestimientos poliméricos que aumentarán la difusión, erosión, disolución y osmosis del fármaco.

Las composiciones farmacéuticas para la liberación ocular también incluyen *in situ* composición acuosa gelificable. Tal composición comprende un agente gelificable en una concentración eficaz para promover la gelificación tras ponerse en contacto con los ojos o con el fluido lagrimal. Agentes gelificantes adecuados incluyen, pero no se limitan, a polímeros de termoajuste. El término "gelificable *in situ*" tal como se usa en el presente documento incluye no solamente líquidos de baja viscosidad que forman geles tras ponerse en contacto con los ojos o con el fluido lagrimal, sino también incluye líquidos más viscosos tales como semifluido y geles tixotrópicos que presentan viscosidad sustancialmente aumentada o dureza de gel tras la administración a los ojos. Véase, por ejemplo, Ludwig (2005) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 3;57:1.595-639, incorporado en el presente documento como referencia para los fines de sus enseñanzas de ejemplos de polímeros para su uso en liberación de fármaco ocular.

Las formas de dosificación para la administración nasal o inhalada convenientemente pueden estar formuladas como aerosoles, soluciones, suspensiones, geles o polvos secos.

Para composiciones adecuadas y/o adaptadas para la administración inhalada, se prefiere que el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, esté en una forma de partícula de tamaño reducido por ejemplo obtenida por micronización. El tamaño de partícula preferible del compuesto o sal de tamaño reducido (por ejemplo, sometido a micronización) está definida por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micras (por ejemplo, como lo medido usando difracción de laser).

Las formulaciones en aerosol, por ejemplo, para la administración inhalada, pueden comprender una solución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol pueden estar presentes en cantidades de dosis única o múltiple en forma estéril en un recipiente sellado, el cual puede tomar la forma de un cartucho o recambio para su uso con un dispositivo de atomización o inhalador. Alternativamente el recipiente sellado puede ser un dispositivo dosificador unitario tal como un inhalador nasal de dosis única o un dosificador en aerosol fijado con una válvula medidora (inhalador de dosis medida) que está destinado a ser desechado una vez se hayan acabado los contenidos del recipiente.

Donde la forma de dosificación comprende un dosificador en aerosol, preferentemente contiene un propulsor adecuado bajo presión tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propulsor orgánico tal como hidrofluorocarbono (HFC). Propulsores 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 pulverizador. 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 tensioactivos para mejorar las características de dispersión y homogeneidad de formulaciones de suspensión. Las formulaciones en solución también pueden requerir la adición de codisolventes tales como etanol.

- 5 Para composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para la administración inhalada, la composición farmacéutica puede ser una composición inhalable en polvo seco. Tal composición 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 (preferentemente en forma de partícula de tamaño reducido, por ejemplo, en forma sometida a micronización), y opcionalmente un modificador de rendimiento tal como L-leucina u otro aminoácido y/o sales de metal de ácido esteárico tal como estearato de magnesio o calcio. Preferentemente, la
- 10 composición inhalable en polvo seco comprende una mezcla de polvo seco de lactosa, por ejemplo, monohidrato de lactosa y el compuesto de fórmula (I) o su sal. Tales composiciones se pueden administrar al paciente usando un dispositivo adecuado como el dispositivo DISKUS®, comercializado por GlaxoSmithKline que, por ejemplo, está descrito en el documento GB 2242134 A.
- 15 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden estar formuladas como una formulación fluida para la liberación a partir de un dosificador de fluido, por ejemplo, un dosificador de fluido que tiene una boquilla dosificadora u orificio dosificador a través del cual se administra una dosis medida de la formulación fluida tras la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bomba del dosificador de fluido. Tales dosificadores de fluido generalmente están proporcionados con una reserva de dosis múltiples
- 20 medidas de la formulación fluida, siendo las dosis administrables tras las actuaciones de bomba secuencial. La boquilla u orificio dosificador puede estar configurado para la inserción en las fosas nasales del usuario para administrar por pulverización la formulación fluida en la cavidad nasal. Un dosificador de fluido del tipo anteriormente mencionado está descrito e ilustrado en el documento WO-A-2005/044354.
- 25 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o 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 requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación, y la vía de administración, y finalmente estará en el criterio del médico o veterinario que atiende. En la composición farmacéutica, cada unidad de dosificación para la administración oral o parenteral preferentemente contiene entre 0,01 y 3.000 mg, más preferentemente 0,5 y 1.000 mg, de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 30 calculado como base libre. Cada unidad de dosificación para administración nasal o inhalada preferentemente contiene entre 0,001 y 50 mg, más preferentemente 0,01 y 5 mg, de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculado como base libre.
- 35 Los compuestos farmacéuticamente aceptables de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden administrar en una dosis diaria (por paciente adulto) de, por ejemplo, una dosis oral o parenteral de 0,01 mg a 3.000 mg por día o 0,5 a 1.000 mg por día, o una dosis nasal o inhalada de 0,001 a 50 mg por día o 0,01 a 5 mg por día, del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, calculada como la base libre. Esta cantidad se puede dar en una dosis única por día o más normalmente en un número (tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis) de subdosis por día de modo 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*.
- 40 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden emplear solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Terapias de combinación de acuerdo con la presente invención comprenden por tanto 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 terapéuticamente activo. Preferentemente, las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de al menos un compuesto de
- 45 fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos otro agente terapéuticamente activo. El(los) compuestos(s) de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, y el(los) otro(s) agente(s) terapéuticamente activo(s) se puede(n) administrar juntos en una composición farmacéutica sencilla o por separado y, cuando se administra(n) por separado esto puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Las cantidades del(de los) compuesto(s) de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, y el(los) otro(s)
- 50 agente(s) terapéuticamente activo(s) y los ritmos relativos de administración se seleccionarán para alcanzar el efecto terapéutico combinado deseado. Por tanto, en un aspecto adicional, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, y al menos otro agente terapéuticamente activo.
- 55 Por tanto, en un aspecto, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la invención se pueden usar en combinación con o incluir uno u otros más agentes terapéuticos, por ejemplo, seleccionados entre antibióticos, antivirales, glucocorticoesteroides, beta-2 agonistas de antagonistas muscarínicos y análogos de Vitamina D3. En un aspecto adicional se puede usar un compuesto de
- 60 fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la invención en combinación con un agente terapéutico adicional que es adecuado para el tratamiento del cáncer.

Se apreciará que cuando el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra 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. Alternativamente los componentes individuales de la composición se pueden administrar por diferentes vías.

- 5 Una realización de la invención abarca combinaciones que comprenden uno u otros dos agentes terapéuticos.

Resultará evidente para un experto en la técnica que, cuando se apropiado, puede usarse el otro ingrediente o ingredientes farmacéuticos en forma de sales, por ejemplo, como sales de metales alcalinos o amina, o como sales de adición de ácidos, 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, tal como la solubilidad, del ingrediente terapéutico. También será evidente que, cuando se apropiado, los ingredientes terapéuticos pueden usarse en forma ópticamente pura.

- 10

Las combinaciones a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden presentarse convenientemente para su uso en forma de una composición farmacéutica y, por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación como se ha definido anteriormente junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable representan un aspecto adicional de la invención.

- 15

Los compuestos de fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden prepararse mediante los procedimientos descritos a continuación o mediante procedimientos similares. Por lo tanto, los siguientes Intermedios y Ejemplos sirven para ilustrar la preparación de los compuestos de fórmula (I) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y no considerarán como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

- 20

Detalles experimentales generales

Todas las temperaturas a las que se hace referencia están en °C.

Los nombres de los siguientes compuestos se han obtenido usando el programa para nombrar compuestos "ACD Name Pro 6.02" o Chem Draw Ultra 12.0.

- 25 **Abreviaturas**

BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
CV	volúmenes de columna
Dave phos	[2'-(d ciclohexilfosfanil)-2-bifenilil]dimetilamina
DCM	diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
h	hora(s)
KOH	hidróxido potásico
CLEM	cromatografía líquida/espectrometría de masas
MDAP	HPLC autoprep. dirigida a masas = preparativa dirigida a masas
min	minuto(s)
MgSO ₄	sulfato de magnesio
Na ₂ SO ₄	sulfato sódico
NMP	N-metil-2-pirrolidona
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibencildienoacetona)dipaladio (0)
t.a.	temperatura ambiente
Tr	tiempo de retención
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano

Metodología de CLEM

Procedimiento formiato

Condiciones de CL

- 30 El análisis por UPLC se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, d.i. 1,7 µm de diámetro de relleno) a 40 °C.

Los disolventes empleados fueron:

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

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

El gradiente empleado fue:

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

- 5 La detección UV fue una señal sumada de una longitud de onda de 210 nm a 350 nm.

