

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 232**

51 Int. Cl.:

C07D 471/10 (2006.01)

C07D 471/20 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2020** **PCT/US2020/044322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2021** **WO21022078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2020** **E 20848360 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 4003345**

54 Título: **Inhibidores duales de ATM y ADN-PK para su uso en terapia antitumoral**

30 Prioridad:

30.07.2019 CN 201910695148
06.08.2019 US 201962883325 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.03.2025

73 Titular/es:

XRAD THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
1800 Pembroke Drive, Suite 300 - No 7239
Orlando, FL 32810, US

72 Inventor/es:

FU, JIANMIN;
WANG, YAODE;
SUN, YUE;
WU, GUOSHENG;
LU, AIJUN;
ZHANG, SHUANG;
GOODNOW, ROBERT, A.;
GILMER, TONA;
KASTAN, MICHAEL y
KIRSCH, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 008 232 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

Inhibidores duales de ATM y ADN-PK para su uso en terapia antitumoral

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer como monoterapia o en combinación con radioterapia, quimioterapia y/o inmunoterapia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

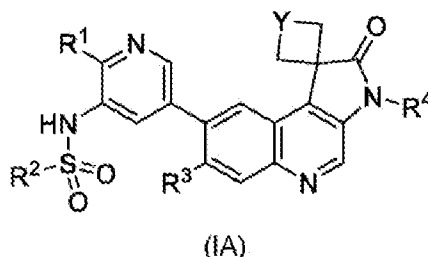
Varios miembros de la familia PIKK (Quinasa tipo PI-3K) de las serina-treonina quinasas son mediadores conocidos de la señalización del daño en el ADN.

La radioterapia (RT) se usa para tratar a más del 50% de los pacientes con cáncer en algún momento durante su enfermedad. A pesar de los importantes esfuerzos realizados, los enfoques anteriores para desarrollar radiosensibilizadores clínicos no han sido muy eficaces, principalmente como resultado de dirigirse a vías no específicas que no son reguladores directos de la respuesta celular a la radiación.

Hay una necesidad de nuevas terapias para enfermedades oncológicas.

SUMARIO DE LA INVENCION

En general, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IA):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

Y es CHR⁵;

R¹ es -O-L-N(R⁷)₂;

R² es alquilo C1-3;

cada R³ es independientemente halógeno o alquilo C1-3;

R⁴ es alquilo;

R⁵ es hidrógeno o benciloxi;

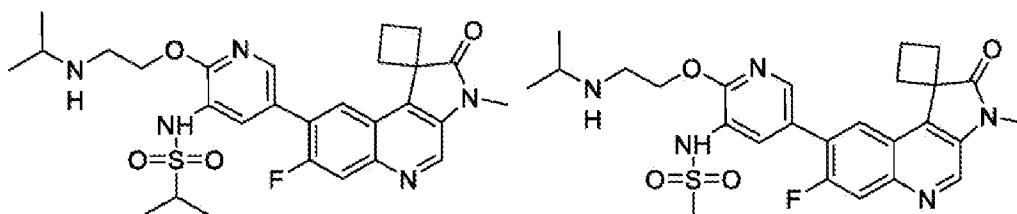
cada R⁷ es independientemente H o alquilo C1-3; y

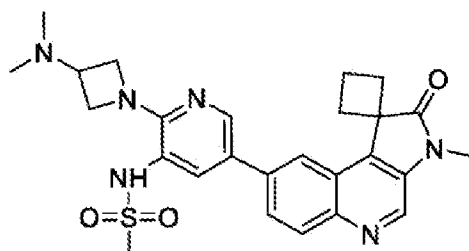
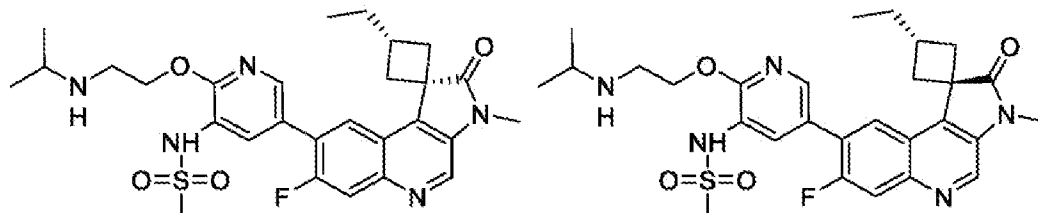
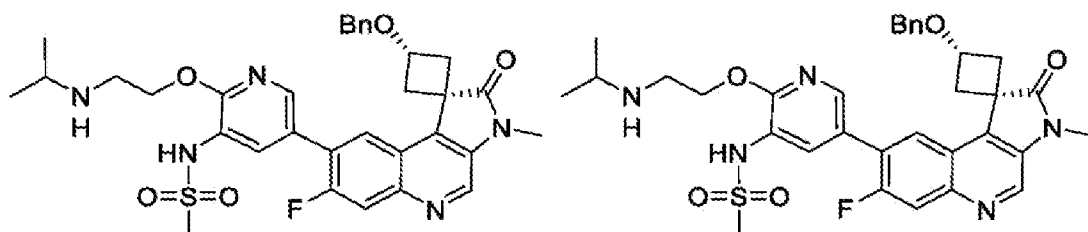
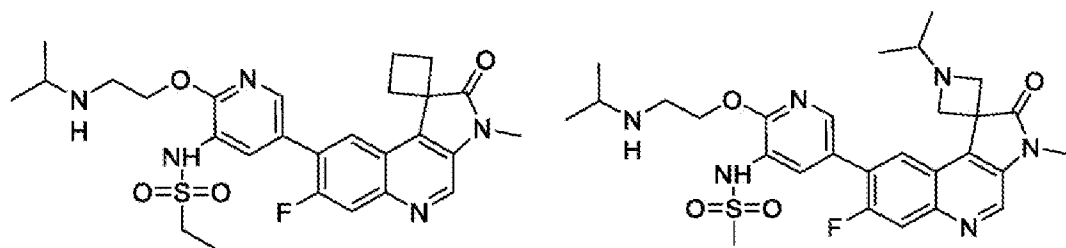
L es etileno.

En realizaciones particulares, R³ es halógeno (por ejemplo, flúor).

En algunas realizaciones, un R⁷ es H, y el R⁷ restante es opcionalmente alquilo C1-3. En ciertas realizaciones, por lo menos un R⁷ es isopropilo. En realizaciones particulares, R² es metilo, etilo o isopropilo. En realizaciones adicionales, R² es metilo. En otras realizaciones más, R⁴ es metilo. En otras realizaciones más, R⁵ es hidrógeno. En otras realizaciones más, R⁵ es alquilo C1-3 opcionalmente sustituido. En otras realizaciones más, R⁵ es benciloxi.

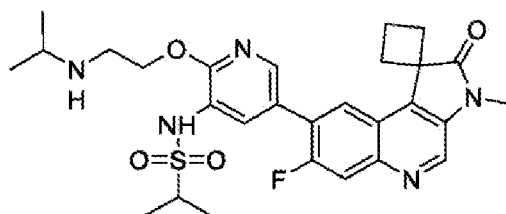
En realizaciones particulares, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:





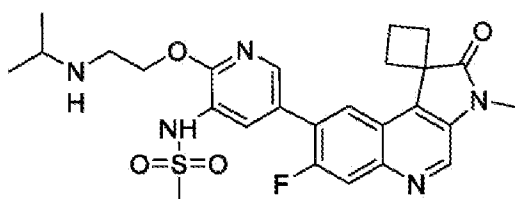
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En realizaciones adicionales, el compuesto tiene la siguiente estructura:



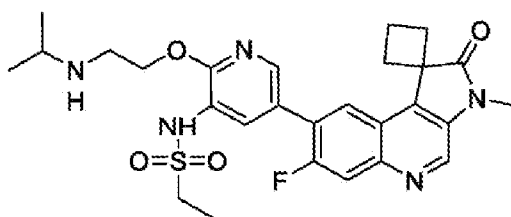
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otras realizaciones más, el compuesto tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otras realizaciones más, el compuesto tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las referencias a los métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad oncológica (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, los cánceres descritos en la presente) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica de la invención a un paciente que lo necesite. En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de una enfermedad oncológica (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, los cánceres descritos en la presente). Las composiciones farmacéuticas incluyen el compuesto de la invención. En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso del compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad oncológica (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, los cánceres descritos en la presente). En algunas realizaciones, la enfermedad oncológica es un cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer bucal, cáncer de boca, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de glándulas salivales, sarcomas, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de vulva o tumor de Wilm. En realizaciones adicionales, la enfermedad oncológica es un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de recto, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, lesiones hepáticas metastásicas, melanoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o carcinoma de células de Merkel.

En algunas realizaciones, el paciente está recibiendo radioterapia. En ciertas realizaciones, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente concomitantemente con la radioterapia. En realizaciones particulares, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente antes de la radioterapia. En realizaciones adicionales, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente después de la radioterapia. En otras realizaciones más, la radioterapia comprende exposición externa, interna, braquiterapia o sistémica, por ejemplo, con un radionucleido (por ejemplo, un radionucleido emisor de β (por ejemplo, ^{32}P Fósforo, ^{67}Cu Cobre, ^{77}Br Bromo, ^{89}Sr Estroncio, ^{90}Y Itrio, ^{105}Rh Rodio, ^{131}I Yodo, ^{137}Cs Cesio, ^{149}Pm Prometeo, ^{153}Sm Samario, ^{166}Ho Holmio, ^{177}Lu Lutecio, ^{186}Re Renio, ^{188}Re Renio, o ^{199}Au Oro), radionucleido emisor de α (por ejemplo, ^{211}At Astatina, ^{213}Bi Bismuto, ^{223}Rn Radio, ^{225}Ac Actinio, o ^{227}Th Torio), radionucleido emisor de rayos γ (por ejemplo, ^{192}Ir Iridio), o radionúclidos captadores de electrones (por ejemplo, ^{67}Ga Galio, ^{103}Pd Paladio, o ^{125}I Yodo)), conjugado de radionúclido anticuerpo (por ejemplo, ^{90}Y -ibritumomab tiuxetán, ^{131}I -tositumomab, ^{225}Ac -lintuzumab satetraxetán, ^{227}Th -anetumab corixetán, ^{90}Y -epitumomab cituxetán, ^{90}Y -clivatuzumab tetraxetán, ^{177}Lu -lilotomab satetraxetán, ^{90}Y -rosopatamab tetraxetán, ^{90}Y -tabituximab barzuxetán, o ^9Y -tacatuzumab tetraxetán), u otro conjugado de radionucleido dirigido (por ejemplo, ^{131}I -PSMA, ^{90}Y -PSMA, ^{177}Lu -PSMA, o ^{177}Lu -satoreotide tetraxetán). Preferiblemente, la radioterapia comprende la administración de un conjugado de

radionúclido y anticuerpo. En otras realizaciones más, el paciente está recibiendo un agente antitumoral. En otras realizaciones, el agente antitumoral es uno o más de cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, valrubicina, idarubicina, calicheamicina o un inhibidor de PARP. En otras realizaciones más, el agente antitumoral es un agente biológico antitumoral y/o un agente inmunoterapéutico antitumoral. En otras realizaciones más, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente concomitantemente con el agente antitumoral. En algunas realizaciones, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente antes del agente antitumoral. En ciertas realizaciones, el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente después del agente antitumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

Debe entenderse que la terminología empleada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa. Además, aunque en la puesta en práctica o ensayo de la invención pueden usarse cualesquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Además de lo anterior, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado:

"Amino" se refiere al radical -NH_2 .
 "Ciano" se refiere al radical -CN .
 "Hidroxilo" se refiere al radical -OH .
 "Imino" se refiere al sustituyente =NH .
 "Nitro" se refiere al radical -NO_2 .
 "Oxo" se refiere al sustituyente =O .
 "Tioxo" se refiere al sustituyente =S .
 "Trifluorometilo" se refiere al radical -CF_3 .

"Alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado lineal, saturado, acíclico, monovalente o a un radical hidrocarbonado ramificado, saturado, acíclico, monovalente, que tiene de uno a doce átomos de carbono, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono o de uno a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (iso-propilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo y similares. Un radical alquilo opcionalmente sustituido es un radical alquilo que está opcionalmente sustituido, si la valencia lo permite, por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, -OR^{14} , -OC(O)-R^{14} , $\text{-N(R}^{14})_2$, -C(O)R^{15} , $\text{-C(O)N(R}^{14})_2$, $\text{-N(R}^{14})C(O)OR^{16}$, $\text{-N(R}^{14})C(O)R^{16}$, $\text{-N(R}^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), -S(O)_pR^{16} (donde p es 0, 1, o 2) y $\text{-S(O)}_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado lineal, acíclico, monovalente o radical hidrocarbonado ramificado, acíclico, monovalente, que contiene uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono, que tiene de dos a doce átomos de carbono, preferiblemente de dos a ocho átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y similares. Un radical alquenilo opcionalmente sustituido es un radical alquenilo que está opcionalmente sustituido, si la valencia lo permite, por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, -OR^{14} , -OC(O)-R^{14} , $\text{-N(R}^{14})_2$, -C(O)R^{15} , -C(O)OR^{14} , $\text{-C(O)N(R}^{14})_2$, $\text{-N(R}^{14})C(O)OR^{16}$, $\text{-N(R}^{14})C(O)R^{16}$, $\text{-N(R}^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), -S(O)_pR^{16} (donde p es 0, 1 o 2) y $\text{-S(O)}_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente, acíclico, lineal, o a un radical hidrocarbonado monovalente, acíclico, ramificado, que contiene uno o dos enlaces triples carbono-carbono y, opcionalmente, uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono, y que tiene de dos a doce átomos de carbono, preferiblemente de dos a ocho átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, etileno, prop-1-ino, but-1-ino, pent-1-ino, penta-1-en-4-ino y similares. Un radical alquinilo opcionalmente sustituido es un radical alquinilo que está opcionalmente sustituido por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, -OR^{14} , -OC(O)-R^{14} , $\text{-N(R}^{14})_2$, -C(O)R^{15} , -C(O)OR^{14} , $\text{-C(O)N(R}^{14})_2$, $\text{-N(R}^{14})C(O)OR^{16}$, $\text{-N(R}^{14})C(O)R^{16}$, $\text{-N(R}^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), -S(O)_pR^{16} (donde p es 0, 1 o 2) y $\text{-S(O)}_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2) donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es

independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Alquilenos" o "cadena de alquilenos" se refiere a una cadena de hidrocarburos lineal, acíclica, saturada y divalente, o una cadena de hidrocarburos ramificada, acíclica, saturada y divalente, que tiene de uno a doce átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno y similares. La cadena de alquilenos está unida mediante enlaces simples. Los puntos de unión de la cadena de alquilenos pueden estar en el mismo átomo de carbono o en átomos de carbono diferentes dentro de la cadena de alquilenos. Una cadena de alquilenos opcionalmente sustituida es una cadena de alquilenos que está opcionalmente sustituida, si la valencia lo permite, por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilano, $-OR^{14}$, $-OC(O)-R^{14}$, $-N(R^{14})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{14}$, $-C(O)N(R^{14})_2$, $-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1 o 2) y $-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2) donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo. En algunas realizaciones, el alquilenos es etileno.

"Alquenilenos" o "cadena de alquenilenos" se refiere a una cadena de hidrocarburos lineal, acíclica y divalente o una cadena de hidrocarburos ramificada, acíclica y divalente, que contiene uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono y que tiene de dos a doce átomos de carbono, por ejemplo, etenileno, propenileno, n-butenileno y similares. La cadena de alquenilenos está unida mediante enlaces simples. Los puntos de unión de la cadena de alquenilenos pueden estar en el mismo átomo de carbono o en átomos de carbono diferentes dentro de la cadena de alquenilenos. Una cadena de alquenilenos opcionalmente sustituida es una cadena de alquenilenos que está opcionalmente sustituida, si la valencia lo permite, por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilano, $-OR^{14}$, $-OC(O)-R^{14}$, $-N(R^{14})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{14}$, $-C(O)N(R^{14})_2$, $-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1 o 2) y $-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2) donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Alquinilenos" o "cadena de alquinilenos" se refiere a una cadena de hidrocarburos lineal, acíclica, divalente, o una cadena de hidrocarburos ramificada, acíclica, divalente, que contiene uno o dos enlaces triples carbono-carbono y, opcionalmente, uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono, y que tiene de dos a doce átomos de carbono, por ejemplo, propinileno, n-butileno y similares. La cadena de alquinilenos se une mediante enlaces simples. Los puntos de unión del alquinilenos pueden estar en el mismo átomo de carbono o en átomos de carbono diferentes dentro de la cadena de alquinilenos. Una cadena de alquinilenos opcionalmente sustituida es una cadena de alquinilenos que está opcionalmente sustituida por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: halo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilano, $-OR^{14}$, $-OC(O)-R^{14}$, $-N(R^{14})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{14}$, $-C(O)N(R^{14})_2$, $-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1 o 2) y $-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 a 2) donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula $-OR_a$ donde R_a es un radical alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de uno a doce átomos de carbono. La parte alquilo del radical alcoxi opcionalmente sustituido está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un radical alquilo.

"Alcoxialquilo" se refiere a un radical de la fórmula $-R_a-O-R_b$ donde R_a es alquilenos y R_b es alquilo como se ha definido anteriormente. Las partes alquilo y alquilenos del radical alcoxialquilo opcionalmente sustituido están opcionalmente sustituidas como se ha definido anteriormente para un radical alquilo y una cadena de alquilenos, respectivamente.

"Aralquilo" se refiere a un radical de la fórmula $-R_a-R_b$, donde R_a es alquilenos y R_b es arilo, como se describe en la presente. Las porciones de alquilenos y arilo del aralquilo opcionalmente sustituido están opcionalmente sustituidas como se describe en la presente para el alquilenos y el arilo, respectivamente.

"Arilo" se refiere a un radical de sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o multicíclico que contiene de 6 a 18 átomos de carbono, donde el sistema de anillo de arilo multicíclico es un sistema de anillo bicíclico, tricíclico o tetracíclico. Los radicales arilo incluyen, entre otros, grupos como fluorenilo, fenilo y naftilo. Un arilo opcionalmente sustituido es un radical arilo que está opcionalmente sustituido por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, halo, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, nitro, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)-R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2),

$-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR_p^{16}$ (donde p es 0, 1, o 2), y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileo o alquienilo lineal o ramificada; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Arlcoxi" se refiere a un grupo de fórmula $-O-R$, donde R es aralquilo. Un arilcoxi opcionalmente sustituido es un arilcoxi que está opcionalmente sustituido como se describe en la presente para el aralquilo. En algunas realizaciones, el arilcoxi es benciloxi.

"Cicloalquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monocíclico o policíclico no aromático estable que tiene de tres a quince átomos de carbono, preferiblemente de tres a diez átomos de carbono, y que está saturado o insaturado, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace simple. Un radical de hidrocarburo policíclico es un sistema de anillo bicíclico, tricíclico o tetracíclico. Un cicloalquilo insaturado contiene uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono y/o un enlace triple carbono-carbono. Los radicales cicloalquilo monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los radicales cicloalquilo policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantilo, norbornilo, decalinilo y similares. Un cicloalquilo opcionalmente sustituido es un radical cicloalquilo que está opcionalmente sustituido por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquienilo, halo, haloalquilo, haloalquienilo, ciano, nitro, oxo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1, o 2) y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2) donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente un enlace directo o una cadena lineal o ramificada de alquileo o alquienilo; y cada R^{16} es independientemente alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heteroarilo.

"Fusionado" se refiere a cualquier sistema de anillos descrito en la presente que se fusione con una estructura de anillos existente en los compuestos de la invención. Cuando el sistema de anillos fusionados es un heterociclilo o un heteroarilo, cualquier átomo de carbono de la estructura de anillos existente que pase a formar parte del sistema de anillos fusionados puede sustituirse por un átomo de nitrógeno.

"Halo" se refiere a los sustituyentes de halógeno: bromo, cloro, fluoro y yodo.

"Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se ha definido anteriormente, que está además sustituido por uno o más sustituyentes de halógeno. El número de sustituyentes halo incluidos en el haloalquilo es de uno y hasta el número total de átomos de hidrógeno disponibles para sustitución con los sustituyentes halo (por ejemplo, perfluoroalquilo). Ejemplos no limitativos de haloalquilo incluyen trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometilo-2-fluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1-bromometilo-2-bromoetilo y similares. Para un haloalquilo opcionalmente sustituido, los átomos de hidrógeno enlazados a los átomos de carbono de la parte alquilo del radical haloalquilo pueden sustituirse opcionalmente con sustituyentes como se ha definido anteriormente para un alquilo opcionalmente sustituido.

"Haloalquienilo" se refiere a un radical alquienilo, como se ha definido anteriormente, que está además sustituido por uno o más sustituyentes halo. El número de sustituyentes halo incluidos en el haloalquienilo es de uno y hasta el número total de átomos de hidrógeno disponibles para sustitución con los sustituyentes halo (por ejemplo, perfluoroalquienilo). Ejemplos no limitativos de haloalquienilo incluyen 2,2-difluoroetenilo, 3-cloroprop-1-enilo y similares. Para un haloalquienilo opcionalmente sustituido, los átomos de hidrógeno enlazados a los átomos de carbono de la parte alquienilo del radical haloalquienilo pueden sustituirse opcionalmente con sustituyentes como se ha definido anteriormente para un grupo alquienilo opcionalmente sustituido.

"Haloalquinilo" se refiere a un radical alquinilo, como se ha definido anteriormente, que está además sustituido por uno o más sustituyentes halo. El número de sustituyentes halo incluidos en el haloalquinilo es de uno y hasta el número total de átomos de hidrógeno disponibles para sustitución con los sustituyentes halo (por ejemplo, perfluoroalquinilo). Ejemplos no limitativos de haloalquinilo incluyen 3-cloroprop-1-quinilo y similares. La parte alquinilo del radical haloalquinilo puede estar opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo alquinilo.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical de la fórmula $-R_a-R_b$, donde R_a es alquileo y R_b es heteroarilo como se describe en la presente. Las porciones alquileo y heteroarilo del heteroarilalquilo opcionalmente sustituido están opcionalmente sustituidas como se describe en la presente para alquileo y heteroarilo, respectivamente.

"Heterociclilo" se refiere a un radical de sistema de anillos no aromático estable de 3 a 18 miembros que tiene un número de carbonos de dos a doce y contiene un total de uno a seis heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. Un radical heterociclilo es un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico. Un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico es un sistema de anillos fusionado, espiro y/o con puente. El radical heterociclilo puede ser saturado o insaturado. Un

heterociclilo insaturado contiene uno, dos o tres enlaces dobles carbono-carbono y/o un enlace triple carbono-carbono. Un heterociclilo opcionalmente sustituido es un radical heterociclilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, halo, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, oxo, tioxo, nitro, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)-R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1, o 2), y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente un enlace directo o una cadena lineal o ramificada de alquilenilo o alquenileno; y cada R^{16} es independientemente alquilo, alquenilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo. Los átomos de nitrógeno, carbono o azufre del radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados (cuando el sustituyente es oxo y está presente en el heteroátomo); el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado (cuando el sustituyente es alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)-R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1 o 2), y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde R^{15} es una cadena lineal o ramificada de alquilenilo o alquenileno, y R^{14} y R^{16} son como se han definido anteriormente). Ejemplos de radicales heterociclilo opcionalmente sustituidos incluyen, pero no se limitan a, azetidino, dioxolano, tienil[1,3]ditiano, decahidroisoquinolino, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidinilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofuro, tritiano, tetrahidropirano, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo.

"Heterociclileno" se refiere a un heterociclilo en el que un átomo de hidrógeno está sustituido por una valencia. Un heterociclileno opcionalmente sustituido está opcionalmente sustituido como se describe en la presente para el heterociclilo.

