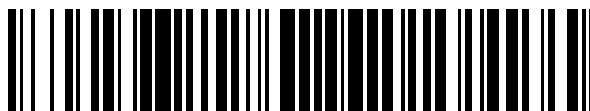


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 239**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2017** **PCT/CN2017/080511**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17177955**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2017** **E 17781931 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3442972**

54 Título: **Inhibidores del bromodominio**

30 Prioridad:

15.04.2016 WO PCT/CN2016/079362

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2020

73 Titular/es:

ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US

72 Inventor/es:

FIDANZE, STEVEN D.;
HASVOLD, LISA A.;
LIU, DACHUN;
MCDANIEL, KEITH F.;
PRATT, JOHN;
SCHRIMPF, MICHAEL;
SHEPPARD, GEORGE S.;
WANG, LE y
LI, BING

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 793 239 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 del bromodominio

5 Antecedentes

Los bromodominios se refieren a pliegues estructurales de proteínas conservadas que se unen a residuos de lisina *N*-acetilada que se encuentran en algunas proteínas. La familia BET de proteínas que contienen bromodominio comprende cuatro miembros (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDt). Cada miembro de la familia BET emplea dos bromodominios para reconocer los residuos de lisina *N*- acetilada típicamente, pero no exclusivamente, los que se encuentran en los factores de transcripción (Shi, J., y otros Cancer Cell 25 (2): 210-225 (2014)) o en las colas amino-terminales de las proteínas histonas. Al numerar desde el extremo N-terminal de cada proteína BET, los bromodominios en tándem se etiquetan típicamente como Dominio de unión I (BDI) y Dominio de unión II (BDII). Estas interacciones modulan la expresión génica al reclutar factores de transcripción a ubicaciones específicas del genoma dentro de la cromatina. Por ejemplo, el BRD4 unido a histona recluta al factor de transcripción P-TEFb a los promotores, lo que resulta en la expresión de un subconjunto de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Yang y otros, Mol. Cell. Biol. 28: 967-976 (2008)). Los BRD2 y BRD3 también funcionan como reguladores transcripcionales de genes promotores del crecimiento (LeRoy y otros, Mol. Cell 30: 51-60 (2008)). Los miembros de la familia BET se establecieron recientemente como importantes para el mantenimiento de varios tipos de cáncer (Zuber y otros, Nature 478: 524-528 (2011); Mertz y otros; Proc. Nat'l. Acad. Sci. 108: 16669-16674 (2011); Delmore y otros, Cell 146: 1-14, (2011); Dawson y otros, Nature 478: 529-533 (2011)). Los miembros de la familia BET también se implican en la mediación de respuestas inflamatorias agudas a través de la vía canónica del NF-KB (Huang y otros, Mol. Cell. Biol. 29: 1375-1387 (2009)) que resulta en la regulación positiva de genes asociados con la producción de citocinas (Nicodeme y otros, Nature 468: 1119-1123, (2010)). Se ha demostrado que la supresión de la inducción de citocinas por los inhibidores de bromodominio BET es un enfoque eficaz para tratar la enfermedad renal mediada por inflamación en un modelo animal (Zhang, y otros, J. Biol. Chem. 287: 28840-28851 (2012)). La función BRD2 se relacionan con la predisposición a la dislipidemia o la regulación inadecuada de la adipogénesis, los perfiles inflamatorios elevados y la mayor susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes (Denis, Discovery Medicine 10: 489-499 (2010)). El virus de la inmunodeficiencia humana utiliza el BRD4 para iniciar la transcripción del ARN viral a partir del ADN viral integrado establemente (Jang y otros, Mol. Cell, 19: 523-534 (2005)). También se ha demostrado que los inhibidores del bromodominio BET reactivan la transcripción del VIH en modelos de infección de células T latentes y de monocitos latentes (Banerjee, y otros, J. Leukocyte Biol. Doi: 10.1189 / jlb.0312165). El BRDt tiene un papel importante en la espermatogénesis que se bloquea por los inhibidores del bromodominio BET (Matzuk, y otros, Cell 150: 673-684 (2012)). Por lo tanto, los compuestos que inhiben la unión de los bromodominios de la familia BET a sus proteínas de lisina acetiladas afines se persiguen para el tratamiento del cáncer, las enfermedades inflamatorias, las enfermedades renales, las enfermedades que involucran el metabolismo o la acumulación de grasa, y algunas infecciones virales, así como para proporcionar un Método para la anticoncepción masculina. En consecuencia, existe una necesidad médica continua de desarrollar nuevos medicamentos para tratar estas indicaciones. El documento US2014 / 0162971 A1 (AbbVie Inc.) describe compuestos inhibidores del bromodominio que son útiles como agentes en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones.

40 Resumen

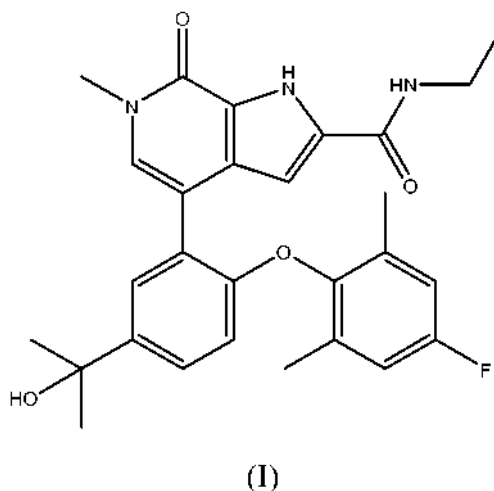
En un aspecto, la presente invención proporciona *N*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1H-pirrollo[2,3-c]piridina-2-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona *N*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxi-propan-2-il)fenil]-6-metil-7oxo-6,7-dihidro-1H-pirrollo[2,3-c]piridina-2-carboxamida.

El compuesto, o sus sales, se puede usar en métodos para tratar o prevenir trastornos que se mejoran mediante la inhibición de BET. Dichos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), solo o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada

En este documento se describe *N*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il) fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1H-pirrollo[2,3-c]piridina-2-carboxamida, que tiene la fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los términos "tratar", "trata" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o abrogar una enfermedad y/o sus síntomas acompañantes. En ciertas realizaciones, "tratar", "trata" y "tratamiento" se refieren a mejorar al menos un parámetro físico, que se puede discernir por el sujeto. En aún otra realización, "tratar", "trata" y "tratamiento" se refieren a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una realización adicional, "tratar", "trata" y "tratamiento" se refieren a ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno.

Los términos "prevenir", "previene" y "prevención" se refieren a un método para prevenir la aparición de una enfermedad y/o sus síntomas concomitantes o para impedir que un sujeto contraiga una enfermedad. Como se usa en el presente documento, "prevenir", "previene" y "prevención" también incluyen retrasar el inicio de una enfermedad y/o sus síntomas acompañantes y reducir el riesgo de un sujeto de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, suficiente para prevenir el desarrollo o para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la afección o trastorno que se trata cuando se administra solo o junto con otro agente terapéutico para el tratamiento en un sujeto particular o población de sujetos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede variar en dependencia del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, salud, etc., del sujeto a tratar. Por ejemplo, en un ser humano u otro mamífero, una cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar experimentalmente en un laboratorio o entorno clínico, o puede ser la cantidad requerida por las pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, o agencia extranjera equivalente, para la enfermedad particular y sujeto a tratar.