Condiciones de EM

Procedimiento HpH

EM : Waters ZQ
 Modo de ionización : Electronebulización positiva y negativa de exploración alterna
 Rango de exploración : 100 a 1000 AMU
 Tiempo de exploración : 0,27 s
 Retardo entre exploraciones : 0,10 s

Condiciones de CL

- 10 El análisis por UPLC se realizó en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, d.i. 1,7 µm de diámetro de relleno) a 40 °C.

Los disolventes empleados fueron:

A = carbonado ácido de amonio 10 mM en agua ajustada a pH 10 con solución de amoniaco

B = acetonitrilo

- 15 El gradiente empleado fue:

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

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

Condiciones de EM

EM : Waters ZQ
 Modo de ionización : Electronebulización positiva y negativa de exploración alterna
 Rango de exploración : 100 a 1000 AMU
 Tiempo de exploración : 0,27 s
 Retardo entre exploraciones : 0,10 s

- 20 Se realizó un análisis por **CLEM (Procedimiento B)** en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i. 1,7 µm de diámetro de relleno) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución al 0,1 % v/v de ácido fórmico en agua (Disolvente A) y una solución al 0,1 % v/v de ácido fórmico en acetonitrilo (Disolvente B) usando el siguiente gradiente de elución 0-1,5 min al 3-100 % de B, 1,5-1,9 min al 100 % de B, 1,9 - 2,0 min al 3 % de B a un caudal de

1 ml/min. La detección UV fue una señal sumada de una longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electronebulización positiva y negativa de exploración alterna. Los datos de ionización se redondearon al número entero más cercano.

Se realizó un análisis por **CLEM (Procedimiento C)** en una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i. 1,7 µm de diámetro de relleno) a 40 grados centígrados, eluyendo con una solución al 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en agua (Disolvente A) y una solución al 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (Disolvente B) usando el siguiente gradiente de elución 0-1,5 min al 3-100 % de B, 1,5-1,9 min al 100 % de B, 1,9-2,0 min al 3 % de B a un caudal de 1 ml/min. La detección UV fue una señal sumada de una longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ usando electronebulización positiva. Los datos de ionización se redondearon al número entero más cercano.

Metodología de MDAP

Formiato del procedimiento

Condiciones de CL

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

Los disolventes empleados fueron:

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

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

Realización como un gradiente durante 15 o 25 min (realización extendida) con un caudal de 20 ml/min (100 mm x 19 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) o 40 ml/min (150 mm x 30 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno).

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

Condiciones de EM

Procedimiento HpH

EM	: Waters ZQ
Modo de ionización	: Electronebulización positiva y negativa de exploración alterna
Rango de exploración	: 100 a 1000 AMU
Tiempo de exploración	: 0,50 s
Retardo entre exploraciones	: 0,20 s

Condiciones de CL

El análisis por HPLC se realizó en una columna Xbridge C18 (100 mm x 19 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) o una columna Xbridge C18 (100 mm x 30 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) a temperatura ambiente.

Los disolventes empleados fueron:

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

B = acetonitrilo

Realización como un gradiente durante 15 o 25 min (realización extendida) con un caudal de 20 ml/min (100 mm x 19 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) o 40 ml/min (100 mm x 30 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno).

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

Condiciones de EM

Procedimiento TFA

EM	: Waters ZQ
Modo de ionización	: Electronebulización positiva y negativa de exploración alterna
Rango de exploración	: 100 a 1000 AMU
Tiempo de exploración	: 0,50 s
Retardo entre exploraciones	: 0,20 s

C

Condiciones de CL

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

Los disolventes empleados fueron:

- 5 A = solución al 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en agua
 B = solución al 0,1 % v/v de trifluoroacético en acetonitrilo

Realización como un gradiente durante 15 o 25 min (realización extendida) con un caudal de 20 ml/min (100 mm x 19 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) o 40 ml/min (150 mm x 30 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno).

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

10 Condiciones de EM

EM	: Waters ZQ
Modo de ionización	: Electronebulización positiva
Rango de exploración	: 100 a 1000 AMU
Tiempo de exploración	: 0,50 s
Retardo entre exploraciones	: 0,20 s

Metodología de HPLC preparativa**Procedimiento HpH****Condiciones de CL**

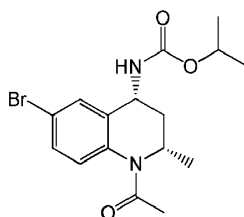
- 15 El análisis por HPLC se realizó en una columna Xbridge C18 (100 mm x 30 mm, d.i. 5 µm de diámetro de relleno) a temperatura ambiente.

Los disolventes empleados fueron:

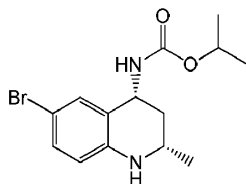
- A = bicarbonato de amonio 10 mM en agua, ajustado a pH 10 con una solución de amoniaco
 B = acetonitrilo

- 20 Realización como un gradiente durante 30 min con un caudal de 30 ml/min

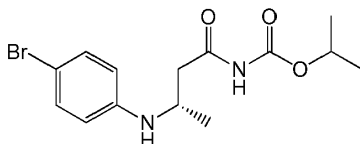
La detección UV fue una señal sumada de una longitud de onda de 210 nm a 350 nm.

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

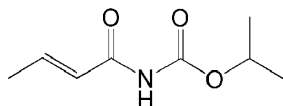
- 25 Se recogió [(2S,4R)-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (para una preparación, véase el Intermedio 2) (14,1 g, 43,1 mmol) en DCM (400 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadieron piridina (10,46 ml, 129 mmol) y después cloruro de acetilo (4,60 ml, 64,6 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, y después se repartió entre acetato de etilo (2,0 l) y carbonato ácido sódico acuoso saturado (800 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con agua y después con salmuera (1500 ml cada vez), después se secó con Na₂SO₄ y se concentró al vacío, produciendo un sólido de color púrpura.
- 30 El producto bruto se recogió en el mínimo de DCM y se aplicó a una columna de 330 g Companion XL y se eluyó con un gradiente de acetato de etilo al 12-63 % en ciclohexano, dando el producto en forma de un sólido de color blanquecino (12,37 g).
- 35 CLEM (Procedimiento B), Tr 1,03 min, MH+ 369
 [α]_D = +281,1025° (T = 20,7 °C, célula de 10 mm, c = 0,508 g/100 ml, etanol).

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

Se recogió {(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanoil}carbamato de 1-metiletilo (para una preparación, véase el Intermedio 3) (17,9 g, 52,2 mmol) en etanol (150 ml) y se enfrió por debajo de -10 °C (temperatura interna) en un baño de CO₂/acetona. Se añadió borohidruro sódico (1,381 g, 36,5 mmol) seguido de magnesio cloruro hexahidrato (11,35 g, 55,8 mmol) en agua (25 ml) manteniendo la temperatura por debajo de -5 °C. La mezcla se dejó en agitación a <0 °C durante 1 h, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La suspensión espesa resultante se vertió en una mezcla de ácido cítrico (25,05 g, 130 mmol), ácido clorhídrico (1 M, 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, produciendo el producto en forma de un sólido de color pardo claro (14,1 g). CLEM (Procedimiento B), Tr 1,13 min, MH+327

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

Se agitó (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (para una preparación, véase el Intermedio 4) (9,38 g, 54,8 mmol) en tolueno (281 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio (II) (para una preparación, véase el Intermedio 5) (3,35 g, 3,01 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se convirtió en una mezcla de color amarillo opaca y se agitó durante 20 min. Se añadió 4-bromoanilina (14,14 g, 82 mmol), la solución se volvió de color pardo claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió adicionalmente. La mezcla se agitó durante 16 h. De forma análoga, se agitó un segundo lote de (2E)-2-butenoilcarbamato de 1-metiletilo (Intermedio 4, 8,51 g, 49,7 mmol) en tolueno (255 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió (R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio (II) (3,04 g, 2,73 mmol). El catalizador formó una bola gomosa, la solución se convirtió en una mezcla de color amarillo opaco y se agitó durante 20 min. Se añadió 4-bromoanilina (12,83 g, 74,6 mmol), la solución se volvió de color pardo claro transparente y el catalizador gomoso se disolvió adicionalmente. La mezcla se agitó durante 16 h. Las dos mezclas de reacción se combinaron y se cargaron sobre una columna de 1,5 kg Isco silica Redisep. La columna se eluyó con DCM/metanol (0 %->0,5 %, 19 VC). Las fracciones que contenían el producto limpio se evaporaron, dando un aceite de color pardo pálido. La mezcla se secó en una estufa de vacío durante una noche a 40 °C, dando {(3S)-3-[(4-bromofenil)amino]butanoil}carbamato de 1-metiletilo en forma de un sólido de color blanco (24,2 g, 67 % total). CLEM (Procedimiento C), Tr 0,91, MH+ 343, e.e. = 92 %.