"Heteroarilo" se refiere a un radical de sistema de anillos de 5 a 18 miembros que contiene por lo menos un anillo aromático, que tiene de uno a diecisiete átomos de carbono, y que contiene un total de uno a diez heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heteroarilo es un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico. El radical heteroarilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico es un sistema de anillo fusionados y/o con puente. Un heteroarilo opcionalmente sustituido es un radical heteroarilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alcoxi, halo, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, oxo, tioxo, nitro, oxo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)-R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1, o 2), y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^{14} es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo; cada R^{15} es independientemente un enlace directo o una cadena lineal o ramificada de alquilenilo o alquenileno; y cada R^{16} es alquilo, alquenilo, haloalquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo. Los átomos de nitrógeno, carbono o azufre del radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados (cuando el sustituyente es oxo y está presente en el heteroátomo), siempre que por lo menos un anillo del heteroarilo siga siendo aromático; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado (cuando el sustituyente es alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, $-R^{15}-OR^{14}$, $-R^{15}-OC(O)-R^{14}$, $-R^{15}-N(R^{14})_2$, $-R^{15}-C(O)R^{14}$, $-R^{15}-C(O)OR^{14}$, $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$, $-R^{15}-N(R^{14})S(O)_tR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (donde t es 1 o 2), $-R^{15}-S(O)_pR^{16}$ (donde p es 0, 1 o 2), y $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (donde t es 1 o 2), donde R^{15} es una cadena lineal o ramificada de alquilenilo o alquenileno, y R^{14} y R^{16} son como se han definido anteriormente), siempre que por lo menos un anillo del heteroarilo siga siendo aromático. Ejemplos de radicales heteroarilo opcionalmente sustituidos incluyen, pero no se limitan a, azepino, acridino, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzindolilo, benzodioxolilo, benzofuranoilo, benzooxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepino, 1,4-benzodioxano, benzonaftofurano, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxolilo, benzopirano, benzopirano, benzofurano, benzofuranilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinolinilo, dibenzofurano, dibenzotiofenilo, furano, furano, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizino, isoxazolilo, naftilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepino, oxazolilo, oxirano, 1-fenil-1H-pirrolilo, fenazino, fenotiazino, fenoxazino, ftalazino, pteridinilo, purino, pirrolilo, pirazolo, piridinilo, pirazino, pirimidino, piridazino, pirrolilo, quinazolino, quinoxalino, quinolino, quinuclidino, isoquinolino, tetrahidroquinolino, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazino y tiofenilo (es decir, tienilo).

La invención aquí divulgada también pretende abarcar todos los compuestos farmacéuticamente aceptables de fórmula (I) que estén marcados isotópicamente habiendo sustituido uno o más átomos por un átomo que tenga una masa atómica o número másico diferente. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos divulgados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, como 2H , 3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I y ^{125}I , respectivamente. Estos compuestos radiomarcados podrían ser útiles para ayudar a determinar o medir la eficacia de los compuestos, caracterizando, por ejemplo, el lugar o el modo de acción sobre las enzimas ATM y ADN-PK, o la afinidad de unión a un lugar de acción farmacológicamente importante sobre las enzimas ATM y ADN-PK. Ciertos compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente, por

ejemplo, los que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y de su facilidad de detección.

5 La sustitución por isótopos más pesados, como el deuterio, es decir ^2H , puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida in vivo aumentada o menores requisitos de dosificación, por lo que en algunas circunstancias puede ser preferible.

10 La sustitución con isótopos emisores de positrones, como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de topografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación de receptores de sustrato. Los compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente pueden prepararse de manera general mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en los Ejemplos y Preparaciones que se exponen a continuación, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado anteriormente.

15 También se pretende que la invención divulgada en al presente abarque los productos metabólicos in vivo de los compuestos divulgados. Dichos productos pueden ser el resultado, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. Por consiguiente, la invención incluye compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de esta invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar un producto metabólico del mismo. Tales productos se identifican típicamente administrando un compuesto radiomarcado de la invención en una dosis detectable a un animal, como rata, ratón, cobaya, canino, mono, o a humano, permitiendo suficiente tiempo para que se produzca el metabolismo, y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas.

25 Se pretende que "compuesto estable" y "estructura estable" indiquen un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y a la formulación en un agente terapéutico eficaz.

30 "Mamífero" incluye a los humanos y tanto a los animales domésticos, como los animales de laboratorio y los animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, conejos), y a los animales no domésticos, como los animales salvajes y similares.

35 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede producirse o no, y que la descripción incluye casos en los que se produce dicho evento o circunstancia y casos en los que no. Por ejemplo, "arilo opcionalmente sustituido" significa que el radical arilo puede estar sustituido o no y que la descripción incluye tanto radicales arilo sustituidos como radicales arilo que no tienen sustitución.

40 "Paciente" significa un humano o un animal no humano (por ejemplo, un mamífero) que padece una enfermedad o afección, según determine un profesional cualificado (por ejemplo, un médico, un enfermero o un veterinario) con o sin pruebas de laboratorio conocidas en la técnica de muestras del paciente.

45 Un "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, sin limitación, cualquier adyuvante, portador, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, surfactante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, solvente o emulsionante que haya sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos como aceptable para su uso en seres humanos o animales domésticos.

50 Una "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, representa aquellas sales que, dentro del ámbito de un buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidas, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se describen en: Berge et al., *J. Pharmaceutical Sciences* 66:1-19, 1977 y en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (Eds. P. H. Stahl y C. G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos y bases.

55 "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables, y que se forman con ácidos inorgánicos como, pero no limitados a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos como, pero no limitados a, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido alginico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfórico, ácido alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido

glicerosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamóico, propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico y similares.

"Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, como amoníaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzetina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son la isopropilamina, la dietilamina, la etanolamina, la trimetilamina, la dicitclohexilamina, la colina y la cafeína.

A menudo las cristalizaciones producen un solvato del compuesto de la invención. Como se usa en la presente, el término "solvato" se refiere a un agregado que comprende una o más moléculas de un compuesto de la invención con una o más moléculas de solvente. El solvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Alternativamente, el solvente puede ser un solvente orgánico. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato, incluyendo un monohidrato, dihidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las formas solvatadas correspondientes. Los compuestos de la invención pueden ser verdaderos solvatos, mientras que, en otros casos, el compuesto de la invención puede simplemente retener agua adventicia o ser una mezcla de agua más algún solvente adventicio.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de un compuesto de la invención y un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración del compuesto biológicamente activo a mamíferos, por ejemplo, humanos. Dicho medio incluye todos los portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que, cuando se administra a un mamífero, preferiblemente un humano, es suficiente para efectuar el tratamiento, como se define a continuación, en el mamífero, preferiblemente un humano o un canino. La cantidad de un compuesto de la invención, o de otro agente farmacéutico (por ejemplo, un agente antitumoral), que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la afección y su gravedad, la forma de administración y la edad del mamífero a tratar, pero puede determinarse rutinariamente por un experto en la técnica teniendo en cuenta sus propios conocimientos y la presente divulgación.

"Tratar" o "tratamiento", como se usa en la presente, abarca el tratamiento de la enfermedad o afección de interés en un mamífero, preferiblemente un humano, que tiene la enfermedad o afección de interés, e incluye:

- (i) prevenir que la enfermedad o afección aparezca en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero esté predispuesto a padecer la afección, pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la padece;
- (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;
- (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o afección; o
- (iv) aliviar los síntomas resultantes de la enfermedad o afección, es decir, aliviar el dolor sin abordar la enfermedad o afección subyacente. Como se usa en la presente, los términos "enfermedad" y "afección" pueden usarse indistintamente o pueden diferir en el sentido de que la enfermedad o afección particular puede no tener un agente causativo conocido (por lo que aún no se ha determinado la etiología) y, por lo tanto, aún no se reconoce como una enfermedad, sino sólo como una afección o síndrome indeseable, en donde los practicantes clínicos han identificado un conjunto más o menos específico de síntomas.

Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)- o, como (D)- o (L)- para los aminoácidos. Se entiende que la presente invención incluye todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (R)- y (S)-, o (D)- y (L)- pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía y cristalización fraccionada. Las técnicas convencionales para la preparación/aislamiento de enantiómeros individuales incluyen la síntesis quiral a partir de un precursor ópticamente puro adecuado o la resolución del racemato (o el racemato de una sal o derivado) usando, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

quiral. Cuando los compuestos descritos en la presente contienen enlaces dobles olefinicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique lo contrario, se pretende que los compuestos incluyan isómeros geométricos tanto E como Z. De igual manera, también se pretende que se incluyan todas las formas tautoméricas.

Un "estereoisómero" se refiere a un compuesto formado por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. La presente invención contempla varios estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluye los "enantiómeros", que se refieren a dos estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Un "tautómero" se refiere a un desplazamiento de protones de un átomo de una molécula a otro átomo de la misma molécula. La presente invención incluye tautómeros de cualquiera de dichos compuestos.

También se encuentran dentro del alcance de la invención los compuestos intermedios de fórmula (I) y todos los polimorfos de las especies mencionadas anteriormente y los hábitos cristalinos de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una imagen de una inmunotransferencia de un experimento representativo que evalúa el efecto del compuesto 569 en células MCF7 con o sin radiación.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de supervivencia clonogénica que examina la viabilidad de las células MCF7 después de la exposición al vehículo (DMSO) o al compuesto 569 con o sin radiación.

La FIG. 3 es una imagen de una inmunotransferencia que muestra la inducción de la fosforilación de TBK1 por el compuesto 569, un inhibidor selectivo de ATM (ATMi), un inhibidor selectivo de ADN-PK (ADN-PKi), y una combinación del inhibidor selectivo de ATM y el inhibidor selectivo de ADN-PK (Ai+Di) en células HCT116 que expresan p53 de tipo salvaje o células HCT116 que fueron negativas para la expresión de p53. En la FIG. 3, p.ATM, p.ADN-PK, p.TBK1 y p.STING indican formas fosforiladas de ATM, ADN-PK, TBK1 y STING, respectivamente.

La FIG. 4 es una inmunotransferencia que muestra la inhibición de la autofosforilación de la ADN-PK quinasa inducida por la radiación y la fosforilación de KAP1, un sustrato de ATM, inducida por la radiación por el compuesto 569 en xenoinjertos tumorales humanos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) FADU. En la FIG. 4, pADN-PK y pKAP1 indican formas fosforiladas de ADN-PK y KAP1, respectivamente.

La FIG. 5 es una inmunotransferencia que muestra la inhibición de la autofosforilación de la ADN-PK quinasa inducida por la radiación y la fosforilación de KAP1, un sustrato de ATM, inducida por la radiación por el compuesto 569 en xenoinjertos tumorales humanos de carcinoma de mama MDA-MB-231. En la FIG. 5, pADN-PK y pKAP1 indican las formas fosforiladas de ADN-PK y KAP1, respectivamente.

La FIG. 6 ilustra la dosificación de un modelo de ratón de xenoinjerto humano subcutáneo FADU con el compuesto 569 y/o IR, qdx3. Se muestra la mediana del volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para cada grupo del estudio. En la FIG. 6, "569" significa compuesto 569, "Veh." significa vehículo, y "Rad." significa radiación.

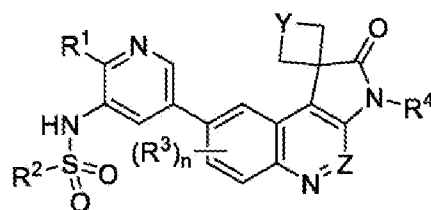
La FIG. 7 representa la supervivencia libre de quintuplicación de Kaplan-Meier para cada grupo dosificado en el modelo de ratón xenoinjerto humano subcutáneo FADU con el compuesto 569 y/o IR, qdx3. En la FIG. 7, "569" significa compuesto 569, "Veh." significa vehículo, y "Rad." significa radiación.

La FIG. 8 ilustra la dosificación de un modelo de ratón de xenoinjerto humano subcutáneo MDA-MB-231 con el compuesto 569 y/o IR, qdx3. Se muestra la mediana del volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo de cada grupo del estudio. En la FIG. 8, "569" significa compuesto 569, "Veh." significa vehículo, y "Rad." significa radiación.

La FIG. 9 representa los datos de supervivencia libre de quintuplicación de Kaplan-Meier para cada grupo dosificado en el modelo de ratón de xenoinjerto humano subcutáneo MDA-MB-231 con el compuesto 569 y/o IR, qdx3. En la FIG. 9, "569" significa compuesto 569, "Veh." significa vehículo, y "Rad." significa radiación.

COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y MÉTODOS

La invención proporciona compuestos y composiciones que pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades oncológicas (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, los cánceres descritos en la presente), por ejemplo, solos o en combinación con radioterapia y/o terapia antitumoral. Un compuesto puede ser un compuesto de fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde

Z es CH, CR³, o N;

Y es CHR⁵ o NR⁶;

n es 0, 1, 2 o 3;

R¹ es -O-L-N(R⁷)₂ o N-heterociclo saturado de cuatro miembros opcionalmente sustituido;

R² es alquilo C₁₋₃;

cada R³ es independientemente halógeno o alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido;

R⁴ es un alquilo opcionalmente sustituido;

R⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido o benciloxi;

R⁶ es un alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido;

cada R⁷ es independientemente H o alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido; y

L es etileno opcionalmente sustituido.

Ventajosamente, los compuestos de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) pueden mostrar una actividad inhibidora superior para ATM y ADN-PK. Ventajosamente, los compuestos de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) pueden presentar una selectividad superior medida por la reducción de la actividad fuera de diana (por ejemplo, inhibición de mTOR, inhibición de PI3K α/δ y/o inhibición de hERG). Por ejemplo, un compuesto de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) puede tener una IC₅₀ de mTOR de por lo menos 10 veces (por ejemplo, por lo menos 20 veces) mayor que la IC₅₀ de ATM o la IC₅₀ de ADN-PK. Un compuesto de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) puede tener una IC₅₀ de mTOR de 10 nM o más (por ejemplo, >100 nM). Adicional o alternatively, un compuesto de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) puede tener una IC₅₀ de hERG de por lo menos 100 veces (por ejemplo, por lo menos 500 veces, por lo menos 1000 veces o por lo menos 3000 veces) mayor que la IC₅₀ de ATM o la IC₅₀ de ADN-PK, cuando se mide a la misma concentración de compuesto. Un compuesto de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) puede tener una IC₅₀ de hERG de 3 μ M o más (por ejemplo, 10 μ M o más).

Ventajosamente, los compuestos de la invención (por ejemplo, el compuesto **568**, **569** o **570**) pueden mostrar propiedades farmacocinéticas superiores (por ejemplo, C_{max}, AUC y/o t_{1/2}).

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

trans-N-(5-(3-Etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
trans-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pyrrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)propano-2-sulfonamida
clorhidrato de N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pyrrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
clorhidrato de N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pyrrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)etanosulfonamida
N-(5-(7'-Fluoro-1-isopropil-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
cis-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
cis-N-(5-(3-Etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida
clorhidrato de N-(2-(3-(dimetilamino)azetidina-1-il)-5-(3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)piridin-3-il)metanosulfonamida

Los compuestos de la invención son ventajosos porque pueden inhibir las quinasas ATM (ataxia-telangiectasia, mutada) y ADN-PK. Las quinasas ATM (ataxia-telangiectasia, mutada) y ADN-PK, en particular, son moduladores importantes de las respuestas celulares a la rotura del ADN y la inhibición de cualquiera de estas moléculas aumenta notablemente la sensibilidad de las células a la radiación ionizante. Por tanto, los compuestos de la invención pueden ser inhibidores eficaces de las acciones de ATM y ADN-PK con o sin radiación y con o sin quimioterapia o inmunoterapia para proporcionar una terapia eficaz para el tratamiento de enfermedades oncológicas (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, los cánceres descritos en la presente). El tratamiento de un paciente con un compuesto de la invención puede retrasar o eliminar la reparación del daño en el ADN por la radioterapia. Como resultado, los pacientes que reciben un compuesto de la invención pueden responder mejor a las terapias antitumorales. Ventajosamente, los pacientes que reciben un compuesto de la invención pueden obtener un beneficio

terapéutico al aumentar el control tumoral con dosis estándar de radioterapia o al lograr niveles similares de control tumoral con dosis más bajas de radiación ionizante que las usadas rutinariamente en pacientes que no reciben un compuesto de la invención. Ventajosamente, las dosis más bajas de radiación ionizante pueden ser menos dañinas para los tejidos no cancerígenos que las dosis necesarias para los pacientes que no reciben un compuesto de la invención.

Los humanos y los ratones que tienen mutaciones de pérdida de función en los genes de ATM o PRKDC, que codifican la quinasa de Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) y la proteína quinasa dependiente del ADN (ADN-PK), respectivamente, son hipersensibles a la radiación ionizante. La inhibición conjunta de las quinasas ATM y ADN-PK puede ser eficaz para sensibilizar las células tumorales a la radiación o a los agentes que dañan el ADN (por ejemplo, los agentes antitumorales). La eficacia de la inhibición dual de las quinasas ATM y ADN-PK puede ser superior a la inhibición de cualquiera de las quinasas por sí sola.

Además, los compuestos de la invención pueden mostrar ventajosamente una inhibición reducida de otras quinasas (ATR y mTOR) y, por lo tanto, pueden presentar una toxicidad reducida.

Los compuestos de la invención pueden sensibilizar las células tumorales a la radiación y/o a los agentes antitumorales.

Métodos

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad oncológica (por ejemplo, cáncer) en un mamífero, preferiblemente humano o canino, en donde los métodos comprenden administrar al mamífero con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el compuesto se administra al mamífero que está recibiendo radioterapia.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad oncológica (por ejemplo, cáncer) en un mamífero, en donde los métodos comprenden administrar al mamífero con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el compuesto se administra al mamífero en combinación con un agente que daña el ADN. Ejemplos no limitativos de agentes que dañan el ADN incluyen cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, valrubicina, idarubicina, calicheamicina, inhibidores de PARP.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención y excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización, la composición farmacéutica comprende un compuesto de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad oncológica en un animal, preferiblemente un mamífero.

Un compuesto de la invención, cuando se usa en una terapia combinada, puede aumentar la potencia de la otra terapia de radiación o farmacológica si permite que se reduzca la dosis del otro tratamiento, lo que puede reducir la frecuencia y/o gravedad de los acontecimientos adversos asociados a la otra terapia farmacológica. Por ejemplo, los efectos secundarios de la radiación (por ejemplo, mucositis oral o gastrointestinal, dermatitis, neumonitis o fatiga) pueden reducirse en pacientes que reciben una terapia combinada que incluye un compuesto de la invención y radioterapia de dosis reducida (por ejemplo, la incidencia de los acontecimientos adversos puede reducirse por lo menos en un 1%, 5%, 10% o 20%) con respecto a los pacientes que reciben radioterapia estándar de dosis completa sin un compuesto de la invención. Además, otros acontecimientos adversos que pueden reducirse en pacientes que reciben una terapia combinada que incluye un compuesto de la invención y radioterapia de dosis reducida (por ejemplo, la incidencia de los acontecimientos adversos puede reducirse por lo menos en un 1%, 5%, 10% o 20%) en relación con pacientes que reciben radioterapia de dosis completa estándar sin un compuesto de la invención pueden ser efectos tardíos de la radiación, por ejemplo, fibrosis pulmonar inducida por radiación, lesión cardíaca, obstrucción intestinal, lesión nerviosa, lesión vascular, linfedema, necrosis cerebral o cáncer inducido por radiación. De manera similar, cuando el compuesto se administra en una terapia combinada con otro fármaco anticancerígeno (por ejemplo, los descritos en la presente), la terapia combinada puede provocar la misma muerte de células tumorales o incluso una mayor, incluso cuando se reduce la dosis del otro fármaco anticancerígeno. Por lo tanto, las dosis reducidas de otros fármacos anticancerígenos puede reducir la gravedad de los acontecimientos adversos provocados por los otros fármacos anticancerígenos.

En otro aspecto, esta invención está dirigida al uso de los compuestos de la invención, como se ha expuesto anteriormente, como un estereoisómero, enantiómero, tautómero del mismo o mezclas del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, o el uso de una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la invención, como se ha expuesto anteriormente, como un estereoisómero, enantiómero, tautómero del mismo o mezclas de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra en combinación con radioterapia. En otras realizaciones, el compuesto de la invención se administra en combinación con un agente que daña el ADN. En realizaciones adicionales, el compuesto de la invención se administra en combinación con un agente

inmunoterapéutico antitumoral (por ejemplo, ipilimumab, ofatumumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, cemiplimab, obinutuzumab, ocaratuzumab, tremelimumab, spartalizumab, camrelizumab, sintilimab, tislelizumab, toripalimab, dostarlimab, veltuzumab, INCMGA00012, AMP-224, AMP-514, KN035, CK-301, AUNP12, CA-170 o BMS-986189). En otras realizaciones, el agente inmunoterapéutico antitumoral es ofatumumab, obinutuzumab, ocaratuzumab o veltuzumab. En otras realizaciones más, el agente inmunoterapéutico antitumoral es nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab, spartalizumab, camrelizumab, sintilimab, tislelizumab, toripalimab, dostarlimab, INCMGA00012, AMP-224 o AMP-514. En otras realizaciones más, el agente inmunoterapéutico antitumoral es atezolizumab, avelumab, durvalumab, KN035, CK-301, AUNP12, CA-170 o BMS-986189. En ciertas realizaciones preferidas de terapia de combinación, el compuesto de la invención se administra en combinación con un agente inmunoterapéutico antitumoral.

Los métodos de la invención pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad oncológica como se describe en la presente. Una enfermedad oncológica puede ser, por ejemplo, un tumor premaligno o un tumor maligno (por ejemplo, un tumor sólido o un tumor líquido). Los tumores malignos típicamente se denominan cánceres. En ciertas realizaciones, la enfermedad oncológica es un cáncer.

En realizaciones adicionales, los ejemplos de cáncer a tratar usando los métodos y usos divulgados en la presente incluyen, entre otros, cánceres hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas. Ejemplos no limitativos de cánceres incluyen leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia, leucemia linfoblástica de células T, leucemias mielógenas crónicas, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia neutrofílica crónica, plasmocitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, leucemia de células del manto, mielomas múltiples, linfoma maligno, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma linfoblástico de células T, linfoma de Burkitt y linfoma folicular.

En otras realizaciones más, los ejemplos de cáncer a tratar usando los métodos y usos divulgados en la presente incluyen, entre otros, tumores sólidos. Ejemplos no limitativos de tumores sólidos incluyen cánceres cerebrales (por ejemplo, astrocitoma, glioma, glioblastoma, meduloblastoma o ependimoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cánceres del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer gástrico, cánceres de cabeza y cuello, cáncer bucal, cáncer de la boca, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de glándulas salivales, sarcomas, cáncer testicular, cáncer urotelial, cáncer de vulva y tumor de Wilm. Preferiblemente, los métodos de la invención se usan en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de recto, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, lesiones metastásicas hepáticas, melanoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o carcinoma de células de Merkel.

En otras realizaciones más, los ejemplos de cáncer a tratar usando los métodos y usos divulgados en la presente no se limitan a metástasis y cáncer metastásico. Por ejemplo, los métodos y los usos divulgados en la presente para tratar el cáncer pueden incluir el tratamiento tanto de tumores primarios como de metástasis.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden reducir el tamaño del tumor en un sujeto, por ejemplo, por lo menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, o pueden eliminar el tumor (por ejemplo, con respecto al tamaño del tumor en el momento del inicio de la terapia o con respecto a un sujeto de referencia que recibe placebo en lugar del compuesto de la invención). En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden reducir la carga tumoral en un sujeto, por ejemplo, por lo menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, o pueden eliminar el tumor (por ejemplo, con respecto a la carga tumoral en el momento del inicio de la terapia o con respecto a un sujeto de referencia que recibe placebo en lugar del compuesto de la invención). En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden aumentar el tiempo medio de supervivencia del sujeto, por ejemplo, en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150% o 200% (por ejemplo, con respecto a un sujeto de referencia que recibe placebo en lugar del compuesto de la invención). En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden aumentar la capacidad de la radioterapia o la farmacoterapia para paliar el dolor u otros síntomas durante un tiempo medio más prolongado para el sujeto, por ejemplo, en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150% o 200% (por ejemplo, con respecto a un sujeto de referencia que recibe placebo en lugar del compuesto de la invención).

En algunas realizaciones, los métodos y usos divulgados en la presente comprenden el pretratamiento de un paciente con un inhibidor dual de ATM y ADN-PK antes de la administración de radioterapia o de un agente que daña el ADN. El pretratamiento del paciente con un inhibidor dual de ATM y ADN-PK puede retrasar o eliminar la reparación del daño en el ADN después de la radioterapia.

La radioterapia incluye, pero no se limita a, la radioterapia de haz externo con rayos X (fotones), rayos gamma procedentes de ⁶⁰ Cobalto u otros isótopos radiactivos, neutrones, electrones, protones, iones de carbono, iones de helio y otras partículas cargadas. La radioterapia también incluye la braquiterapia y los radiofármacos que emiten

rayos gamma, partículas alfa, partículas beta, electrones Auger u otros tipos de partículas radiactivas procedentes de isótopos como ³²Fósforo, ⁶⁷Cobre, ⁷⁷Bromo, ⁸⁹Estroncio, ⁹⁰Itrio, ¹⁰⁵Rodio, ¹³¹Yodo, ¹³⁷Cesio, ¹⁴⁹Prometeo, ¹⁵³Samario, ¹⁶⁶Holmio, ¹⁷⁷Lutecio, ¹⁸⁶Renio, ¹⁸⁸Renio, ¹⁹⁹Oro, ²¹¹Astatina, ²¹³Bismuto, ²²³Radio, ²²⁵Actinio, o ²²⁷Torio, ¹⁹²Iridio, ⁶⁷Galio, ¹⁰³Paladio, ¹²⁵Yodo, y otros isótopos radiactivos (por ejemplo, ¹⁹²Iridio, ¹²⁵Yodo, ¹³⁷Cesio, ¹⁰³Paladio, ³²Fósforo, ⁹⁰Itrio, ⁶⁷Galio, ²¹¹Astatina, o ²²³Radio). La radioterapia también incluye la radioinmunoterapia (RIT) con anticuerpos o pequeñas moléculas que se conjugan con isótopos radiactivos que incluyen ¹³¹Yodo, ⁹⁰Itrio, ²²⁵Actinio, ²¹¹Astatina, ⁶⁷Galio, ¹⁷⁷Lutecio, ²²⁷Torio y otros isótopos radiactivos.

