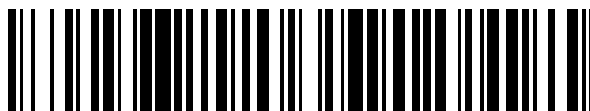


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 671**

51 Int. Cl.:

C07D 209/20 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2006 E 06736390 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1851200**

54 Título: **Inhibidores diméricos de IAP**

30 Prioridad:

25.02.2005 US 656201 P

05.04.2005 US 668344 P

20.06.2005 US 692111 P

09.08.2005 US 706649 P

25.10.2005 US 729853 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2014

73 Titular/es:

**TETRALOGIC PHARMACEUTICALS
CORPORATION (100.0%)
365 PHONIXVILLE PIKE
MALVERN, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**CONDON, STEPHEN M.;
LAPORTE, MATTHEW G.;
DENG, YIJUN y
RIPPIN, SUSAN R.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 456 671 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 diméricos de IAP

Referencias cruzadas y solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/656.201 titulada "PEPTIDOMIMÉTICOS", presentada el 25 de febrero de 2005, la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/668.344 titulada "USOS INMUNOTERAPÉUTICOS DE MIMÉTICOS DE SMAC" presentada el 5 de abril de 2005, solicitud provisional de EE.UU. nº 60/692.111 titulada "PEPTIDOMIMÉTICOS DE SMAC SOLOS O COMBINADOS CON INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA", presentada el 20 de junio de 2005, solicitud provisional de EE.UU. nº 60/706.649 titulada "PEPTIDOMIMÉTICOS DE SMAC COMO INHIBIDORES DE CIAP", presentada el 9 de agosto de 2005 y la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/729.853 titulada "PEPTIDOMIMÉTICOS DE SMAC SOLOS O COMBINADOS CON COMPUESTOS QUE CONTIENEN PLATINO Y TAXANOS", presentada el 25 de octubre 2005.

Antecedentes

- 15 La apoptosis (muerte celular programada) desempeña un papel principal en el desarrollo y la homeostasis de todos los organismos pluricelulares. La apoptosis puede iniciarse dentro de una célula a partir de un factor externo tal como una quimiocina (vía extrínseca) o por medio de un fenómeno intracelular tal como alteración del ADN (vía intrínseca). Las alteraciones en las rutas apoptóticas han estado implicadas en muchos tipos de patologías humanas, entre ellas los trastornos del desarrollo, el cáncer, las enfermedades autoinmunitarias, así como los trastornos neurodegenerativos. Un modo de acción de los fármacos quimioterapéuticos es la muerte celular por apoptosis.

- 20 La apoptosis se conserva a través de la especie y es ejecutada principalmente por caspasas activadas, una familia de cisteína proteasas con especificidad de aspartato en sus sustratos. Estas proteasas específicas de aspartato que contienen cisteína ("caspasas") se producen en células como zimógenos catalíticamente inactivos y se procesan proteolíticamente para convertirse en proteasas activas durante la apoptosis. Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsables de la escisión proteolítica de un amplio espectro de dianas celulares que conducen en última instancia a la muerte celular. En las células supervivientes normales que no han recibido un estímulo apoptótico, la mayoría de las caspasas permanecen inactivas. Si caspasas se activan anormalmente, su actividad proteolítica puede ser inhibida por una familia de proteínas conservadas por evolución denominadas IAP (inhibidores de proteínas de apoptosis).

- 30 La familia de proteínas IAP suprime la apoptosis al evitar la activación de procaspasas e inhibir la actividad enzimática de caspasas maduras. Se han identificado varias IAP de mamífero distintas entre ellas XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP, NAIP (proteína inhibidora de la apoptosis neuronal), Bruce, y survivina, y todas presentan actividad antiapoptótica en cultivo celular. Las IAP se descubrieron originalmente en baculovirus por su capacidad funcional para sustituir a la proteína P35, un gen antiapoptótico. Las IAP se han descrito en organismos que van desde *Drosophila* al hombre, y se sabe que se sobreexpresan en muchos cánceres humanos. En términos generales, las IAP comprenden uno a tres dominios con la repetición LAP IAP de Baculovirus (BIR), y la mayoría de ellos también poseen un motivo dedo ANULAR en el terminal carboxilo. El dominio BIR en sí es un dominio de unión al cinc de aproximadamente 70 restos que comprenden 4 hélices alfa y 3 cadenas beta, con restos de cisteína e histidina que coordinan el ión zinc. Se cree que el dominio BIR produce el efecto antiapoptótico al inhibir las caspasas y por lo tanto inhibir la apoptosis. XIAP se expresa por doquier en la mayoría de tejidos adultos y fetales. La sobreexpresión de XIAP en las células tumorales se ha demostrado que confiere protección contra una variedad de estímulos proapoptóticos y favorece la resistencia a la quimioterapia. Consecuente con esto, se ha demostrado una fuerte correlación entre las concentraciones de proteína XIAP y la supervivencia para los pacientes con leucemia mielógena aguda. El descenso de la expresión de XIAP por oligonucleótidos complementarios se ha demostrado que sensibiliza células tumorales a la muerte inducida por una amplia gama de agentes proapoptóticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los péptidos derivados de Smac/DIABLO también se ha demostrado que sensibilizan a numerosas diferentes estirpes de células tumorales a la apoptosis inducida por una variedad de fármacos proapoptóticos.

- 50 En las células normales señaladas para sufrir apoptosis, sin embargo, debe eliminarse el efecto inhibitor en el que IAP actúa como mediador, un proceso al menos en parte realizado por una proteína mitocondrial denominada Smac (segundo activador mitocondrial de las caspasas). Smac (o DIABLO), se sintetiza como una molécula precursora de 239 aminoácidos; los 55 restos del terminal N sirven como las mitocondrias que se dirigen a la secuencia que se retira después de la importación. La forma madura de Smac contiene 184 aminoácidos y se comporta como un oligómero en disolución. Smac y varios de sus fragmentos se han propuesto para su uso como dianas para la identificación de agentes terapéuticos.

- 55 Smac se sintetiza en el citoplasma con una secuencia de orientación mitocondrial N-terminal que se elimina proteolíticamente durante la maduración al polipéptido maduro y se dirige a continuación al espacio intermembranario de las mitocondrias. En el momento de la inducción de apoptosis, se libera Smac de las mitocondrias al citosol, junto con citocromo c, donde se une a las IAP, y permite la activación de caspasas, eliminando en éstas el efecto inhibitor de las IAP sobre la apoptosis. Mientras que el citocromo c provoca la

polimerización de Apaf-1 para activar la procaspasa-9 y -3, Smac elimina el efecto inhibitorio de múltiples IAP. Smac interactúa esencialmente con todos las IAP que se han examinado hasta la fecha, entre ellos XIAP, c-IAP1, c-IAP2, y ML-IAP. Por lo tanto, Smac parece ser un regulador patrón de apoptosis en mamíferos.

Se ha demostrado que Smac actúa como un antagonista de IAP estimulando no sólo la activación proteolítica de las procaspasas, sino también la actividad enzimática de la caspasa madura, ambas de las cuales dependen de su capacidad para interactuar físicamente con IAP. La cristalografía de rayos X ha demostrado que los primeros cuatro aminoácidos (AVPI) de Smac madura se unen a una parte de las PAI. Esta secuencia del terminal N es esencial para unir las IAP y bloquear sus efectos antiapoptóticos.