El término "sujeto" se define en el presente documento para referirse a animales tales como mamíferos, que incluye, pero no se limita a, primates (por ejemplo, humanos), vacas, ovejas, cabras, cerdos, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En una realización, el sujeto es un humano. Los términos "humano", "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento.

El compuesto de la invención se nombra mediante el uso del algoritmo de nombres Name 2015 por Advanced Chemical Development o el algoritmo de nombres Struct = Name como parte de CHEMDRAW® ULTRA v. 12.0.2.1076.

Se debe entender que el compuesto de la invención puede poseer formas tautoméricas, así como isómeros geométricos, y que estos también constituyen un aspecto de la invención.

La presente descripción incluye todos los compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente farmacéuticamente aceptables en donde uno o más átomos se reemplazan por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa o número de masa atómica diferente a la masa o número de masa atómica que predomina en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la descripción incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , de carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , de cloro, tales como ^{36}Cl , de flúor, tales como ^{18}F , de yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , de nitrógeno, como ^{13}N y ^{15}N , de oxígeno, como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , de fósforo, como ^{32}P , y de azufre, como ^{35}S . Ciertos compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente, por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o sustrato en tejidos. 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 medios de detección listos. La sustitución con isótopos más pesados, como el deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos, y por lo tanto puede ser preferible en algunas circunstancias. 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 del receptor de sustrato. Los compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente generalmente se pueden preparar mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en los Ejemplos acompañantes mediante el uso de reactivos apropiados marcados isotópicamente en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

Los dibujos de fórmulas dentro de esta especificación pueden representar solo una de las posibles formas tautoméricas, geométricas o estereoisoméricas. Se debe entender que la invención abarca cualquier forma tautomérica, geométrica o estereoisomérica, y las mezclas de éstos, y no se debe limitar simplemente a ninguna forma tautomérica, geométrica o estereoisomérica utilizada en los dibujos de fórmula.

El compuesto de fórmula (I) se puede usar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. La frase "sal farmacéuticamente aceptable" significa aquellas sales que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.

Se han descrito sales farmacéuticamente aceptables en SM Berge y otros J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66: 1-19.

El compuesto de fórmula (I), que puede contener una funcionalidad básica o ácida o ambas, se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable, cuando se desee, mediante el uso de un ácido o base adecuado. Las sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación del compuesto de la invención.

Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforado, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, malato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con tales agentes como haluros de alquilo inferior tales como, pero sin limitarse a, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil sulfatos como dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos; haluros de cadena larga tales como, pero sin limitarse a, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De este modo se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite. Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen tales ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos como ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido succínico y ácido cítrico.

Las sales de adición básicas se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos de esta invención haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como, pero sin limitarse a, el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metal farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como, pero no se limitan a, sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares y cationes amina y amonio cuaternario no tóxicos que incluyen amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otros ejemplos de aminas orgánicas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares.

El término "profármaco farmacéuticamente aceptable" o "profármaco" como se usa en el presente documento, representa aquellos profármacos del compuesto de la presente invención que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable y efectivas para su uso previsto.

La presente invención contempla un compuesto de fórmula (I) formado por medios sintéticos o formado por biotransformación in vivo de un profármaco.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas, que incluyen formas hidratadas, tales como hemihidratos. En general, las formas solvatadas, con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua y etanol entre otros, son equivalentes a las formas no solvatadas para los propósitos de la invención.

Los siguientes ejemplos se pueden usar con fines ilustrativos y no se debe considerar que limitan el alcance de la invención. El Ejemplo 35 es el compuesto de la invención. Se proporcionan otros ejemplos como ejemplos comparativos.

Ejemplos

Todos los reactivos eran de grado comercial y se usaron como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron disolventes anhidros disponibles en el mercado para las reacciones realizadas en atmósfera inerte. Los solventes de grado reactivo se usaron en todos los demás casos, a menos que se especifique lo

contrario. Los desplazamientos químicos (δ) para los espectros de ^1H NMR se informaron en partes por millón (ppm) con respecto al tetrametilsilano (δ 0.00) o el pico de disolvente residual apropiado, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna. Las multiplicidades se dieron como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), quintillizo (quin), multiplete (m) y ancho (br).

Ejemplo 1

4-[2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxipropan-2-il)piridin-3-il]-*N*-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1H-pirrololo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Método A para la preparación de acetato de 4-bromo-6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1H-pirrololo[2,3-*c*] piridina-2-carboxilato de etilo:

Ejemplo 1a

(*E*)-2-(5-bromo-2-metoxi-3-nitropiridin-4-il)-*N,N*-dimetiletinamina

Se disolvió 5-bromo-2-metoxi-4-metil-3-nitropiridina (15,0 g, 60,7 mmol) en dimetilformamida (300 ml) y se añadió metanolato de litio (6,07 ml, 6,07 mmol, 1 M). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C. A esta mezcla se le añadió 1,1-dimetoxi-*N,N*-dimetilmetanamina (64,5 ml, 486 mmol) durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 95 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua cuidadosamente (300 ml, exotérmica). El precipitado resultante se recogió por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó para proporcionar el compuesto del título (13,9 g, 45,9 mmol, 76 % de rendimiento).

Ejemplo 1b

4-bromo-7-metoxi-1H-pirrololo[2,3-*c*]piridina

El del Ejemplo 1a (13,9 g, 45,8 mmol) y acetato de etilo (150 ml) se añadieron a una suspensión de agua Ra-Ni 2800 (prelavada con etanol) (6,9 g, 118 mmol) en una botella a presión de acero inoxidable y se agitó durante 30 minutos a 30 psi de H_2 y a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y se concentró. El residuo se trituró con diclorometano y el sólido se filtró para proporcionar el compuesto del título (5,82 g). El licor madre se concentró y el residuo se trituró nuevamente con diclorometano y se filtró para proporcionar 1,63 g adicionales del compuesto del título. Rendimiento total = 7,45 g, 72 % de rendimiento.

Ejemplo 1c

4-bromo-7-metoxi-1-tosil-1H-pirrololo[2,3-*c*]piridina

Una solución del Ejemplo 1b (7,42 g, 32,7 mmol) en dimetilformamida (235 ml) se agitó a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió hidruro de sodio (1,18 g, 1,96 g de dispersión al 60 % en aceite, 49,0 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. Después se añadió en porciones cloruro de *P*-toluenosulfonilo (9,35 g, 49,0 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió con agua. El sólido beige resultante se recogió por filtración al vacío en un embudo Buchner y se lavó con agua. El sólido se recogió y se secó en un horno de vacío a 50 °C para proporcionar 12,4 g (100 %) del compuesto del título.

Ejemplo 1d

4-bromo-7-metoxi-1-tosil-1H-pirrololo[2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo

A una solución del Ejemplo 1c (12 g, 31,5 mmol) en tetrahidrofurano (150 ml) se le añadió diisopropilamida de litio (24,3 ml, 47,2 mmol) gota a gota a -70 °C. La mezcla se agitó a una temperatura de -70 °C a -50 °C durante 45 minutos, seguido de la adición gota a gota de cloruro de carbonato de etilo (5,12 g, 47,2 mmol). Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de cloruro de amonio, la capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se trituró con diclorometano y metanol (1:10) para proporcionar el compuesto del título (13 g, 91 % de rendimiento).

Ejemplo 1e

4-bromo-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1H-pirrololo [2,3-*c*] piridina-2-carboxilato

A una mezcla del Ejemplo 1d (29 g, 64,0 mmol) y yoduro de sodio (14,38 g, 96 mmol) en acetonitrilo (400 ml), se añadió clorotrimetilsilano (10,43 g, 96 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,576 g, 32,0 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a 65 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El precipitado se disolvió en

diclorometano, se filtró y se concentró para proporcionar un sólido que se trituró con éter de petróleo y diclorometano para proporcionar el compuesto del título (32 g, 97 %).