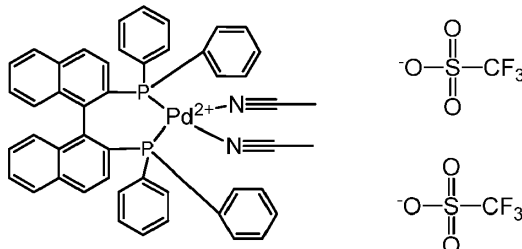
Intermedio 4**(2E)-2-Butenoilcarbamato de 1-metiletilo**

Se cargó carbamato de isopropilo (30 g, 291 mmol, disponible en TCI) en un recipiente de 3 l de Lara y se añadió THF seco (150 ml). Se añadió cloruro de (2E)-2-butenilo (31,2 ml, 326 mmol, disponible en Aldrich) en una atmósfera de nitrógeno y la camisa se enfrió a -30 °C. Cuando la temperatura de la solución alcanzó -17 °C, se añadió terc-butoxido de litio (1 M, 655 ml, 655 mmol) mediante una bomba peristáltica durante 2 h, manteniendo la temperatura de reacción entre -10 °C y -18 °C. Una vez completa la adición, la mezcla se agitó durante 30 min y se llevó a 0 °C. Se añadieron éter dietílico (450 ml) y ácido clorhídrico (1 M, 375 ml) y la mezcla se llevó a 20 °C con agitación vigorosa. La agitación se detuvo, se dejó que las fases se separasen y la fase acuosa se evacuó. Se añadió salmuera (375 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente. La agitación se detuvo, se dejó que las fases se separasen y la fase acuosa se evacuó. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, dando un aceite de color pardo (60 g). El aceite se aplicó a una columna de sílice (40+M Biotage) y se eluyó con DCM/acetato de etilo

(1:1 a 0:1, 10 VC). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a sequedad, se cargaron sobre una columna de sílice (1500 g, Redisep Isco) y se eluyeron con un gradiente de acetato de etilo en ciclohexano (0-40 %). Las fracciones que contenían el producto limpio se evaporaron, dando un sólido de color blanquecino (15,41 g). CLEM (Procedimiento C), Tr 0,68, MH+ 172

5 Intermedio 5

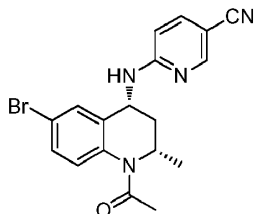
(R-BINAP)ditriflatobis(acetonitrilo)paladio (II)



Se agitó R-(+)-BINAP (6,08 g, 9,76 mmol, disponible en Avocado) en DCM (626 ml) y se añadió diclorobis(acetonitrilo)paladio (II) (2,5 g, 9,64 mmol, disponible en Aldrich). La mezcla se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 30 min, la suspensión no se convirtió en una solución y se añadió más cantidad de DCM (100 ml). La mezcla se agitó durante 30 min más y se añadió triflato de plata (5,00 g, 19,47 mmol, disponible en Aldrich) disuelto en acetonitrilo (250 ml). La mezcla cambió de una suspensión turbia de color naranja a una suspensión de color amarillo. La mezcla se agitó durante 1 h, se filtró a través de Celite™ y se evaporó, dando un sólido de color naranja. El residuo se secó al vacío (a aproximadamente 14 mbar) a temperatura ambiente durante el fin de semana, dando el producto deseado (10,69 g).
 RMN ¹H (400 MHz, MeCN-d₃) δ ppm 2,0 (s, 6 H), 6,7 (d, 2H), 6,9 (m a, 4H), 7,1 (t a, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,5 - 7,9 (m, 22H)

Intermedio 6

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



A una mezcla de 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 7) (2,28 g, 8,05 mmol) y 6-cloronicotinonitrilo (2,231 g, 16,10 mmol) se le añadió 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 lavó abundantemente con nitrógeno, se cerró herméticamente y se agitó con irradiación de microondas a 200 °C durante 2 h. Las mezclas de reacción se combinaron y se repartieron entre agua y acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (x 4) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (x 3), después con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo sólido de color pardo se purificó por cromatografía (gradiente de acetato de etilo/hexanos), dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (1,940 g, 5,04 mmol, rendimiento del 62,5 %) en forma de una espuma de color amarillo pálido. CLEM (HpH), Tr 1,02 min, MH+ = 386 (1 Br).

Intermedio 6, preparación alternativa

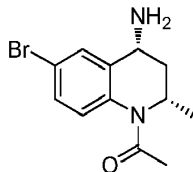
6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo

Se disolvió 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 7) (18 g, 63,6 mmol) en NMP seco (90 ml). Se añadieron 6-cloronicotinonitrilo (13,21 g, 95 mmol) y DIPEA (22,20 ml, 127 mmol), la mezcla se agitó a 150 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 8 h, y después se dejó en reposo durante una noche a temperatura ambiente. La solución se añadió a agua (1 l) y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 400 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 500 ml), se secó y se evaporó al vacío, dando una espuma de color pardo. Esta espuma de color pardo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna de 750 g, eluyendo con EtOAc al 0-100 %/ciclohexano). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron al vacío, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (18,7 g, 48,5 mmol, rendimiento del 76 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

CLEM (formiato): Tr 0,99 min, MH+ 385/387.

Intermedio 7

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



- 5 Una suspensión de cloruro de aluminio (41,2 g, 309 mmol) en DCM (480 ml) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno se trató con una solución de ((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)carbamato de 1-metiletilo (para una preparación, véase el Intermedio 1) (30 g, 81 mmol) en DCM (80 ml) mediante una cánula y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 30 min. 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 resultante
- 10 formada se agitó en acetato de etilo (800 ml), se aisló por filtración y posteriormente se repartió entre DCM (800 ml) y una solución saturada de carbonato ácido sódico (800 ml). Se añadió tartrato potásico sódico (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, dando un primer extracto de 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (19,6 g, 69,2 mmol, rendimiento del 85 %) en forma de una espuma de color amarillo. La fase acuosa se trató adicionalmente con DCM (800 ml) y la mezcla bifásica se agitó durante una noche. Después, las fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre (MgSO₄) y se concentró al vacío, dando un segundo extracto de 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (3,4 g, 12,01 mmol, rendimiento del 14,78 %). CLEM (HpH), Tr 0,77 min, MH+ 283 (1 Br).

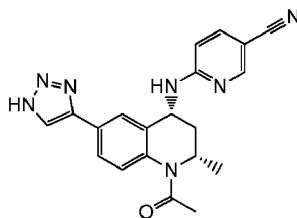
Intermedio 7, preparación alternativa

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

- Se suspendió tricloruro de aluminio (31,6 g, 237 mmol) en DCM (320 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota una solución de ((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)carbamato de 1-metiletilo (para una preparación, véase el Intermedio 1) (25 g, 67,7 mmol) en DCM (100 ml) durante aproximadamente 45 min y la mezcla se dejó en agitación en el baño de hielo durante 1 h más. La mezcla de reacción se inactivó mediante la
- 25 adición gota a gota de NaOH (28,4 g, 711 mmol) en agua (350 ml), dando como resultado la formación de un precipitado espeso que se descompuso para asegurar que la agitación continuara. Se añadió una solución de tartrato sódico potásico (100 g, 354 mmol) en agua (400 ml) y la mezcla se agitó durante una noche. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo adicionalmente con DCM (2 x 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron, dando 1-((2S,4R)-4-amino-6-bromo-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (20,71 g, 65,8 mmol, rendimiento del 97 %) en forma de un aceite de color pardo pegajoso.
- 30 CLEM (formiato): Tr 0,49 min, MH+ 266/268.

Intermedio 8

6-(((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-(1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo

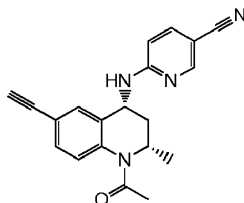


- 35 Un vial para microondas se cargó con 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-etinil-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para una preparación, véase el Intermedio 9) (527 mg, 1,595 mmol), yoduro de cobre (I) (30 mg, 0,158 mmol), metanol (0,333 ml), DMF (3 ml). A la solución se le añadió azidotrimetilsilano (0,423 ml, 3,19 mmol), el vial se cerró herméticamente y se calentó a 100 °C durante 1 h (microondas). En el vial se añadió azidotrimetilsilano (0,211 ml, 1,59 mmol) y la mezcla se calentó durante 1 h más (vial cerrado herméticamente, microondas). Se añadieron azidotrimetilsilano (0,211 ml, 1,590 mmol) y yoduro de cobre (I) (30 mg, 0,158 mmol). El vial se cerró herméticamente de nuevo y se calentó durante 1 h más. La solución de reacción se concentró al vacío, se diluyó con agua (15 ml) y se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron (frita hidrófoba). La mezcla se concentró y la muestra se purificó por cromatografía sobre un cartucho de sílice (50 g) eluyendo con un gradiente de metanol/DCM (0-10 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se
- 40
- 45

evaporó al vacío, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-(1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (50 mg). CLEM (formiato): Tr 0,71 min, MH+ 374

Intermedio 9

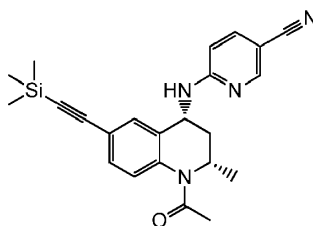
6-(((2S,4R)-1-acetil-6-etinil-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo



Se trató 6-(((2S,4R)-1-Acetil-2-metil-6-((trimetilsilil)etinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para una preparación, véase el Intermedio 10) (1,69 g, 4,20 mmol) con cloruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 4,62 ml, 4,62 mmol) y THF (18 ml) y la solución se agitó a condiciones ambiente durante 30 min. La reacción se concentró al vacío, se diluyó con agua (25 ml) y se extrajo con DCM (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre un cartucho de sílice (100 g) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/ciclohexano (0-75 %). Las fracciones apropiadas se recogieron y el disolvente se evaporó al vacío, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-etinil-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (990 mg) en forma de una espuma de color amarillo. CLEM (formiato), Tr 0,92 min, MH+ 331.