Los antagonistas de IAP de la biología básica sugieren que pueden complementar o sinergizar otros agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos y/o radiación. Sería de esperar que los agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos y la radiación provoquen apoptosis como resultado de daño al ADN y/o la alteración del metabolismo celular.

Las tendencias actuales en el diseño de fármacos contra el cáncer se enfocan en la activación selectiva de las vías de señalización apoptótica en los tumores mientras se salvan las células normales. Se han descrito las propiedades específicas del tumor de agentes antitumorales específicos, tales como por TRAIL. El ligando que provoca apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) es uno de varios miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (FNT) que provocan apoptosis mediante la participación de receptores de muerte. TRAIL interactúa con un sistema receptor inusualmente complejo, que en el hombre comprende dos receptores de muerte y tres receptores señuelo. Se ha utilizado TRAIL como un agente anticanceroso solo y en combinación con otros agentes, entre ellos fármacos quimioterapéuticos y radiación ionizante. TRAIL puede iniciar la apoptosis en las células que sobreexpresan los factores de supervivencia Bcl-2 y Bcl-XL, y puede representar una estrategia de tratamiento para los tumores que han adquirido resistencia a fármacos quimioterapéuticos. TRAIL une sus receptores afines y activa la cascada de caspasas utilizando moléculas adaptadoras tal como FADD. En la actualidad, se han identificado cinco receptores TRAIL. Dos receptores TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5) actúan como mediadores en la señalización apoptótica, y tres receptores no funcionales, DcR1, DcR2, y la osteoprotegerina (OPG) pueden actuar como receptores de señuelo. Los genes que aumentan la expresión de DR4 y DR5 pueden presentar actividad antitumoral sinérgica cuando se combina con TRAIL.

Se han demostrado efectos beneficiosos de la producción de TRAIL en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, la instilación intravesical de la vacuna BCG provoca una respuesta inmunitaria de Th1, dando como resultado la producción de citocinas antitumorales, como TRAIL, y la infiltración de la lesión con inmunocitos y es la primera línea de terapia para el tratamiento de cáncer superficial de vejiga. En estudios *in vitro* indican que el interferón alfa (INF- α), que en la actualidad se está probando la eficacia en estudios clínicos en cáncer de vejiga, provoca apoptosis en la que actúa como mediador la producción autocrina de TRAIL en las estirpes celulares de cáncer de vejiga humano. La concentración circulante de osteoprotegerina, un receptor señuelo para TRAIL, se incrementa también en pacientes con cáncer de vejiga y se correlaciona negativamente con el estadio tumoral, el grado y el pronóstico.

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de TRAIL por células NK (destructoras naturales) se mejora con tratamiento con IL-2 (interleucina 2), y se requiere la expresión de TRAIL para los efectos citotóxicos completos de células tumorales. IL-2, una citocina, está aprobado actualmente para el tratamiento tanto de melanoma como de carcinoma de células renales.

La inhibición de la replicación de las células del cáncer y/o la reparación de daños en el ADN mejorará la fragmentación del ADN nuclear, induciendo de este modo a la célula a entrar en la vía apoptótica. Las topoisomerasas, una clase de enzimas que reducen el superenrollamiento en el ADN al romper y volver a unir una o ambas cadenas de la molécula de ADN, son vitales para los procesos celulares, tales como la replicación y reparación del ADN. La inhibición de esta clase de enzimas deteriora la capacidad de las células para replicar, así como para reparar el ADN dañado y activa la vía apoptótica intrínseca.

Las principales vías que conducen desde el daño al ADN en el que la topoisomerasa actúa como mediador a la muerte celular implican la activación de las caspasas en el citoplasma por moléculas proapoptóticas liberadas desde las mitocondrias, tales como Smac. El vínculo de estas vías efectoras apoptóticas está estrechamente controlado por las vías reguladoras aguas arriba que responden a las lesiones inducidas en el ADN por inhibidores de la topoisomerasa de en las células sometidas a apoptosis. La iniciación de las respuestas celulares a las lesiones inducidas en el ADN por inhibidores de la topoisomerasa está asegurada por proteína cinasas que unen a cortes de ADN. Estas cinasas (ejemplos no restrictivos de los que se comprenden Akt, JNK y p38) comúnmente denominados "sensores de ADN" actúan como mediadores en la reparación del ADN, la detención y/o la apoptosis del ciclo celular por fosforilación de un gran número de sustratos, entre ellos varias cinasas aguas abajo.

Los medicamentos para la quimioterapia de platino pertenecen a un grupo general de los agentes que modifican el ADN. Los agentes modificadores del ADN pueden ser cualquier compuesto químico muy reactivo que se une con varios grupos nucleófilos en los ácidos nucleicos y las proteínas y provoca efectos mutágenos, carcinógenos o citotóxicos. Los agentes modificadores de ADN actúan por diferentes mecanismos, la interrupción de la función del ADN y la muerte celular; el daño en el ADN/la formación de puentes cruzados o enlaces entre los átomos en el ADN,

y la inducción de emparejamiento incorrecto de los nucleótidos que conduce a mutaciones, para conseguir el mismo resultado final. Tres ejemplos no restrictivos de agentes modificadores de ADN que contiene platino son cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

Se cree que el cisplatino destruye células cancerosas al unirse al ADN e interferir con su mecanismo de reparación, lo que conduce finalmente a la muerte celular. El carboplatino y oxaliplatino derivados de cisplatino que comparten el mismo mecanismo de acción. Los complejos de platino muy reactivos se forman en el interior de las células e inhiben la síntesis de ADN mediante moléculas de ADN que se unen por enlaces covalentes para formar reticulaciones de ADN en las cadenas y entre las cadenas.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE) se ha demostrado que provocan apoptosis en células colorrectales. Los FAINE parecen provocar apoptosis mediante la liberación de Smac procedente de las mitocondrias (PNAS, 30 de noviembre de 2004, vol. 101:16897-16902). Por lo tanto, es de esperar que el uso de los FAINE en combinación con miméticos de Smac aumente la actividad de cada fármaco sobre la actividad de cualquier fármaco independientemente.

La Patente de EE.UU. n.º 6.992.063 de Shi *et al.* titulada "Compositions and methods for Regulation Apoptosis", presentada el 28 de septiembre 2001 y publicada el 31 de enero de 2006, da a conocer que los miméticos de la parte del terminal N de Smac proporcionan fármacos experimentales viables.

Además, se ha demostrado en la publicación de EE.UU. n.º US 2008/0199439 de McLendon *et al.* titulada "IAP-Binding Cargo Molecules and Peptidomimetics for Use In Diagnostic and Therapeutics Methods", presentada el 12 de febrero de 2004, que una molécula de carga se puede acoplar a un tetrapéptido peptidomimético de Smac con terminal N.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona compuestos que imitan la estructura de unión terciaria de Smac a los IAP o la actividad de la parte del terminal N de Smac. Los estereoisómeros de los compuestos miméticos descritos en la presente memoria también están comprendidos en la presente invención. La invención también proporciona métodos de utilización de estos miméticos para modular la apoptosis y además con fines terapéuticos. La invención también proporciona productos intermedios y métodos para utilizar estos productos intermedios para la preparación de compuestos que modulan la apoptosis al imitar la estructura terciaria de enlace de Smac a IAP o la actividad de la parte del terminal N de Smac.

Un compuesto de la presente invención que tiene la fórmula general tal como en la reivindicación 1. Otros compuestos se reivindican en las reivindicaciones 19 a 27.