En algunas realizaciones, la terapia combinada comprende la administración a un paciente de un inhibidor de ATM y ADN-PK y un agente antitumoral, por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, antraciclinas, valrubicina, idarubicina, calicheamicina, inhibidores de PARP (por ejemplo, olaparib, rucaparib, niraparib, veliparib o talazoparib), así como otros agentes anticancerígenos conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la terapia combinada comprende la administración a un paciente de un inhibidor de ATM y ADN-PK y un agente inmunoterapéutico antitumoral, incluyendo, pero no limitados a, ipilimumab, ofatumumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, etc.

En las terapias combinadas descritas en la presente, un inhibidor de ATM y de ADN-PK puede administrarse al paciente simultánea o secuencialmente (por ejemplo, antes o después) del otro fármaco.

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

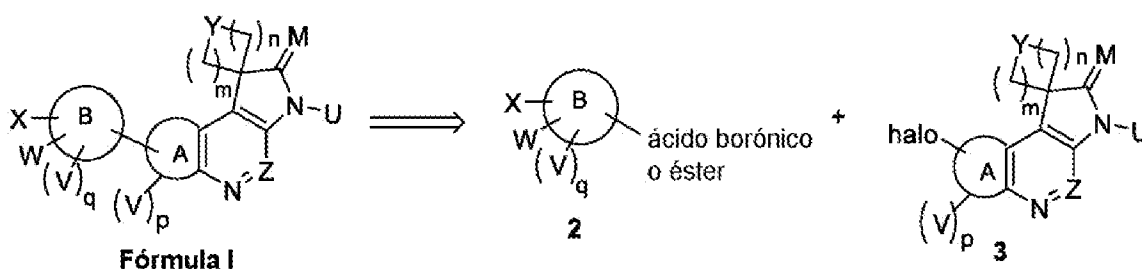
Los compuestos de la presente invención pueden prepararse usando métodos y técnicas conocidos en la técnica. En los Ejemplos se proporcionan procesos adecuados para sintetizar estos compuestos. En general, los compuestos de Fórmula (I) pueden prepararse de acuerdo con los Esquemas descritos a continuación. También se describen las fuentes de los materiales de partida para estas reacciones.

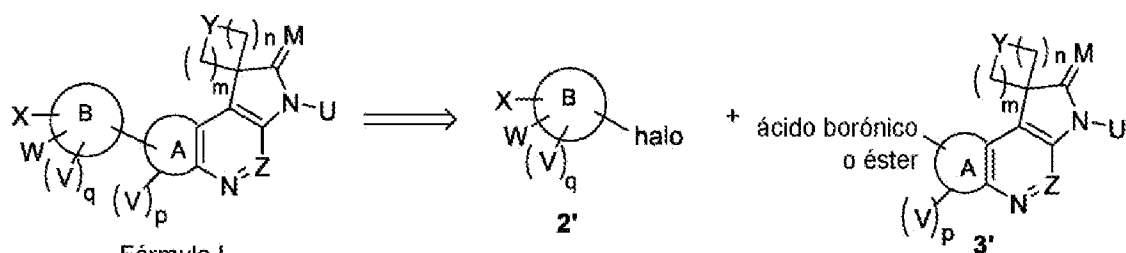
Los grupos protectores pueden añadirse o eliminarse en la preparación de los compuestos de la invención de acuerdo con técnicas estándar, que son conocidas por los expertos en la técnica y como se describe en la presente. El uso de grupos protectores se describe en detalle en Greene, T. W. y P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (2006), 4ª Ed., Wiley. El grupo protector también puede ser una resina polimérica como una resina Wang o una resina de cloruro de 2-clorotritilo.

Los expertos en la técnica también apreciarán que, aunque tales derivados protegidos de compuestos de esta invención pueden no poseer actividad farmacológica como tales, pueden administrarse a un mamífero y posteriormente metabolizarse en el cuerpo para formar compuestos de la invención que son farmacológicamente activos.

Todos los compuestos descritos a continuación como preparados que pueden existir en forma de ácido o base libre pueden convertirse en sus sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con la base o ácido inorgánico u orgánico apropiado. Las sales de los compuestos preparados a continuación pueden convertirse en su forma de ácido o base libre mediante técnicas estándar. Se entiende que todos los polimorfos, formas amorfas, anhidratos, hidratos, solvatos y sales de los compuestos de la invención están comprendidos en el alcance de la invención. Además, todos los compuestos de la invención que contienen un ácido o un grupo éster pueden convertirse en el éster o ácido correspondiente, respectivamente, mediante métodos conocidos por un experto en la técnica o mediante los métodos descritos en la presente.

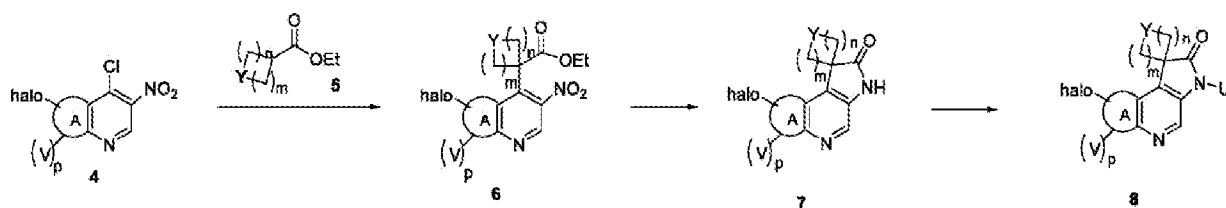
A continuación, en el **Esquema 1**, se muestra una representación general de la preparación de muchos de estos compuestos. Los compuestos se preparan mediante el acoplamiento de varios componentes de la molécula: acoplamiento de Suzuki del compuesto **3** (o **2'**) halo sustituido con un ácido bórico o un compuesto de borato **2** (**3'**). Para proporcionar la síntesis de los compuestos de esta invención pueden ser necesarias o no reacciones adicionales. En los **Esquemas** siguientes se muestran las preparaciones de compuestos específicos de esta invención.





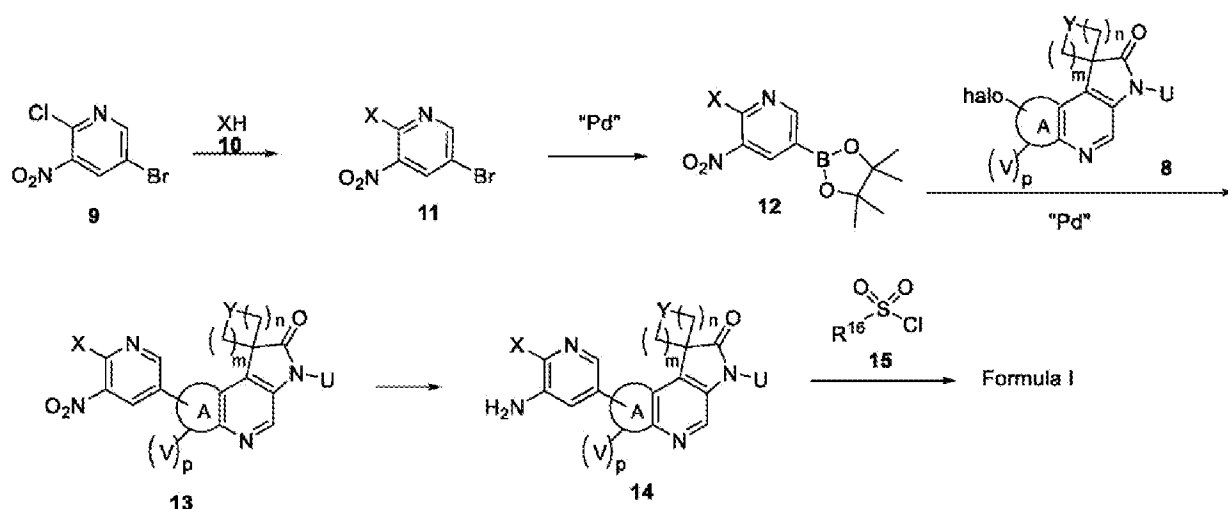
Esquema 1

En las reacciones de acoplamiento arilo-arilo, el halógeno puede ser yodo, bromo o cloro, preferiblemente bromo o yodo. En este método, las sustituciones de halógeno pueden transformarse en sustituciones de arilo usando condiciones de reacción de acoplamiento de Suzuki. Las condiciones de este método se divulgan en numerosas publicaciones que han sido revisadas por A. Suzuki en un artículo titulado "The Suzuki reaction with arylboron compounds in arene chemistry" en *Modern Arene Chemistry* 2002, 53-106. Para llevar a cabo esta reacción puede utilizarse cualquiera de las condiciones adecuadas convencionales en una reacción de Suzuki. Generalmente, las reacciones de acoplamiento de Suzuki se llevan a cabo en presencia de un catalizador de metal de transición, como un catalizador de paladio, utilizando cualquier solvente orgánico convencional para esta reacción y una base débil inorgánica u orgánica. Entre los solventes orgánicos preferidos se encuentran los solventes apróticos polares. Para preparar los compuestos de la invención puede usarse cualquier solvente aprótico polar convencional. Los solventes adecuados son habituales, especialmente los solventes de alto punto de ebullición, por ejemplo, dimetoxietano. La base inorgánica débil puede ser un carbonato o bicarbonato, como carbonato de potasio o carbonato de cesio. La base orgánica puede ser una amina, como la trietilamina.



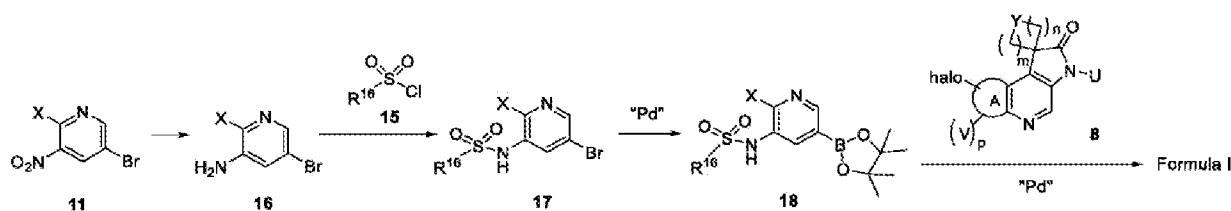
Esquema 2

Específicamente, el otro producto intermedio 7 espiro oxindol se sintetiza como se muestra en el **Esquema 2**. El éster de cicliolo o heterociclo sustituido 5 se trata con una base fuerte como, pero no limitada a, diisopropilamida de litio a baja temperatura en un solvente anhidro como, pero no limitado a, tetrahydrofurano para reaccionar con el material de partida 4, que está disponible comercialmente o es preparado por los expertos en la técnica siguiendo los métodos descritos en la bibliografía para proporcionar el producto intermedio 6. El producto intermedio 6 se reduce mediante un reactivo reductor como, pero no limitado a, hierro para dar el producto intermedio de amino correspondiente que cicla para proporcionar el oxindol compuesto 7 *in situ*. Por tanto, el compuesto 7 se alquila luego con un reactivo alquilante en presencia de una base como, pero no limitado a, carbonato de potasio o hidruro de sodio en un solvente polar como, pero no limitado a, *N,N*-dimetilformamida o tetrahydrofurano para generar el producto intermedio 8 espiro oxindol.



Esquema 3

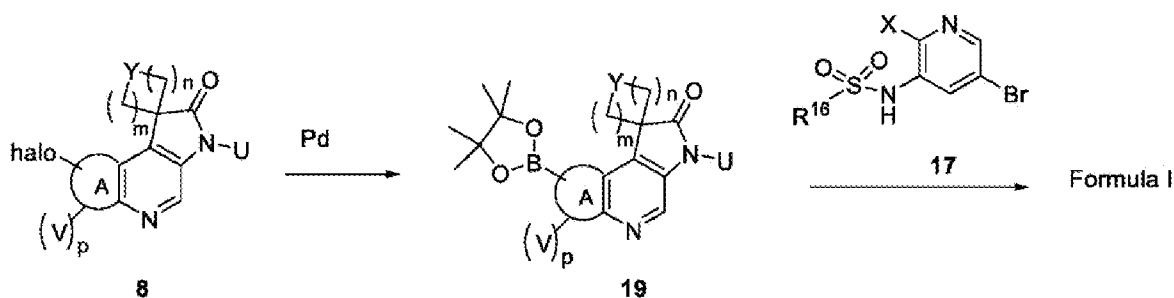
Específicamente, los compuestos de Fórmula (I) de esta invención pueden sintetizarse como se muestra en el **Esquema 3**. La 5-bromo-2-cloro-3-nitropiridina (**9**) comercialmente disponible reacciona con un nucleófilo XH (**10**) en presencia de una base fuerte como, pero no limitada a, hidruro de sodio para proporcionar el producto intermedio **11**. En condiciones catalizadas por paladio, puede prepararse el borato **12**, que reacciona luego con el producto intermedio **8** espiro para proporcionar el producto **13** acoplado de manera cruzada. El grupo nitrógeno en el compuesto **13** se reduce a grupo amino usando un reactivo reductor como, pero no limitado a, el hierro para proporcionar el producto intermedio **14**. La reacción de **14** con diferentes cloruros de sulfonilo (**15**) proporciona la síntesis de compuestos de Fórmula (I).



Esquema 4

Específicamente, los compuestos de Fórmula (I) de esta invención también pueden sintetizarse como se muestra en el **Esquema 4**. El grupo nitrógeno en el compuesto **11** se reduce a grupo amino usando un reactivo reductor tal como, pero no limitado a, hierro para proporcionar el intermediario **16**. La reacción de **16** con diferentes cloruros de sulfonilo (**15**) proporciona el producto intermedio sulfonamida **17**, que se convierte en su correspondiente borato **18** bajo catálisis de paladio. El borato **18** puede acoplarse con el compuesto halo **8** en condiciones de reacción de Suzuki para proporcionar los compuestos de Fórmula (I).

En el **Esquema 3** y el **Esquema 4**, los compuestos de acoplamiento cruzado también pueden sintetizarse usando la química de acoplamiento de Suzuki con componentes que han invertido los patrones de sustitución del halógeno y el boronato/ácido borónico, por ejemplo, como se muestra en el **Esquema 5**.



Esquema 5

Específicamente, los compuestos de Fórmula (I) de esta invención también pueden sintetizarse como se muestra en el **Esquema 5**. El compuesto halo **8** puede convertirse en su correspondiente borato **19** bajo catálisis de paladio. El borato **19** puede acoplarse con el compuesto halo **17** en condiciones de reacción de Suzuki para proporcionar los compuestos de Fórmula (I).

En la puesta en práctica del método de la presente invención, se administra una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos de esta invención o una combinación de cualquiera de los compuestos de esta invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, mediante cualquiera de los métodos habituales y aceptables conocidos en la técnica, ya sea por separado o en combinación. Por tanto, los compuestos o composiciones pueden administrarse por tanto por vía oral (por ejemplo, cavidad bucal), sublingual, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea), rectal (por ejemplo, mediante supositorios o lavados), transdérmica (por ejemplo, electroporación cutánea) o por inhalación (por ejemplo, mediante aerosol), y en forma de dosificaciones sólidas, líquidas o gaseosas, incluyendo comprimidos y suspensiones. La administración puede realizarse en forma de dosificación unitaria individual con terapia continua o en terapia de dosis única ad litio. La composición terapéutica también puede presentarse en forma de emulsión o dispersión oleosa junto con una sal lipofílica como el ácido pamoico, o en forma de composición biodegradable de liberación sostenida para administración subcutánea o intramuscular.

Los portadores farmacéuticos útiles para la preparación de las composiciones de los mismos pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos; por tanto, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, polvos, formulaciones con recubrimiento entérico u otras formulaciones protegidas (por ejemplo, unión a resinas de intercambio iónico o envasado en vesículas lipídico-proteicas), formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles y similares. El portador puede seleccionarse entre los varios aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y los glicoles son portadores líquidos preferidos, en particular (cuando son isotónicos con la sangre) para soluciones inyectables. Por ejemplo, las formulaciones para administración intravenosa comprenden soluciones acuosas estériles del principio o principios activos que se preparan disolviendo el principio o principios activos sólidos en agua para producir una solución acuosa, y volviendo a la solución estéril. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las composiciones pueden someterse a aditivos farmacéuticos convencionales como conservantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes o emulsionantes, sales para ajustar la presión osmótica, tampones y similares. Los portadores farmacéuticos adecuados y su formulación se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. Tales composiciones, en cualquier caso, contendrán una cantidad eficaz del compuesto activo junto con un portador adecuado con objeto de preparar la forma de dosificación apropiada para la administración apropiada al receptor.

La dosis de un compuesto de la presente invención depende de una serie de factores, como, por ejemplo, la forma de administración, la edad y el peso corporal del paciente, y la condición del paciente a tratar, y en última instancia será decidida por el médico o veterinario tratante. Dicha cantidad del compuesto activo determinada por el médico o veterinario tratante se denomina en la presente y en las reivindicaciones "cantidad eficaz".

La invención se describirá con más detalle en los Ejemplos siguientes, que se pretende únicamente que tengan carácter ilustrativo y no limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Los reactivos se adquirieron de Aldrich, Sigma, TCI (Shanghai) Development, Chembon Pharmaceutical Co., Ltd, Zhangjiagang Aimate Huaxue Youxiangongsi, Changzhou Qينو BioTech Co. Ltd, y Shanghai Weiyuan Fine Fluorine Technology Development Co., Ltd u otros proveedores como se indica a continuación y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones usando irradiación de microondas para el calentamiento se realizaron con un Biotage Initiator+. La purificación de escala multimiligramo a multigramo se llevó a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como la elución de cromatografía en columna flash de gel de sílice; las purificaciones de cromatografía ultrarrápida preparativa también se vieron afectadas en algunos casos por el uso de columnas de gel de sílice preempaquetadas de eliminación (Welch/Agela) eluidas con un sistema Biotage CombiFlash.

Con el propósito de juzgar la identidad y pureza de los compuestos, típicamente se usaba un sistema analítico LC-MS (cromatografía líquida/espectroscopia de masas) consistente en una plataforma Waters ZQ™ con ionización por electropulverización en modo de detección de iones positivos con una HPLC de la serie Agilent 1100 con automuestreador. La columna era generalmente una Water Xterra MS C18, 3,0x50 mm, 5 µm. El caudal era de 1 ml/min, y el volumen de inyección era de 10 µl. La detección UV se realizó en el intervalo de 210-400 nm. La fase móvil consistía en solvente A (agua más 0,06% de TFA) y solvente B (acetonitrilo más 0,05% de TFA) con un gradiente de 100% de solvente A durante 0,7 min cambiando a 100% de solvente B durante 3,75 min, mantenido durante 1,1 min, y luego volviendo a 100% de solvente A durante 0,2 min.

Para algunas separaciones, también puede ser útil el uso de la cromatografía de fluidos supercríticos. Las separaciones por cromatografía de fluidos supercríticos se realizaron usando un sistema Minigram de Mettler-Toledo con las siguientes condiciones típicas: 100 bar, 30° C., 2,0 ml/min eluyendo una columna AD de 12 mm con 40% de MeOH en fluido supercrítico CO₂. En el caso de analitos con grupos amino básicos, al modificador de metanol se le añadió un 0,2% de isopropil amina.

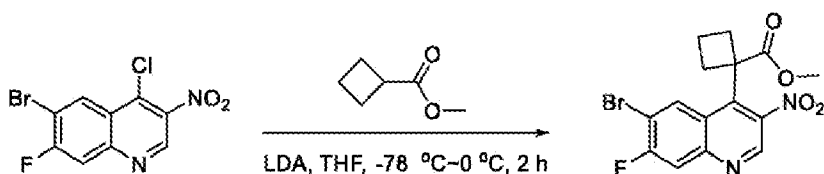
Muchos compuestos de Fórmula (I) también se purificaron por HPLC de fase inversa, usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En algunos casos, la purificación por HPLC preparativa se llevó a cabo usando PE Sciex 150 EX Mass Spec controlando un colector Gilson 215 acoplado a un sistema de HPLC preparativa Shimadzu y un autoinyector Leap. Los compuestos se recogieron de la corriente de elución usando detección por MS en la detección de iones positivos: La elución de los compuestos de las columnas C-18 (2,0x10 cm eluyendo a 20 ml/min) se efectuó usando el modo de gradación lineal apropiado durante 10 minutos de solvente (A) 0,05% de TFA/H₂O y solvente (B) 0,035% de TFA/nitrilo de acetilo. Para la inyección en los sistemas HPLC, las muestras brutas se disolvieron en mezclas de metanol, nitrilo de acetilo y DMSO.

Los compuestos se caracterizaron o mediante ¹H-NMR usando un espectrómetro Bruker ADVANCE III HD 400 MHz o un espectrómetro Bruker AVANCE 300 MHz.

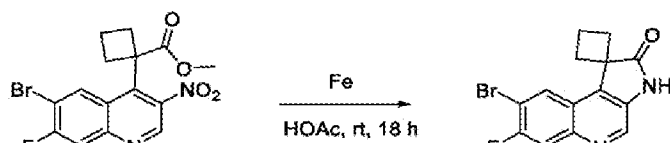
LISTA DE ABREVIATURAS

DCE	1,2-dicloroetano
DCM	diclorometano
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOAc	acetato de etilo
HOAc	Ácido acético
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
MeI	yoduro de metilo
MeOH	alcohol metílico
MW	microondas
NMP	1-metil-2-pirrolidinona
rt	temperatura ambiente
TBDMS	terc-butil-dimetilsililo
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi
THF	tetrahidrofurano

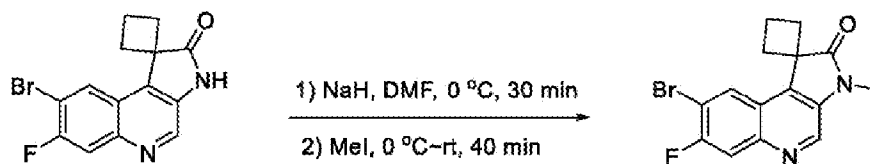
PREPARACIÓN DE COMPUESTOS



1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-yl)ciclobutano-1-carboxilato de metilo: Se trató una solución de ciclobutanocarboxilato de metilo (0,73 g, 6,38 mmol) en tetrahidrofurano (5,00 ml) con diisopropilamida de litio recién preparada (6,38 mmol) en tetrahidrofurano (45,0 ml) durante 1 hora a -78° C. bajo atmósfera de nitrógeno seguida de la adición de 6-bromo-4-cloro-7-fluoro-3-nitroquinolina (1,50 g, 4,91 mmol) en porciones durante 2 min. Después de agitar durante 1 hora más a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (60,0 ml) y se diluyó con agua (120 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (3x60,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x50,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 1%~2% en éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (240 mg, 13%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.14 (s, 1H), 8.20 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.90 (d, J=8.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.12-2.99 (m, 1H), 2.58-2.48 (m, 3H), 1.91-1.83 (m, 1H), 1.45-1.27 (m, 1H); MS: [(M+1)]⁺=383.17, 385.17.

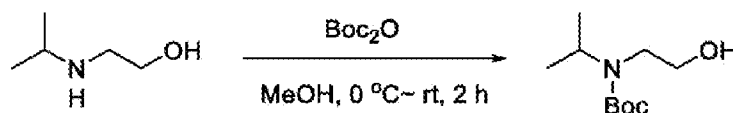


8'-Bromo-7'-fluorospiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'F)-ona: Se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente una mezcla de 1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)ciclobutano-1-carboxilato de metilo (240 mg, 0,63 mmol) y polvo de hierro (350 mg, 6,26 mmol) en ácido acético (10,0 ml). La mezcla resultante se filtró y la torta del filtro se lavó con acetato de etilo (5x100 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con metanol al 1%~2% en diclorometano para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (100 mg, 50%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.75 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.52 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 2.90-2.75 (m, 2H), 2.50-2.37 (m, 4H); MS: $[(M+1)]^+=321.15$, 323.15.

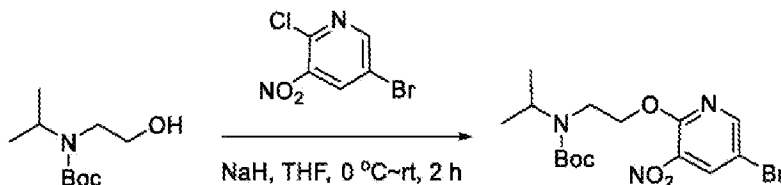


Z

8'-Bromo-7'-fluoro-3'-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona: Se trató una solución de 8-bromo-7-fluoro-2,3-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2-ona (100 mg, 0,31 mmol) en N,N-dimetilformamida (10,0 ml) con hidruro de sodio (19,9 mg, 0,50 mmol, 60% disperso en aceite mineral) a 0° C durante 30 min bajo atmósfera de nitrógeno seguido de la adición de yodometano (66,3 mg, 0,47 mmol). Después de agitar durante 40 min adicionales a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (10,0 ml). La mezcla resultante se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x30,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x20,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=20/1, v:v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (102 mg, 98%): ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.78 (s, 1H), 8.61 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=9.8$ Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.94-2.85 (m, 2H), 2.72-2.61 (m, 3H), 2.56-2.48 (m, 1H); MS: $[(M+1)]^+=335.00$, 337.00.