Intermedio 10

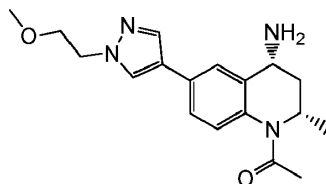
6-(((2S,4R)-1-Acetil-2-metil-6-((trimetilsilil)etinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo



Se mezclaron 6-(((2S,4R)-1-Acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para una preparación, véase el Intermedio 6) (1,62 g, 4,20 mmol), etiniltrimetilsilano (17,5 ml, 124 mmol), trietilamina (23 ml, 165 mmol), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (0,590 g, 0,841 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,080 g, 0,420 mmol) en DMF (18 ml) y calentaron a 90 °C durante una noche. La reacción se concentró al vacío, se diluyó con agua (30 ml) y se extrajo con DCM (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron (frita hidrófoba). La solución se concentró al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía sobre un cartucho de sílice (100 g) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/ciclohexano (0-75 % sobre 14 VC). Las fracciones apropiadas se recogieron y el disolvente se evaporó al vacío, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-((trimetilsilil)etinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (881 mg) en forma de una espuma de color negro, que se usó sin purificación adicional. CLEM (formiato), Tr 1,24 min, MH+ 402

Intermedio 11

1-((2S,4R)-4-amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona

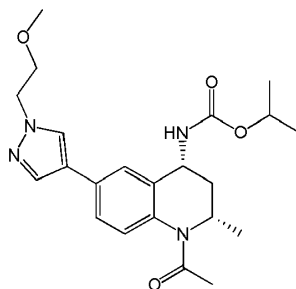


Se combinaron (2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahydro-4-quinolinamina (para una preparación, véase el Intermedio 7) (900 mg, 2,82 mmol), 1-(2-metoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (852 mg, 3,38 mmol), [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (309 mg, 0,422 mmol) y K₂CO₃ (895 mg, 6,48 mmol) en 1,4-dioxano (12 ml) y agua (4,0 ml) y calentaron a 110 °C durante 60 min (microondas). La reacción se calentó durante 10 min más y después, durante 30 min más en las mismas condiciones. Se añadieron PdCl₂(dppf) (309 mg, 0,422 mmol), K₂CO₃ (895 mg, 6,48 mmol) y agua (1,5 ml) y la mezcla se calentó a 110 °C durante 30 min (microondas). La mezcla de reacción se repartió entre carbonato ácido sódico acuoso saturado (150 ml) y DCM (3 x

150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y se evaporaron al vacío. El residuo se disolvió en DCM, la solución se aplicó a un cartucho de sílice (100 g) y se purificó el cartucho eluido con un gradiente de acetato de etilo/ciclohexano (0-100 % sobre 10 VC seguido de acetato de etilo al 100 % sobre 5 VC). El cartucho se lavó usando un gradiente de metanol/DCM (0-20 % sobre 10 VC seguido de mantenimiento en metanol al 20 %/DCM sobre 5 VC). El cartucho se lavó adicionalmente usando un gradiente de amoniaco 2 M en metanol/DCM (0-20 % sobre 10 VC, seguido de amoniaco 2 M en metanol/DCM 20 % sobre 5 VC). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron al vacío, dejando 1-((2S,4R)-4-amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (631 mg, 1,921 mmol, rendimiento 68 %) en forma de un vidrio de color pardo. CLEM (HpH), Tr 0,68 min, MH+ 329

Ejemplo 1

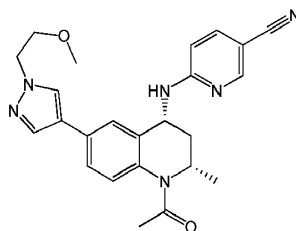
((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-{1-[2-(metiloxi)etil]-1H-pirazol-4-il}-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)carbamato de 1-metiletilo



Se combinaron [(2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil]carbamato de 1-metiletilo (para la preparación, véase el Intermedio 1) (185 mg), 1-[2-(metiloxi)etil]-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (para una preparación, véase Journal of Heterocyclic Chemistry, 41(6), 931-939; 2004) (151 mg), carbonato potásico (90 mg) y *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) (28,9 mg) en etanol y tolueno en una atmósfera de nitrógeno y se calentaron a 80 °C durante 18 h. La reacción se concentró, el residuo se repartió entre acetato de etilo (10 ml) y agua (10 ml) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (25 ml), se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por MDAP (formiato x 2) y el producto recogido se disolvió en 1,4-dioxano (0,5 ml), se enfrió en un baño de CO₂ y después se dejó en un liofilizador durante una noche. El sólido de color blanco resultante se secó a 40 °C al vacío durante una noche, dando ((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-{1-[2-(metiloxi)etil]-1H-pirazol-4-il}-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)carbamato de 1-metiletilo (84,7 mg). CLEM (formiato), Tr 0,84 min, MH+ 415

Ejemplo 2

6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo



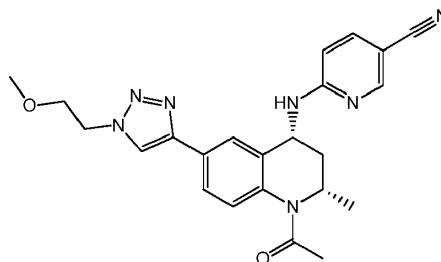
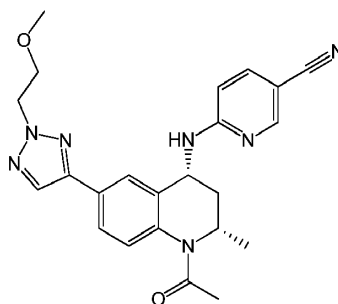
Un vial para microondas se cargó con 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para una preparación, véase el Intermedio 6) (74 mg, 0,192 mmol), 1-(2-metoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (CAS n.º 847818-71-7 disponible en Milestone PharmTech USA Inc.) (63 mg, 0,250 mmol), [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaldio (II) (21 mg, 0,029 mmol), carbonato potásico (56 mg, 0,405 mmol), agua (0,5 ml), y 1,4-dioxano (1,5 ml). El vial se cerró herméticamente y se calentó a 120 °C durante 30 min (microondas). La solución de reacción se diluyó con agua (10 ml), se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba). El disolvente se evaporó al vacío. El residuo se disolvió en metanol/DMSO (1:1, 1 ml) y se purificó por MDAP (TFA). El disolvente se evaporó en una corriente de nitrógeno, el residuo se disolvió de nuevo en metanol y se filtró a través de un aminopropil SPE (2 g). El disolvente se evaporó al vacío, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (40 mg) en forma de un sólido de color blanco. CLEM (formiato): Tr 0,82 min, MH+ 431.

Ejemplo 2, preparación alternativa**6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo**

Se combinaron 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-bromo-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (Intermedio 6) (10 g, 26,0 mmol), PEPPSI™ (1,764 g, 2,60 mmol), KOH (4,37 g, 78 mmol) y 1-(2-metoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (CAS n.º 847818-71-7 disponible en Milestone PharmTech USA Inc.) (11,78 g, 46,7 mmol) en una mezcla de tolueno (80 ml), EtOH (40 ml) y agua (50 ml). La mezcla se desgasificó y después se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 6 h. La solución se enfrió, se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con agua (200 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró al vacío, dando una goma de color amarillo pálido. Esta goma de color amarillo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna de 330 g, eluyendo con EtOAc al 0-100 %/ciclohexano seguido de MeOH al 10 %/EtOAc). Las fracciones apropiadas se recogieron y el disolvente se evaporó al vacío, dando el producto en bruto que se purificó adicionalmente por HPLC preparativa (Procedimiento HpH) y después se secó durante una noche en un horno de vacío a 55 °C, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (4,62 g).

CLEM (formiato): Tr 0,82 min, MH⁺ 431.