El documento WO 2005/084317 describe péptidomiméticos de Smac diméricos. El documento WO 2006/020060 describe compuestos que se unen a IAP útiles para el tratamiento del cáncer.

Además se describe la combinación terapéutica de compuestos de la presente invención con TRAIL u otro agentes químicos o biológicos que se unen a y activan el/los receptor(es) de TRAIL. TRAIL ha recibido considerable atención recientemente debido a la constatación de que muchos tipos de células de cáncer son sensibles a la apoptosis provocada por TRAIL, mientras que la mayoría de las células normales parecen ser resistentes a esta acción de TRAIL. Las células resistentes a TRAIL pueden aparecer por una variedad de diferentes mecanismos, entre ellos la pérdida del receptor, la presencia de receptores señuelo, o la sobreexpresión de FLIP que compite por la unión ciónógeno caspasa-8 durante la formación de DISC. En la resistencia a TRAIL, los miméticos de Smac aumentan la sensibilidad de las células tumorales a TRAIL lo que conduce a un aumento de la muerte celular, cuyas correlaciones clínicas es de esperar que aumenten la actividad apoptótica en tumores resistentes a TRAIL, mejoren la respuesta clínica, aumenten la duración de la respuesta, y en última instancia, aumenten la tasa de supervivencia de los pacientes. En apoyo de esto, se ha demostrado que la reducción en las concentraciones de XIAP por tratamiento complementario *in vitro* provoca sensibilización a TRAIL de las células de melanoma resistentes y de las células de carcinoma renal (Chawla-Sarkar, *et al.*, 2004). Los miméticos de Smac descritos en la presente memoria se unen a las IAP e inhiben su interacción con las caspasas, potenciando en ellas la apoptosis provocada por TRAIL.

Los miméticos de Smac pueden utilizarse en combinación con tratamiento con la vacuna BCG del cáncer de vejiga. XIAP, el objetivo nominal de miméticos de Smac, se sobreexpresa en una alta proporción de cánceres de vejiga. En los estudios que utilizaron XIAP complementario, las células de cáncer de vejiga se sensibilizaron a agentes quimioterapéuticos que provocan apoptosis de las células efectuadas por la vía TRAIL. La presente invención proporciona miméticos de Smac para su uso en el tratamiento con BCG en el cáncer superficial de vejiga/carcinoma *in situ*. Los miméticos de Smac descritos en la presente memoria potenciarán los efectos de la vacuna BCG al potenciar los efectos si TRAIL se generó en respuesta a la vacuna.

Del mismo modo, los miméticos de Smac aumentarán la apoptosis provocada por TRAIL observada en pacientes con melanoma y carcinoma de células renales que están siendo tratados con IL-2. Dado que IL-2 provoca la actividad de las células NK potenciando la expresión de TRAIL, la adición del tratamiento con un activador de la caspasa-9, tal como el mimético de Smac, dará lugar a una respuesta clínica más eficiente.

Se describen además miméticos de Smac que actúan sinérgicamente con inhibidores de topoisomerasa para potenciar su efecto provocador de apoptosis. Los inhibidores de la topoisomerasa inhiben la replicación y reparación del ADN, favoreciendo con ello la apoptosis y se han utilizado como agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de la topoisomerasa favorecen el daño al ADN al inhibir las enzimas que se requieren en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, la exportación de citocromo c y Smac procedente de las mitocondrias en el citosol de las células está provocada por el daño del ADN causado por los inhibidores de la topoisomerasa.

Los inhibidores de topoisomerasa tanto de la clase de tipo I (camptotecina, topotecan, SN-38, irinotecán, topotecán, BNP 1350, 9-amino-camptotecán, lurtotecán, grimatecán, exatecán, amsacrina, y diflomotecán) como de la clase de tipo II (etopósido, antraciclina, antraquinona, y podofilotoxina) presentan potente sinergia con los miméticos de Smac de la invención en una estirpe celular de glioblastoma multirresistente (T98G), estirpe de cáncer de mama (MDA-MB-231), y estirpe de cáncer de ovario (OVCAR-3), entre otras. Otros inhibidores de la topoisomerasa comprenden, por ejemplo, aclacinomicina A, camptotecina, daunorrubicina, doxorrubicina, elipticina, epirubicina, y mitaxantrona.

El agente quimioterapéutico/antineoplásico puede ser un compuesto que contiene platino. En una realización, el compuesto que contiene platino es el cisplatino. El cisplatino puede sinergizar con un peptidomimético de Smac y potenciar la inhibición de un IAP, tal como, pero sin limitarse a XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. En otra realización, un compuesto que contiene platino es el carboplatino. El carboplatino puede sinergizar con un peptidomimético de Smac y potenciar la inhibición de un IAP, entre ellos, pero sin limitarse a, XIAP, la cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. En otra realización, un compuesto que contiene platino es el oxaliplatino. El oxaliplatino puede sinergizar con un peptidomimético de Smac y potenciar la inhibición de un IAP, entre ellos, pero sin limitarse a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc.

En otra realización el agente quimioterapéutico/antineoplásico que sinergiza con un compuesto según la presente invención es un taxano. Los taxanos son antimitóticos, inhibidores mitóticos o agentes de polimerización de microtúbulos. Los taxanos comprenden, pero no se limitan a, docetaxel y paclitaxel.

Los taxanos se caracterizan como compuestos que favorecen el ensamblaje de microtúbulos inhibiendo la despolimerización de tubulina, bloqueando de este modo la evolución del ciclo celular por deterioro centrosómico, provocación de husillos anormales y supresión de la dinámica de los microtúbulos del husillo. El mecanismo único de acción de taxano está en contraste con otros venenos de microtúbulos, tales como alcaloides de la vinca, colquicina y criptoficinas, que inhiben la polimerización de tubulina. Los microtúbulos son polímeros celulares muy dinámicos hechos de $\alpha\beta$ -tubulina y proteínas asociadas que desempeñan funciones clave durante la mitosis al participar en la organización y función del husillo, asegurando la integridad del ADN segregado. Por lo tanto, representan un blanco efectivo para la terapia del cáncer.

En otra realización, cualquier agente que activa la vía intrínseca apoptótica y/o produce la liberación de Smac o citocromo c de las mitocondrias tiene el potencial de actuar de forma sinérgica con un mimético de Smac.

Una combinación de un peptidomimético de Smac y un agente quimioterapéutico/neoplásico y/o radioterapia de cualquier tipo que activa las vías intrínsecas o extrínsecas o la liberación de Smac puede proporcionar un enfoque más eficaz para destruir las células tumorales. Los peptidomiméticos de Smac interactúan con los IAP, tales como XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP, etc., y bloquean la inhibición de apoptosis en la que actúa como mediador IAP, mientras que los quimioterapéuticos/agentes antineoplásicos y/o la radioterapia destruye las células se dividen activamente activando la vía apoptótica intrínseca que conduce a la apoptosis y la muerte celular. Como se describe con más detalle a continuación, las realizaciones de la invención proporcionan combinaciones de un peptidomimético de Smac y un agente quimioterapéutico/antineoplásico y/o radiación que proporcionan una acción sinérgica contra la proliferación celular no deseada. Esta acción sinérgica entre un peptidomimético de Smac y un agente quimioterapéutico/antineoplásico y/o radioterapia puede mejorar la eficiencia del agente quimioterapéutico/antineoplásico y/o de la radioterapia. Esto permitirá un aumento en la eficacia de los agentes antineoplásicos/quimioterapéuticos actuales o de la radioterapia permitiendo reducir la dosis de agente quimioterapéutico/antineoplásico, proporcionando en el mismo tanto una posología más eficaz, así como una dosis más tolerable de agente quimioterapéutico/antineoplásico y/o radioterapia.