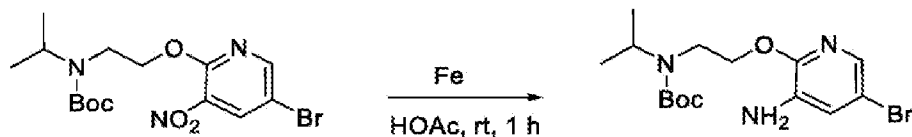


N-(2-hidroxi-etil)-N-(propan-2-il)carbamato de terc-butilo: A una solución de 2-[(propan-2-il)amino]etan-1-ol (40,0 g, 388 mmol) en metanol (300 ml) se le añadió dicarbonato de di-terc-butilo (127 g, 586 mmol) gota a gota a 0° C. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 0%~4% en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (65,0 g, 82%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.17 (s, 1H), 3.71 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 3.30 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.12 (d, $J=6.8$ Hz, 6H).

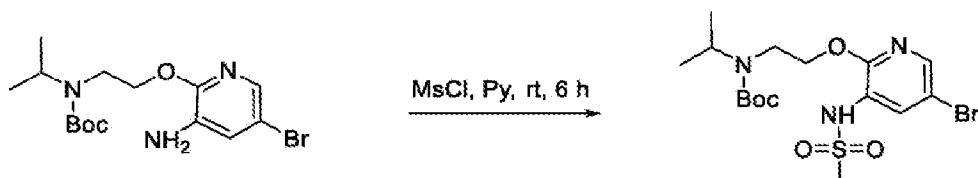


N-[2-[(5-bromo-3-nitropiridin-2-il)oxi]etil]-N-(propan-2-il)carbamato de terc-butilo: Se trató una solución de N-(2-hidroxi-etil)-N-(propan-2-il)carbamato de terc-butilo (15,4 g, 75,8 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (250 ml) con hidruro sódico (3,30 g, 82,1 mmol, 60% p/p disperso en aceite mineral) durante 1 hora a 0° C bajo atmósfera de nitrógeno seguido de la adición de 5-bromo-2-cloro-3-nitropiridina (15,0 g, 63,2 mmol) durante 2 min a 0° C. Después de 2 horas adicionales a 25° C, la reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (50,0 ml) y se diluyó con agua (500 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a

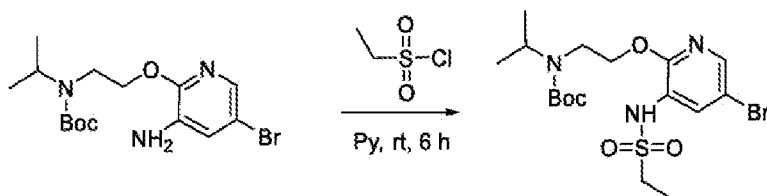
presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~18% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (18,0 g, 71%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.42 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.57 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 4.32 (s, 1H), 3.51 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.15 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); MS: $[(M+1)]^+=404.00, 406.00$.



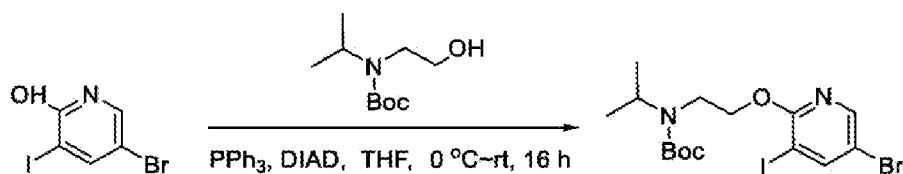
N-[2-[(3-amino-5-bromopiridin-2-yl)oxy]etil]-N-(propan-2-yl)carbamato de terc-butilo: A una solución de N-[2-[(5-bromo-3-nitropiridin-2-yl)oxy]etil]-N-(propan-2-yl)carbamato de terc-butilo (15,0 g, 37,1 mmol) en ácido acético (150 ml) se añadió polvo de hierro (20,7 g, 371 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 1 hora adicional a temperatura ambiente, la mezcla resultante se filtró y la torta filtrada se lavó con tetrahidrofurano (4x100 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20% en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (12,0 g, 86%): ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.40 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 4.40 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 4.25-3.99 (m, 1H), 3.52 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.17 (d, $J=6.8$ Hz, 6H); MS: $[(M+1)]^+=374.10, 376.10$.



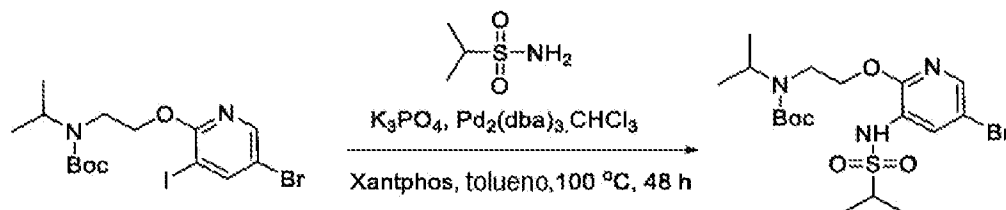
(2-[(5-bromo-3-(metilsulfonamido)piridin-2-yl)oxy]etil)(isopropil)carbamato de terc-butilo: A una solución de N-[2-[(3-amino-5-bromopiridin-2-yl)oxy]etil]-N-(propan-2-yl)carbamato de terc-butilo (18,8 g, 50,3 mmol) en piridina (400 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo gota a gota (8,63 g, 75,4 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 3%~25% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (16,3 g, 72%): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.41 (s, 1H), 8.05 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 4.35 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 4.15 (s, 1H), 3.43 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.11 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.09 (d, $J=6.8$ Hz, 6H); MS: $[(M+1)]^+=452.00, 454.00$.



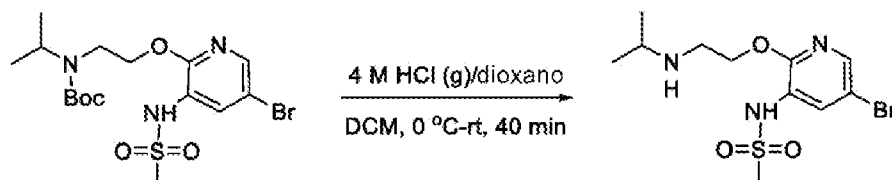
(2-[(5-bromo-3-(etilsulfonamido)piridin-2-yl)oxy]etil)(isopropil)carbamato de terc-butilo: A una solución agitada de (2-[(3-amino-5-bromopiridin-2-yl)oxy]etil)(isopropil)carbamato de terc-butilo (5,00 g, 13,4 mmol) en piridina (120 ml) se le añadió cloruro de etanosulfonilo (5,15 g, 40,1 mmol) gota a gota a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 3%~25% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (3,78 g, 61%): ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.92 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 4.48 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.54 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.13 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.35 (t, $J=7.4$ Hz, 3H), 1.19 (d, $J=6.8$ Hz, 6H); MS: $[(M+1)]^+=466.10, 468.10$.



N-[2-[(5-bromo-3-iodopiridin-2-il)oxi]etil]-N-isopropilcarbamato de terc-butilo: A una solución de 5-bromo-3-iodopiridin-2-ol (10,0 g, 33,3 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (300 ml) se le añadieron trifenilfosfina (11,4 g, 43,3 mmol), N-(2-hidroxietil)-N-isopropilcarbamato de terc-butilo (8,80 g, 43,3 mmol) y azodiformato de diisopropilo (8,80 g, 43,4 mmol) gota a gota a 0° C. La mezcla resultante se agitó durante 16 horas adicionales a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 2%~10% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (14,0 g, 87%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 2H), 4.43 (t, J=6.4 Hz, 2H), 4.38-3.96 (m, 1H), 3.50 (t, J=6.4 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.19 (d, J=6.8 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=484.95, 486.95.



(2-((5-bromo-3-((1-metiletil)sulfonamido)piridin-2-il)oxi)etil)(isopropil)carbamato de terc-butilo: A una mezcla de (2-((5-bromo-3-yodopiridin-2-il)oxi)etil)(isopropil)carbamato de terc-butilo (5,00 g, 10,3 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (1,80 g, 3,10 mmol) y propano-2-sulfonamida (1,50 g, 12,4 mmol) en tolueno (125 ml) se le añadieron fosfato tripotásico (10,9 g, 51,5 mmol) y aducto de tris(dibencilideneacetona)dipaladio-cloroformo (1,10 g, 1,10 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 48 horas a 100°C bajo atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla resultante se filtró. La torta filtrada se lavó con acetato de etilo (3x20 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~20% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (1,90 g, 39%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J=2.1 Hz, 1H), 7.89 (d, J=2.2 Hz, 1H), 4.44 (t, J=6.3 Hz, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.48 (t, J=6.3 Hz, 2H), 3.24-3.30 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.41 (d, J=6.8 Hz, 6H), 1.14 (d, J=6.8 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=480.20, 482.20.

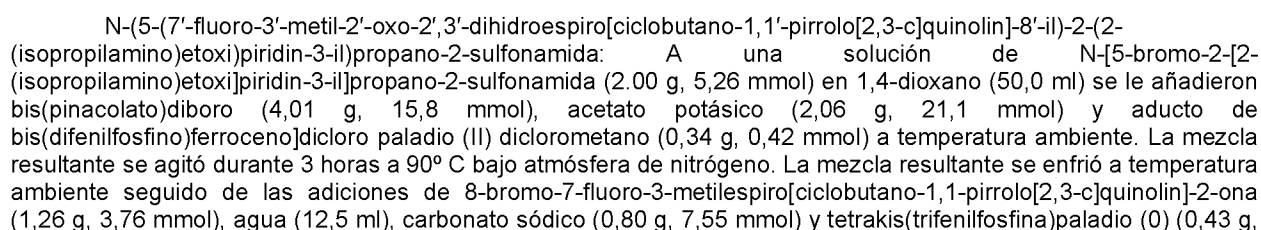


N-(5-bromo-2-[2-[(propan-2-il)amino]etoxi]piridin-3-il)metanosulfonamida: Se trató una solución de N-[2-[(5-bromo-3-metanosulfonamidopiridin-2-il)oxi]etil]-N-(propan-2-il)carbamato de terc-butilo (3.00 g, 6,63 mmol) en diclorometano (5,00 ml) con cloruro de hidrógeno (20,0 ml, 4 M en 1,4-dioxano) durante 40 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se basificó a pH=8 con bicarbonato sódico acuoso saturado (30,0 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (6x200 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~10% de metanol en diclorometano. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (1,20 g, 50%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.68 (d, J=2.3 Hz, 1H), 7.61 (d, J=2.3 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.36 (t, J=5.2 Hz, 2H), 3.19-3.12 (m, 1H), 3.07 (t, J=5.1 Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 1.15 (d, J=6.4 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=352.10, 354.10.

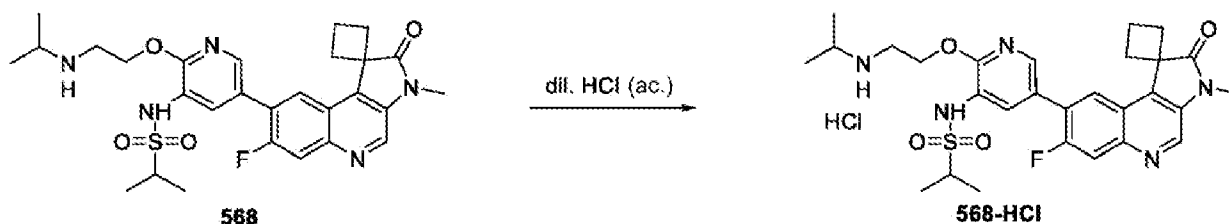
Los siguientes productos intermedios se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente:

Productos Intermedios	Estructura	Nombre	MS: [(M + 1)] ⁺	¹ H NMR
CC108		N-(5-Bromos-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)etanosulfonamida	366.10 368.10	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.92 (s, 2H), 4.50 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.15 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 3.07 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.01-2.93 (m, 1H), 1.40 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.16 (d, J = 6.3 Hz, 6H).

COMPUESTO 568



0,38 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 6 horas a 85° C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con las siguientes condiciones: Columna: Esférica C18, 20~40 µm, 120 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM de NH₄HCO₃); Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 45 ml/min; Gradiente (B %): 5%, 2 min; 5%~25%, 8 min; 25%~39%, 9 min; 39%, 10 min; 39%~95%, 3 min; 95%, 2 min; Detector: UV 254 nm; Rt: 21 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se recogieron y concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (1,66 g, 80%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.88 (s, 1H), 8.35-8.31 (m, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 4.55 (br, 1H), 4.44 (t, J=5.2 Hz, 2H), 3.35-3.30 (m, 4H), 2.93-2.79 (m, 5H), 2.55-2.38 (m, 4H), 1.29 (d, J=7.2 Hz, 6H), 1.02 (d, J=6.0 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=556.30.

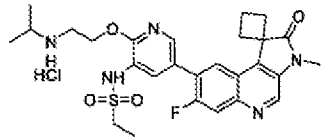


Cloruro de hidrógeno de N-(5-(7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)propano-2-sulfonamida. Se liofilizó una solución de N-(5-(7'-fluoro-3'-metil-2-oxospiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8-il)-2-[2-(isopropilamino)etoxi]piridin-3-il)propano-2-sulfonamida (1,66 g, 2.99 mmol) en solución acuosa diluida de ácido clorhídrico (392 ml, 3,14 mmol, 0,008 M) y acetonitrilo (79,0 ml) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (1,76 g, 100%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.45 (s, 1H), 9.02 (br, 2H), 8.90 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.32 (d, J=8.4 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.00 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.65 (t, J=4.4 Hz, 2H), 3.54-3.40 (m, 3H), 3.31 (s, 3H), 2.91 (t, J=11.2 Hz, 2H), 2.55-2.45 (m, 5H), 1.34-1.30 (m, 12H); MS: [(M+1)]⁺=556.30.

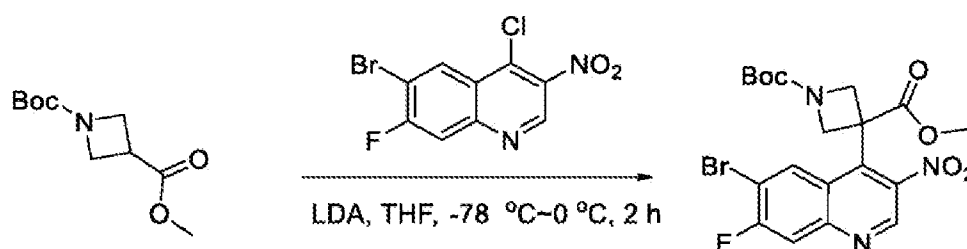
De manera similar o se afectaron parejas de paladio (II) con los productos intermedios CC108 y CC110 para proporcionar los siguientes compuestos ejemplo 569 y ejemplo 570.

Nº de Comp.	Estructura	Nombre	MS: [(M+ 1)] ⁺	¹ H NMR
569		N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida.	528.30	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.88 (s, 1H), 8.31 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.01-7.94 (m, 2H), 4.44 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.97 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.95-2.85 (m, 3H), 2.60-2.51 (m, 2H), 2.49-2.41 (m, 2H), 1.07 (d, J = 6.3 Hz, 6H).
569 (Sal de HCl)		Clorhidrato de N-(5-(7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida.	528.30	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.77 (s, 1H), 8.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.18 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 8.13 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.63 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.40-3.32 (m, 6H), 3.04 (s, 3H), 3.00-2.90 (m, 2H), 2.74-2.51 (m, 4H), 1.31 (d, J = 5.2 Hz, 6H).
570		N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)etanosulfonamida.	542.30	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.88 (s, 1H), 8.35-8.28 (m, 2H), 8.02 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.43 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.14 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.96 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 2.93-2.82 (m, 3H), 2.60-2.53 (m, 2H), 2.49-2.40 (m, 2H), 1.28 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.2 Hz, 6H).

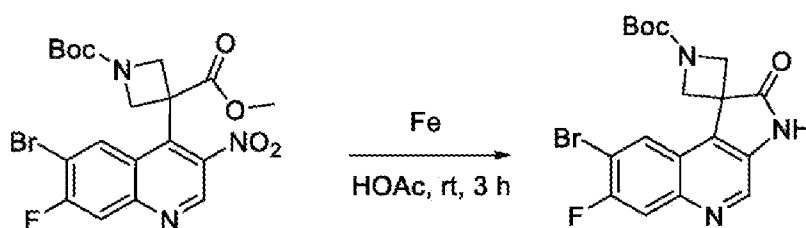
(continuación)

Nº de Comp.	Estructura	Nombre	MS: [(M+ 1)] ⁺	¹ H NMR
570 (Sal de HCl)		Clorhidrato de N-(5-(7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)etanosulfonamida.	542.30	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.82 (s, 1H), 8.43 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.22 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 4.78 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.60-3.50 (m, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.27 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.02-2.89 (m, 2H), 2.76-2.49 (m, 4H), 1.45-1.37 (m, 9H).

COMPUESTO 571

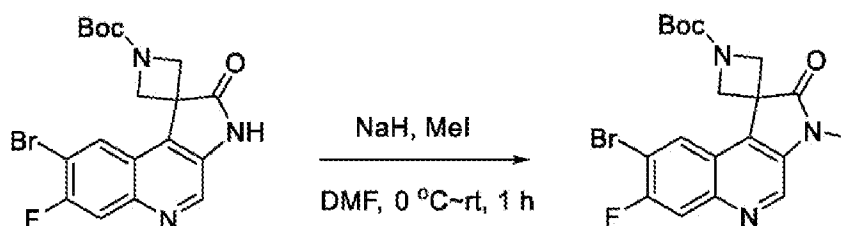


3-metil 3-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)azetidina-1,3-dicarboxilato de 1-(terc-butil): A una solución de diisopropilamida de litio recién preparada (137 mmol) en tetrahydrofurano anhidro (110 ml) se le añadió una solución de 3-metil azetidina-1,3-dicarboxilato de 1-terc-butilo (29,3 g, 137 mmol) en tetrahydrofurano (100 ml) a -78° C. Después de agitar durante 1 hora, se añadió a la mezcla de reacción durante 20 min una solución de 6-bromo-4-cloro-7-fluoro-3-nitroquinolina (32,0 g, 105 mmol) en tetrahydrofurano (100 ml). La mezcla resultante se calentó lentamente a 0°C durante 2 horas. La reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (20,0 ml) y se diluyó con agua (800 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (3x150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 5%-20% de acetato de etilo en éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (25,0 g, 49%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.35 (s, 1H), 8.21 (d, J=9.3 Hz, 1H), 8.14 (d, J=7.1 Hz, 1H), 4.18-4.11 (m, 2H), 3.87-3.74 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 1.37 (s, 9H); MS: [(M+1)]⁺=484.20, 486.20.

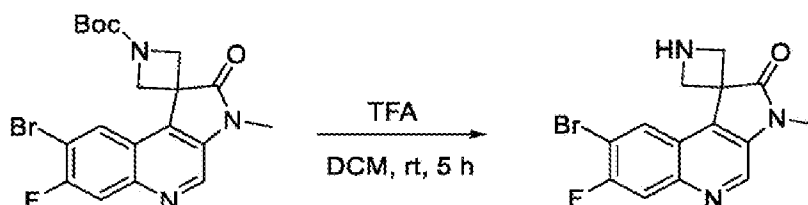


8'-bromo-7'-fluoro-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinoleína]-1-carboxilato de terc-butilo

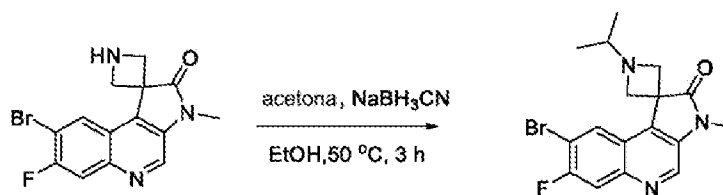
A una solución de 3-metil 3-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)azetidina-1,3-dicarboxilato de 1-terc-butilo (12,0 g, 24,8 mmol) en ácido acético (300 ml) se añadió polvo de hierro (9,69 g, 174 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se tomó con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (4x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%-5% de metanol en diclorometano para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (10,4 g, 99%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.02 (br, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.24 (d, J=7.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J=10.1 Hz, 1H), 4.29 (d, J=9.0 Hz, 2H), 4.21 (d, J=9.0 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H); MS: [(M+1)]⁺=422.20, 424.20.



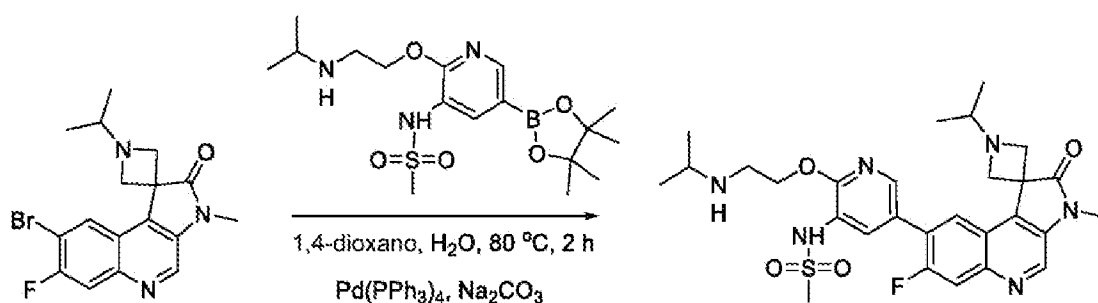
8'-bromo-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinoleína]-1-carboxilato de terc-butilo: A una solución agitada de 8-bromo-7-fluoro-2-oxo-2,3-dihidroespiro[azetidina-3,1-pirrolo[2,3-c]quinolina]-1-carboxilato de terc-butilo (4,22 g, 9,99 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (100 ml) se le añadió hidruro sódico (0,52 g, 13,0 mmol, 60% disperso en aceite mineral) a 0° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de la adición de yodometano (1,70 g, 12,0 mmol). Después de agitar durante 1 hora adicional a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (20,0 ml) y se diluyó con agua (1,00 l). Los sólidos precipitados se recogieron por filtración, se lavaron con agua (3x30,0 ml) y hexano (2x30,0 ml). El sólido resultante se secó bajo luz infrarroja para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (3,93 g, 90%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 8.47 (d, J=7.0 Hz, 1H), 7.94 (d, J=9.1 Hz, 1H), 4.54 (d, J=9.1 Hz, 2H), 4.31 (d, J=9.0 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 1.56 (s, 9H); MS: [(M+1)]⁺=436.15, 438.15.



8-Bromo-7-fluoro-3-metil-2,3-dihidroespiro[azetidina-3,1-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2-ona: Se agitó una solución de 8-bromo-7-fluoro-3-metil-2-oxo-2,3-dihidroespiro[azetidina-3,1-pirrolo[2,3-c]quinolina]-1-carboxilato de terc-butilo (3,93 g, 9,01 mmol) y ácido trifluoroacético (20,0 ml) en diclorometano (100 ml) durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se basificó a pH=8 con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (6x300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x300 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (3,00 g, 99%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.56 (d, J=7.7 Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.02 (d, J=10.2 Hz, 1H), 4.18 (d, J=7.5 Hz, 2H), 3.59 (d, J=7.5 Hz, 2H), 3.29 (s, 3H); MS: [(M+1)]⁺=335.95, 337.95.

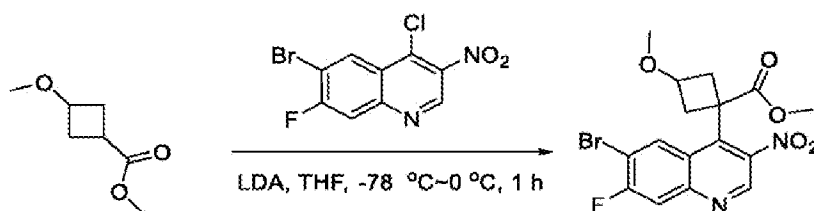


8'-Bromo-7'-fluoro-1-isopropil-3'-metilespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona: A una solución agitada de 8'-bromo-7'-fluoro-3'-metilespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'F)-ona (100 mg, 0.30 mmol) y acetona (4,00 ml) en etanol (8,00 ml) se le añadió cianoborohidruro sódico (94,0 mg, 1,50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 3 horas a 50° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con las siguientes condiciones: Columna: Esférica C18, 20~40 µm, 120 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM de NH₄HCO₃); Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 50 ml/min; Gradiente (B): 5%~20%, 6 min; 20%~50%, 30 min; 50%~95%, 5 min; 95%, 5 min; Detector: UV 254 nm. Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (85,0 mg, 77%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.84 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.00 (d, J=10.2 Hz, 1H), 3.69 (d, J=7.6 Hz, 2H), 3.46 (d, J=7.3 Hz, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.63-2.56 (m, 1H), 1.01 (d, J=6.1 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=378.10, 380.10.