Ejemplo 1f

4-bromo-6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo [2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo

A una solución del Ejemplo 1e (18,72 g, 42,6 mmol) en dimetilformamida anhidra (200 ml) se añadió carbonato de cesio (16,66 g, 51,1 mmol), seguido de la adición gota a gota de yodometano (3,20 ml, 51,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 72 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua a la mezcla de reacción (500 ml) y el precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó durante la noche en un horno de vacío a 55 °C para proporcionar 17,9 g (93 %) del compuesto del título.

Método B para la preparación de 4-bromo-6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo:

Ejemplo 1f-i

N-(2,2-dimetoxietil)-*N*-metil-1*H*-pirrol-2-carboxamida

Una solución de ácido 1*H*-pirrol-2-carboxílico (50,0 g, 450 mmol) en 500 ml de tetrahidrofurano se enfrió a -5 a -8 °C, seguido de la adición de 2,2-dimetoxi-*N*-metiletanamina (64,4 g, 540 mmol) y diisopropiletilamina (171 ml, 128 mmol). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura, mientras que se añadió anhídrido propilfosfónico (315 g, 495 mmol) gota a gota durante 20 minutos. Después de la adición, la mezcla de reacción se calentó a 23 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se calentó a 40 °C. Después de 18 horas a 40 °C, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se diluyó con 1000 ml de agua y 500 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se volvió a extraer tres veces con 250 ml de acetato de etilo. Las capas combinadas de acetato de etilo se lavaron con 250 ml de agua y 250 ml de salina. La capa orgánica resultante se redujo bajo cámara de alto vacío con una temperatura de la camisa de 30-40 °C. Después que el volumen se redujo en un 50 % a 850 ml, se añadieron 850 ml adicionales de heptano y la destilación continuó bajo cámara de alto vacío con una temperatura de la camisa de 30-40 °C. El heptano (550 mL) se eliminó por destilación y la mezcla de reacción se enfrió a 15 °C. El producto comenzó a precipitar y después se añadieron 500 ml de heptano para generar una suspensión, que se calentó a 30-40 °C para eliminar todos los sólidos que se adhirieron a la pared del recipiente. La suspensión se enfrió a 25 °C. Se agregaron 500 ml adicionales de heptano para diluir la suspensión. La suspensión se enfrió en un baño de hielo y se filtró a 0 °C. El sólido se lavó rápidamente con heptano, y después se secó en el horno de vacío a 40 °C durante la noche para dar el compuesto del título (63,6 g, 70,1 % de rendimiento) como un sólido blanco esponjoso.

Ejemplo 1f-ii

6-metil-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridin-7(6*H*)-ona

Al Ejemplo 1f-i (50 g, 236 mmol) en 500 ml de tetrahidrofurano, se añadió monohidrato de ácido *p*-toluenosulfónico (8,96 g, 47,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 5 horas. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas y se dejó enfriar a 23 °C. Durante este tiempo, el producto comenzó a precipitar de la mezcla de reacción. Se añadió una solución de bicarbonato de sodio (0,2 N, 500 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con 250 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se volvió a extraer tres veces con 188 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina (188 ml). La capa orgánica resultante se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros, y la capa orgánica se redujo a 850 ml bajo vacío con una temperatura de la camisa de 40 °C. Después de este tiempo, se añadieron lentamente 500 ml de heptano durante 10 minutos a 25 °C. Se formó una suspensión, que se enfrió a 10 °C y se agitó a esta temperatura durante 14 horas. El sólido resultante se filtró, se lavó con heptano y se secó en el horno de vacío a 50 °C para producir el compuesto del título (27,9 g, 80 % de rendimiento) como un sólido tostado.

Ejemplo 1f-iii

6-metil-1-tosil-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-7(6*H*)-ona

Se enjuagó con nitrógeno un matraz de fondo redondo de 3000 ml con camisa y se cargó con el Ejemplo 1f-ii (121 g, 817 mmol). Se añadió tetrahidrofurano (1200 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a -8 °C. Se añadió una solución de tetrahidrofurano de bis(trimetilsilil)amida de litio (1 M, 1022 ml, 1022 mmol) a la suspensión resultante a una velocidad que mantuvo una temperatura de reacción interna por debajo de 10 °C. La solución se enfrió a -8 °C y se agitó durante 1 hora. Después de este tiempo, se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (238 g, 1225 mmol) en varias porciones. Una vez que la temperatura interna de la mezcla de reacción se estabilizó, los contenidos del matraz se dejaron calentar a 20 °C, momento en el cual el producto comenzó a precipitar. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas y se mantuvo durante 14 horas adicionales. Después de este tiempo, se añadió heptano (600 ml) y la mezcla de reacción se destiló hasta un volumen total de aproximadamente 1200 ml. La solución se enfrió a 0 °C y el sólido precipitado se filtró en un embudo de filtro de 2 L con una frita de poro medio. El sólido recogido después se suspendió en 1200 ml de agua y se

volvió a filtrar. Se generó una suspensión adicional mediante el uso de un sólido y 1200 ml de metanol. Después de agitar la suspensión durante 15 minutos, el sólido se filtró y se secó a 35 °C para dar el compuesto del título (215 g, 86 % de rendimiento) como un sólido blanquecino.

5 Ejemplo 1f-iv

6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo [2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo

10 A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml se añadió el Ejemplo 1f-iii (10,0 g, 33,1 mmol). El matraz se ajustó con un termopar y se purgó con nitrógeno. Después de 30 minutos, el matraz se selló con septos y una entrada de nitrógeno. El sólido se suspendió después en 70 ml de tetrahidrofurano. La suspensión blanquecina se agitó y se enfrió a -15 °C. Después de mantener a esta temperatura durante 2 minutos, se añadió *n*-butil litio en hexanos (2,5 M, 13,0 ml, 32,5 mmol) a una velocidad para mantener la temperatura a +/- 5 °C, lo que dio una suspensión marrón clara. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y después se enfrió a -55 °C. Después de mantener a esta temperatura durante 1 minuto, se añadió carbonocloridato de etilo (4,6 ml, 50,7 mmol) a una velocidad para mantener la temperatura +/- 10 °C. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y después se retiró el baño frío. La mezcla de reacción se agitó durante 180 minutos adicionales o hasta que la mezcla de reacción se calentó a 20 °C. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se añadió a un embudo separador con aproximadamente 100 ml de agua adicional. Después se añadió acetato de etilo (200 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo después 2 X 100 ml con acetato de etilo. Después de eliminar el acetato de etilo, el sólido marrón oscuro crudo se suspendió en 100 ml de acetonitrilo, que produjo un precipitado de color tostado. El sólido se recogió, se lavó con 20 ml de acetonitrilo y se secó. El filtrado de acetonitrilo se destiló hasta que la precipitación comenzó nuevamente. El sólido tostado se recogió por filtración, se lavó con acetonitrilo (1 x 20 ml) y se secó. Los sólidos recogidos se combinaron para dar el compuesto del título (6,94 g, 57 % de rendimiento) como un sólido tostado.