RMN ¹H (DMSO-d₆): 8,42 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,97 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,79 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,48 (dd, J = 8,1, 2,2 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,79 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,99 (s, 1H), 4,62 - 4,77 (m, 1H), 4,26 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,63 - 3,71 (m, 2H), 3,21 (s, 3H), 2,56 (ddd, J = 12,7, 8,3, 4,6 Hz, 1H), 2,09 (s, 3H), 1,24 - 1,38 (m, 1H), 1,08 (d, J = 6,2 Hz, 3H)

Ejemplo 3**6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo****Ejemplo 4****6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(2-(2-metoxietil)-2H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo**

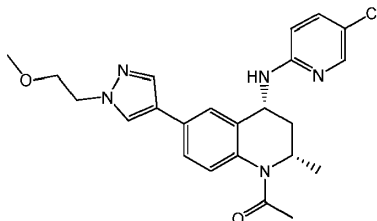
Una solución de 6-(((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-(1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (para una preparación, véase el Intermedio 8) (50 mg, 0,134 mmol) en DMF (3 ml) se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-agua. A la solución se le añadieron 1-bromo-2-metoxietano (0,04 ml, 0,420 mmol) y carbonato potásico (56 mg, 0,405 mmol). Después, la solución se dejó calentar a temperatura ambiente, y se agitó a condiciones ambientales durante 2 h. A la solución de reacción se le añadió yoduro sódico (61 mg, 0,407 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la reacción se le añadieron 1-bromo-2-metoxietano (0,013 ml, 0,134 mmol), carbonato potásico (21 mg, 0,152 mmol) y yoduro sódico (21 mg, 0,140 mmol), que se calentó a 60 °C durante 1 h. A la reacción se le añadieron porciones adicionales de 1-bromo-2-metoxietano (0,013 ml, 0,134 mmol), carbonato potásico (21 mg, 0,152 mmol) y yoduro sódico (21 mg, 0,140 mmol) y el calentamiento continuó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo con DCM (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron (frita hidrófoba). Después, el disolvente se evaporó al vacío, la muestra se disolvió de nuevo en metanol/DMSO (1:1, 1 ml) y se purificó por MDAP

(formiato). Ambos regioisómeros se recogieron, dando 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (8 mg) y 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(2-(2-metoxietil)-2H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo (18 mg).

- 5 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo CLEM (formiato), Tr 0,78 min, MH+ 432, 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(2-(2-metoxietil)-2H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo CLEM (formiato), Tr 0,86 min, MH+ 432.

Ejemplo 5

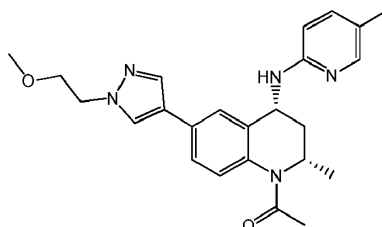
1-((2S,4R)-4-((5-cloropiridin-2-il)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona



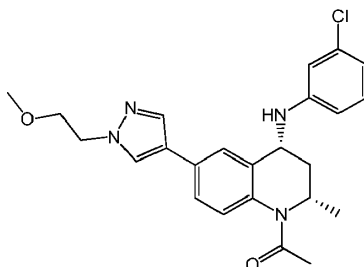
- 10 Se combinaron 1-((2S,4R)-4-amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 11) (100 mg, 0,304 mmol), 2-bromo-5-cloropiridina (117 mg, 0,609 mmol), Davephos (23,97 mg, 0,061 mmol), Pd₂(dba)₃ (27,9 mg, 0,030 mmol) y terc-butoxido sódico (58,5 mg, 0,609 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) y la mezcla se desgasificó durante un periodo de 20 min antes de calentarse a 120 °C durante 25 min (microondas). La mezcla de reacción se repartió entre agua (100 ml) y DCM (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y se evaporaron al vacío. El aceite de color pardo residual se disolvió en DMSO (2 x 1 ml) y se purificó por MDAP (HpH x 2). El disolvente se evaporó al vacío, dando 1-((2S,4R)-4-((5-cloropiridin-2-il)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (51 mg, 0,116 mmol, rendimiento del 38 %) en forma de un vidrio de color amarillo. CLEM (formiato), Tr 0,87 min, MH+ 440.

Ejemplo 6

1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpiridin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona

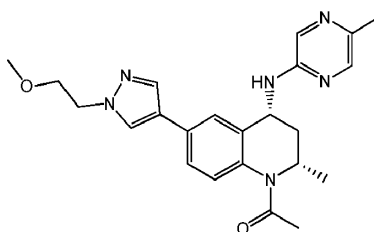


- 25 Se combinaron 1-((2S,4R)-4-amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 7) (100 mg, 0,304 mmol), 2-bromo-5-metilpiridina (105 mg, 0,609 mmol), Davephos (23,97 mg, 0,061 mmol), Pd₂(dba)₃ (27,9 mg, 0,030 mmol) y terc-butoxido sódico (58,5 mg, 0,609 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) y la mezcla se desgasificó durante un periodo de 20 min. La mezcla se calentó a 120 °C durante 25 min (microondas). La mezcla de reacción se repartió entre agua (100 ml) y DCM (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y se evaporaron al vacío. El aceite de color pardo residual se disolvió en DMSO (2 x 1 ml) y se purificó por MDAP (HpH x 2). El disolvente se evaporó al vacío, dando 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpiridin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (49 mg, 0,117 mmol, rendimiento del 38 %) en forma de un vidrio de color amarillo. CLEM (formiato), Tr 0,61 min, MH+ 420.

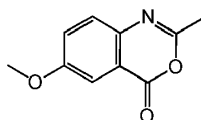
Ejemplo 7**1-((2S,4R)-4-((3-clorofenil)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona**

5

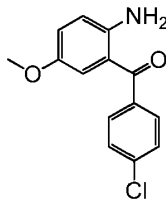
Se combinaron 1-((2S,4R)-4-Amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 7) (100 mg, 0,304 mmol), 1-bromo-3-clorobenceno (0,072 ml, 0,609 mmol), Davephos (24 mg, 0,061 mmol), Pd₂(dba)₃ (27,9 mg, 0,030 mmol) y terc-butoxido sódico (58,5 mg, 0,609 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) y la mezcla se desgasificó durante un periodo de 20 min. La mezcla se calentó a 120 °C durante 25 min (microondas). La mezcla de reacción se repartió entre agua (100 ml) y DCM (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y se evaporaron al vacío. El aceite de color pardo residual se disolvió en DMSO (2 x 1 ml) y se purificó por MDAP (formiato x 2). El disolvente se evaporó al vacío, el residuo se disolvió en DCM y se aplicó a un cartucho de sílice (10 g). El cartucho se eluyó con un gradiente de acetato de etilo/ciclohexano (0-100 % sobre 10 VC seguido de mantenimiento en acetato de etilo al 100 % durante 5 VC). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron al vacío, dando 1-((2S,4R)-4-((3-clorofenil)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (39 mg, 0,089 mmol, rendimiento del 29 %) en forma de un vidrio incoloro. CLEM (formiato), Tr 1,05 min, MH⁺ 438.

Ejemplo 8**1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpirazin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona**

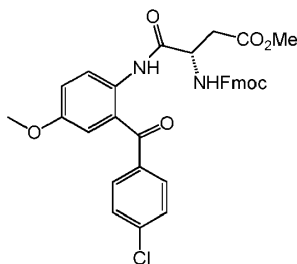
Se combinaron 1-((2S,4R)-4-Amino-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (para una preparación, véase el Intermedio 7) (150 mg, 0,457 mmol), 2-cloro-5-metilpirazina (147 mg, 1,142 mmol), Davephos (71,9 mg, 0,183 mmol), Pd₂(dba)₃ (84 mg, 0,091 mmol) y terc-butoxido sódico (132 mg, 1,370 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) y la mezcla se calentó a 120 °C durante 25 min (microondas). La mezcla de reacción se repartió entre agua (75 ml) y DCM (3 x 75 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (frita hidrófoba) y se evaporaron al vacío. El aceite de color pardo resultante se disolvió en DMSO (3 x 1 ml) y se purificó por MDAP (formiato x 3). El disolvente se evaporó al vacío, dando 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpirazin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona (91 mg, 0,216 mmol, rendimiento del 47 %) en forma de un vidrio de color amarillo. CLEM (formiato), Tr 0,75 min, MH⁺ 421.

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

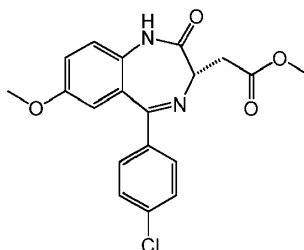
Una solución de ácido 5-metoxiantranílico (Lancaster) (41,8 g, 0,25 mol) se calentó a reflujo en anhídrido acético (230 ml) durante 3,5 h antes de concentrarse a presión reducida. Después, el compuesto en bruto se concentró dos veces en presencia de tolueno antes de filtrarse y lavarse dos veces con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

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

A una solución de 2-metil-6-(metiloxi)-4H-3,1-benzoxacin-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 añadió le gota a gota una solución de bromuro de 4-clorofenilmagnesio (170 ml, 1 M en éter dietílico, 0,17 mol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h antes de inactivarse con HCl 1 N (200 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Después, el compuesto en bruto se disolvió en etanol (400 ml) y se añadió HCl 6 N (160 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h antes de concentrarse hasta un tercio en volumen. El sólido resultante se filtró y se lavó dos veces con éter antes de suspenderse en EtOAc y neutralizarse con hidróxido sódico 1 N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo (39 g, rendimiento del 88 %) CL/EM (Procedimiento D): m/z 262 [M+H]⁺, Tr 2,57 min.