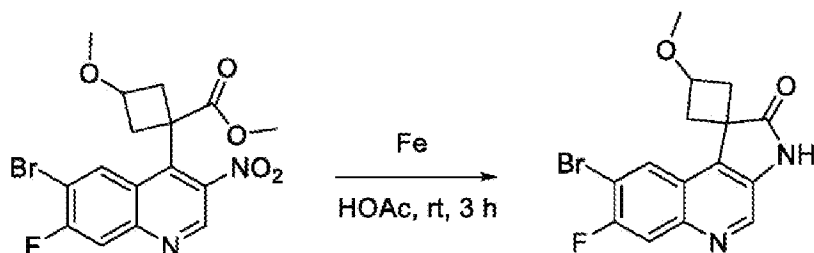


N-[5-[7-Fluoro-3-metil-2-oxo-1-(propan-2-il)-2,3-dihidroespiro[azetidina-3,1-pirrol[2,3-c]quinolin]-8-il]-2-[2-[(propan-2-il)amino]etoxi]piridin-3-il]metanosulfonamida: A una solución de 8-bromo-7-fluoro-3-metil-1-(propan-2-il)-2,3-dihidroespiro[azetidina-3,1-pirrol[2,3-c]quinolin]-2-ona (80,0 mg, 0,21 mmol) y N-(2-[2-[(propan-2-il)amino]etoxi]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-il]metanosulfonamida (169 mg, 0,42 mmol) en agua (2,00 ml) y 1,4-dioxano (10,00 ml) se le añadieron carbonato sódico (33,6 mg, 0,32 mmol) y tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (24,3 mg, 0,021 mmol). Después de agitar durante 2 horas a 80° C bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=10/1, v/v) para dar un producto bruto que se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida de fase inversa con las siguientes condiciones: Columna: C18 esférica, 20~40 µm, 120 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM NH₄HCO₃), Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 45 ml/min; Gradiente (B %): 5%, 2 min; 5%~24%, 5 min; 24%~34%, 9 min; 34%~95%, 3 min; 95%, 2 min; Detector: UV 254 nm; Rt: 21 min. Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (65,0 mg, 54%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.66 (d, J=8.9 Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.25 (t, J=1.9 Hz, 1H), 7.99-7.91 (m, 2H), 4.42 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.76 (d, J=7.2 Hz, 2H), 3.47 (d, J=7.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.96 (t, J=5.4 Hz, 2H), 2.92-2.84 (m, 1H), 2.62-2.53 (m, 1H), 1.05 (d, J=6.3 Hz, 6H), 0.97 (d, J=6.1 Hz, 6H); MS: [(M+1)]⁺=571.25.

COMPUESTO 572

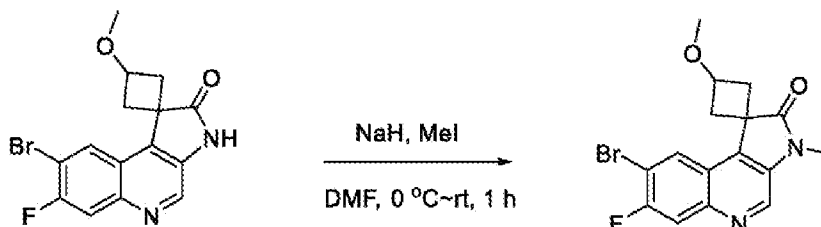


1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)-3-metoxiciclobutano-1-carboxilato de metilo: A una solución de diisopropilamida de litio recién preparada (10,6 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (100 ml) se le añadió 3-metoxiciclobutano-1-carboxilato de metilo (1,53 g, 10.6 mmol) a -78° C. Después de agitar durante 1 hora adicional, se añadió durante 5 min una solución de 6-bromo-4-cloro-7-fluoro-3-nitroquinolina (2,50 g, 8,18 mmol) en tetrahidrofurano (5,00 ml). La mezcla resultante se calentó lentamente hasta 0°C y luego se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (100 ml). La mezcla resultante se diluyó con agua (1,00 l) y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x200 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 5%~50% de acetato de etilo en éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un jarabe marrón (720 mg, 21%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.25 (s, 1H), 8.31 (d, J=7.3 Hz, 1H), 8.17 (d, J=9.3 Hz, 1H), 4.16-4.13 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.47-2.38 (m, 2H), 2.00-1.89 (m, 2H); MS: [(M+1)]⁺=413.20, 415.20.

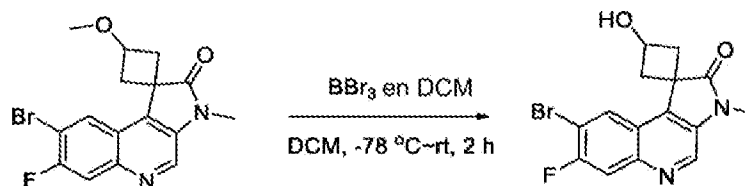


8'-Bromo-7'-fluoro-3-metoxiespiro[ciclobutano-1,1'-pirrol[2,3-c]quinolin]-2'(3'F)-ona: A una solución de 1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)-3-metoxiciclobutano-1-carboxilato de metilo (720 mg, 1,74 mmol) en ácido acético (10,0 ml) se le añadió polvo de hierro (681 mg, 12,2 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 3 horas a temperatura

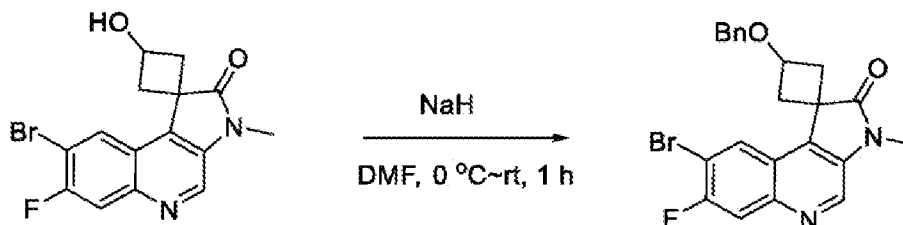
ambiente. La mezcla resultante se diluyó con agua (150 ml) y se extrajo con acetato de etilo (4x50,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x50,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 5%~30% de acetato de etilo en éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (550 mg, 89%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.93 (s, 0.45H), 8.88 (d, $J=7.2$ Hz, 0.55H), 8.84 (s, 1H), 8.78 (s, 0.55H), 8.27 (d, $J=7.0$ Hz, 0.45H) 7.92 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 4.71-4.63 (m, 0.45H), 4.57-4.49 (m, 0.55H), 3.48 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 3.07-2.83 (m, 4H); MS: $[(M+1)]^+ = 351.00, 353.00$.



8'-Bromo-7'-fluoro-3-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona: Se trató una solución de 8-bromo-7-fluoro-3-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona (550 mg, 1,56 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10,0 ml) con hidruro sódico (81,4 mg, 2,04 mmol, 60% dispersado en aceite mineral) durante 0,5 horas a 0° C. Después de agitar durante 1 hora adicional a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado (20,0 ml) y se diluyó con agua (150 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (3x50,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x30,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 5%~10% de acetato de etilo en éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (500 mg, 87%): MS: $[(M+1)]^+ = 365.10, 367.10$.

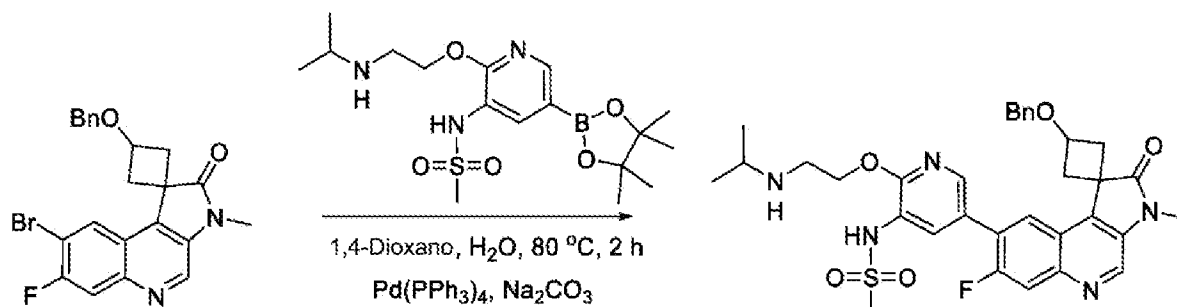


8'-Bromo-7'-fluoro-3-hidroxi-3'-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona: A una solución agitada de 8-bromo-7-fluoro-3-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona (900 mg, 2.46 mmol) en diclorometano (20,0 ml) se le añadió tribromuro de boro (24,6 ml, 24,6 mmol, 1 M en diclorometano) gota a gota a -78° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se calentó lentamente hasta temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se neutralizó con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~5% de metanol en diclorometano. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (530 mg, 62%): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.96-8.89 (m, 1.6H), 8.32 (d, $J=7.4$ Hz, 0.4H), 8.05-7.98 (m, 1H), 5.99 (d, $J=6.5$ Hz, 0.6H), 5.73 (d, $J=5.7$ Hz, 0.4H), 4.97-4.87 (m, 0.4H), 4.75-4.65 (m, 0.6H), 3.31 (s, 1.2H), 3.29 (s, 1.8H), 2.98-2.87 (m, 0.8H), 2.81-2.67 (m, 2.4H), 2.65-2.55 (m, 0.8H); MS: $[(M+1)]^+ = 351.00, 353.00$.

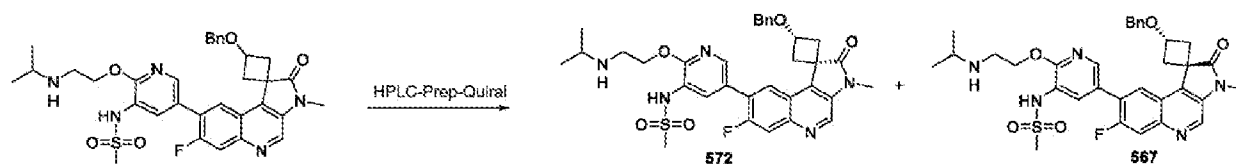


3-(benciloxi)-8-bromo-7-fluoro-3'-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'H)-ona: A una solución de 8-bromo-7-fluoro-3-hidroxi-3'-metilespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona (100 mg, 0,29 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (5,00 ml) se le añadió hidruro sódico (13,7 mg, 0,35 mmol, 60% dispersado en aceite mineral) a 0° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a 25°C, seguido de la adición de bromuro de bencilo (97,4 mg, 0,57 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 1 hora adicional a 25°C, la reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de cloruro amónico (10,0 ml). La mezcla resultante se diluyó con agua (100

ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x50,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x50,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=25/1, v/v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (64,0 mg, 51%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.92 (d, J=3.6 Hz, 1H), 8.79 (d, J=7.6 Hz, 0.5H), 8.25 (d, J=7.2 Hz, 0.5H), 8.03 (d, J=10.1 Hz, 1H), 7.50 (d, J=7.0 Hz, 1H), 7.46-7.37 (m, 3H), 7.37-7.30 (m, 1H), 4.87-4.79 (m, 0.5H), 4.62-4.50 (m, 2.5H), 3.30 (d, J=5.7 Hz, 3H), 2.98-2.90 (m, 1H), 2.80 (d, J=6.7 Hz, 2H), 2.72-2.64 (m, 1H); MS: [(M+1)] $^+$ =441.00, 443.00.

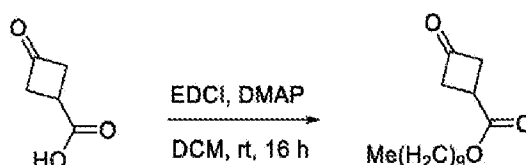


N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida: A una solución de 3-(benciloxi)-8'-bromo-7'-fluoro-3'-metilspiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-2'(3'F)-ona (64,0 mg, 0,15 mmol) y N-[2-[2-(isopropilamino)etoxi]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-il]metanosulfonamida (69,5 mg, 0,17 mmol) en agua (1,00 ml) y 1,4-dioxano (4,00 ml) se le añadieron carbonato sódico (15,4 mg, 0,15 mmol) y tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (33,5 mg, 0,029 mmol). Después de agitar durante 2 horas a 80° C bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=10/1, v/v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (55,0 mg, 60%): MS: [(M+1)] $^+$ =634.55.



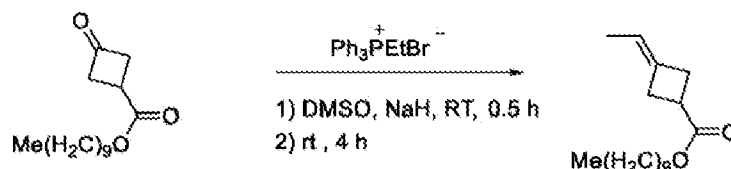
cis-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 572) y trans-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 567). La anterior N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (55,0 mg, 0,087 mmol) se separó por HPLC-Prep-Quiral con las siguientes condiciones: (Columna: CHIRALPAK ID, 2x25 cm (5 μ m); Fase móvil A: metil terc-butil éter (más 0,2% de isopropilamina), Fase móvil B: EtOH; Caudal: 17 ml/min; Gradiente: 10% de B en 13 min; Detector: UV 220/254 nm) para proporcionar cis-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 572, RT1: 8,70 min) como un sólido amarillo claro (15,3 mg, 28%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.09 (d, J=8.3 Hz, 1H), 8.02 (d, J=1.9 Hz, 1H), 7.98 (d, J=12.1 Hz, 1H), 7.42-7.34 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 1H), 4.90-4.82 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.47 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.05-2.88 (m, 5H), 2.68 (dd, J=13.9, 6.2 Hz, 2H), 1.08 (d, J=6.2 Hz, 6H); MS: [(M+1)] $^+$ =634.50 y trans-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 567, RT2: 11.2 min) como un sólido incoloro (12,6 mg, 23%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 (s, 1H), 8.59 (d, J=8.3 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.02-7.94 (m, 2H), 7.36-7.21 (m, 5H), 4.58 (q, J=6.3 Hz, 1H), 4.44 (t, J=5.4 Hz, 2H), 4.41-4.33 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.00-3.94 (m, 3H), 2.92-2.84 (m, 1H), 2.83-2.74 (m, 1H), 2.69 (dd, J=13.1, 5.8 Hz, 2H), 2.59-2.54 (m, 1H), 1.35 (d, J=6.4 Hz, 3H), 1.05 (d, J=6.3 Hz, 6H); MS: [(M+1)] $^+$ =634.55.

COMPUESTO 573

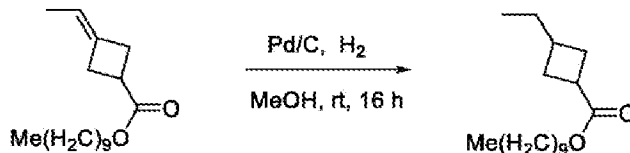


3-oxociclobutano-1-carboxilato de decilo: A una solución agitada de ácido 3-metilciclobutano-1-carboxílico

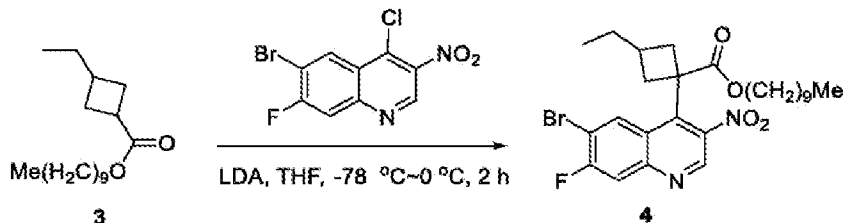
(3,00 g, 26,3 mmol) y 1-decanol (4,16 g, 26,3 mmol) en diclorometano (90,0 ml) se le añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (7,56 g, 39,4 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,32 g, 2,62 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 16 horas a 25° C y se inactivó con agua (30,0 ml). La mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x50,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~8% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (3,10 g, 47%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.15 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.47-3.35 (m, 2H), 3.35-3.15 (m, 3H), 1.69-1.61 (m, 2H), 1.39-1.22 (m, 14H), 0.88 (t, J=6.7 Hz, 3H); MS: [(M+1)]⁺=252.20.



3-etilidenciclobutano-1-carboxilato de decilo: A una solución de bromuro de etiltripenilfosfonio (17,3 g, 46,5 mmol) en dimetilsulfóxido (300 ml) se le añadió t-butoxido de potasio (4,94 g, 44,1 mmol) en porciones a 14° C. La mezcla resultante se agitó durante 0.5 horas a 25° C bajo atmósfera de nitrógeno seguido de la adición de 3-oxociclobutano-1-carboxilato de decilo (8,00 g, 31,5 mmol) gota a gota durante 2 min a 14° C. Después de agitar durante 4 horas a 25° C, la reacción se inactivó con solución acuosa saturada de cloruro amónico (20,0 ml) a 0° C. La mezcla resultante se diluyó con agua (1,00 l) y se extrajo con acetato de etilo (3x200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 1%~5% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (1,70 g, 21%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.22-5.14 (m, 1H), 4.09 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.10 (tt, J=9.2, 7.2 Hz, 1H), 2.96-2.79 (m, 4H), 1.67-1.58 (m, 2H), 1.49 (dq, J=6.0, 2.0 Hz, 3H), 1.39-1.20 (m, 14H), 0.88 (t, J=6.7 Hz, 3H).

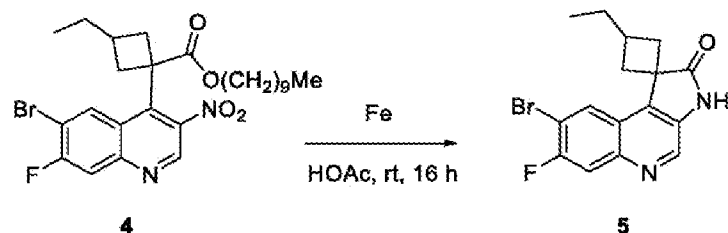


3-etilidenciclobutano-1-carboxilato de decilo: A una solución agitada de 3-etilidenciclobutano-1-carboxilato de decilo (700 mg, 4,94 mmol) en metanol (10,0 ml) se le añadió Pd/C anhidro (70,0 mg, 10% de paladio sobre carbón) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno (2 atm.), la mezcla resultante se filtró. La torta del filtro se lavó con metanol (3x20,0 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (666 mg, 95%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.10-4.02 (m, 2H), 3.10-2.87 (m, 1H), 2.40-2.22 (m, 2H), 2.16-2.03 (m, 1H), 1.91-1.76 (m, 2H), 1.67-1.56 (m, 2H), 1.48-1.21 (m, 16H), 0.92-0.75 (m, 6H).

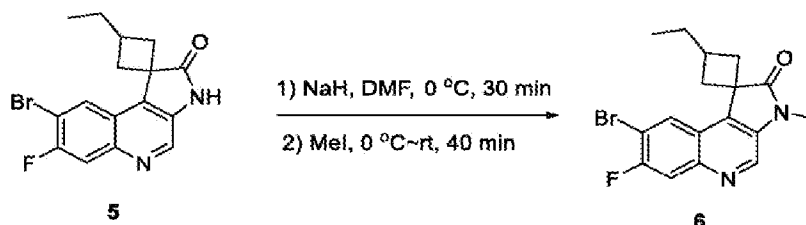


1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-yl)-3-etilciclobutano-1-carboxilato de decilo: A una solución de diisopropilamida de litio recién preparada (2,45 mmol) en tetrahydrofurano anhidro (20,0 ml) se le añadió 3-oxociclobutano-1-carboxilato de decilo (657 mg, 2,45 mmol) a -78° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y a continuación se añadió 6-bromo-4-cloro-7-fluoro-3-nitroquinolina (575 mg, 1,88 mmol) a -78° C. Después de agitar durante 1 hora más a 25° C, la reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de cloruro amónico (10,0 ml). La mezcla resultante se diluyó con agua (20,0 ml) y se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (5x30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (4x30,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 3%~9% en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título

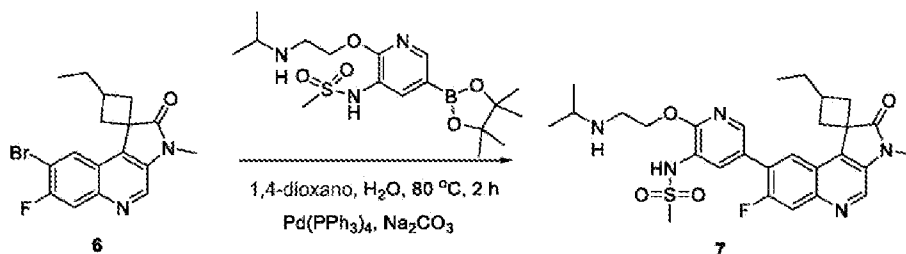
como un aceite amarillo (450 mg, bruto): MS: $[(M+1)]^+ = 537.25, 539.25$.



8'-Bromo-3-etil-7'-fluorospiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'H)-ona: Se agitó una mezcla de 1-(6-bromo-7-fluoro-3-nitroquinolin-4-il)-3-etilciclobutano-1-carboxilato de decilo bruto (450 mg, 0,84 mmol) y polvo de hierro (327 mg, 5,86 mmol) en ácido acético (8,00 ml) durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se filtró, la torta filtrada se lavó con tetrahidrofurano (5x300 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se basificó hasta pH=8 con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (5x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50,0 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=15/1, v/v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (40,0 mg, 14%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.76 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.67 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J=7.2$ Hz, 0.4H), 8.39 (d, $J=7.4$ Hz, 0.6H), 7.98 (dd, $J=10.1, 3.4$ Hz, 1H), 2.88-2.73 (m, 2H), 2.55-2.51 (m, 2H), 2.29-2.19 (m, 1H), 1.78-1.64 (m, 2H), 0.99-0.88 (m, 3H); MS: $[(M+1)]^+ = 349.05, 351.05$.

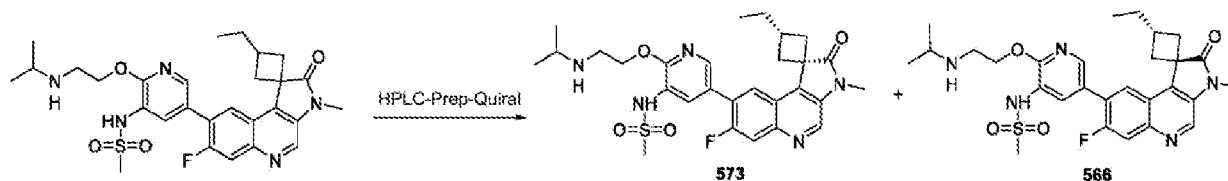


8'-bromo-3-etil-7'-fluoro-3'-metilspiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'H)-ona: A una solución de 8'-bromo-3-etil-7'-fluorospiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'H)-ona (35,0 mg, 0,10 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (3,00 ml) se le añadió hidruro sódico (5,21 mg, 0,13 mmol, 60% dispersado en aceite mineral) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a 25 °C y a continuación se añadió yodometano (21,4 mg, 0,15 mmol) a 0 °C. Después de agitar durante 40 minutos adicionales a 25 °C, la reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de cloruro amónico (20,0 ml). La mezcla resultante se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (4x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (4x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=20/1, v/v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (30,0 mg, 83%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J=7.4$ Hz, 0.4H), 8.42 (d, $J=7.4$ Hz, 0.6H), 8.02 (dd, $J=10.1, 3.1$ Hz, 1H), 3.29 (d, $J=4.5$ Hz, 3H), 2.93-2.75 (m, 2H), 2.61-2.52 (m, 2H), 2.29-2.21 (m, 1H), 1.82-1.67 (m, 2H), 0.98-0.89 (m, 3H); MS: $[(M+1)]^+ = 363.05, 365.05$.



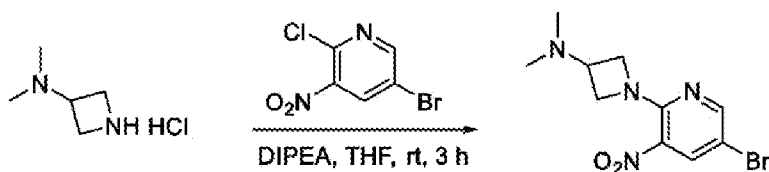
N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida: A una solución de 8'-bromo-3-etil-7'-fluoro-3'-metilspiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2'(3'H)-ona (50,0 mg, 0,14 mmol) y *N*-[2-[2-(isopropilamino)etoxi]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-il]metanosulfonamida (165 mg, 0,41 mmol) en agua (0,75 ml) y 1,4-dioxano (3,00 ml) se le añadieron carbonato sódico (17,5 mg, 0,17 mmol) y tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (31,8 mg, 0,028 mmol). Después de agitar durante 2 horas a 80 °C bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=10/1, v/v) para dar un producto bruto que se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida de fase inversa con las siguientes condiciones: Columna: C18 esférica, 20~40 μm , 120 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM de NH_4HCO_3), Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 45 ml/min; Gradiente (B %): 5%~25%, 7 min; 25%~45%, 25 min; 45%~65%, 8 min; 95%, 5 min; Detector: UV 254 nm.