25 Ejemplo 1f

4-bromo-6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo [2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo

30 Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con una barra de agitación y el Ejemplo 1f-iv (3,00 g, 8,02 mmol). Se añadieron al matraz 100 ml de tetrahidrofurano, y la mezcla de reacción se agitó hasta la disolución completa (aproximadamente 1 minuto). A la mezcla de reacción en agitación se añadió hidrato de ácido *p*-toluenesulfónico (0,763 g, 4,01 mmol), seguido de *N*-bromosuccinimida (1,455 g, 8,17 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 23 °C durante 12,5 horas. Después de este tiempo, el tetrahidrofurano se eliminó en un evaporador rotatorio, dejando un residuo amarillo. El residuo se suspendió en 200 etanol de prueba (75 ml) y se agitó como una suspensión durante 80 minutos. La suspensión se filtró y se lavó con etanol (200 pruebas, 1 x 50 ml), para proporcionar el compuesto del título (3,06 g, 84 % de rendimiento) como un sólido blanquecino.

40 Ejemplo 1g

4-bromo-*N*-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

45 A una solución del Ejemplo 1f (10 g, 22,06 mmol) y etanamina 2 M en tetrahidrofurano (90 ml, 180 mmol) a 20 °C se añadió 8 % en peso de metanolato de magnesio (88 ml, 66,7 mmol) en metanol. La mezcla de reacción se calentó a 55 °C durante 15 horas con el sistema sellado. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con HCl 0,5 N (800 ml), se agitó durante 5 minutos y se filtró. El sólido se lavó con agua con hielo y se secó para proporcionar 6,8 g (98 %) del compuesto del título.

50 Ejemplo 1h

N-etil-6-metil-7-oxo-4- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) -6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

55 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 1 l se cargó con acetato de potasio seco (17,18 g, 175 mmol), el Ejemplo 1g (17,4 g, 58,4 mmol), 4,4,4',4',5,5,5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (29,6 g, 117 mmol), cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (1,837 g, 2,335 mmol) y 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo (1,113 g, 2,335 mmol), y se coloca bajo nitrógeno. Se añadió 2-metil tetrahidrofurano anhidro desgasificado (500 ml) y la mezcla se calentó a 75 °C durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua y acetato de etilo y la mezcla bifásica se agitó durante aproximadamente una hora con 1,2 g. (3,0 equiv. basado en moles de paladio) de ditiocarbamato de pirrolidina de amonio. La mezcla se filtró a través de un tapón de tierra de diatomeas con acetato de etilo y lavados con metanol/acetato de etilo al 10 %. El filtrado se diluyó adicionalmente con acetato de etilo y salina, las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salina, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El producto bruto se trituró con 300 ml de acetato de etilo al 20 %/heptano. Los sólidos secos proporcionaron 17,4 g (86 %) del compuesto del título.

65 Ejemplo 1i

Ácido 5-bromo-6-(2,6-dimetilfenoxi)nicotínico

Se calentó una solución de ácido 5-bromo-6-cloronicotínico (12 g, 50,8 mmol), 2,6-dimetilfenol (7,44 g, 60,9 mmol) y carbonato de cesio (49,6 g, 152 mmol) en dimetilsulfóxido (100 ml) a 100 °C durante 40 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en 500 ml de agua con hielo. El pH se ajustó a un pH constante de 2 mediante la adición cuidadosa de HCl 12 M. La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con cloruro de sodio acuoso saturado, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se trataron con carbón decolorante, se filtraron y se concentraron. El material bruto se adsorbió en gel de sílice y se cromatografió en un cartucho de sílice de 330 g, y se eluyó con un 10-70 % de acetato de etilo/etanol:heptanos al 10-70 % para proporcionar 10,74 g (66 %) del compuesto del título.

Ejemplo 1j

5-bromo-6-(2,6-dimetilfenoxi)-*N*-metoxi-*N*-metilnicotinamida

Una solución del Ejemplo 1i (8,5 g, 26,4 mmol), clorhidrato de *N*¹-((etilimino)metileno)-*N*³,*N*³-dimetilpropano-1,3-diamina (6,05 g, 31,6 mmol), 1*H*-benzo[d][1,2,3] hidrato de triazol-1-ol (5,12 g, 33,4 mmol), clorhidrato de *N*,*O*-dimetilhidroxilamina (5,21 g, 53,4 mmol) y 4-metilmorfolina (10 ml, 91 mmol) en diclorometano (130 ml) se agitó a 25 °C durante 3 horas. La mezcla se lavó en un embudo separador con 50 ml de diclorometano, se extrajo con agua, se lavó con bicarbonato de sodio acuoso y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, acetato de etilo al 0-50 % en heptano) para proporcionar el compuesto del título (8,56 g, 89 %).

Ejemplo 1k

1-(5-bromo-6-(2,6-dimetilfenoxi)piridin-3-il)etenona

Una solución del Ejemplo 1j (1,51 g, 4,13 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) se trató con una solución de cloruro de metilmagnesio (solución 3,0 M en tetrahidrofurano, 1,8 ml, 5,40 mmol) y se agitó a 25 °C durante 90 minutos. La solución se vertió en cloruro de amonio acuoso y se extrajo en acetato de etilo (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, 0-100 % acetato de etilo en heptano) para proporcionar 0,875 g (66 %) del compuesto del título.

Ejemplo 1l

1-(5-bromo-6-(2,6-dimetilfenoxi)piridin-3-il)propan-2-ol

Una solución del Ejemplo 1k (0,239 g, 0,746 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) se trató con una solución de cloruro de metilmagnesio (solución 3,0 M en tetrahidrofurano, 0,4 ml, 1,2 mmol) y se agitó a 25 °C durante 3,5 horas. La solución se vertió en cloruro de amonio acuoso y se extrajo en acetato de etilo (60 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, 0-100 % de acetato de etilo en heptano) para proporcionar 0,195 g (78 %) del compuesto del título.

Ejemplo 1m

4-(2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-*N*-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Del Ejemplo 1h (222 mg, 0,643 mmol), Ejemplo 1l (195 mg, 0,580 mmol), fosfato de potasio (363 mg, 1,710 mmol), tris(dibencilideneacetona)dipaladio(0) (16,7 mg, 0,018 mmol) y 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfadamantano (18,3 mg, 0,063 mmol) se combinaron y rociaron con nitrógeno durante 15 minutos, seguido de la adición de una mezcla desgasificada de tetrahidrofurano (4,80 ml)/agua (1,20 ml). La mezcla se calentó a 60 °C durante 3 horas. La mezcla se diluyó con 20 ml de acetato de etilo, se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. Los residuos se purificaron por HPLC de fase inversa (C18, CH₃CN/agua (0,1 % de ácido trifluoroacético), 0-100 % de gradiente) para proporcionar el compuesto del título como una sal de ácido trifluoroacético. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,31 (bs, 1H), 8,35 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,06 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,28 (m, 2H), 1,99 (s, 6H), 1,48 (s, 6H), 1,12 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H). MS (ESI+) *m/z* 475,2 (M+H)⁺.

Ejemplo 3

4-[2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-*N*-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamidaEjemplo 3^a

Ácido 3-bromo-4-(2,6-dimetilfenoxi)benzoico

Se calentó una mezcla de 3-bromo-4-fluorobenzoato de metilo (10,80 g, 46,3 mmol), 2,6-dimetilfenol (6,24 g, 51,1 mmol) y carbonato de cesio (16,6 g, 50,9 mmol) en sulfóxido de dimetilo (95 ml) a 190 °C durante 20 horas. La mezcla se dejó enfriar, después se vertió en 400 ml de salina, se acidificó con HCl y se extrajo con 500 ml de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con salina y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de la filtración, el material bruto se adsorbió sobre gel de sílice y se cromatografió en un cartucho de sílice de 220 g y se eluyó con 10-70 % 3:1 de acetato de etilo/etanol:heptanos para proporcionar 13,54 g (91 %) del compuesto del título.