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

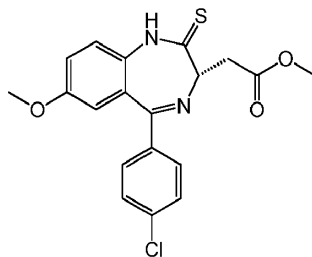
Se disolvió N-[[[(9H-fluoren-9-ilmetil)oxi]carbonil]-L- α-aspartil cloruro de metilo (Int. J. Peptide Protein Res. 1992, 40, 13-18) (93 g, 0,24 mol) en CHCl₃ (270 ml) y se añadió [2-amino-5-(metiloxi)fenil](4-clorofenil)metanona (para una preparación, véase el Compuesto de referencia B) (53 g, 0,2 mol).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

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

A una solución de N1-[2-[(4-clorofenil)carbonil]-4-(metiloxi)fenil]-N2-[[[(9H-fluoren-9-ilmetil)oxi]carbonil]-L-α-asparaginato de metilo (para una preparación, véase el Compuesto de referencia C) (asumidos 0,2 mol) en DCM (500 ml) se le añadió Et₃N (500 ml, 3,65 mol) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h antes de concentrarse. La amina en bruto resultante se disolvió en 1,2-DCE (1,5 l) y se añadió cuidadosamente AcOH (104 ml, 1,8 mol). Después, la mezcla de reacción se agitó 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 (x 3). 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 recrystalizó en MeCN, conduciendo al compuesto del título (51 g) en forma de un sólido de color amarillo pálido. El filtrado pudo concentrarse y recrystalizarse en MeCN, dando 10 g más del producto deseado F_r = 0,34 (DCM/MeOH:95/5).

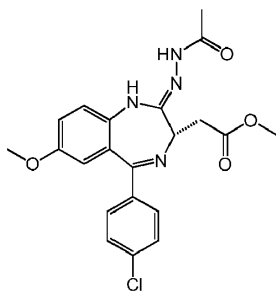
EMAR MH⁺ calculado para C₁₉H₁₈³⁵ClN₂O₄ 373,0955; observado 373,0957.

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



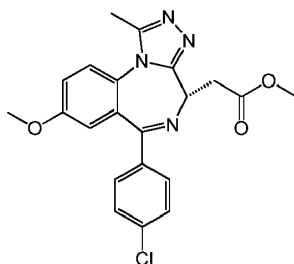
Una suspensión de P_4S_{10} (36,1 g, 81,1 mmol) y Na_2CO_3 (8,6 g, 81,1 mmol) en 1,2-DCE (700 ml) a temperatura ambiente se agitó durante 2 h antes de añadir [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo (para una preparación, véase el Compuesto de referencia D) (16,8 g, 45,1 mmol). La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 2 h antes de enfriarse y filtrarse. El sólido se lavó dos veces con DCM y el filtrado se lavó con carbonato ácido sódico sat. y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH:99/1), proporcionando el compuesto del título (17,2 g, rendimiento del 98 %) en forma de un sólido de color amarillento. CL/EM (Procedimiento D): m/z 389 $[M(^{35}Cl)+H]^+$, Tr 2,64 min EMAR MH+ calculado para $C_{19}H_{18}^{35}ClN_2O_3S$ 389,0727; observado 389,0714.

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



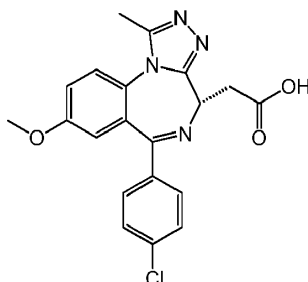
A una suspensión de [(3S)-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo (para una preparación, véase el Compuesto de referencia E (9,0 g, 23,2 mmol) en THF (300 ml) a 0 °C se le añadió gota a gota hidrazina monohidrato (3,4 ml, 69,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h entre 5 °C y 15 °C antes de enfriarse a 0 °C. Después, se añadió lentamente Et_3N (9,7 ml, 69,6 mmol) y se añadió gota a gota cloruro de acetilo (7,95 ml, 69,6 mmol). Después, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante 16 h 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 Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío, dando el compuesto del título en bruto (9,7 g, rendimiento del 98 %) que se usó sin purificación adicional. F_r = 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



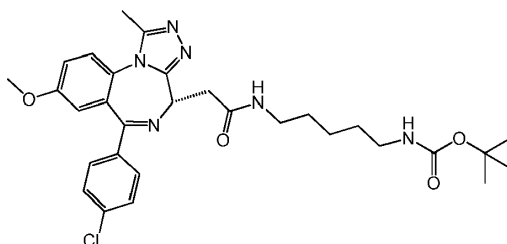
El [(3S)-2-[(1Z)-2-acetilhidrazino]-5-(4-clorofenil)-7-(metiloxi)-3H-1,4-benzodiazepin-3-il]acetato de metilo en bruto (para una preparación, véase el Compuesto de referencia F) (asumidos 9,7 g) se suspendió en THF (100 ml) y se añadió AcOH (60 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 2 días antes de concentrarse a presión reducida. El sólido en bruto se trituró en i -Pr₂O y se filtró, dando el compuesto del título (8,7 g, 91 % en 3 etapas) en forma de un sólido de color blanquecino. EMAR MH+ calculado para $C_{21}H_{20}ClN_4O_3$ 411,1229; observado 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



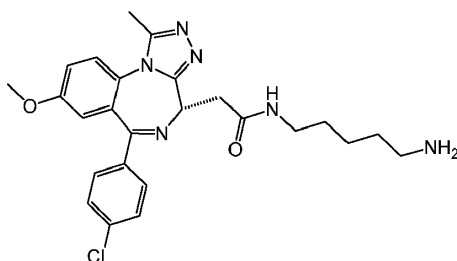
A una solución de [(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetato de metilo (para una preparación, véase el Compuesto de referencia G) (7,4 g, 18,1 mmol) en THF (130 ml) a temperatura ambiente se le añadió hidróxido sódico 1 N (36,2 ml, 36,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 5 h antes de inactivarse con HCl 1 N (36,2 ml) y concentrarse al vacío. Después, se añadió agua y la fase acuosa se extrajo con DCM (x 3) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, dando el compuesto del título (7 g, rendimiento del 98 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

Compuesto de referencia H: [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 una preparación, véase el Compuesto de referencia G) (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 ésta se le añadió (4-aminobutil)carbamato de 1,1-dimetiletilo (1,05 ml, 5,0 mmol, disponible en Aldrich). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h antes de concentrarse. El residuo se recogió en diclorometano y se lavó con HCl 1 N. La fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano. Se lavó la fase orgánica con hidróxido sódico 1 N seguido de una solución saturada de cloruro sódico, se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando 95/5 de diclorometano/metanol, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,2 g). CL/EM (Procedimiento D): Tr = 3,04 min.

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



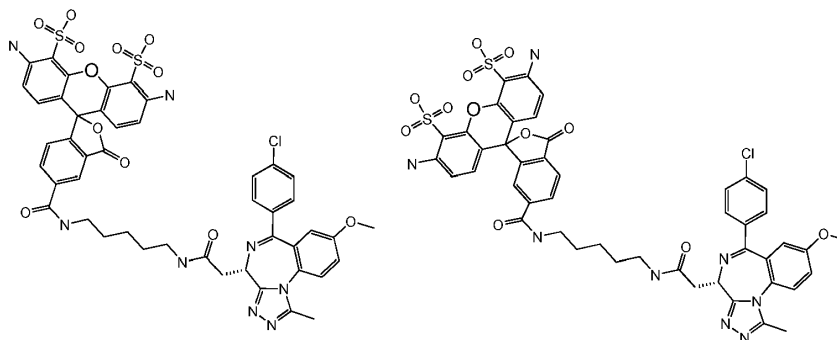
.TFA

A una solución de [5-({[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-8-(metiloxi)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-il]acetil}amino)pentil]carbamato de 1,1-dimetiletilo (para una preparación, véase el Compuesto de referencia H) (0,2 g, 0,34 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió gota a gota ácido trifluoroacético (0,053 ml, 0,68 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h de 0 °C a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo higroscópico (200 mg)

CL/EM (Procedimiento D): Tr = 2,33 min.

EMAR MH⁺ calculado para C₂₅H₂₉ClN₆O₂ 481,2119; observado 481,2162.