Por simplicidad y a título ilustrativo, los principios de la invención se describen haciendo referencia principalmente a una de sus realizaciones. Además, en la descripción siguiente, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de la invención. En otros casos, no se han descrito con detalle métodos y estructuras bien conocidos para no oscurecer innecesariamente la invención.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gráfico que representa la afinidad de unión relativa de un tetrapéptido de Smac (AVPI) y un mimético de Smac potente a XIAP BIR-3 utilizando un ensayo de polarización de fluorescencia. Los resultados presentaban un aumento de 30.000 veces en la afinidad de unión del mimético de Smac con relación al tetrapéptido de Smac.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la vida media de tres miméticos de Smac después de una sola dosis de administración intravenosa de 1 mg/kg en una rata. Los resultados muestran hasta una vida media de seis horas para los miméticos probados.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la capacidad de un mimético de Smac para antagonizar selectivamente la proliferación de una estirpe celular de cáncer de ovario SK-OV-3. En este ensayo MTT, el mimético de Smac presenta propiedades contra el cáncer a concentraciones que no tienen ningún efecto sobre la estirpe normal de células diploides MRC-5.

- 5 La Fig. 4 muestra el efecto quimiopotenciador de un mimético de Smac utilizando células de melanoma que han demostrado ser resistentes a los efectos apoptóticos de TRAIL. Los ensayos para la proliferación celular pusieron de manifiesto que cuando se trataban células MDA-MB-231, una estirpe celular de cáncer de mama, con un peptidomimético de Smac (Entrada 1) solo, las células eran resistentes a los efectos antiproliferativos del mimético de Smac. Por el contrario, cuando se utilizó la Entrada 1 en combinación con TRAIL había un aumento de 1000
10 veces en el efecto antiproliferativo dando como resultado un aumento de 100 veces en la destrucción de células como se detecta por la pérdida correspondiente en la formación de colonias.

Descripción detallada

- También debe tenerse en cuenta que, como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" comprenden la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos normalmente por cualquier experto en la técnica. Aunque cualesquiera métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la práctica o ensayo de formas de las realizaciones de la presente invención, los métodos preferidos se describen ahora. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no está
20 facultada para poner una fecha anterior a dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor numérico del número que se está empleando. Por lo tanto, aproximadamente 50% significa en el intervalo de 45% - 55%.

- "Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático ramificado o no ramificado, saturado o insaturado (es decir, alquenilo, alquilino), que tiene hasta 12 átomos de carbono a menos que se especifique lo contrario. Cuando se emplea como parte de otro término, por ejemplo, "alquilamino", el fragmento alquilo puede ser una cadena de hidrocarburo saturada, sin embargo, también comprende cadenas de carbono de hidrocarburos insaturados tales como "alquenilamino" y "alquinilamino". Ejemplos de grupos alquilo concretos comprenden metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, n-heptilo, 3-heptilo, 2-metilhexilo y similares. Las expresiones "alquilo inferior" "alquilo C1-C4" y "alquilo de 1 a 4 átomos de carbono" son sinónimos y se emplean indistintamente para significar metilo, etilo, 1-propilo, isopropilo, ciclopropilo, 1-butilo, sec-butilo o t-butilo. A menos que se especifique, los grupos alquilo sustituidos pueden contener uno, dos, tres o cuatro sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes. Ejemplos de grupos alquilo sustituidos anteriores comprenden, pero no se limitan a: cianometilo, nitrometilo, hidroximetilo, tritiloximetilo, propioniloximetilo, aminometilo, carboximetilo, carboxietilo, carboxipropilo, alquiloiloximetilo, aliloxilaminometilo, carbamoiloximetilo, metoximetilo, etoximetilo, t-butoximetilo, acetoximetilo, clorometilo, bromometilo, yodometilo, trifluorometilo, 6-hidroxihexilo, 2,4-dicloro (n-butilo), 2-amino (iso-propilo), 2-carbamoiloxietilo y similares. El grupo alquilo también puede estar sustituido con un grupo carbociclo. Los ejemplos comprenden grupos ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo y ciclohexilmetilo, así como los correspondientes grupos -etil, propil-, butil-, -pentil-, -hexil-, etc. Los alquilos sustituidos concretos son metilos sustituidos, p. ej., un grupo metilo sustituido por los mismos sustituyentes que el grupo "alquilo Cn-Cm sustituido". Ejemplos del grupo metilo sustituido comprenden grupos tales como hidroximetilo, hidroximetilo protegido (p. ej., tetrahidropiranioloximetilo), acetoximetilo, carbamoiloximetilo, trifluorometilo, clorometilo, carboximetilo, bromometilo y yodometilo.

- 45 "Amino" indica aminas primarias (es decir, -NH₂), secundarias (es decir, -NRH) y terciarias (es decir, -NRR). Aminas secundarias y terciarias concretas son alquilamina, dialquilamina, arilamina, diarilamina, arilalquilamina y diarilalquilamina. Aminas secundarias y terciarias particulares son metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, fenilamina, bencilamina dimetilamina, dietilamina, dipropilamina y diisopropilamina.

- 50 "Ariilo" cuando se utiliza solo o como parte de otro término significa un grupo aromático carbocíclico si o no condensado que tiene el número de átomos de carbono designado, o si no se designa ningún número, hasta 14 átomos de carbono. Grupos ariilo concretos comprenden fenilo, naftilo, bifenilo, fenantrenilo, naftacenilo, y similares (véase p. ej. Lang's Handbook of Chemistry (Dean, J.A., ed.) 13^a ed. Tabla 7-2 [1985]). En una realización concreta un grupo ariilo es fenilo. Fenilo sustituido o ariilo sustituido indica un grupo fenilo o un grupo ariilo sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados, a menos que se especifique lo contrario, entre halógeno (F, Cl, Br, I), hidroxi, hidroxi protegido, ciano, nitro, alquilo (tal como alquilo C1-C6), alcoxi (tal como alcoxi C1-C6), benciloxi, carboxi, carboxi protegido, carboximetilo, carboximetilo protegido, hidroximetilo, hidroximetilo protegido, aminometilo, aminometilo protegido, trifluorometilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heterociclisulfonilamino, heterociclilo, ariilo u otros grupos especificados. Uno o más grupos metino (CH) y/o metileno (CH₂) en estos sustituyentes pueden a su vez estar sustituidos con un grupo similar a los indicados anteriormente. Ejemplos del
60 término "fenilo sustituido" comprenden pero no se limitan a un grupo mono-o di (halo) fenilo tales como 2-clorofenilo,