Ejemplo 3b

3-bromo-4-(2,6-dimetilfenoxi)-N-metoxi-N-metilbenzamida

El ejemplo 3b se preparó de acuerdo con el procedimiento utilizado para la preparación del Ejemplo 1j, sustituyendo el Ejemplo 3a por el Ejemplo 1i.

Ejemplo 3c

1-(3-bromo-4-(2,6-dimetilfenoxi)fenil)etanona

Método A

A una mezcla del Ejemplo 3b (1,19 g, 3,27 mmol) en tetrahidrofurano (24 ml) se añadió con una jeringa cloruro de metilmagnesio (solución 3,0 M en tetrahidrofurano, 1,4 ml, 4,20 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 90 minutos, la solución se vertió en cloruro de amonio acuoso saturado y se extrajo en acetato de etilo (100 ml). Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea (gel de sílice, 0-100 % acetato de etilo/heptano) para proporcionar el compuesto del título (0,631 g, 61 % de rendimiento).

Método B:

Una mezcla de carbonato de potasio (4,78 g, 34,6 mmol) de 2,6-dimetilfenol (2,96 g, 24,19 mmol) de 1-(3-bromo-4-fluorofenil)etanona (5 g, 23,04 mmol) en dimetilacetamida (50 ml) agitado a 80 °C durante 1,5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua (40 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica combinada se lavó con agua, salina, y se concentró para proporcionar el compuesto del título (7,1 g, 22,24 mmol, 97 % de rendimiento).

Ejemplo 3d

2-(3-bromo-4-(2,6-dimetilfenoxi)fenil)propan-2-ol

Método A:

A una solución del Ejemplo 3c (0,365 g, 1,144 mmol) en tetrahidrofurano (10,00 mL) se le añadió una jeringa de cloruro de metilmagnesio (solución 3,0 M en tetrahidrofurano, 1 mL, 3,00 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 3,5 horas, la solución se repartió entre cloruro de amonio acuoso saturado (50 ml) y acetato de etilo (75 ml). Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 0-100 % acetato de etilo/heptano) para proporcionar el compuesto del título (0,247 g, 64 % de rendimiento).

Método B:

A una solución de 2,6-dimetilfenol (11,53 g, 94 mmol) y 3-bromo-4-fluorobenzoato de metilo (20 g, 86 mmol) en dimetil sulfóxido (80 ml) se añadió carbonato de cesio (41,9 g, 129 mmol). La mezcla se agitó a 80 °C bajo nitrógeno durante 2 horas, se enfrió, se diluyó con 200 ml de agua y se agitó durante 10 minutos. La mezcla se transfirió a un embudo separador y se extrajo 4 x 200 ml con metil terc-butil éter. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía (sílice, acetato de etilo al 0-10 % en heptanos) proporcionó 3-bromo-4-(2,6-dimetilfenoxi)benzoato de metilo como un aceite que solidificó al reposar (25,7 g, 82 %). A una solución de este material (11,08 g, 33,1 mmol) en tetrahidrofurano (165 ml) en nitrógeno a 23 °C se añadió bromuro de metilmagnesio (33,1 ml, 99 mmol, 3,0 M en éter dietílico) en forma de gota a gota. La reacción fue exotérmica. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora lo que permitió que la temperatura interna se enfriara hasta aproximadamente la temperatura ambiente. La mezcla se vertió en cloruro de amonio acuoso al 5 % frío y se repartió con 400 ml de éter dietílico. La capa orgánica se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía (sílice, acetato de etilo al 0-25 % en heptanos) proporcionó el compuesto del título (9,0 g, 81 %).

Ejemplo 3e

4-(2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)-*N*-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

El Ejemplo 3e se preparó de acuerdo con el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 1m, sustituyendo el Ejemplo 3d por el Ejemplo 11. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,21 (bds, 1H), 8,34 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,31 (dd, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,04 (m, 1H), 6,86 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,28 (m 2H), 2,02 (s, 6H), 1,44 (s, 6H), 1,12 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H). MS (ESI+) *m/z* 474,2 (M+H)⁺.

Ejemplo 32

N-*terc*-butil-4-[2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Ejemplo 32^a

Ácido 4-bromo-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxílico

Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con el Ejemplo 1f (7,9 g, 17,43 mmol) y dioxano (100 ml). A esta solución se le añadió NaOH 2 M (34,9 ml, 69,7 mmol), y la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 2 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con HCl (0,1 N) a pH 2. Después se añadió HCl 1N gota a gota para reducir el pH a aproximadamente 1. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante aproximadamente una hora. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó con agua y se secó para proporcionar el compuesto del título (4,44 g, 94 % de rendimiento).

Ejemplo 32b

4-bromo-*N*-(*terc*-butil)-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

A una suspensión del Ejemplo 32a (2,98 g, 11,0 mmol) en diclorometano (30 ml) se añadieron 4 gotas de dimetilformamida seguido de la adición de cloruro de oxalilo (1,93 ml, 22,0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se concentró. Al residuo se le añadieron tetrahydrofurano (30 ml) y 2-metilpropan-2-amina (3,47 ml, 33,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se repartió con acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo resultante se trituró con acetato de etilo/heptanos (1:1) para proporcionar el compuesto del título (3,35 g, 10,27 mmol, 93 %).

Ejemplo 32c

N-(*terc*-butil)-6-metil-7-oxo-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Una mezcla de acetato de potasio anhidro (26,6 g, 271 mmol), el Ejemplo 32b (29,5 g, 90 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (45,9 g, 181 mmol), cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bi-fenilo)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (2,85 g, 3,62 mmol), y 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-bifenilo (1,725 g, 3,62 mmol) se desgasificó bajo una corriente de nitrógeno. A esta mezcla se le añadió 2-metil tetrahydrofurano anhidro desgasificado (1 l). La suspensión amarilla resultante se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y después se diluyó con agua (500 ml) y acetato de etilo (500 ml) y se agitó durante 90 minutos con 1,8 g. (3,0 equivalentes basados en moles de paladio) de ditiocarbamato de pirrolidina de amonio. La mezcla resultante se filtró a través de tierra de diatomeas y la almohadilla de tierra de diatomeas se enjuagó con acetato de etilo. El filtrado se lavó con salina. La capa orgánica se mezcló con aproximadamente 20 g de. SiliaMetS Thiol® (un tiol unido a sílice a través de una cadena de alquilo, un eliminador de paladio de Silicycle), y esta mezcla se agitó durante aproximadamente una hora. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó en un MPC Grace Reveleris X2 mediante el uso de una columna de gel de sílice Teledyne-Isco RediSep Rf Gold 750 g., y se eluyó con 50 % a 60 % a 70% a 80 % de acetato de etilo/heptano para proporcionar el compuesto del título. Este material se sonicó en 250 ml de acetato de etilo/heptano al 20 %. El sólido se recogió por filtración, se lavó con acetato de etilo/heptano al 20 % y se secó para proporcionar el compuesto del título (17,6 g, rendimiento del 52 %).