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



- 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 una preparación, véase el Compuesto de referencia J) (7,65 mg, 0,013 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF) (300 µl) y se añadió a succinimidil éster del ácido carboxílico Alexa Fluor 488 (5 mg, 7,77 µmol, mezcla de isómeros 5 y 6, disponible en Invitrogen, producto número A-20100) en un tubo de centrifuga Eppendorf. Se añadió base de Hunig (7,0 µl, 0,040 mmol) y la mezcla se mezcló vorticialmente durante una noche. Después de 18 h, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió de nuevo en DMSO/agua (50 %, <1 ml total), se aplicó a una columna preparativa Phenomenex Jupiter C18 y se diluyó con un gradiente de 95 % de A: 5 % de B a B al 100 % (A = ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua, B = TFA al 0,1 %/acetonitrilo al 90 %/agua al 10 %) a un caudal de 10 ml/min durante 150 minutos. Las fracciones impuras se combinaron y se purificaron de nuevo usando el mismo sistema. Las fracciones se combinaron y se evaporaron, produciendo el producto del título (2,8 mg) en forma de una mezcla de los 2 regioisómeros mostrados. CL/EM (Procedimiento F);, MH+ = 999, tr = 1,88 min.

Procedimientos de ensayo biológico

Ensayo de unido por anisotropía de fluorescencia

La unión de los compuestos de fórmula (I) a Bromodominio BRD2, BRD3 y BRD4 se puede valorar usando un Ensayo de Unión por Anisotropía de Fluorescencia.

- Se incuban juntos la proteína de Bromodominio, el ligando fluorescente (compuesto de referencia K véase anteriormente) y una concentración variable de compuesto de ensayo para alcanzar el equilibrio termodinámico bajo condiciones de modo que la ausencia de compuesto de ensayo el ligando fluorescente esté significativamente (>50 %) unido y en presencia de una concentración suficiente de un inhibidor potente la anisotropía del ligando fluorescente no unido sea apreciablemente diferente del valor del unido.
- Todos los datos se normalizaron a la media de 16 de altos pocillos control y 16 bajos en cada placa. A continuación, se aplicó un ajuste de curva de cuatro parámetros de la siguiente forma:

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

en la que "a" es el mínimo, "b" es la pendiente Hill, "c" es pIC₅₀ y "d" es el máximo.

- Se expresaron Bromodominios Humanos Recombinantes (Bromodominio BRD2 (1-473), Bromodominio BRD3 (1-435) y Bromodominio BRD4 (1-477)) en células de *E. coli* (en el vector pET15b) con una etiqueta de 6-Histidina (6-His Tag) en el N-terminal. El bromodominio marcado con Histidina se extrae de las células de *E. coli* usando 0,1 mg/ml de lisozima y sonicación. A continuación, se purificó el bromodominio mediante cromatografía de afinidad en una columna HP HisTRAP, eluyendo con un gradiente de imidazol 10-500 mM lineal, sobre 20 Cv. Se completó la purificación adicional por columna de exclusión por tamaño de Superdex 200 prep grade. La proteína purificada se almacenó a -80 °C en HEPES 20 mM pH 7,5 y NaCl 100 mM.

- Protocolo para Bromodominio BRD2:** Todos los componentes se disolvieron en composición tampón de HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales de Bromodominio 2, 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 µl de esta mezcla de reacción usando un micro multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones de compuesto de ensayo o vehiculizante DMSO (1 % final) en placa de microtitulación (microtiter) de bajo volumen negra de 384 pocillos Greiner y se calibró en oscuridad 60 min a temperatura ambiente. La anisotropía de fluorescencia se leyó en Envision (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 530 nm; Dicroico - 505 nm).

- Protocolo para Bromodominio BRD3:** Todos los componentes se disolvieron en tampón de composición HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales de Bromodominios 3 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 µl de esta mezcla de reacción usando un micro multidrop a pocillos que

contenían 100 nl de diversas concentraciones de compuesto de ensayo o vehiculizante DMSO (1 % final) en placa de microtitulación (microtiter) de bajo volumen negra de 384 pocillos Greiner y se calibró en oscuridad 60 min a temperatura ambiente. La anisotropía de fluorescencia se leyó en Envision ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 530 \text{ nm}$; Dicroico - 505 nm).

- 5 Protocolo para Bromodominio BRD4: Todos los componentes se disolvieron en tampón de composición HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CHAPS 0,5 mM con concentraciones finales de Bromodominio 4 75 nM, ligando fluorescente 5 nM. Se añadieron 10 μl de esta mezcla de reacción usando un micro multidrop a pocillos que contenían 100 nl de diversas concentraciones del compuesto de ensayo o vehiculizante DMSO (1 % final) en placa de microtitulación (microtiter) de bajo volumen negra de 384 pocillos Greiner y se calibró en oscuridad 60 min a temperatura ambiente. La anisotropía de fluorescencia se leyó en Envision ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 530 \text{ nm}$; Dicroico - 505 nm).

Se ensayó el Ejemplo 1 en uno o más de los ensayos anteriores y se encontró que tenía un $\text{pIC}_{50} \geq 6,5$.

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

- 15 La unión de los compuestos de fórmula (I) a Bromodominios BRD2, BRD3 y BRD4 se valoró usando un ensayo de unión por transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en tiempo, que mide la unión de un péptido de histona acetilada a la proteína del bromodominio.

- Se incuban juntos la proteína de bromodominio, el péptido de histona y una concentración variable de compuesto de ensayo para alcanzar el equilibrio termodinámico. El ensayo se configura de modo que en ausencia de compuesto de ensayo el bromodominio y el péptido estén significativamente unidos (~30 %) y en presencia de una concentración suficiente de un inhibidor potente esta interacción esté interrumpida conduciendo a una bajada apreciable en la transferencia de energía por 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. 3TFA

- 25 El péptido protegido se montó sobre un sintetizador de fase sólida usando resina Wang precargada y utilizando protocolos de síntesis de Fmoc estándares. Se protegió la lisina C-terminal mediante un hiper grupo lábil de ácido que permite su separación selectiva en el extremo del montaje 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, a continuación, se purificó usando una columna de fase inversa C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo tamponado con TFA al 0,1 %. Se analizaron las fracciones resultantes y las fracciones que eran puras a >95 % mediante HPLC analítica y que daban el pm correcto (mediante espectroscopia de masa MALDITOF) se juntaron y se liofilizaron. El material final se analizó mediante HPLC para confirmar la pureza.

- 35 Producción de proteína: Se expresaron Bromodominios Humanos Recombinantes (BRD2 (1-473), BRD3 (1-435) y BRD4 (1-477)) en células de *E. coli* (en el vector pET15b) con una etiqueta de 6-Histidina (6-His tag) en el N-terminal. El bromodominio marcado con Histidina se extrajo de las células de *E. coli* usando sonicación y se purificó usando una columna de sefarsa de níquel 6FF, las proteínas se lavaron y, a continuación, se eluyeron con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e imidazol 20 mM. La purificación adicional se realizó mediante cromatografía de afinidad sobre una columna HP HisTRAP, eluyendo con un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-500 mM, sobre 20 volúmenes de columna. La purificación final se completó por columna de exclusión por tamaño Superdex 200 prep grade. La proteína purificada se almacenó a -80°C en HEPES 20 mM pH 7,5 y NaCl 100 mM. La identidad de proteína se confirmó mediante identificación por huella de masa de péptido y el peso molecular previsto se confirmó por espectrometría de masa.

- 45 Protocolo para ensayos de Bromodominio BRD2, 3 y 4: Todos los componentes del ensayo se disolvieron en una composición tampón de HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM y CHAPS 0,5 mM. La concentración final de las proteínas de bromodominio eran de 100 nM y el péptido de histona era de 300 nM, estos componentes están premezclados y se dejaron equilibrarse durante 1 hora en oscuridad. Se añadieron 8 μl de esta mezcla de reacción a todos los pocillos que contenían 50 nl de diversas concentraciones de compuestos de ensayo o vehiculizante DMSO (final al 0,5 %) en placas de microtitulación (microtiter) de bajo volumen negra de 384 pocillos Greiner y se incubó en oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 μl de la mezcla de investigación que contenía anticuerpo marcado anti-6his XL665 y estreptavidina marcada con criptato de europio a todos los pocillos y se realizó una incubación en oscuridad adicional de al menos 30 min. A continuación, las placas se leyeron en el lector de placa Envision, ($\lambda_{\text{ex}} = 317 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM donante}} = 615 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM aceptor}} = 665 \text{ nm}$; LANCE dual dicroico). Se realizaron mediciones de la intensidad fluorescente resuelta en tiempo a ambas longitudes de onda de emisión y se calculó la proporción de aceptor/donante y se usó para el análisis de datos. Todos los datos se normalizaron a la media de 16 pocillos control altos y 16 bajos en cada placa. A continuación, se aplicó un ajuste de curva de cuatro parámetros de la siguiente forma:

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

en la que "a" es el mínimo, "b" es la pendiente Hill, "c" es pIC50 y "d" es el máximo.