Las fracciones que contenían el producto deseado se recogieron a los 17 min y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (30,0 mg, 40%): MS: $[(M+1)]^+ = 556.20$.

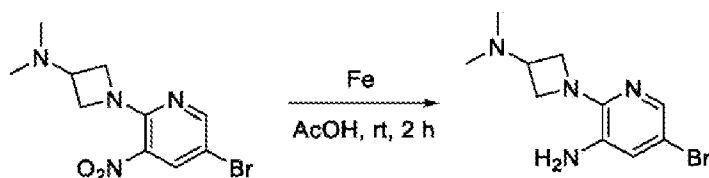


cis-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 573) y trans-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 566): La N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida anterior (30,0 mg) se separó por HPLC-Prep-Quiral con las siguientes condiciones: Columna: Chiralpak IC, 2x25 cm, 5 μ m; Fase móvil A: Hexano/DCM=3/1 (más 0,2% de isopropilamina), Fase móvil B: EtOH; Caudal: 20 ml/min; Gradiente: 30% B en 15 min; Detector: UV 220/254 nm. Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron a presión reducida para proporcionar cis-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 573, RT1: 10.94 min) como sólido incoloro (12,8 mg, 43%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.87 (s, 1H), 8.32-8.22 (m, 2H), 7.98 (d, J=12.2 Hz, 2H), 4.44 (t, J=5.3 Hz, 2H), 3.30 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.99 (t, J=5.3 Hz, 2H), 2.94-2.78 (m, 4H), 2.26 (dd, J=12.2, 5.7 Hz, 2H), 1.75 (t, J=7.2 Hz, 2H), 1.07 (d, J=6.3 Hz, 6H), 0.89 (t, J=7.3 Hz, 3H); MS: $[(M+1)]^+ = 556.25$ y trans-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida (EJEMPLO 566, RT2: 13.63 min) como un sólido incoloro (8,6 mg, 29%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 (s, 1H), 8.34-8.26 (m, 2H), 8.01-7.93 (m, 2H), 4.44 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 3.00 (d, J=5.4 Hz, 2H), 2.96-2.83 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 1.66 (q, J=7.2, 6.7 Hz, 2H), 2.56-2.52 (m, 2H), 1.07 (d, J=6.2 Hz, 6H), 0.89 (t, J=7.3 Hz, 3H); MS: $[(M+1)]^+ = 556.20$.

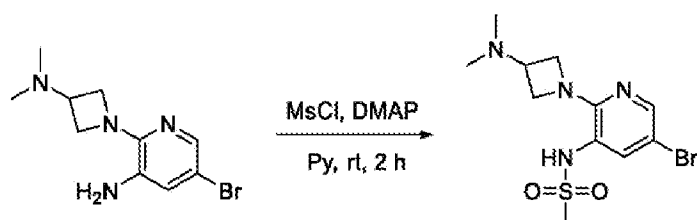
COMPUESTO 574



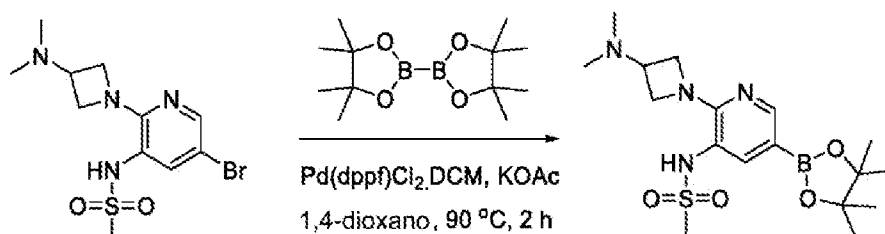
1-(5-Bromo-3-nitropiridin-2-il)-N,N-dimetilazetidin-3-amina: A una solución agitada de clorhidrato de N,N-dimetilazetidin-3-amina (0,27 g, 2,08 mmol) y 5-bromo-2-cloro-3-nitropiridina (0,49 g, 2,08 mmol) en tetrahidrofurano (40,0 ml) se le añadió diisopropiletilamina (0,67 g, 5,19 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 3 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un 3%-9% de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (0,50 g, 59%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (d, J=2.2 Hz, 1H), 8.29 (d, J=2.2 Hz, 1H), 4.20 (ddd, J=10.0, 7.0, 1.2 Hz, 2H), 3.93 (ddd, J=9.9, 5.1, 1.2 Hz, 2H), 3.16 (tt, J=7.0, 5.1 Hz, 1H), 2.20 (s, 6H); MS: $[(M+1)]^+ = 301.00, 303.00$.



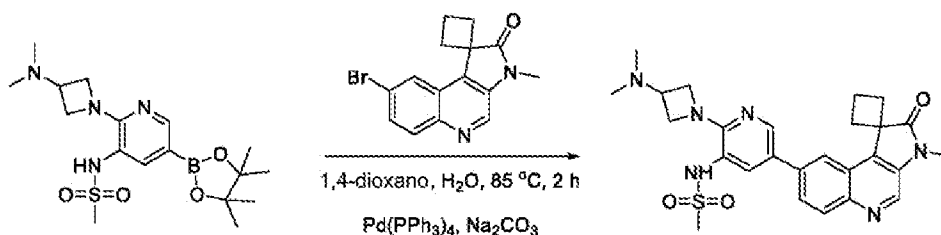
1-(5-bromo-3-nitropiridin-2-il)-N,N-dimetilpiperidin-3-amina. A una solución de 1-(5-bromo-3-nitropiridin-2-il)-N,N-dimetilpiperidin-4-amina (6,20 g, 20,7 mmol) en ácido acético (90,0 ml) se le añadió polvo de hierro (11,5 g, 206 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla resultante se filtró y la torta filtrada se lavó con tetrahidrofurano (3x100 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se tomó con carbonato sódico acuoso saturado (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con metanol al 2%-4% en diclorometano para proporcionar el compuesto del título como un sólido gris (5,20 g, 92%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.93 (d, J=2.0 Hz, 1H), 4.19-4.04 (m, 2H), 3.93-3.88 (m, 2H), 3.21-3.14 (m, 1H), 2.24 (s, 6H); MS: $[(M+1)]^+ = 271.00, 273.00$.



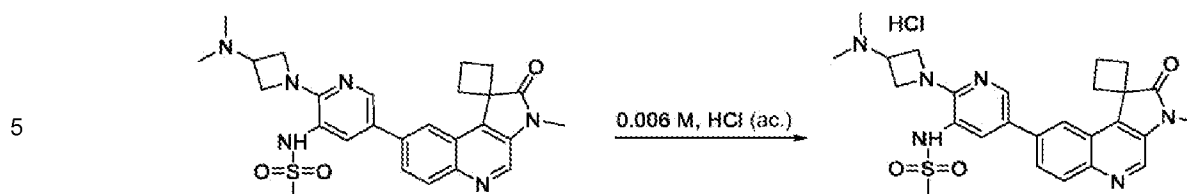
N-(5-bromo-2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)piridin-3-il)metanosulfonamida: A una solución agitada de 5-bromo-2-[3-(dimetilamino)azetidin-1-il]piridin-3-amina (2,10 g, 7,77 mmol) y *N,N*-4-dimetilaminopiridina (77,0 mg, 0,63 mmol) en piridina (70,0 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (1,77 g, 15,5 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con las siguientes condiciones: Columna: C18 esférica, 20~40 μ m, 330 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM NH_4HCO_3), Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 65 ml/min; Gradiente (B %): 5%~20%, 8 min; 20%~40%, 20 min; 40%~95%, 2 min; 95%, 5 min; Detector: UV 254 nm. Las fracciones deseadas se recogieron a 19 min y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (1,40 g, 52%): ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.92 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J=8.8, 7.2$ Hz, 2H), 3.96 (dd, $J=9.0, 5.6$ Hz, 2H), 3.24-3.16 (m, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.20 (s, 6H); MS: $[(M+1)]^+=349.00, 351.00$.



N-(2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-il)metanosulfonamida: A una solución de N-[5-bromo-2-[3-(dimetilamino)azetidin-1-il]piridin-3-il]metanosulfonamida (1,00 g, 2,86 mmol) y 4 bis(pinacolato)diboro (2,18 g, 8,59 mmol) en 1,4-dioxano (30,0 ml) se le añadieron acetato potásico (1,12 g, 11,5 mmol) y aducto de bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloro paladio (II) diclorometano (351 mg, 0,43 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a 85 $^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida inversa con las siguientes condiciones: Columna: Esférica C18, 20~40 μ m, 330 g; Fase móvil A: agua (más 10 mM NH_4HCO_3), Fase móvil B: acetonitrilo; Caudal: 65 ml/min; Gradiente (B %): 5%~20%, 7 min; 20%~40%, 12 min; 40%~95%, 2 min; 95%, 5 min; Detector: UV 254 nm. Las fracciones deseadas se recogieron a 20 min y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (800 mg, 71%): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.78 (s, 1H), 8.18 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.93 (dd, $J=8.9, 5.0$ Hz, 2H), 3.12-3.04 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.09 (s, 6H), 1.27 (s, 12H); MS: $[(M+1)]^+=397.20$.



N-(2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)-5-(3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)piridin-3-il)metanosulfonamida: A una solución de 8-bromo-3-metil-2,3-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-2-ona (320 mg, 1.01 mmol) y N-[2-[3-(dimetilamino)azetidin-1-il]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-il]metanosulfonamida (600 mg, 1,51 mmol) en 1,4-dioxano (13,0 ml) y agua (2,00 ml) se le añadieron carbonato sódico (160 mg, 1,51 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (175 mg, 0,15 mmol). Después de agitar durante 2 horas a 85 $^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por TLC-Prep (DCM/MeOH=8/1, v/v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (350 mg, 69%): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.07 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.13 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 4.28-4.21 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 3.14 (s, 4H), 2.98-2.90 (m, 2H), 2.60-2.52 (m, 4H), 2.13 (s, 6H); MS: $[(M+1)]^+=507.20$.



Clorhidrato de N-(2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)-5-(3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)piridin-3-il)metanosulfonamida: Se liofilizó directamente una solución de N-(2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)-5-(3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)piridin-3-il)metanosulfonamida (350 mg, 0.69 mmol) en solución acuosa de ácido clorhídrico diluido (115 ml, 0.69 mmol, 0.006 M) y acetonitrilo (20.0 ml) para proporcionar el compuesto del título como un sólido naranja (375 mg, 100%): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.77 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.64 (d, J=2.1 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.17 (d, J=8.9 Hz, 1H), 8.02-7.94 (m, 2H), 4.50-4.41 (m, 2H), 4.39-4.32 (m, 2H), 4.27-4.16 (m, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.99-2.88 (m, 2H), 2.82 (d, J=4.1 Hz, 6H), 2.63-2.52 (m, 4H); MS: [(M+1)] $^+$ =507.20.

ACTIVIDAD INHIBIDORA EN DIANA Y FUERA DE DIANA

ATM en ensayo Western celular:

Por la mañana, se colocaron células de cáncer de mama MCF-7 en una placa de 384 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo (Corning, #356663), 25 μl de células por pocillo. Al día siguiente, se añadieron compuestos a la placa usando una herramienta de pin (Echo 550) hasta una concentración final de 1 μM mediante una dilución en serie de 3 veces (un total de 10 dosis). A continuación, se añadió etopósido (Sigma, #E1383) a una concentración final de 100 μM . La placa se incubó a 37°C durante 1 h, y las células se fijaron mediante la adición de 25 μl de solución de fijación (paraformaldehído al 8%) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron mediante 5 lavados con 1xPBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía un 0,1% de Triton X-100; cada lavado duró 5 minutos. Las células se bloquearon añadiendo 50 μl de tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR, #927-40000) en placas de 384 pocillos durante 1,5 horas con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el tampón de bloqueo y se añadieron 20 μl de solución de anticuerpo anti-pKAP1 (Bethyl Laboratories, #A300-767A) (1/2000) a cada pocillo de la placa de 384 pocillos. La placa se incubó durante la noche a 4°C y después se lavó 5 veces con 1xPBST (1xPBS que contenía un 0,1% de Tween-20). Se añadió a cada pocillo de la placa una solución de anticuerpo secundario (IRDye 800CW IgG de cabra anti-conejo, LI-COR, #926-32211) (1/5.000) que contenía tinción de ADN DRAQ5 (CST, #4084L) (1/5.000) (20 μl), y la placa se incubó 1 hora con agitación suave en la oscuridad. Las células se lavaron 5 veces con 1xPBST (1xPBS con 0,1% de Tween-20) a temperatura ambiente con agitación suave en la oscuridad. Después del último lavado, se retiró la solución de lavado, se invirtió la placa sobre una toalla de papel fina y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto para absorber todo el tampón de lavado. El fondo de la placa se limpió con un papel húmedo y sin pelusa. La placa se escaneó inmediatamente usando ODYSSEY CLx (LI-COR).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de ADN-PK:

El primer día, se recubrió una placa de 96 pocillos (ThermoFisher, N° de Cat: 442404) con el péptido GST-p53 (1-101) (purificado por Pharmaron, departamento BCS) diluyendo 3 μg de GST-p53 en cada pocillo con 0,1 M de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9,6). La placa se incubó toda la noche a 4°C. El segundo día, se retiró el tampón de recubrimiento y la placa se lavó dos veces con PBST (1xPBS con 0,1% de Tween-20). A continuación, se añadió la solución enzimática de ADN-PK (Invitrogen, #PR9107A; la concentración final de ADN-PK: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los compuestos se diluyeron en serie hasta la concentración final máxima de 100 nM (dilución en serie de 3 veces, un total de 10 dosis), y se añadió a la placa una solución de ATP (la concentración final de ATP: 20 μM). La placa se incubó a 25°C durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con PBST (1xPBS con 0,1% de Tween-20) y se bloqueó con una solución de PBST y 1% de BSA a 4°C durante toda la noche. Al tercer día, la placa se lavó cuatro veces con PBST (1xPBS que contenía 0,1% de Tween-20). Se añadió a cada pocillo el anticuerpo primario anti-fosfo-p53 (cell signaling Technology, #9286, Phospho-p53 (Ser15) (16G8) mAb de ratón) (1/1000). Se selló la placa, se incubó 1 h a 37°C y se lavó cuatro veces con PBST (1xPBS con 0,1% de Tween-20). Se añadió a cada pocillo un anticuerpo secundario enlazado a HRP (Cell signaling Technology, #7076, IgG anti-ratón, anticuerpo enlazado a HRP) (1/1000) (100 μl). La placa se selló con cinta adhesiva, se incubó 30 min a 37°C y se lavó cuatro veces con PBST (1xPBS que contenía un 0,1% de Tween-20). En este momento, a cada pocillo se le añadieron 100 μl de sustrato TMB (Cell signaling Technology, #7004). La placa se selló con cinta adhesiva y se incubó 10 minutos a 37°C. Se añadió solución de parada (Cell signaling Technology, #7002) (100 μl) a cada pocillo y la placa se sometió a detección de absorción a 450 nm.

Ensayo bioquímico de mTOR:

Las reacciones de la quinasa mTOR se realizaron en un volumen de 10 μl en placas de 384 pocillos de bajo volumen. Típicamente, se usaron placas PerkinElmer modelo 6008260. La composición del tampón de reacción de quinasa 1x fue: 50 mM de HEPES pH 7,5, 0,01% de Tween 20, 1 mM de EGTA, 10 mM de MnCl_2 , y 2 mM de DTT.

Se añadió la solución de enzima mTOR (ThermoFisher, #PR8683B; la concentración final de mTOR: 0,5 µg/ml), y los compuestos se diluyeron en serie hasta la concentración máxima final de 100 nM (dilución en serie de 3 veces, un total de 10 dosis). Se añadieron GFP-4E-BP1 (la concentración final: 0,4 µM) y la solución de ATP (la concentración final de ATP: 3 µM) a la placa de 384 pocillos. La placa se incubó a 25°C durante 1 hora, y se añadieron a cada pocillo 10 µl de la solución de EDTA (20 mM) y anticuerpo anti-p4E-BP1 marcado con Tb (4 nM) en tampón de dilución TR-FRET. La placa se selló, se incubó 30 min a 25°C y se leyó en un lector de placas configurado para LanthaScreen™ TRFRET.

Ensayo bioquímico de PI3Kα y PI3Kδ:

Las reacciones de PI3Kα y PI3Kδ quinasa se realizaron en un volumen de 5 µl en placas de 384 pocillos de bajo volumen. Típicamente, se usaron placas PerkinElmer modelo 6008280. El tampón de reacción de quinasa 1x consistió en 50 mM de HEPES pH 7,5, 3 mM de MgCl₂, 0,03% de CHAPS, 1 mM de EGTA, 100 mM de NaCl y 2 mM de DTT. Se añadió a la placa PI3Kα (ThermoFisher, #PV4788; la concentración final de PI3Kα: 120 ng/ml) o solución enzimática de PI3Kδ (ThermoFisher, #PV6451; la concentración final de PI3Kδ: 250 ng/ml), los compuestos se diluyeron en serie hasta la concentración máxima final de 100 nM (dilución en serie de 3 veces, un total de 10 dosis), y la solución de PIP2:3PS (la concentración final: 10 µg/ml) y ATP (la concentración final de ATP: 10 µM) se añadió a la placa de 384 pocillos. La placa se incubó a 25°C durante 1 hora. Se añadió tampón reactivo ADP-Glo (5 µl) a cada pocillo. La placa se selló y se incubó durante 40 minutos a 25°C. Se añadió tampón de detección ADP-Glo (10 µl) a cada pocillo, y la placa se incubó durante 40 minutos a 25°C y se leyó en un lector de placas configurado para luminiscencia.

Ensayo de inhibición de hERG in vitro:

Se generaron células HEK 293 hERG-T-REX™ (Invitrogen, K1236) transfectando la secuencia codificadora de hERG en el vector de expresión pT-Rex-DEST30 regulado por Tet en células que expresan el represor Tet (T-Rex™ HEK293), produciendo de este modo células que pueden ser inducidas para que expresen un alto nivel de canales hERG. Las células se cultivaron en un medio que contenía un 85% de DMEM, un 10% de FBS dializado, 0,1 mM de NEAA, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, 5 µg/ml de blasticidina y 400 µg/ml de geneticina. Las células se dividieron usando TrypLE™ Express (Gibco, 12604) aproximadamente tres veces por semana y se mantuvieron entre ~40% y ~80% de confluencia. Antes del ensayo, las células se indujeron con doxiciclina (Sigma, D9891) a 1 µg/ml durante 48 horas. El día del experimento, las células inducidas se volvieron a suspender y se sembraron en los cubreobjetos a 5x10⁵ células por placa de cultivo celular de 6 cm antes de su uso. La corriente mediada por el canal hERG se adquirió mediante sistemas de registro parche abrazadera manuales equipados con amplificadores (HEKA, EPC10 y Molecular Devices, multiclamp 700B) y el microscopio de contraste de fase invertida (Olympus, IX51/71/73). Las pipetas de vidrio se prepararon con un extractor de micropipetas (Sutter, P97 y Narishige, PC-10) y se calificaron por la resistencia de la pipeta en el intervalo de 2-4 MW. La solución interna de la pipeta era 140 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA, 5 mM de MgATP, y 10 mM de HEPES (pH ajustado a 7,35 con KOH), y el tampón externo era 132 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 3 mM de CaCl₂, 0,5 mM de MgCl₂, 11,1 mM de glucosa, y 10 mM de HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH). Se mantuvo la configuración de células enteras con la resistencia de acceso continuamente monitorizada (<15 MΩ). La corriente de hERG se provocó despolarizando la membrana a +30 mV durante 4,8 segundos, y el voltaje se volvió a ajustar a -50 mV durante 5,2 segundos para eliminar la inactivación y medir la corriente de cola de desactivación. La cantidad máxima de tamaño de la corriente de cola se usó para determinar la amplitud de la corriente de hERG. Para evaluar la inhibición de hERG, el vehículo en blanco y los artículos de prueba se perfundieron a las células bajo la configuración de registro de células enteras a través del sistema de perfusión líquida (ALA, sistema de suministro de flujo por gravedad VM8). Para el ensayo de dosis-respuesta, el artículo de prueba se aplicó a las células acumulativamente desde concentraciones bajas a altas. En los experimentos se usó un control positivo (Dofetilida) para garantizar el rendimiento de las células y las operaciones como parte principal de la validación del método. El porcentaje de inhibición de la corriente de hERG se ajustó a las concentraciones de dosis para construir la curva de dosis-respuesta y determinar el IC₅₀.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se selecciona del grupo que consiste en los compuestos enumerados en la tabla siguiente.

TABLA Resultados de ensayos

Compuesto	nomenclatura	IC ₅₀ de ATM (nM) (célula)	IC ₅₀ de ADN-PK (nM)	IC ₅₀ de mTOR (nM)	IC ₅₀ de PI3K-α/δ IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de hERG (µM)
566	trans-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida	6.72	1.03	>100	>100/14	2.10

(continuación)

Compuesto	nomenclatura	IC ₅₀ de ATM (nM) (célula)	IC ₅₀ de ADN-PK (nM)	IC ₅₀ de mTOR (nM)	IC ₅₀ de PI3K-α/δ IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de hERG (μM)
567	trans-N-(5-(3-(benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida	11	2.70	>100	>100/>100	5.50
568	N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)propano-2-sulfonamida	2.88	0.79	>100	18/54	14
569	clorhidrato de N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida	2.43	0.63	>100	16/73	>30
570	clorhidrato de N-(5-(7'-Fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)etanosulfonamida	3.60	0.63	>100	21/55	10.5
571	N-(5-(7'-Fluoro-1-isopropyl-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[azetidina-3,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida	5.76/5.51	0.67/0.94	>100	62/100	5.60
572	cis-N-(5-(3-(Benciloxi)-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolin]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-il)metanosulfonamida	1.05	0.32	>100	23/15	7.5
573	cis-N-(5-(3-etil-7'-fluoro-3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)-2-(2-(isopropilamino)etoxi)piridin-3-yl)metanosulfonamida	0.92	0.30	>100	18/12	3
574	clorhidrato de N-(2-(3-(dimetilamino)azetidin-1-il)-5-(3'-metil-2'-oxo-2',3'-dihidroespiro[ciclobutano-1,1'-pirrolo[2,3-c]quinolina]-8'-il)piridin-3-il)metanosulfonamida	1.52	1.03	19.9	0.12/3	> 30

ENSAYOS CLONOGÉNICOS Y DE EFICACIA IN VIVO

Métodos

Cultivo celular. La línea celular de carcinoma de mama humano MCF-7 y las líneas celulares HCT116 p53 de tipo salvaje y HCT116 p53-/- se obtuvieron de la ATCC. Las células MCF7 y HCT116 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM (Gibco #11995-065). La línea celular de cáncer de mama triple negativo humano

MDA-MB-231 y la línea de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano FADU se obtuvieron de Charles River Laboratories (Morrisville, NC). Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, 11875-093). Las células FADU se cultivaron en medio esencial mínimo a (MEM a) (Gibco, 12571-063) suplementado con 1 mM de piruvato sódico (Gibco, 11360-070), 1xMEM aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140-050). Todas las líneas celulares se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Corning, 35-010-CV) y 1x Antibiótico-Antimicótico (Gibco #15240-062) y se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂. Todas las líneas celulares se autenticaron mediante realización de perfiles de repeticiones cortas en tándem y dieron negativo para micoplasma.

Anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen ATM fosforilada/activada (S1981, #ab81292) y ADN-PKcs (S2056, #ab18192) se adquirieron de Abcam Biotechnology (Cambridge, MA). Los anticuerpos contra ATM (#A1106) y ADN-PKcs (#ab1832) eran de Sigma y Abcam, respectivamente. Los anticuerpos de fosfo-KAP1 (S824, #A300-767A) y KAP1 (A700-014) eran de Bethyl Labs (Montgomery, TX.). Los anticuerpos de fosfo-TBK1 (#5483), cGAS (#15102) y pSTING (S366, #19781S) eran de Cell Signaling Technology (CST) (Danvers, MA.). Los anticuerpos de STING (PA5-23381) eran de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA), y los anticuerpos de actina (#A5316) eran de Sigma. Todos los anticuerpos se diluyeron 1:1000 con la excepción de la actina, que se diluyó 1:3000 en 1xTBS (1xTBS-10xTBS, Corning, 46-012-CM), 0,05% de Tween-20 (P7949) Sigma y 1% de BSA. Los anticuerpos secundarios usados fueron (a) anti-conejo de cabra método Li-Cor (926-3221) y anti-ratón de cabra (926-68020) Li-Cor (b) método ECL: IgG Anti-conejo, enlazado con HRP (#7074S), CST.