Ejemplo 32d

N-*terc*-butil-4-[2-(2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Se sopló una corriente de gas nitrógeno sobre una mezcla del Ejemplo 32c (15,0 g, 40,2 mmol), Ejemplo 3d (16,2 g, 48,2 mmol), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfadamantano (1,175 g, 4,02 mmol), fosfato de potasio (21,33 g, 100

mmol) y dipaladio tris(dibencilideneacetona) (1,104 g, 1,206 mmol) durante una hora. Mientras tanto, en un matraz de 1 L. se mezclaron dioxano anhidro (300 ml) y agua (75 ml). Esta solución se desgasificó durante una hora haciendo burbujear nitrógeno a través de ella. Después de una hora, los solventes se transfirieron mediante una cánula a la mezcla de sólidos desgasificados. Cuando se añadieron los disolventes, se observó una exotermia y la temperatura aumentó de 20,5 °C a 32,0 °C. Cuando la mezcla de reacción se mezcló suficientemente, se calentó a 80 °C durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo y agua. La mezcla se agitó durante una hora con aproximadamente 600 mg. (3,0 equivalentes. basado en moles de paladio) de ditiocarbamato de pirrolidina de amonio. La mezcla resultante se filtró a través de tierra de diatomeas. La almohadilla de tierra de diatomeas se lavó con acetato de etilo. El filtrado resultante se vertió en un embudo separador y la mezcla se diluyó adicionalmente con acetato de etilo y salina. La capa orgánica se lavó con agua (2X) y salina. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó en una MPLC Grace Reveleris X2 mediante el uso de una columna de gel de sílice Teledyne Isco RediSep Rf Gold 330 g. y se eluyó con 70 % a 80 % a 90 % de acetato de etilo/heptanos a 100 % de acetato de etilo. El material puro resultante se disolvió con calentamiento en etanol, se concentró a presión reducida y se secó para producir el compuesto del título (18,0 g, 89 % de rendimiento). ¹H RMN (501 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,34 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,52 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,28 (dd, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,03 (dd, *J* = 8,3, 6,6 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,26 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 4,97 (s, 1H), 3,59 (s, 3H), 2,00 (s, 6H), 1,42 (s, 6H), 1,35 (s, 9H). MS (ESI+) *m/z* 502,1 (M+H)⁺.

Ejemplo 35

N-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Ejemplo 35^a

4-fluoro-2,6-dimetilfenol

Una solución de 2-bromo-5-fluoro-1,3-dimetilbenceno (25 g, 123 mmol) en tetrahidrofurano (300 ml) se enfrió a -78 °C y se añadió *n*-butil litio (59,1 ml, 148 mmol) gota a gota a una velocidad para mantener la temperatura interna a -75 °C o menos. La mezcla se agitó durante 2 horas y después se añadió trimetilborato (16,51 ml, 148 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 horas a -78 °C, luego se calentó a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la mezcla se enfrió a -10 °C y se añadió una solución preenfriada de NaOH (7,39 g, 185 mmol) y peróxido de hidrógeno al 30 % (201 ml, 1970 mmol). Una vez que se completó la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la mezcla se ajustó a pH 1 con HCl 2M. Se añadieron 400 ml de éter etílico y 200 ml de agua y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo con 3 x 200 ml de éter, y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ saturado y Na₂O₃ saturado, después se agitó con una solución acuosa saturada de Na₂O₅ (200 mL) durante 15 minutos. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. Los residuos se recogieron en 1/1 de éter dietílico/pentano y se lavaron con un tapón de sílice. La concentración del filtrado proporcionó 11,47 g (67 %) del compuesto del título.

Ejemplo 35b

3-bromo-4-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)benzoato de metilo

A una solución del Ejemplo 35a (1,86 g, 13,27 mmol) y 3-bromo-4-fluorobenzoato de metilo (2,099 ml, 14,20 mmol) en dimetil sulfóxido (14 ml) se añadió carbonato de cesio (6,49 g, 19,91 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 2 horas, se enfrió y se diluyó con agua (100 ml), después se extrajo con metil terc-butil éter (200 ml). La fase acuosa se extrajo con porciones adicionales (2 x 100 ml) de metil terc-butil éter. Los orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron. El material bruto se purificó por cromatografía (gel de sílice, y se eluyó con 0-25 % de acetato de etilo/heptanos) para proporcionar 4,56 g (97 %) del compuesto del título.

Ejemplo 35c

2-(3-bromo-4-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)fenil)propan-2-ol

Se colocó un matraz que contenía una solución del Ejemplo 35b (2,49 g, 7,05 mmol) en tetrahidrofurano (28,0 ml) en un baño de agua, y después se trató con bromuro de metilmagnesio 3 M en tetrahidrofurano (7,0 ml, 21,00 mmol). Después de 30 minutos, la mezcla se inactivó mediante la adición de 100 ml de cloruro de amonio acuoso y se repartió con 100 ml de éter dietílico. Los orgánicos se lavaron con agua y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración y la eliminación del disolvente, el material bruto se cromatografió (cartucho de sílice, 0-100 % acetato de etilo/heptanos) para proporcionar 2,056 g (83 %) del compuesto del título.

Ejemplo 35d

N-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Método A:

Una mezcla del Ejemplo 35c, Ejemplo 1h (0,280 g, 0,810 mmol), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfadamantano (0,021 g, 0,073 mmol), tris(dibencilideneacetona)dipaladio(0) (4) (0,017 g, 0,019 mmol) y fosfato de potasio (0,331 g, 1,557 mmol) en dioxano (4 ml) y agua (1 ml) se desgasificó y se volvió a llenar con nitrógeno seis veces. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se repartió entre agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo adicional (3 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea sobre gel de sílice y se eluyó con metanol al 5 % en acetato de etilo. El producto en bruto se purificó adicionalmente por HPLC preparativa de fase inversa (C18, CH₃CN/agua (ácido trifluoroacético al 0,1 %), 20-80 % de gradiente). Las fracciones deseadas se combinaron y se secaron por congelación para proporcionar el compuesto del título (0,14 g, 0,285 mmol, 45,7 % de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,20 (s, 1H), 8,32 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,46 - 7,21 (m, 2H), 6,96 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,83 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,24 (dt, J = 12,6, 6,2 Hz, 2H), 2,00 (s, 6H), 1,42 (s, 6H), 1,10 (t, J = 7,2 Hz, 2H). MS (ESI+) m/z 492,2 (M+H)⁺.

Método B:

Etap 1: Preparación de 4-(2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)-6-metil-7-oxo-1-a-sililo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de metilo