Se ensayaron los Ejemplos 2-8 en cada uno de los ensayos anteriores y se encontró que tenían pIC50s en el intervalo de 6,5-7,2. Se encontró que el Ejemplo 2 tenía pIC50 en el intervalo de 6,9-7,2 en cada uno de los ensayos anteriores.

Medición de la secreción de IL-6 inducida por LPS a partir de la sangre total

La activación de monocitos mediante agonistas de receptores tipo toll tales como lipopolisacáridos (LPS) bacterianos dan como resultado la producción de mediadores inflamatorios claves incluyendo IL-6. Ampliamente se considera que tales rutas son fundamentales a la patofisiología de una variedad de trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Se diluyeron los compuestos a ensayar para dar un intervalo de concentraciones apropiadas de las cuales se añadieron µl de los stocks diluidos a una placa de 96 pocillos. Después de la adición de la sangre total (130 µl) se incubaron las placas a 37 grados (CO₂ al 5%) durante 30 min 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 incubación adicional durante 24 horas a 37 grados, se añadieron 140 µl de PBS a cada pocillo. Las placas se sellaron, se agitaron durante 10 minutos y a continuación se centrifugaron (2.500 rpm x 10 min). Se separaron 100 µl del sobrenadante y se analizaron los niveles de IL-6 mediante inmunoensayo (generalmente por Meso Scale Discovery technology) o bien inmediatamente o después de almacenamiento a -20 grados. Las curvas de la respuesta de concentración para cada compuesto se generaron a partir de los datos y se calculó un valor IC₅₀.

Se ensayaron los Ejemplos 1-8 en el ensayo anterior y se encontró que tenían pIC50s en el intervalo de 6,0-6,9. El Ejemplo 2 se encontró que tenía un pIC50 de 6,7 en el ensayo anterior.

Modelo de endotoxemia en ratón *in vivo*

Altas dosis de endotoxina (lipopolisacárido bacteriano) administrado a animales producen un síndrome de shock intenso incluyendo una fuerte respuesta inflamatoria, desregulación de la función cardiovascular, fallo de órgano y finalmente mortalidad. Este patrón de respuesta es muy similar a la sepsis humana y al shock séptico, donde la respuesta del cuerpo a una infección bacteriana significativa puede estar del mismo modo amenazando la vida.

Para ensayar los compuestos para su uso en la invención se da a grupos de ocho ratones macho Balb/c una dosis letal de 15 mg/kg de LPS por inyección intraperitoneal. Noventa minutos después, se medican los animales intravenosamente con vehiculizante (ciclodextrina al 20 %, etanol al 1 % en agua de apirógena) o compuesto (10 mg/kg). Se hace un seguimiento de la supervivencia de los animales a los 4 días.

Ensayo del crecimiento celular de oncología

Se cultivaron líneas celulares humanas (n = 33 comprendiendo 15 líneas de hemoglobina, 14 líneas de células de pecho y 4 de otras líneas celulares) en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, se sembraron en placa 1.000 células viables por pocillo en placas de poliestireno de fondo plano negras de 384 pocillos (Greiner N°781086) en 48 µl de medios de cultivo. Todas las placas se colocaron en CO₂ al 5%, 37 °C durante la noche. Al día siguiente se recogió una placa con CellTiter-Glo (CGT, Promega N°G7573) para una medición a tiempo igual a 0 (T0) y se añadió el compuesto (20 titulación puntual desde 14,7 µM a 7 pM) a las placas restantes. La concentración final de DMSO en todos los pocillos era de 0,15 %. Las células se incubaron durante 72 horas o el tiempo indicado y cada placa se mostró con reactivo 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 el Analyst GT (Molecular Devices) o lector de placa EnVision (Perkin Elmer).

Los resultados se expresaron como porcentaje del T0 y se trazaron frente a la concentración de compuesto. El valor T0 se normalizó al 100 % y representa el número de células en el momento de la adición del compuesto y los datos de respuesta de concentración se ajustaron con un ajuste de curva de 4 parámetros usando el programa informático XLfit (modelo 205). La concentración que presentó crecimiento celular por el 50 % (glC50) es el punto medio de la "ventana de crecimiento" (entre el T0 y DMSO control). El valor Ymin-T0 se determina mediante la resta del valor T0 (100 %) al valor Ymin (%) determinado a partir del ajuste de la curva de respuesta de concentración. Los valores de los pocillos sin células se restaron de todas las muestras para corrección del ruido de fondo.

Medición de células infectadas por HPV

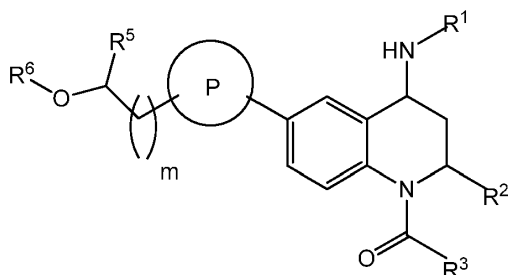
El clon de célula W12 N°20850, derivado de un carcinoma cervical de bajo grado (Stanley y col., *Int. J. Cancer*. V. 43. P.672-676. 1989), lleva genomas HPV16 episomales, mantenidos en aproximadamente 100 copias por célula. Se usó la línea celular epitelial C33A, que no estaba infectada con ninguna cepa de HPV como célula control negativo para valorar la citotoxicidad no específica.

Se cultivaron células W12 y C33A con el compuesto del Ejemplo 2 durante 2 días y se hizo un seguimiento del contenido celular viable mediante la valoración [ATP] al final de este periodo. Los datos se normalizaron a las células tratadas control con DMSO en el día 2.

- 5 El compuesto redujo la viabilidad de la célula W12 de una manera dependiente de concentración (valor de pIC₅₀ medio de $7,09 \pm 0,14$, n=4) (con efecto limitado sobre las células control negativas C33A). La viabilidad a la máxima concentración ensayada (3 μ M) era de 34,8 % y 73,5 % en células W12 y C33A respectivamente. Estos datos muestran un efecto específico sobre las células víricamente infectadas y por lo tanto esos compuestos de la invención pueden tener utilidad en el tratamiento de células epiteliales infectadas por HPV.

REIVINDICACIONES

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

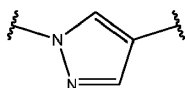


(I)

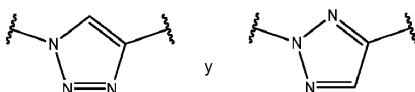
en la que

- 5 P es pirazolilo o triazolilo;
R¹ es un grupo seleccionado entre fenilo, piridilo, pirazinilo y pirimidinilo, estando dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados entre halógeno, alquilo C₁₋₄ y CN;
R² es alquilo C₁₋₄;
R³ es alquilo C₁₋₄;
10 R⁵ es H o alquilo C₁₋₄;
R⁶ es alquilo C₁₋₄;
o R⁵ y R⁶, junto con el O al que R⁶ está unido, forman un anillo oxetanilo, tetrahidrofuranoilo o tetrahidropiranilo;
m es 1 o 2.

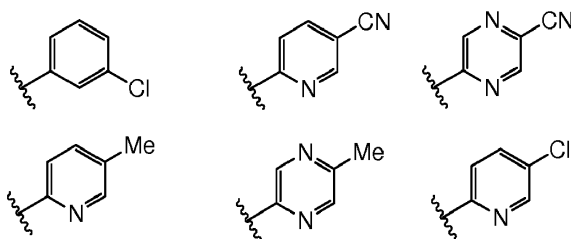
2. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que P es un grupo



3. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que P es un grupo seleccionado entre



4. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que R¹ se selecciona entre



5. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que R² es metilo.

6. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que R³ es metilo.

7. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que m es 1.

8. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que R⁵ es hidrógeno.

9. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que R⁶ es metilo.
10. Un compuesto, o una sal del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que el compuesto de fórmula (I) es el enantiómero (2S, 4R).
- 5 11. Un compuesto que se selecciona entre
 ((2S,4R)-1-acetil-2-metil-6-{1-[2-(metiloxi)etil]-1H-pirazol-4-il}-1,2,3,4-tetrahidro-4-quinolinil)carbamato de 1-metiletilo;
 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo;
 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(2-(2-metoxietil)-2H-1,2,3-triazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo;
 1-((2S,4R)-4-((5-cloropiridin-2-il)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-ilo);
 10 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpiridin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona;
 1-((2S,4R)-4-((3-clorofenil)amino)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-ilo); y
 1-((2S,4R)-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-4-((5-metilpirazin-2-il)amino)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)etanona;
 15 6-(((2S,4R)-1-acetil-6-(1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)amino)nicotinonitrilo
 o una sal del mismo.
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como el definido en la reivindicación 11 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 12 para su uso en terapia.
- 25 15. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de cáncer o una afección autoinmune y/o inflamatoria crónica.