Inmunotransferencia. Las células se pretrataron con el Compuesto 569 a 20, 100, 500 o 1000 nM o DMSO durante 30 min y luego se irradiaron con 0 o 10 Gy (XRAD 160, Precision X Ray) como se muestra en la FIG. 1. En la FIG. 3, las células se pretrataron con Compuesto 569 a 1 µM, ATMi (AZD0156) a 1 µM, ADN-PKi (peposertib) a 1 µM como agentes individuales o DMSO o con ATMi y ADN-PKi en combinación a 0,5 micromolar cada uno o a 1 micromolar cada uno durante 30 min y luego se irradiaron con 0 o 10 Gy (XRAD 160, Precision X Ray) como se muestra en la FIG. 1. Una hora después de la IR, las células se lisaron en tampón RIPA (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% de SDS, 0,5% de desoxicolato sódico, 1% de IGEPAL® CA-630 (Sigma, 18896) durante 20 min a 4°C en presencia de cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche, #04693159001 & #04906837001). Los lisados celulares se centrifugaron a 13.200 g durante 10 min a 4°C y se analizó el contenido proteico de los sobrenadantes mediante el ensayo BCA (Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA, N° de cat. 23227, ThermoFisher Waltham, MA 02451) y se usaron cantidades iguales de proteína/carril para los análisis de inmunotransferencia posteriores. Las proteínas se desnaturalizaron mediante la adición de tampón de muestras NuPAGE LSD [4x] (Invitrogen, NP0007) que contenía β-mercaptoetanol a una concentración final del 2,5% y las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles de proteínas del 3-8% de Tris-Acetato NuPAGE (Invitrogen, EA03785BOX) y se electroforizaron con tampón SDS 1xTris-Acetato (Invitrogen, LA0041), o se cargaron en geles de proteínas del 4-12% de Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen, NP0336BOX) y se electroforizaron con tampón SDS 1xMOPS (Invitrogen, NP0001).

Las proteínas se transfirieron durante la noche a membranas de nitrocelulosa (Amersham, 10600003). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en 1xTBS durante 1 hora y se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 4 x 10 min con 1X TBS a RT y, a continuación, se incubaron con anticuerpos secundarios durante 1 h a RT, seguido de un lavado de 3 x 10 min con 1XTBS a RT. Las membranas se visualizaron con el sistema ODYSSEY CLX, o con ECL (sustrato de transferencia ECL, Pierce, 32209, 34075, 34095).

Ensayo de supervivencia clonogénica. Este ensayo se realizó con el compuesto 569. Las células se sembraron en placas en placas de 6 pocillos a diferentes densidades: 250 células para el control sin IR, 5000 células para 2 Gy de IR y 10000 células para 4 Gy de IR y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, las células se preincubaron con el compuesto 569 a 100, 250, 500 o 1000 nM o DMSO durante 30 minutos antes de exponerlas a dosis crecientes de IR (0, 2 o 4 Gy). Después de la IR, las células se incubaron continuamente con DMSO o el compuesto 569 durante 5 h antes de retirar el medio de cultivo y lavar las células con PBS. Las células se cultivaron en medio completo en ausencia de inhibidor durante 9 días. A continuación, se tiñeron las células (PBS, 0,0037% v/v de formaldehído, 0,1% de violeta cristal), se enjuagaron con agua y se secaron.

Estudios tumorales. Se obtuvieron hembras de ratón NCr nu/nu (CrI:NU(NCr)-Foxn1 nu, cepa 490) de Charles River a las 5-6 semanas de edad. Todos los procedimientos con animales usados en estos estudios fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Duke.

Se recogieron células FADU o MDA-MB-231 durante la fase logarítmica de crecimiento para su implantación in vivo. Las células resuspendidas se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de preparar la dilución de trabajo en PBS. Las células FADU se diluyeron a 1x10⁷ células/ml y las células MDA-MB-231 se diluyeron a 5x10⁷ células/ml. A cada ratón se le inyectaron por vía subcutánea en el costado derecho 100 µl de la suspensión celular. Se controló el crecimiento tumoral hasta que los tumores alcanzaron un volumen objetivo de por lo menos 100 mm³, momento en el que los ratones se estratificaron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento.

Después de la implantación de las líneas celulares tumorales, se monitorizó una vez por semana el desarrollo tumoral en los ratones. Una vez detectados, los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores

digitales. Los tumores se trataron cuando alcanzaron por lo menos 100 mm³ y se midieron dos o tres veces por semana tras su inclusión en uno de los grupos de tratamiento. El criterio de valoración del estudio se definió como la quintuplicación del volumen del tumor en el momento del tratamiento.

El vehículo usado en este estudio fue 0,5% de (Hidroxipropil)metilcelulosa (HPMC) y 0,2% de Tween80 disueltos en agua desionizada. El pH del vehículo se ajustó a 7,0-8,0 y el vehículo se almacenó a 4° C. Cada día de tratamiento in vivo se añadió una masa adecuada del compuesto de prueba al vehículo a temperatura ambiente. La mezcla se agitó en vórtice según fue necesario para generar una concentración final de 1,6 mg/ml.

Ensayos farmacodinámicos (PD). Los estudios tumorales se realizaron de la siguiente manera. A ratones portadores de tumores FADU o MDA-231 se les predosificó con vehículo solo o compuesto 569 solo a 3, 6 y 10 mg/kg. A continuación, los tumores se irradiaron con 10 Gy 45 min después de la administración del vehículo o del compuesto 569 o se dejaron sin irradiar (vehículo y compuesto 569 a 10 mg/kg). Los tumores se recogieron 1 h después de la radiación.

Los homogeneizados tisulares para los análisis farmacodinámicos se recogieron y procesaron de la siguiente manera. Los tejidos tumorales de los tumores FADU o MDA-MB-231 se congelaron al instante en nitrógeno líquido y se pulverizaron sobre hielo seco usando un pulverizador de tejidos. Una parte del polvo tumoral se transfirió a un microtubo, seguido de la adición de 500 µl de tampón RIPA [50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% de SDS, 0,5% de desoxicolato sódico, 1% de IGEPAL® CA-630 (Sigma, 18896)]. A 10 ml de tampón RIPA, se añadieron 2 comprimidos de cada uno del inhibidor de proteasa y del inhibidor de fosfatasa (Roche, #04693159001 & #04906837001), 200 µl de PMSF 0,1 M y 160 µl de aprotinina, (Sigma, A6279). La suspensión se homogeneizó en hielo con un motor de mano para sedimentos (KONTES) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Los lisados celulares se centrifugaron a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo y se analizaron para determinar la concentración de proteínas con un kit BCA (Pierce, 23227), seguido de inmunotransferencia.

El estudio del retraso del crecimiento tumoral in vivo se realizó de la siguiente manera. Después de la implantación de las líneas celulares tumorales, se monitorizó una vez por semana el desarrollo tumoral en los ratones. Tras el desarrollo de un tumor que midiese por lo menos 100 mm³, los ratones portadores de tumores se estratificaron en uno de 4 grupos, usando 5 ratones por grupo. Los volúmenes tumorales se encontraban entre 100 y 500 mm³. El vehículo o el compuesto 569 (10 mg/kg) se administraron por alimentación forzada oral una vez al día durante tres días consecutivos (qd x 3), solos o en combinación con radiación focal. El volumen administrado de vehículo o compuesto 569 se ajustó sobre la base del peso corporal de los animales individuales. Los ratones estratificados en los grupos de radioterapia recibieron 3 Gy al día durante tres días consecutivos (qd x 3) 45 minutos después de la administración del vehículo o del compuesto 569. Se anestesió a los ratones con isoflurano durante el tratamiento con radiación, que se realizó con el irradiador guiado por imágenes para animales pequeños X-RAD 225Cx (Precision X-Ray). El campo de irradiación de 40 mmx40 mm se centró en la pata portadora del tumor mediante fluoroscopia. Los ratones fueron irradiados con campos anteriores y posteriores paralelos opuestos de 225 kVp, 13 mA de rayos X usando un filtro de Cu de 0,3 mm a una tasa de dosis media de 300 cGy/min.

Los ratones del grupo 1 recibieron vehículo qd x 3.

Los ratones del grupo 2 recibieron 10 mg/kg de compuesto 569 qd x 3.

Los ratones del grupo 3 recibieron vehículo 45 minutos antes de la irradiación focal de 3 Gy qd x 3.

Los ratones del grupo 4 recibieron 10 mg/kg de compuesto 569 45 minutos antes de la irradiación focal de 3 Gy qd x 3.

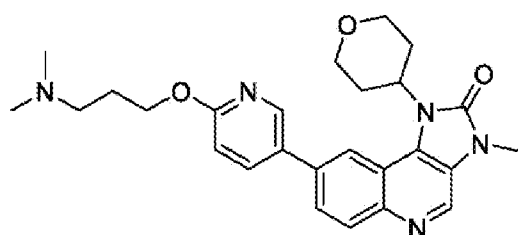
Análisis estadístico y gráfico de los datos in vivo. Para las presentaciones gráficas se usó Prism (GraphPad). Para los análisis estadísticos se usaron SAS 9.4 y R 3.6.1. Se compararon las tasas de crecimiento tumoral entre los cuatro grupos de tratamiento. Para tener en cuenta los distintos tamaños tumorales al inicio del tratamiento, se calculó el volumen tumoral relativo dividiendo el volumen tumoral en cada momento por el volumen al inicio del tratamiento. Se usaron gráficos de líneas para mostrar la mediana del volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo (FIGS. 6 y 8). Cuando un animal abandonó el estudio debido a la quintuplicación del tumor, el volumen tumoral final registrado para el animal se incluyó con los datos usados para calcular la mediana del volumen en los puntos temporales posteriores. Se usaron gráficos de Kaplan-Meier para mostrar el porcentaje de ratones de cada grupo de tratamiento que permanecían en el estudio a lo largo del tiempo (FIGS. 7 y 9). Los ratones que murieron antes de alcanzar el criterio de valoración de quintuplicación fueron censurados a la derecha. Las diferencias en la supervivencia sin quintuplicación entre los cuatro grupos de tratamiento se evaluaron con una prueba de rangos logarítmicos. Un valor de P de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

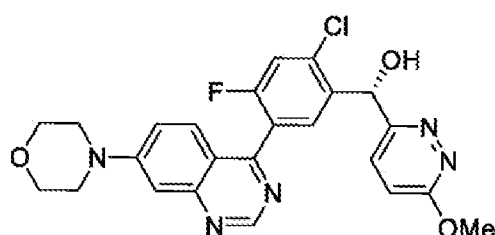
La FIG. 1 muestra una imagen de una inmunotransferencia de un experimento in vitro que evalúa el efecto del compuesto 569 en células MCF7 con o sin radiación. La inmunotransferencia muestra la inhibición de la autofosforilación inducida por radiación de las quinasas ATM y ADN-PK y la fosforilación inducida por radiación de KAP1, un sustrato de ATM, por el compuesto 569 en células tumorales. Se pretrató MCF7, una línea celular de carcinoma de mama humano, durante 30 min con el compuesto 569 a concentraciones de 20, 100, 500 y 1000 nM. Se usó DMSO como control negativo. A continuación, las células se expusieron a 0 o 10 Gy de radiación ionizante (IR) y, una hora más tarde, se recogieron las células para realizar análisis de inmunotransferencia. El compuesto 569 mostró una potente inhibición dependiente de la dosis y de la fosforilación inducida por la radiación de ADN-PKs en Ser2056 y ATM en Ser1981 (ambos eventos de autofosforilación) y el sustrato de ATM KAP1 (ser824) demostrando que el compuesto 569 inhibía tanto ADN-PK como ATM quinasas en una célula.

La FIG. 2 demuestra las propiedades radiosensibilizadoras del compuesto 569 en un ensayo de supervivencia clonogénica in vitro. Las células MCF7 se pretrataron con vehículo o con el compuesto 569 a 100, 250, 500 y 1000 nM durante 30 min antes de la irradiación con dosis crecientes de IR (0, 2 y 4 Gy). Después de 5 h, se retiró el medio y se añadió a las células medio fresco sin inhibidores, y se cultivaron durante 9 días antes de ser fijadas, teñidas y contar las colonias. La exposición de 5 h de las células al compuesto 569 indujo un grado significativo de radiosensibilización sin evidencia de toxicidad celular en ausencia de IR en las células MCF7 (FIG. 2, Tabla 1).

La FIG. 3 es una inmunotransferencia que muestra la inducción de la fosforilación de TBK1 por el compuesto 569, AZD0156 (un inhibidor selectivo de ATM; ATMi), peposertib (un inhibidor selectivo de ADN-PK; ADN-PKi), y una combinación de AZD0156 y peposertib (Ai+Di) en células HCT116 que expresan p53 de tipo salvaje o células HCT116 que eran negativas para la expresión de p53. La fosforilación de TBK1 es un marcador de activación de la respuesta al interferón de tipo I y se ha relacionado con una respuesta tumoral aumentada a la terapia de bloqueo de puntos de control inmunitarios. La inhibición dual de ATM y ADN-PKs mediante la combinación de los dos inhibidores químicos selectivos (AZD0156 y peposertib) produjo una activación más profunda de TBK1 que cualquiera de los inhibidores selectivos por separado. De manera similar, la exposición de las células al compuesto 569, un inhibidor dual de ATM y ADN-PKs, fue un activador más potente de la fosforilación de TBK1 que cualquiera de los inhibidores de quinasa de diana única y fue independiente del estado de p53. La activación de TBK1 por 569 y la inhibición dual de ATM y ADN-PKs pareció ser independiente de la inducción de cGAS y fosfo-STING.



AZD0156



peposertib

Para evaluar la actividad farmacodinámica del compuesto 569 in vivo, se cultivaron células FADU y MDA-MB-231 como xenoinjertos tumorales en ratones desnudos. El vehículo o el compuesto 569 se administraron por alimentación forzada oral solos o en combinación con radiación focal. A los ratones se les dosificó vehículo o el compuesto 569 de 3, 6 y 10 mg/kg. A continuación, los tumores recibieron 10 Gy de irradiación focal 45 min después o se dejaron sin irradiar (0 Gy, vehículo y 0 Gy + compuesto 569 a 10 mg/kg). Los tumores se recogieron 1 h después de la radiación. La inmunotransferencia de los lisados de estos tumores muestra la autofosforilación de pADN-PK inducida por la radiación y la fosforilación de KAP1 inducida por la radiación, una diana en sentido descendente de ATM, así como la inhibición dependiente de la dosis de estos eventos de fosforilación en los tumores FADU y MDA231 tratados con radiación más el compuesto 569. Los niveles tumorales de autofosforilación de ADN-PK inducida por radiación y de fosforilación de KAP1 inducida por radiación se inhibieron significativamente en un ~55% y >80%, respectivamente a 10 mg/kg (FIGS. 4 y 5, Tablas 2-5). La fosforilación de referencia de ADN-PK también fue inhibida por el compuesto 569 en tumores.

TABLA 1 Ensayo clonogénico del compuesto 569 en células MCF7 (véase la FIG. 2)

Compuesto (concentración)	Índice de supervivencia clonogénica	Índice de supervivencia clonogénica	Veces	Índice de supervivencia clonogénica	Veces	% de supervivencia @ 0Gy con/sin IR
DMSO	1.000	0.662	1.0	0.317	1.0	97%
569 (100 nM)	1.000	0.0882	7.5	0.0146	21.8	92%
569 (250 nM)	1.000	0.0610	10.8	0.00588	54.0	97%
569 (500 nM)	1.000	0.0451	14.7	0.00347	91.5	105%
569 (1000 nM)	1.000	0.0301	22.0	0.00160	198	100%

TABLA 2 Cuantificación de pADN-PK/ADN-PK en tumores FADU

Tratamiento	pADN-PK/ADN-PK	Desviación estándar
Sin radiación, vehículo	1.14	0.263
Sin radiación, 10 mg/kg compuesto 569	0.343	NA
10 Gy, vehículo	1	0.0565
10 Gy, 3 mg/kg compuesto 569	0.938	0.181
10 Gy, 6 mg/kg compuesto 569	0.658	0.126
10 Gy, 10 mg/kg compuesto 569	0.476	0.188

TABLA 3 Cuantificación de pKAP1/KAP1 en tumores FADU

Tratamiento	pKAP1/KAP1	Desviación estándar
Sin radiación, vehículo	0.00505	0.000265
Sin radiación, 10 mg/kg compuesto 569	0.00595	NA
10 Gy, vehículo	1	0.0616
10 Gy, 3 mg/kg compuesto 569	0.0903	0.005
10 Gy, 6 mg/kg compuesto 569	0.0982	0.0741
10 Gy, 10 mg/kg compuesto 569	0.156	0.171

TABLA 4 Cuantificación de pADN-PK/ADN-PK en tumores MDA-231

Tratamiento	pADN-PK/ADN-PK	Desviación estándar
Sin radiación, vehículo	0.648	0.0948
Sin radiación, 10 mg/kg compuesto 569	0.223	NA
10 Gy, vehículo	1	0.231
10 Gy, 3 mg/kg compuesto 569	0.889	0.414
10 Gy, 6 mg/kg compuesto 569	0.670	0.278
10 Gy, 10 mg/kg compuesto 569	0.454	0.116

TABLA 5 Cuantificación de pKAP1/KAP1 en tumores MDA-231

Tratamiento	pKAP1/KAP1	Desviación estándar
Sin radiación, vehículo	0.00357	0.000826
Sin radiación, 10 mg/kg compuesto 569	-0.00319	NA
10 Gy, vehículo	1	0.114
10 Gy, 3 mg/kg compuesto 569	0.327	0.158
10 Gy, 6 mg/kg compuesto 569	0.0130	0.00879
10 Gy, 10 mg/kg compuesto 569	0.00901	0.00242

Tumores FADU. Los ratones del Grupo 1 recibieron vehículo, qd x 3. El crecimiento tumoral agregado en este grupo fue progresivo. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 14 días, con un intervalo de 11-14 días (FIGS. 6 y 7). Los ratones del Grupo 2 recibieron el compuesto 569 a una dosis de 10 mg/kg, qd x 3. La mediana de tiempo hasta el criterio de valoración fue de 14 días, con un intervalo de 11 a 17 días. Las curvas de crecimiento tumoral y supervivencia libre de quintuplicación para los animales del Grupo 2 son casi idénticas a las del Grupo 1 (FIGS. 6 y 7). Los ratones del Grupo 3 recibieron vehículo y una dosis de radiación focal de 3 Gy, que se administró 45 minutos después de la administración del vehículo. Tanto el vehículo como la radiación se administraron qd x 3. Un animal murió el día 16 por causas desconocidas. La mediana del tiempo transcurrido hasta el criterio de valoración fue de 21 días, con un intervalo de 19 a 25 días. La supervivencia global mejoró significativamente en comparación con el Grupo 1 y el Grupo 2 ($P < 0,01$, rango log). En las FIGS. 6 y 7 se muestra el retraso en el crecimiento tumoral agregado y el aumento de la supervivencia libre de quintuplicación para el Grupo 3 con respecto a los Grupos 1 y 2. Los ratones del Grupo 4 recibieron el compuesto 569 y una dosis de radiación focal de 3 Gy, que se administró 45 minutos después de la administración del compuesto. Tanto el compuesto 569 como la radiación se administraron qd x 3. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 42 días, con un intervalo de 31 a 51 días. La supervivencia global mejoró significativamente en comparación con los grupos 1, 2 y 3 ($P < 0,01$, rango log). En las FIGS. 6 y 7 se muestra el retraso en el crecimiento tumoral agregado y el aumento de la supervivencia libre de quintuplicación para el Grupo 4 con respecto a todos los demás grupos. Todos los tratamientos fueron bien tolerados.

Tumores MDA-MB-231. Los ratones del Grupo 1 recibieron vehículo, qd x 3. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 12 días, con un intervalo de 12 a 17 días. Los ratones del Grupo 2 recibieron el compuesto 569 a una dosis de 10 mg/kg, qd x 3. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 17 días, con un intervalo de 12 a 22 días. Las curvas de crecimiento tumoral y supervivencia libre de quintuplicación para los animales del Grupo 2 son casi idénticas a las del Grupo 1 (FIGS. 8 y 9). Los ratones del Grupo 3 recibieron vehículo y una dosis

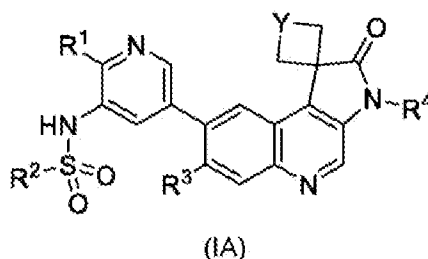
de radiación focal de 3 Gy, que se administró 45 minutos después de la administración del vehículo. Tanto el vehículo como la radiación fueron qd x 3. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 22 días, con un intervalo de 16 a 22 días. La supervivencia global mejoró significativamente en comparación con los animales del Grupo 1 tratados sólo con vehículo ($P < 0,01$, rango log.). En la FIG. 9 se muestra el aumento de la supervivencia libre de quintuplicación para el Grupo 3 con respecto a los Grupos 1 y 2. Los ratones del Grupo 4 recibieron 10 mg/kg de compuesto 569 y una dosis de radiación focal de 3 Gy, que se administró 45 minutos después de la administración del compuesto. Tanto el compuesto 569 como la radiación fueron a qd x 3. El día 35 se encontró muerto a un animal por causas desconocidas. La mediana del tiempo hasta el criterio de valoración fue de 43 días, con un intervalo de 37 a 58 días. La supervivencia global mejoró significativamente en comparación con el grupo 1, el grupo 2 y el grupo 3 ($P < 0,01$, rango log.). En las FIGS. 8 y 9 se muestra el retraso en el crecimiento tumoral agregado y el aumento de la supervivencia libre de quintuplicación para el Grupo 4 con respecto a todos los demás grupos. Todos los tratamientos fueron bien tolerados.

OTRAS REALIZACIONES

Varias modificaciones y variaciones de la invención descrita serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en la técnica estén dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (IA);



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde

Y es CHR⁵;
R¹ es-O-L-N(R⁷)²;
R² es alquilo C₁₋₃;
cada R³ es independientemente halógeno o alquilo C₁₋₃;
R⁴ es alquilo;
R⁵ es hidrógeno o benciloxi;
cada R⁷ es independientemente H o alquilo C₁₋₃; y
L es etileno.

2. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R³ es halógeno; preferiblemente en donde el halógeno es flúor.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde un R⁷ es H, y el R⁷ restante es alquilo C₁₋₃.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde por lo menos un R⁷ es isopropilo.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R² es metilo, etilo o isopropilo.

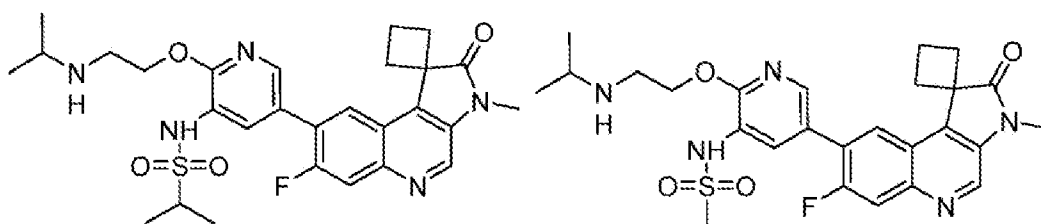
6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R² es metilo.

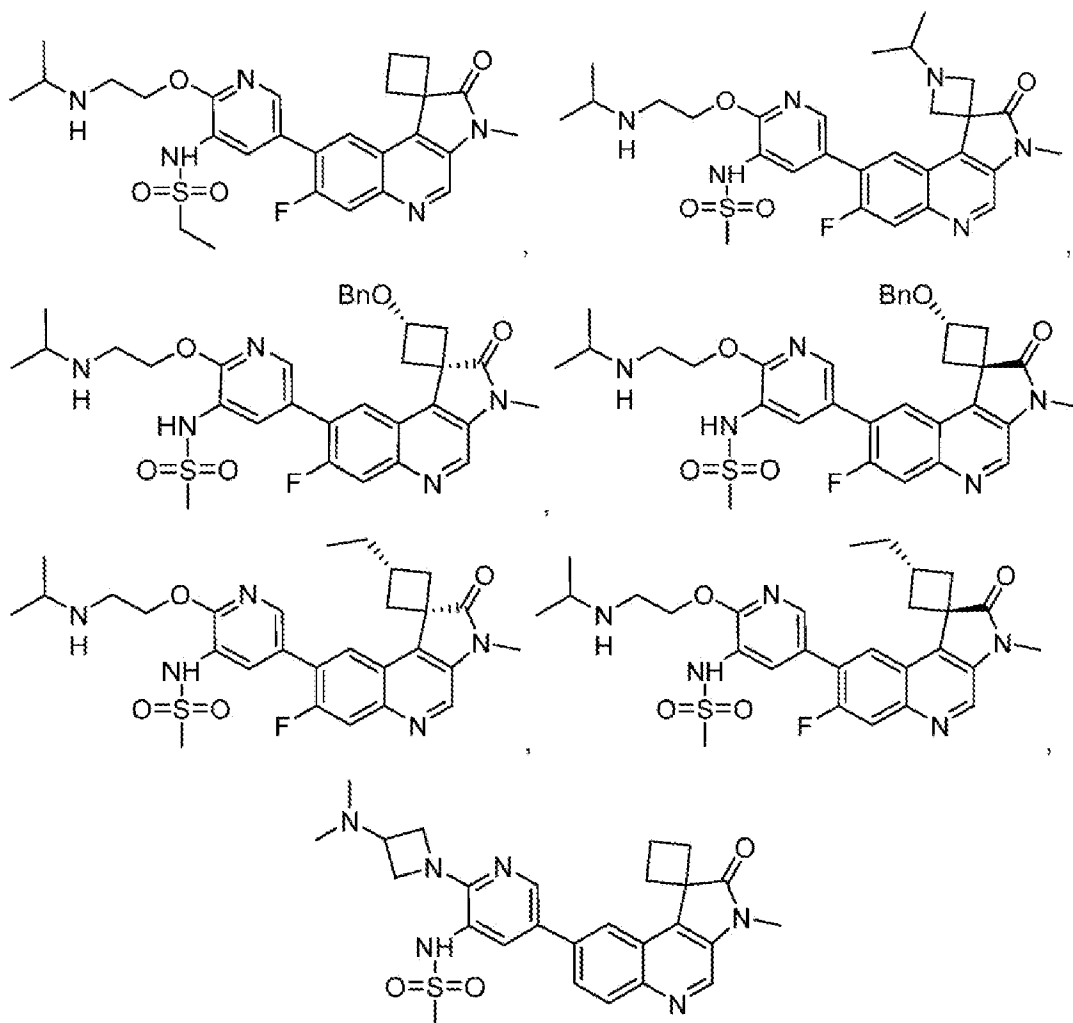
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁴ es metilo.