2-bromofenilo, 4-clorofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 3-clorofenilo, 3-bromofenilo, 4-bromofenilo, 3,4-dibromofenilo, 3-cloro-4-fluorofenilo, 2-fluorofenilo y similares; un grupo mono-o di (hidroxi) fenilo tales como 4-hidroxifenilo, 3-hidroxifenilo, 2,4-dihidroxifenilo, los derivados hidroxi-protegidos de los mismos y similares; un grupo nitrofenilo tal como 3- o 4-nitrofenilo; un grupo cianofenilo, por ejemplo, 4-cianofenilo; un grupo mono- o di (alquilo inferior) fenilo tal como 4-metilfenilo, 2,4-dimetilfenil, 2-metilfenilo, 4-(isopropil)fenilo, 4-etilfenilo, 3-(n-propil)fenilo y similares; un grupo mono-o di(alcoxi)fenilo, por ejemplo, 3,4-dimetoxifenilo, 3-metoxi-4-benciloxifenilo, 3-metoxi-4-(1-clorometil) benciloxi-fenilo, 3-etoxifenilo, 4-(isopropoxi)fenilo, 4-(t-butoxi)fenilo, 3-etoxi-4-metoxifenilo y similares; 3- o 4-trifluorometilfenilo; un mono-o dicarboxifenilo o (carboxi protegido) fenilo tal 4-carboxifenilo; un grupo mono- o di (hidroximetil)fenilo o (hidroximetil protegido)fenilo tal como 3- (hidroximetil protegido)fenilo o 3,4-di (hidroximetil)fenilo; un mono-o di (aminometil)fenilo o (aminometil protegido)fenilo tal como 2-(aminometil)fenilo o 2,4-(aminometil protegido)fenilo; o un mono-o di (N-(metilsulfonilamino))fenilo tal como 3-(N-metilsulfonilamino))fenilo. También, el término "fenilo sustituido" representa grupos fenilo disustituídos, donde los sustituyentes son diferentes, por ejemplo, 3-metil-4-hidroxifenilo, 3-cloro-4-hidroxifenilo, 2-metoxi-4-bromofenilo, 4-etil-2-hidroxifenilo, 3-hidroxi-4-nitrofenilo, 2-hidroxi-4-clorofenilo, y similares, así como grupos fenilo trisustituídos donde los sustituyentes son diferentes, por ejemplo 3-metoxi-4-benciloxi-6-metil sulfonilamino, sulfonilamino 3-metoxi-4-benciloxi-6-fenil sulfonilamino, y grupos fenilo tetrasustituídos donde los sustituyentes son diferentes, tales como 3-metoxi-4-benciloxi-5-metil-6-fenil sulfonilamino. Grupos fenil sustituidos concretos son los grupos 2-clorofenilo, 2-aminofenilo, 2-bromofenilo, 3-metoxifenilo, 3-etoxifenilo, 4-benciloxifenilo, 4-metoxifenilo, 3-etoxi-4-benciloxifenilo, 3,4-dietoxifenilo, 3-metoxi-4-benciloxifenilo, 3-metoxi-4-(1-clorometil)benciloxi-fenilo, 3-metoxi-4-(1-clorometil)benciloxi-6-metilsulfonil aminofenilo. Anillos de arilo condensados también pueden estar sustituidos con los sustituyentes especificados en la presente memoria, por ejemplo con 1, 2 o 3 sustituyentes, de la misma manera como los grupos alquilo sustituidos.

El término radical alquileo tal como se emplea en la presente memoria comprende la referencia a un radical de hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado difuncional que contiene de 1 a 30 átomos de carbono, e comprende, por ejemplo, metileno (CH_2), etileno (CH_2CH_2), propileno ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2-metilpropileno ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), hexileno ($(\text{CH}_2)_6$), y similares. Alquileo inferior comprende un grupo alquileo de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5, átomos de carbono.

Radicales alquileo sustituido comprende la referencia a un radical o grupo alquileo saturado di-funcional ramificado o no ramificado que tiene 1 a 30 átomos de carbono y que tiene de 1 a 5 sustituyentes. Los radicales alquileo inferior sustituido se refieren a un grupo radical alquileo sustituido, que tiene 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente que tiene 1 a 5 átomos de carbono, y que tiene de 1 a 5 sustituyentes. Los sustituyentes pueden incluir, pero no se limitan a aquellos para los grupos alquilo.

El término radical alqueno tal como se emplea en la presente memoria comprende la referencia a un hidrocarburo ramificado, cíclico, o a un radical de hidrocarburo no ramificado de 2 a 30 átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, t-butenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, hexadecenilo, eicosenilo, tetracosenilo y similares. El término alqueno inferior comprende un grupo alqueno de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono, que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Uno o más dobles enlaces carbono-carbono pueden tener independientemente una configuración cis o trans. Radical alqueno sustituido se refiere a un radical alqueno o a un grupo alqueno inferior que tiene de 1 a 5 sustituyentes que pueden incluir pero no están limitados a los de los grupos alquilo.

El término radical alquenoileno comprende la referencia a un radical o grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado difuncional que contiene de 2 a 30 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. "Alquenoileno inferior" comprende un grupo alquenoileno de 2 a 10, más preferiblemente de 2 a 5, átomos de carbono, que contiene un doble enlace carbono-carbono. Alquenoileno radical sustituido se refiere a un radical alquenoileno o a un grupo alquenoileno inferior que tiene de 1 a 5 sustituyentes que pueden incluir pero no están limitados a los de los grupos alquilo.

El término radical o grupo alquino se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace, algunas realizaciones comprenden grupos alquino de 2 a 6 átomos de carbono que tienen un triple enlace. Un alquino sustituido contendrá uno, dos o tres sustituyentes como se define para los grupos alquilo sustituidos. Alquinoileno comprende la referencia a una cadena de hidrocarburo ramificada o no ramificada difuncional que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono; algunas realizaciones comprenden un grupo alquinoileno de 2 a 6 átomos de carbono con un triple enlace. Un alquinoileno sustituido contendrá uno, dos, o tres sustituyentes como se define para los grupos alquilo sustituidos.

"Grupo heterocíclico", "heterocíclico", "heterociclo", "heterociclilo", o "heterociclo" solo y cuando se emplea como un resto en un grupo complejo tal como un grupo heterocicloalquilo, se emplean indistintamente y se refieren a cualquier anillo mono-, bi- o tricíclico, saturado o insaturado, aromático (heteroarilo) o no aromático que tiene el número de átomos designados, en general, de 5 a aproximadamente 14 átomos en el anillo, en donde los átomos del anillo son carbono y al menos un heteroátomo (nitrógeno, azufre u oxígeno). En una realización concreta, el grupo incorpora 1 a 4 heteroátomos. Por lo general, un anillo de 5 eslabones tiene de 0 a 2 dobles enlaces y un

anillo de 6 o 7 eslabones tiene de 0 a 3 dobles enlaces y los heteroátomos de nitrógeno o azufre pueden estar opcionalmente oxidados (p. ej., SO, SO₂), y cualquier heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Determinados heterociclos no aromáticos comprenden morfolinil (morfolino), pirrolidinilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, 2,3-dihidrofuranilo, 2H-piraniilo, tetrahidropiraniilo, tiiranilo, tietanilo, tetrahidrotietanilo, aziridinilo, azetidino, 1-metil-2-pirrolilo, piperazinilo y piperidinilo. Un grupo "heterocicloalquilo" es un grupo heterociclo como se definió anteriormente unido por enlace covalente a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente.