Se cargó un matraz de tres bocas con una barra de agitación y se ajustó con un termopar y un condensador de reflujo. Al matraz se le añadió bis(pinacolato)diborón (27,0 g, 106 mmol), tris(dibencilideneacetona)dipaladio(0) (605 mg, 0,661 mmol), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfadamantano (465 mg, 1,591 mmol), Ejemplo 1f preparado a partir del Método B (38,832 g, 86 mmol) y acetato de potasio (1767 g, 180 mmol). El matraz que contenía los sólidos se purgó con nitrógeno durante 30 minutos y un matraz separado que contenía 350 ml de tetrahidrofurano se roció durante 30 minutos. Después de este tiempo, el matraz de tres bocas se tapó y se transfirieron 350 ml del tetrahidrofurano burbujeado a los sólidos mediante el uso de una cánula. La mezcla de reacción después se agitó y calentó a 60 °C hasta que la reacción se juzgó completa por HPLC (22 horas). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de tierra de diatomeas y se recogió en un matraz de fondo redondo. La almohadilla de tierra de diatomeas se lavó con tetrahidrofurano (1 x 50 ml) y se añadió a la reacción. La mezcla de reacción se roció después con nitrógeno durante 30 minutos. En un matraz separado, se disolvió fosfato de potasio tribásico (52,0 g, 548 mmol) en agua (50 ml) y la solución se roció con nitrógeno durante 30 minutos. Después de este tiempo, el matraz que contenía la mezcla de reacción estaba abierto (bajo alto flujo de nitrógeno) y se añadió el Ejemplo 35c (28,8 g, 82 mmol) como un sólido. Inmediatamente después de la adición, la solución de fosfato y agua se añadió mediante una cánula. La mezcla de reacción se calentó después a 60 °C durante 2 horas o hasta que se observó el consumo completo del Ejemplo 35C. Los componentes volátiles se eliminaron después en un evaporador rotativo. A la mezcla restante se le añadieron 300 ml de acetato de etilo para disolver completamente el residuo crudo. La capa acuosa y orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con 5 % de cisteína/8 % de bicarbonato de sodio (2 x 100 ml). Las capas orgánicas y acuosas se separaron y el componente orgánico se eliminó en un evaporador rotatorio dejando un sólido amarillo/marrón claro. El sólido se disolvió en metil terc-butil éter (450 ml) para dar una solución amarilla y se añadieron 900 ml de heptano para promover la precipitación. El sólido blanquecino se filtró y se lavó rápidamente con 200 ml de heptano. El filtrado se concentró hasta que la precipitación comenzó nuevamente. El sólido se filtró nuevamente y se lavó. Se eliminó una cantidad final de disolvente del segundo filtrado y comenzó a formarse un precipitado. Al enfriar el filtrado, seguido de filtración y lavado del sólido con heptano, se obtuvo un tercer y último lote del compuesto del título (41,69 g, 75 %).

Etap 2: Preparación de ácido 4-(2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxílico

Se cargó un vial de 24 ml con una barra de agitación y 4-(2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)-6-metil-7-oxo-1-tosil-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo [2,3-*c*]piridina-2-carboxilato de etilo (140 mg, 0,216 mmol). El sólido se disolvió en 3 ml de tetrahidrofurano y se añadió hidróxido de potasio acuoso (4,45 M, 0,60 ml, 2,67 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 22 horas. Se añadieron al vial 10 ml de acetato de etilo. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se agitó. Las capas orgánica y acuosa se separaron. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo adicional (2 x 10 ml). La capa acuosa se ajustó después a pH = 3 mediante el uso de HCl 1 M, y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Las fracciones de acetato de etilo recogidas después del ajuste del pH se combinaron y se destilaron de la reacción mediante el uso de un evaporador rotatorio para proporcionar el compuesto del título (80 mg, 80 % de rendimiento).

Etap 3: Preparación de *M*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida

Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación y ácido 4-(2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxílico (80 mg, 0,388 mmol). El matraz se enjuagó con nitrógeno y se añadieron 3,8 ml de *N,N*- dimetilforamida anhidra. La solución de color amarillo claro se agitó

como HATU (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato, 166 mg, 0,437 mmol) se añadió en una porción como un sólido. La mezcla de reacción amarilla brillante se agitó durante 10 minutos. Después de este tiempo, se añadió etanamina (0,40 ml, 0,800 mmol) y la mezcla de reacción se agitó 20 minutos más antes de que se añadiera diisopropiletilamina (0,20 ml, 1,145 mmol). Después de 12 horas, se añadieron 20 ml de agua a la mezcla de reacción, lo que provocó la precipitación del producto como un sólido blanco. El sólido se lavó rápidamente con agua adicional (2 x 10 ml) y se secó para proporcionar el compuesto del título (70 mg, 83 % de rendimiento).

Ejemplos biológicos

10 Ensayo de unión al dominio de bromodominio

Se usó un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) para determinar las afinidades de los compuestos de los Ejemplos enumerados en la Tabla 1 para cada bromodominio de BRD4. Los bromodominios de BRD4 primero marcados con His (BDI: aminoácidos K57-E168) y segundo (BDII: aminoácidos E352-M457) se expresaron y purificaron. Se usó un inhibidor de BET marcado con Alexa647 como sonda fluorescente en el ensayo.

20 Síntesis del compuesto inhibidor de bromodominio marcado con Alexa647 ácido 2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno [3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il) acético.

Se suspendió metil 2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetato (véase, por ejemplo, WO 2006129623) (100,95 mg, 0,243 mmol en 1 ml de metanol al que se añadió una solución recién preparada de monohidrato de hidróxido de litio (0,973 ml, 0,5 M, 0,487 mmol) y agitado a temperatura ambiente durante 3 horas. El metanol se evaporó y el pH se ajustó con ácido clorhídrico acuoso (1 M, 0,5 ml, 0,5 mmol) y se extrajo cuatro veces con acetato de etilo. Las capas combinadas de acetato de etilo se secaron sobre sulfato de magnesio y se evaporaron para proporcionar ácido 2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il) acético (85,3 mg, 87,0 %); ESI-MS *m/z* = 401,1 [(*M*+*H*)⁺] que se usó directamente en la siguiente reacción.

30 *N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetamida bis(2,2,2-trifluoroacetato).

Se combinó ácido 2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il) acético (85,3 mg, 0,213 mmol) con 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dietanamina (Sigma-Aldrich, 0,315 mg, 2,13 mmol) se combinaron en 5 ml de dimetilformamida anhidra. Se añadió (1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-iloxi)tripirrolidin-1-ilfosfonio hexafluorofosfato(V) (PyBOB, CSBio, Menlo Park CA; 332 mg, 0,638 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se diluyó a 6 ml con dimetilsulfóxido:agua (9:1, v:v) y se purificó en dos inyecciones con la columna de recogida de tiempo Waters Deltapak C18 200 x 25 mm eluida con un gradiente de ácido trifluoroacético al 0,1 % (v/v) en agua y acetonitrilo. Las fracciones que contenían los dos productos purificados se liofilizaron para proporcionar *N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetamida bis(2,2,2-trifluoroacetato) (134,4 mg, 82,3 %); ESI-MS *m/z* = 531,1 [(*M*+*H*)⁺]; 529,1 [(*MH*)⁺] y (*S*,*Z*)-*N*,*N'*-(2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi)) bis(etano-2,1-diil)) bis(2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetamida) bis(2,2,2-trifluoroacetato) (3,0 mg, 1,5 %); ESI-MS *m/z* = 913,2 [(*M*+*H*)⁺]; 911,0 [(*MH*)⁺].

45 *N*-(2-(2-(2-amido-(Alexa647)-etoxi)etoxi)etil)-2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetamida (2,2,2-trifluoroacetato).

Se combinó *N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4] triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il) acetamida bis(2,2,2-trifluoroacetato) (5,4 mg, 0,0071 mmol) con Alexa Fluor® 647 Carxylic Acid, succinimidil ester (Life Technologies, Grand Island, NY; 3 mg, 0,0024 mmol) se combinaron en 1 ml de dimetilsulfóxido anhidro que contiene diisopropiletilamina (1 % v/v) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se diluyó a 3 ml con dimetilsulfóxido:agua (9:1, v:v) y se purificó en una inyección con la columna de recogida de tiempo Waters Deltapak C18 200 x 25 mm que se eluyó con un gradiente de ácido trifluoroacético al 0,1 % (v/v) en agua y acetonitrilo. Las fracciones que contenían el producto purificado se liofilizaron para proporcionar *N*-(2-(2-(2-amido-(Alexa647)-etoxi)etoxi)etil)-2-((6*S*,*Z*)-4-(4-clorofenilo)-2,3,9-trimetil-6*H*-tieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]diazepin-6-il)acetamida (2,2,2-trifluoroacetato) (1,8 mg); MALDI-MS *m/z* = 1371,1, 1373,1 [(*M*+*H*)⁺] como un polvo azul oscuro.