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁵ es hidrógeno.

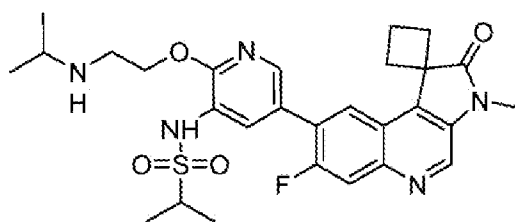
9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁵ es benciloxi.

10. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



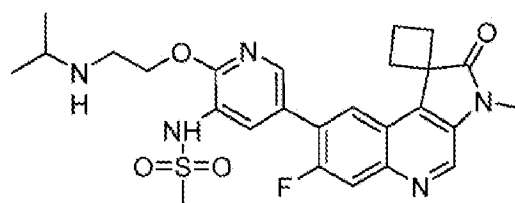


11. El compuesto de la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es:



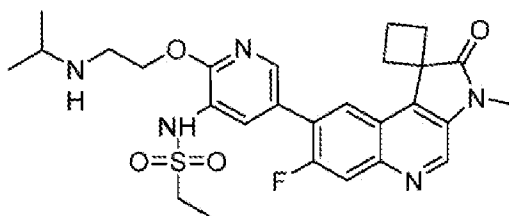
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. El compuesto de la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. El compuesto de la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad oncológica, dicho método comprendiendo administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica de la reivindicación 14 a un paciente con necesidad de ello.

16. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde:

el paciente está recibiendo radioterapia; opcionalmente en donde el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente concomitantemente con la radioterapia; o el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente antes de la radioterapia; o el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente después de la radioterapia; opcionalmente en donde:

- i) la radioterapia comprende exposición externa, interna, braquiterapia o sistémica; y/o
- ii) la radioterapia comprende la administración de un conjugado anticuerpo radionucleótido.

17. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en donde:

el paciente está recibiendo un agente antitumoral; opcionalmente en donde:

- i) el agente antitumoral es cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, valrubicina, idarubicina, calicheamicina o un inhibidor de PARP; y/o
- ii) el agente antitumoral es un agente biológico antitumoral o un agente inmunoterapéutico antitumoral; y/o
- iii) el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente concomitantemente con el agente antitumoral; o
- iv) el compuesto o la composición farmacéutica se administra al paciente después del agente antitumoral.

18. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde:

la enfermedad oncológica es un cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer bucal, cáncer de la boca, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de glándulas salivales, sarcomas, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de vulva o tumor de Wilm;

y/o la enfermedad oncológica es un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de recto, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, una lesión metastásica hepática, melanoma, sarcoma óseo, sarcoma de partes blandas, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata o carcinoma de células de Merkel.

FIG. 1

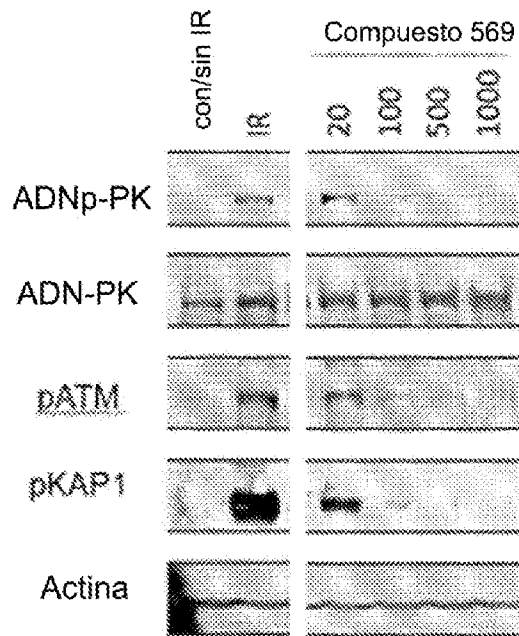


FIG. 2

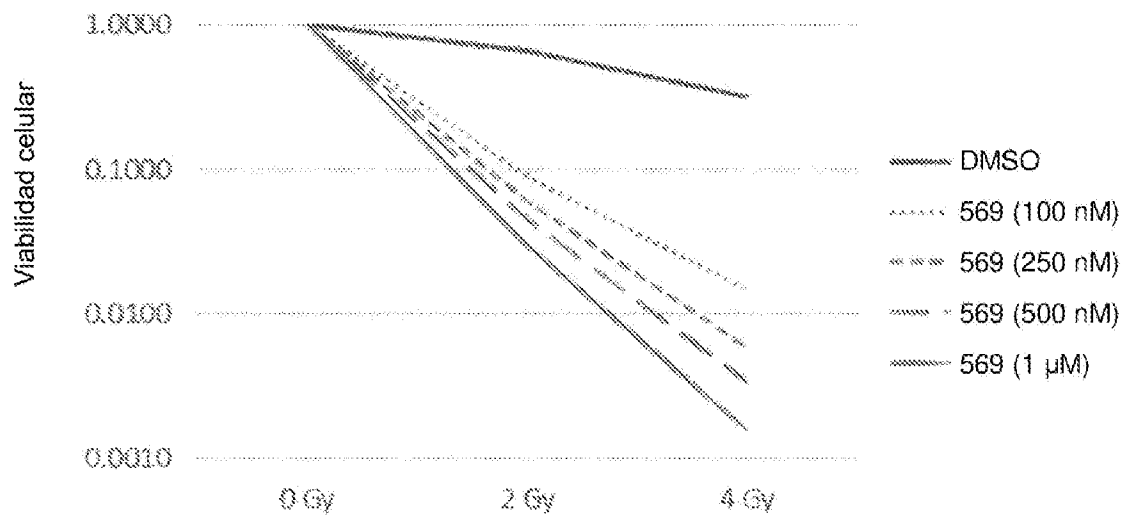


FIG. 3

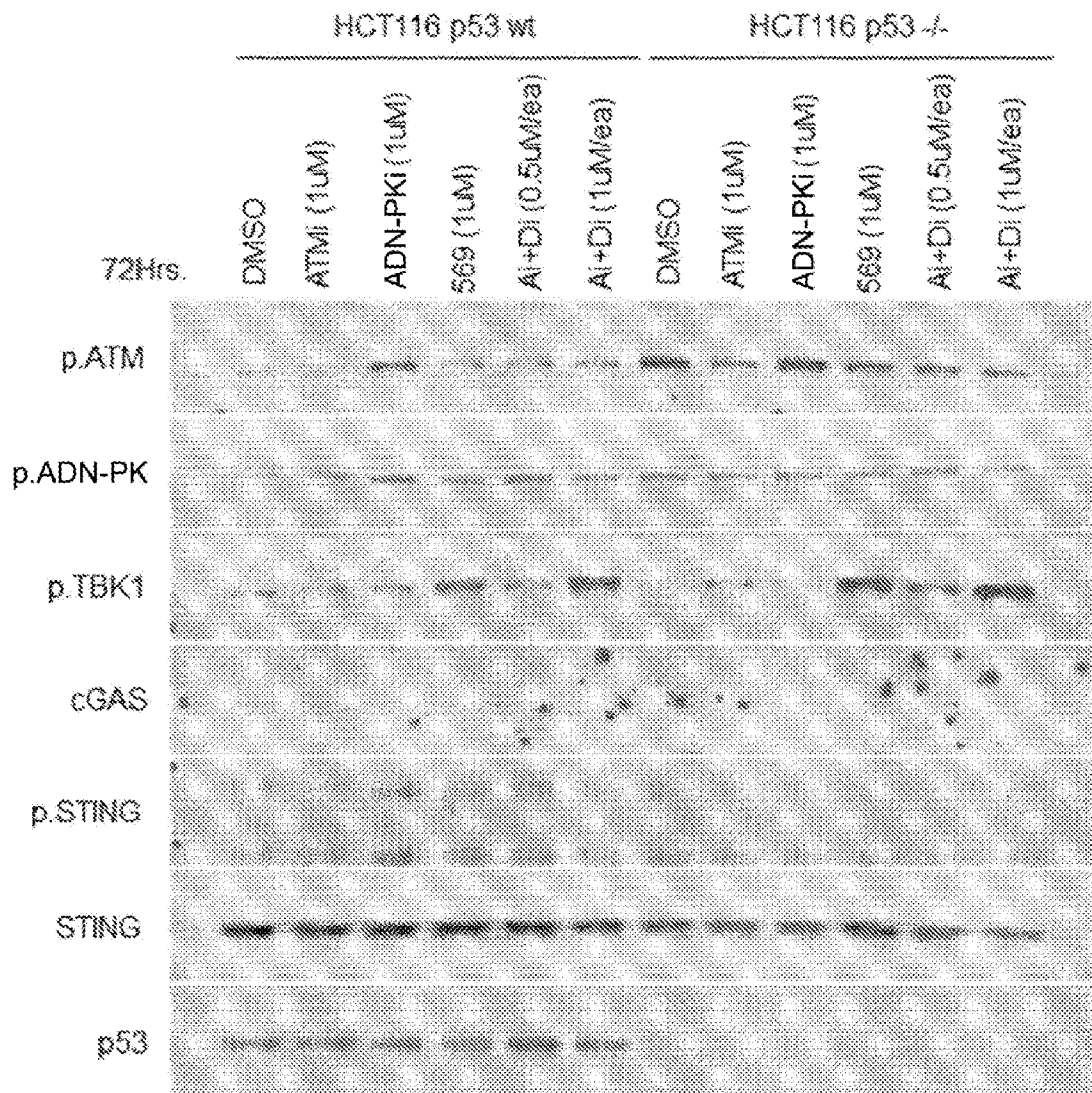


FIG. 4

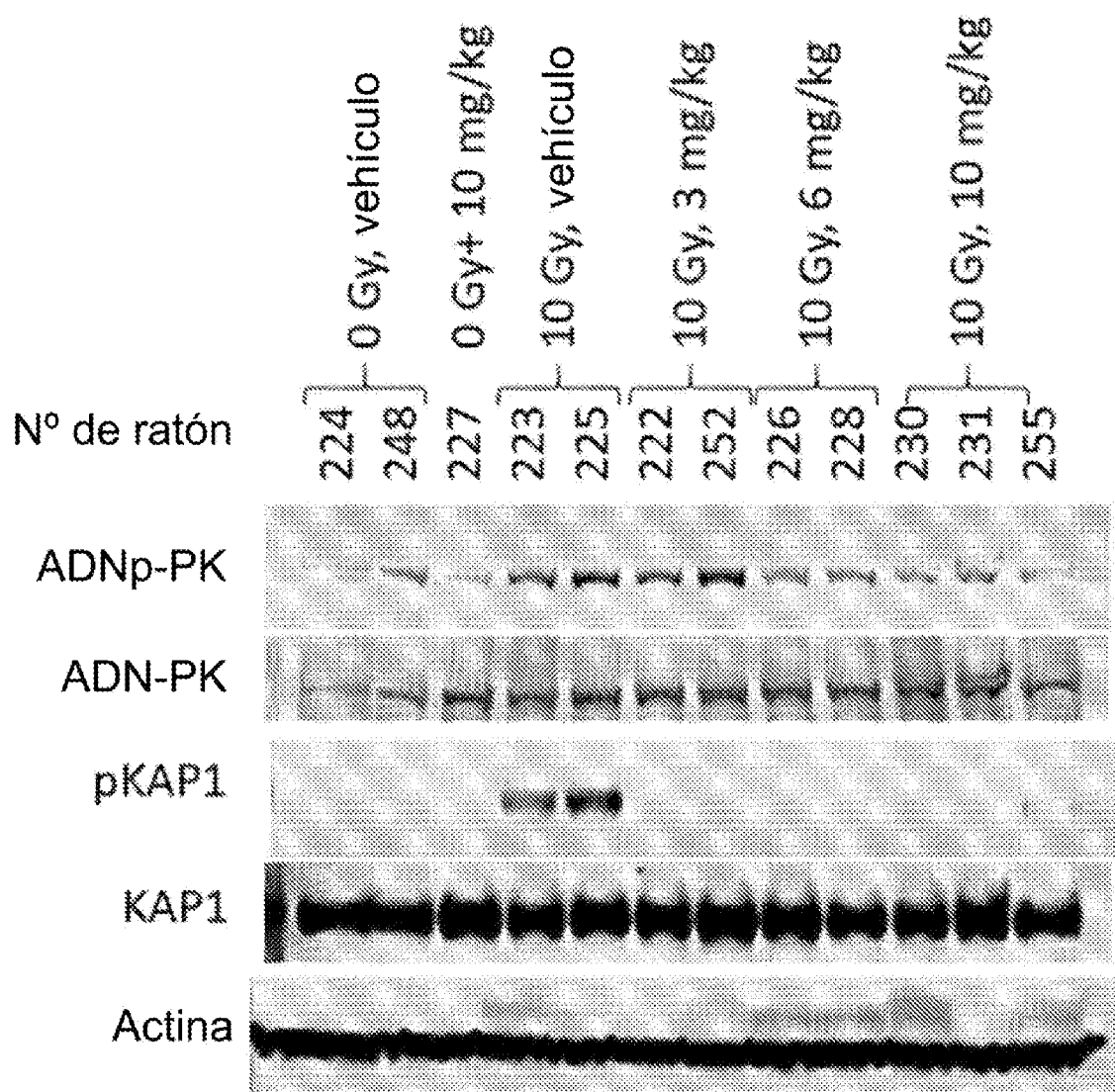


FIG. 5

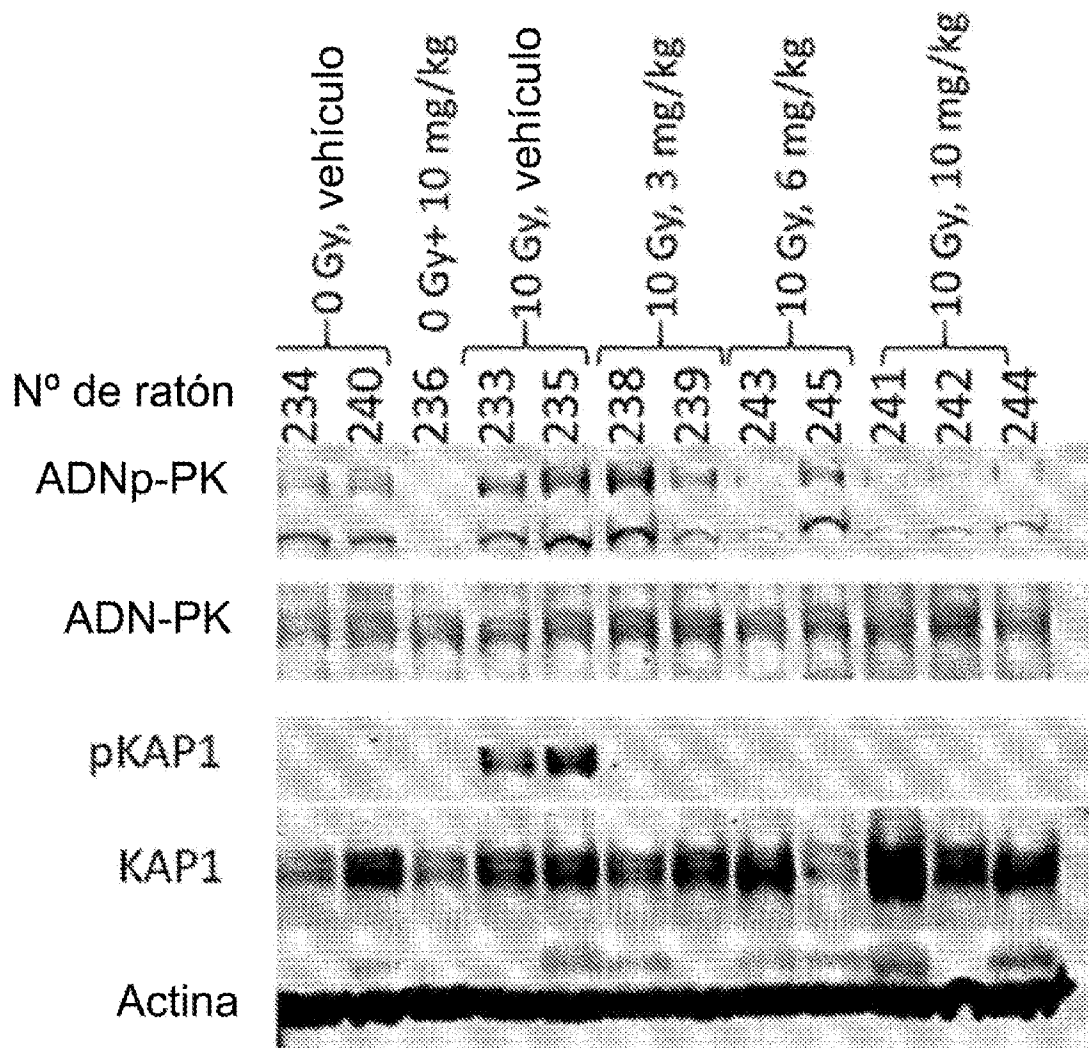


FIG. 6

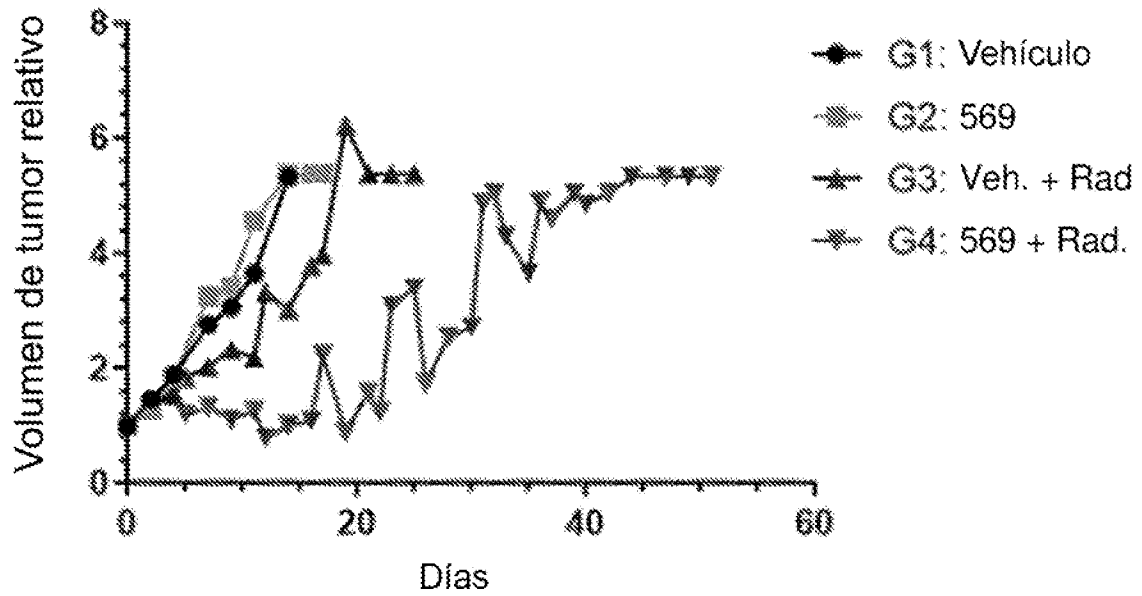


FIG. 7

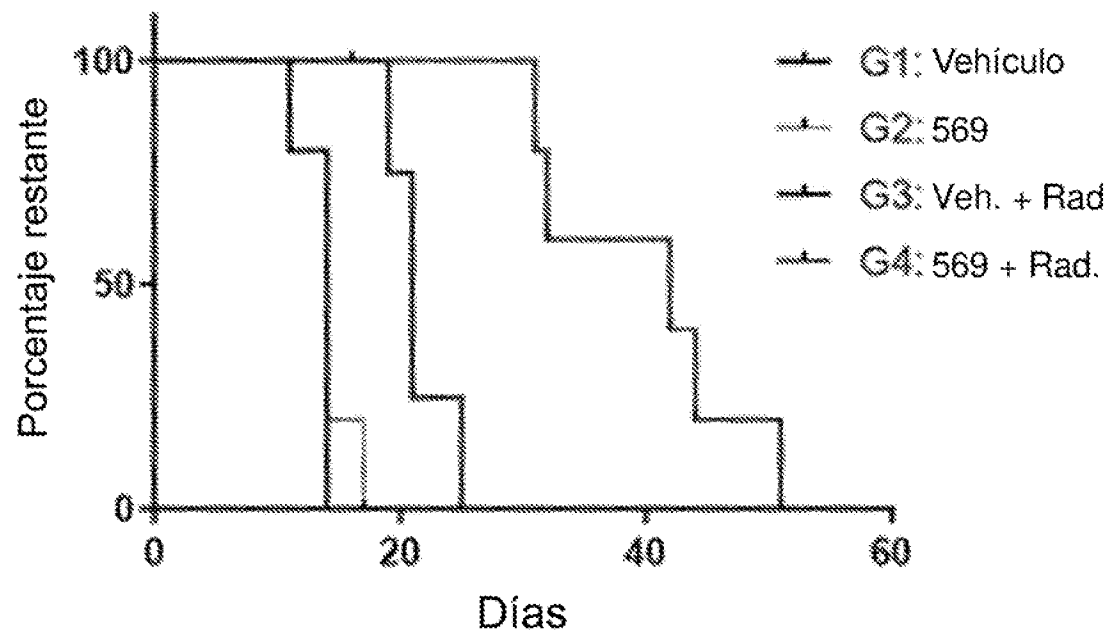


FIG. 8

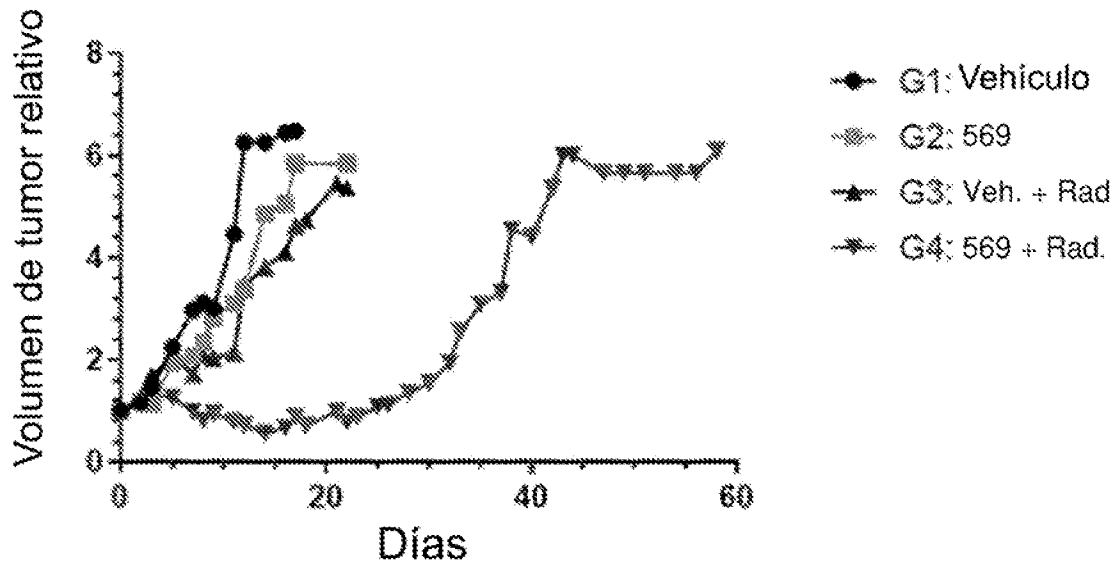


FIG. 9