Determinados heterociclos de 5 eslabones que contienen un átomo de azufre o de oxígeno y de uno a tres átomos de nitrógeno comprenden tiazolilo, tales como tiazol-2-ilo y tiazol-2-il N-óxido, tiadiazolilo tales como 1,3,4-tiadiazol-5-ilo y 1,2,4-tiadiazol-5-ilo, oxazolilo, tales como oxazol-2-ilo, y oxadiazolilo tales como 1,3,4-oxadiazol-5-ilo, y 1,2,4-oxadiazol-5-ilo. Determinados heterociclos de anillo de 5 eslabones que contienen de 2 a 4 átomos de nitrógeno comprenden imidazolilo, tal como imidazol-2-ilo; triazolilo tales como 1,3,4-triazol-5-ilo, 1,2,3-triazol-5-ilo, y 1,2,4-triazol-5-ilo, y tetrazolilo, tal como 1H-tetrazol-5-ilo. Benzo-fusionados especial heterociclos de 5 eslabones son benzoxazol-2-ilo, benzotiazol-2-ilo y bencimidazol-2-il. Determinados heterociclos de 6 eslabones contienen uno a tres átomos de nitrógeno y opcionalmente un átomo de azufre o de oxígeno, por ejemplo, piridilo, tal como pirid-2-ilo, pirid-3-ilo, y pirid-4-ilo; pirimidilo tales como pirimid-2-ilo y pirimid-4-ilo; triazinilo, tales como 1,3,4-triazin-2-ilo y 1,3,5-triazin-4-ilo; piridazinilo tales como piridazin-3-ilo y pirazinilo. Los sustituyentes para los heterociclos opcionalmente sustituidos, y ejemplos adicionales de los sistemas de anillo de 5 y 6 eslabones expuestos anteriormente se pueden encontrar en la patente de EE.UU. n° 4.278.793 de W. Druckheimer *et al.*

Radical arilalquilo se refiere a radicales alquilo que llevan un sustituyente arilo y tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose con desde aproximadamente 6 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos arilalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos. Los ejemplos no restrictivos comprenden, por ejemplo, bencilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo. Un grupo arilalquilo sustituido contendrá uno o más sustituyentes en el grupo arilo o alquilo como se define para grupos alquilo sustituidos.

Radical o grupo cicloalquilarilo, se refiere a un radical cicloalquilo condensado con un grupo arilo, inclusive todas las combinaciones de alquil cicloalquilarilos independientemente sustituidos, teniendo los grupos cicloalquilo y arilo dos átomos en común.

El radical o grupo cicloalquilo comprende más específicamente la referencia a un radical alquilo carbocíclico monovalente saturado que consiste en uno o más anillos en sus estructuras y que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose con desde aproximadamente 3 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Las estructuras de anillos múltiples pueden ser estructuras de aillo formando puente o condensadas. Los anillos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más de los sustituyentes para los grupos alquilo. Ejemplos de grupos cicloalquilo comprenden, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclooctilo y adamantilo. Un grupo cicloalquilo sustituido contendrá uno o más sustituyentes como se define para grupos alquilo sustituidos.

Radical cicloalquilalquilo se refiere más específicamente a radicales alquilo que llevan un sustituyente cicloalquilo y que tienen de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose con desde aproximadamente 6 a aproximadamente 12 átomos de carbono y puede incluir, pero no se limitan a los grupos metilciclopropilo, metilciclohexilo, isopropilciclohexilo y butilciclohexilo. El radical o grupo cicloalquilalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes para los grupos alquilo, entre ellos pero sin limitarse a hidroxilo, ciano, alquilo, alcoxi, tioalquilo, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, amino, alquilamino y dialquilamino.

"Heteroarilo" solo y cuando se emplea como un resto en un grupo complejo tal como un grupo heteroarilalquilo, se refiere a cualquier sistema de anillo aromático mono-, bi- o tricíclico que tiene el número de átomos designado, donde al menos un anillo es un anillo de 5, 6 o 7 eslabones que contiene de uno a cuatro heteroátomos seleccionados del grupo de nitrógeno, oxígeno, y azufre (Lang's Handbook of Chemistry, anteriormente). En la definición se incluyen los grupos bicíclicos en donde cualquiera de los anillos de heteroarilo anteriores están fusionados a un anillo de benceno. Los siguientes sistemas de anillo son ejemplos de grupos heteroarilo (ya sea sustituido o no sustituido) indicados por el término "heteroarilo": tienilo, furilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tetrazolilo, tiatriazolilo, oxatriazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, tiazinilo, oxazinilo, triazinilo, tiadiazinilo, oxadiazinilo, ditiazinilo, dioxazinilo, oxatiazinilo, tetrazinilo, tiatriazinilo, oxatriazinilo, ditiadiazinilo, imidazolinilo, dihidropirimidilo, tetrahidropirimidilo, tetrazolo[1,5-b]piridazinilo y purinilo, así como los derivados benzo-condensados, por ejemplo, benzoxazolilo, benzofurilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotriazolilo, benzoimidazolilo e indolilo. Concretamente los "heteroarilos" comprenden; 1,3-tiazol-2-ilo, 4-(carboximetil)-5-metil-1,3-tiazol-2-ilo, sal sódica de 4-(carboximetil)-5-metil-1,3-tiazol-2-ilo, 1,2,4-tiadiazol-5-ilo, 3-metil-1,2,4-tiadiazol-5-ilo, 1,3,4-triazol-5-ilo, 2-metil-1,3,4-triazol-5-ilo, 2-hidroxil-1,3,4-triazol-5-ilo, sal sódica de 2-carboxi-4-metil-1,3,4-triazol-5-ilo, 2-carboxi-4-metil-1,3,4-triazol-5-ilo, 1,3-oxazol-2-ilo, 1,3,4-oxadiazol-5-ilo, 2-metil-1,3,4-oxadiazol-5-ilo, 2-(hidroximetil)-1,3,4-oxadiazol-5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-

5-ilo, 1,3,4-tiadiazol-5-ilo, 2-tiol-1,3,4-tiadiazol-5-ilo, 2-(metiltio)-1,3,4-tiadiazol-5-ilo, 2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-ilo, 1H-tetrazol-5-ilo, 1-metil-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(1-(dimetilamino)et-2-il)-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(carboximetil)-1H-tetrazol-5-ilo, sal sódica de 1-(carboximetil)-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(ácido metilsulfónico)-1H-tetrazol-5-ilo, sal sódica de 1-(ácido metilsulfónico)-1H-tetrazol-5-ilo, 2-metil-1H-tetrazol-5-ilo, 1,2,3-triazol-5-ilo, 1-metil-1,2,3-triazol-5-ilo, 2-metil-1,2,3-triazol-5-ilo, 4-metil-1,2,3-triazol-5-ilo, N-óxido de pirid-2-ilo, 6-metoxi-2-(N-óxido)-piridaz-3-ilo, 6-hidroxipiridaz-3-ilo, 1-metilpirid-2-ilo, 1-metilpirid-4-ilo, 2-hidroxipirimid-4-ilo, 1,4,5,6-tetrahidro-5,6-dioxo-4-metil-as-triazin-3-ilo, 1,4,5,6-tetrahidro-4-(formilmetil)-5,6-dioxo-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-6-hidroxi-as-triazin-3-ilo, sal sódica de 2,5-dihidro-5-oxo-6-hidroxi-2-metil-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-6-hidroxi-2-metil-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-6-metoxi-2-metil-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-2-metil-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-2,6-dimetil-as-triazin-3-ilo, tetrazolo[1,5-b] piridazin-6-ilo y 8-aminotetrazolo[1,5-b]-piridazin-6-ilo. Un grupo alternativo de "heteroarilo" comprende: 4-(carboximetil)-5-metil-1,3-tiazol-2-ilo, sal sódica de 4-(carboximetil)-5-metil-1,3-tiazol-2-ilo, 1,3,4-triazol-5-ilo, 2-metil-1,3,4-triazol-5-ilo, 1H-tetrazol-5-ilo, 1-metil-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(1-(dimetilamino)et-2-il)-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(carboximetil)-1H-tetrazol-5-ilo, sal sódica de 1-(carboximetil)-1H-tetrazol-5-ilo, 1-(ácido metilsulfónico)-1H-tetrazol-5-ilo, sal sódica de 1-(ácido metilsulfónico)-1H-tetrazol-5-ilo, 1,2,3-triazol-5-ilo, 1,4,5,6-tetrahidro-5,6-dioxo-4-metil-as-triazin-3-ilo, 1,4,5,6-tetrahidro-4-(2-formilmetil)-5,6-dioxo-as-triazin-3-ilo, sal sódica de 2,5-dihidro-5-oxo-6-hidroxi-2-metil-as-triazin-3-ilo, 2,5-dihidro-5-oxo-6-hidroxi-2-metil-as-triazin-3-ilo, tetrazolo[1,5-b] piridazin-6-ilo, y 8-aminotetrazolo [1,5-b] piridazin-6-ilo.