Ensayo

Las series de dilución del compuesto se prepararon en DMSO a través de una dilución en serie de aproximadamente 3 veces. Las diluciones del compuesto se agregaron directamente en placas de ensayo blancas de bajo volumen (Perkin Elmer Proxiplate 384 Plus # 6008280) mediante el uso de un Labcyte Echo junto con la robótica Labcyte Access y Thermo Multidrop CombinL. Los compuestos se suspendieron después en ocho microlitros (μL) de tampón de ensayo (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0, NaCl 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM dihidrato de sal disódica, 0,01 % Triton X-100, DL-Ditiotretol 1 mM) que contiene el bromodominio marcado con His, el anticuerpo anti-His conjugado con Europium (Invitrogen PV5596) y la sonda conjugada con Alexa-647.

La concentración final de la mezcla de ensayo IX contenía DMSO al 2 %, BRD4 marcado con His 12 nM (BDI_K57-E168) y sonda 100 nM o BRD4 marcado con His 4 nM (BDII_E352-M457) y sonda 30 nM, y el anticuerpo anti-marca-His conjugado con Europio 1 nM y concentraciones de los compuestos en el intervalo de: 49,02 μ M-0,61 nM o 0,98 μ M – 0,15 nM.

Después de un equilibrio de una hora a temperatura ambiente, se determinaron las relaciones TR-FRET mediante el uso de un lector de placas de múltiples etiquetas Envision (Ex 340, Em 495/520).

Los datos de TR-FRET se normalizaron a los promedios de 24 controles sin compuesto ("alto") y 8 controles que contenían una sonda no marcada 1 μ M ("bajo"). El porcentaje de inhibición se representó en función de la concentración del compuesto y los datos se ajustaron con la ecuación logística de 4 parámetros para obtener la CI_{50} S. Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon a partir de la CI_{50} S, la K_d de la sonda y la concentración de la sonda.

Los valores medios de la K_i se reportan en la Tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo #	K_i de unión TR-FRET: BRD4 (BDI_K57-E168) (μ M)	K_i de unión TR-FRET: BRD4 (BDII_E352-M457) (μ M)
32	0,599	0,0028
35	0,426	0,0014
Compuesto X	0,00209	0,000952
Compuesto Y	0,0216	0,00132
Compuesto Z	0,0699	0,0155

El compuesto X es N-[4-(2,4-difluorofenoxi)-3-(6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1H-pirrol[2,3-c]piridin-4-il)fenilo]etanosulfonamida;

El compuesto Y es 4-[2-(2,4-difluorofenoxi)-5-(metilsulfonil)fenil]-N-etil-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1H-pirrol[2,3-c]piridina-2-carboxamida; y

El compuesto Z es 4-[5-(hidroximetil)-2-fenoxifenil]-6-metil-1,6-dihidro-7H-pirrol[2,3-c]piridin-7-ona.

Se encontró que todos los compuestos probados tenían selectividad para el BRD4 BDII sobre el BRD4 BDI en el ensayo TR-FRET descrito anteriormente, y son al menos 10 veces selectivos para el BRD4 BDII sobre el BRD4 BDI. En una realización, los presentes compuestos son de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 veces selectivos para el BRD4 BDII sobre el BRD4 BDI. En una realización, los presentes compuestos son aproximadamente de 100 a aproximadamente 200 veces selectivos para el BRD4 BDII sobre el BRD4 BDI. En una realización, los presentes compuestos son al menos aproximadamente 200 veces selectivos para el BRD4 BDII sobre el BRD4 BDI.

Ensayo de inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjerto

Se evaluó el efecto del compuesto del Ejemplo 32, 35 y el Compuesto X para inhibir el crecimiento de los tumores de xenoinjerto SKM-1_FP1 y LNCaP-FGC. Se utilizaron ratones hembra SCID Beige (Charles River) para el modelo de xenoinjerto de flanco SKM-1_FP1. Se usaron ratones macho NSG (JAX Labs) para el estudio LNCaP-FGC. Las células se suspendieron en PBS, se mezclaron con Matrigel (libre de fenol rojo, Becton Dickinson Biosciences Discovery Labware) en una proporción de 1:4 (V/V) y se inocularon subcutáneamente en el flanco (cinco millones de células por sitio) de los ratones. Los ratones inoculados se aleatorizaron en grupos y el tratamiento se inició cuando el volumen tumoral promedio fue de 0,2-0,25 cm^3 . Los compuestos se administraron por vía oral en (% en volumen): 1,5 % de DMSO, 30 % de PEG 400 y 68,5% de Phosol 53 MCT. El crecimiento tumoral en el flanco se evaluó midiendo el tamaño del tumor con calibradores y calculando el volumen utilizando la fórmula ($L \times W^2/2$). Los grupos de estudio se terminaron antes de que el volumen tumoral alcanzara 3 cm^3 . La inhibición del crecimiento tumoral se evaluó en el momento en que se finalizó el grupo tratado con vehículo calculando la relación del volumen medio del grupo de fármaco de prueba con el volumen medio del grupo (T/C) no tratado (control) y calculando el porcentaje de la inhibición del crecimiento tumoral (% TGI). % TGI = $((1-T/C) \times 100)$. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Eficacia y márgenes de exposición de los inhibidores de BET selectivos a BDII

La eficacia en la AML (leucemia mieloide aguda) y el cáncer de próstata se estudió con dos compuestos inhibidores de BET selectivos a BDII (Ejemplo 35 y Ejemplo 32), y un inhibidor pan BET (Compuesto X), en xenoinjerto de ratón SKM-1 (AML) y LNCaP (próstata) (Tabla 2).

Se realizaron estudios de toxicología en ratas de catorce días con el Ejemplo 35, el Ejemplo 32 y el Compuesto X, y se determinaron las exposiciones máximas toleradas en base a observaciones en la vida que incluyen signos clínicos, peso corporal y consumo de alimentos. Los compuestos se dosificaron por vía oral una vez al día, en ratas Sprague-Dawley. Los márgenes de exposición calculados a partir de las exposiciones toleradas en ratas en relación con las exposiciones eficaces en modelos de xenoinjerto de ratón se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

	Resultados de eficacia de ratones a partir de los estudios de xenoinjerto						Exposición máxima tolerada en ratas	Relación AUC (exposición máxima tolerada en ratas/exposición eficaz en ratones)	
Ejemplo	AML (SKM-1)			Próstata (LNCaP)			AUC (ug* hr/ml) (dosis)	AML (SKM-1)	Próstata (LNCaP)
	AUC (ug* hr/mL)	Dosis (mg/kg)	% TGI	AUC (ug* hr/mL)	Dosis (mg/kg)	% TGI			
Ej. 35	0,84	4,7	74	1,1	4,7	64	27,5 (30 mg/kg)	32x	25x
Ej. 32	5	9,4	76	12,6	30	60	69,2 (30 mg/kg)	14x	5,5x
Compuesto X	1,2	1	76	1,2	1	64	0,725 (1 mg/kg)	0,6x	0,6x

REIVINDICACIONES

5

1. *N*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. *N*-etil-4-[2-(4-fluoro-2,6-dimetilfenoxi)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil]-6-metil-7-oxo-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridina-2-carboxamida.