"Inhibidor" significa un compuesto que reduce o impide la unión de proteínas IAP a las proteínas de caspasa o que reduce o impide la inhibición de la apoptosis por una proteína IAP, o que se une a un dominio BIR de IAP de una manera similar al fragmento amino terminal de Smac, liberando de este modo Smac para inhibir la acción de una IAP.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" comprenden sales de adición tanto de ácido como de base. "Sal farmacéuticamente aceptable de adición de ácido" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres y que no son biológicamente o de otro modo indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido fosfórico y similares, y los ácidos orgánicos pueden seleccionarse entre las clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares.

Los términos "mimético", "péptido mimético" y "peptidomimético" se utilizan indistintamente en la presente memoria, y se refieren en general a un péptido, péptido parcial o molécula no peptídica que imita la estructura terciaria de enlace o actividad de un péptido natural o dominio funcional de proteínas seleccionados (p. ej., motivo o zona activa de unión). Estos peptidomiméticos comprenden péptidos modificados de manera recombinante o químicamente, así como agentes no peptídicos, tales como pequeñas moléculas farmacomiméticas, como se describe con más detalle a continuación.

Como se emplea en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticales, en cuanto se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se emplean indistintamente y representan que los materiales se pueden administrar a un mamífero sin producir efectos fisiológicos indeseables, como náuseas, mareos, erupciones o molestias gástricas.

"Proporcionar" cuando se utiliza junto con un medio terapéutico para administrar un agente terapéutico directamente en o sobre un tejido diana o para administrar un agente terapéutico a un paciente con lo que el agente terapéutico impacta positivamente en el tejido al que se dirige.

Como se emplea en la presente memoria "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal o mamífero, entre ellos, pero sin limitarse a, ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, conejo, rata, ratón, etc.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, mejorar, prevenir o mejorar una afección o enfermedad no deseada de un paciente. Las realizaciones de la presente invención están dirigidas a estimular la apoptosis, y por lo tanto la muerte celular.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz", como se emplean en la presente memoria, se pueden emplear indistintamente y se refieren a una cantidad de un componente del compuesto terapéutico de la presente invención. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico es una cantidad predeterminada calculada para alcanzar el efecto deseado, es decir, para estimular eficazmente la apoptosis, o para sensibilizar una célula a la apoptosis preferiblemente eliminando una inhibición de la apoptosis de IAP, más preferiblemente inhibiendo una unión de IAP a una caspasa.

"Miméticos" o "peptidomiméticos" son compuestos sintéticos que tienen una estructura tridimensional (es decir, un

"motivo de péptido en el núcleo") basado en la estructura tridimensional de un péptido seleccionado. El motivo peptídico proporciona el compuesto mimético con la actividad biológica deseada, es decir, la unión a IAP, en donde la actividad de unión del compuesto mimético no se reduce sustancialmente, y es a menudo la misma o mayor que la afinidad de unión del péptido natural en el que se modela el mimético. Por ejemplo, en los miméticos de la presente invención, se ha encontrado que X₃ y X₄ pueden completamente similares a no péptidos. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que mejoran su aplicación terapéutica, tales como aumento de la permeabilidad celular, mayor afinidad y/o aidez y vida media biológica prolongada.

Las estrategias de diseño miméticas, específicamente, peptidomiméticas están fácilmente disponibles en la técnica y se puede adaptar fácilmente para su uso en la presente invención (véase, por ejemplo, Ripka y Rich, *Curr. Op. Chem. Biol.* 2, 441-452, 1998; Hruby *et al.*, *Curr. Op. Chem. Biol.* 1, 114-119, 1997; Hruby y Balse, *Curr. Med. Chem.* 9, 945-970, 2000). Una clase de miméticos imita un eje central que es parcial o completamente no peptídico, pero imita el eje central del péptido átomo por átomo y comprende grupos laterales que de igual manera imitan la funcionalidad de los grupos laterales de los restos de aminoácidos naturales. Varios tipos de enlaces químicos, p. ej., enlaces éster, tioéster, tioamida, cetoamida, carbonilo reducido, dimetileno y cetometileno, son conocidos en la técnica por ser sustitutos generalmente útiles de enlaces peptídicos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a la proteasa. Otra clase de peptidomiméticos comprende una molécula pequeña no peptídica que se une a otro péptido o proteína, pero que no es necesariamente un mimético estructural del péptido natural. No obstante, ha surgido otra clase de peptidomiméticos de la química combinatoria y la generación de bibliotecas químicas masivas. Estos comprenden generalmente nuevas plantillas que, aunque estructuralmente no relacionados con el péptido natural, poseen grupos funcionales necesarios situados en una matriz para servir como miméticos "topográficos" del péptido original de (Ripka y Rich, 1998, anteriormente). Tetrapeptidomiméticos de la invención son del tipo descrito y reivindicado en la patente de EE.UU. n° 6.992.063 de Shi *et al.*

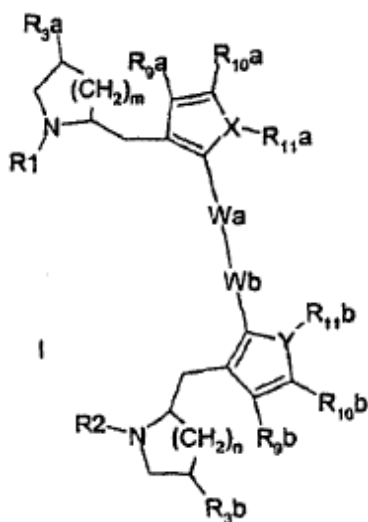
Se ha demostrado según la presente invención que los péptidos de unión a IAP o sus miméticos pueden potenciar la apoptosis de las células.

Se prefieren los miméticos de los fragmentos de unión a IAP del núcleo. Los miméticos descritos en la presente memoria son adecuadamente pequeños, y puesto que las características estructurales en relación con el surco de unión de IAP están bien caracterizadas, puede sintetizarse una amplia variedad de compuestos miméticos. Ventajas adicionales de compuestos de este tamaño comprenden una mejor solubilidad en solución acuosa y la facilidad de entrega a objetivos seleccionados *in vivo*.

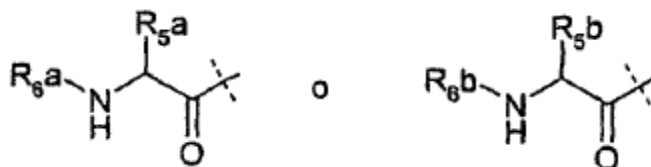
En una realización, los péptidos de unión a IAP de la invención se modifican para producir compuestos peptidomiméticos por sustitución de una o más cadenas laterales naturales de los 20 aminoácidos codificados genéticamente, o D-aminoácidos con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos tales como alquilo, alquilo inferior, alquilo cíclico de 4, 5, 6 a 7 eslabones, amida, alquilamida inferior, di (alquil inferior)amida, alcoxi inferior, hidroxi, carboxi y sus derivados de éster inferior y con heterocíclicos de 4, 5, 6 a 7 eslabones. Por ejemplo, se pueden crear análogos de prolina en los que el tamaño del anillo del resto de prolina se cambia desde 5 eslabones a 4, 6 o 7 eslabones. Los grupos cíclicos pueden ser saturados o insaturados, y si son insaturados, puede ser aromáticos o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos pueden contener uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de dichos grupos comprenden el furazanil, imidazolidinil, imidazolil, imidazolinil, isotiazolil, isoxazolil, morfolinil (p. ej. morfolino), oxazolil, piperazinil (por ejemplo, 1-piperazinil), piperidil (p. ej., 1-piperidil, piperidino), piranil, pirazinil, pirazolidinil, pirazolinil, pirazolil, piridazinil, piridil, pirimidinil, pirrolidinil (p. ej., 1-pirrolidinil), pirrolinil, pirrolil, tiadiazolil, tiazolil, tienil, tiomorfolinil (p. ej. tiomorfolino), y triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Cuando el grupo está sustituido, el sustituyente puede ser alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno o fenilo sustituido o no sustituido. Los peptidomiméticos pueden tener también restos de aminoácidos que han sido modificados químicamente por fosforilación, sulfonación, biotinilación, o la adición o eliminación de otros restos.

La presente invención proporciona compuestos que imitan la estructura terciaria de unión de Smac a IAP o la actividad del fragmento N-terminal de Smac según la reivindicación. Los estereoisómeros de los compuestos miméticos descritos en la presente memoria también están incluidos en la presente invención. La invención también describe métodos de utilización de estos miméticos para modular la apoptosis y además con fines terapéuticos. También se describen productos intermedios y métodos para utilizar estos productos intermedios para la preparación de compuestos que modulan la apoptosis imitando la estructura terciaria de unión de Smac a IAP o la actividad del fragmento N-terminal de Smac.

En la presente memoria se expone un compuesto que tiene la fórmula general (I):

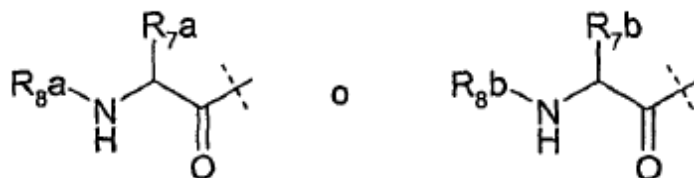


en donde R1 y R2 son independientemente H, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, acetilo, trifluoroacetilo, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, o



- 5 en donde R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltio; o R5a y R5b están independientemente sustituidos opcionalmente con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltio; u
- 10 opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo alquileno, alquenileno, puente de alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o alquileno, alquenileno, puente de alquinileno opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono están reemplazados con N, O o S;

R6a y R6b son independientemente H, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, acetilo, trifluoroacetilo, alquilo, alquilo inferior, alquilo opcionalmente sustituido, o



- 15 donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independientemente o en conjunto un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y
- 20 R7a y R8b y R7b pueden formar independientemente o en conjunto un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxi, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxi, dialquilamino, amido, sulfonamido, o amidino;

m y n son independientemente 0, 1, 2, o 3;

X e Y son independientemente O, N, S, o C=C;

5 R9a, R9b, R10a, R10b son independientemente H, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, o R9a y R10a, independientemente o en paralelo con R9b y R10b, pueden estar unidos por 4 a 8 átomos, opcionalmente sustituidos, tales como C, N, O o S, para formar un anillo aromático o no aromático.

10 Cuando Wa y Wb están unidos por enlace covalente, Wa y Wb son un enlace, alquilenos, alquilenos, alquilenos, arilo, arilalquilenos, arilalquilenos, heteroarilo, heteroarilalquilenos, o una cadena de alquilenos, alquilenos, alquilenos opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O o S; R11a y R11b y están independientemente ausentes, H, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo, alcoxialquilo; o R11a y R11b juntos forman una cadena de alquilenos, alquilenos, alquilenos, o alquioxialquilenos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono están, opcionalmente, sustituidos con N, O, o S;

15 Cuando Wa y Wb no están unidos por enlace covalente, Wa y Wb son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, CN, CO₂H; y R11a y R11b forman juntos una cadena de alquilenos, alquilenos, alquilenos o alquioxialquilenos de 2 a 12 átomos de carbono o una cadena de alquilenos, alquilenos, alquilenos o alquioxialquilenos opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O, o S; o Wa puede ser H, Cl, Br, F, alquilo, CN, CO₂H y W y R11a juntos son un enlace, alquilenos, alquilenos, alquilenos, arilo, arilalquilenos, arilalquilenos, heteroarilo, heteroarilalquilenos, o una cadena de alquilenos, alquilenos, alquilenos opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados con N, O o S, y R11b falta o H, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo, alcoxialquilo.

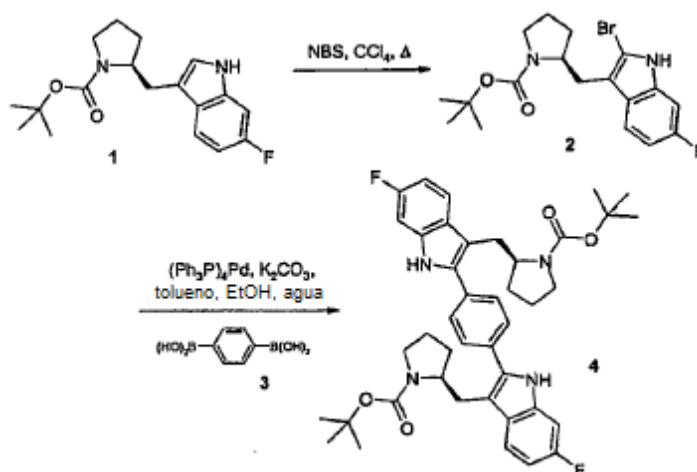
25 Los compuestos incluidos en la presente invención comprenden tanto miméticos de Smac como intermedios para ellos. La presente invención comprende estereoisómeros de cada compuesto descrito. Generalmente, los compuestos expuestos en la presente memoria comprenden tetrapeptidomiméticos de Smac, dímeros unidos por enlaces covalentes de tetrapeptidomiméticos de Smac y homodímeros unidos por enlaces covalentes de tetrapeptidomiméticos de Smac. Los homodímeros son aquellos miméticos en donde los tetrapeptidomiméticos sustancialmente idénticos están unidos por enlace covalente.

30 Los esquemas experimentales a continuación están relacionadas con los esquemas utilizados para producir los compuestos descritos en primer lugar en la publicación PCT n° WO 2004/007529. Los péptidos y peptidomiméticos adecuados se describen también en la publicación de EE.UU. n° US 2006/0025347.

35 La afinidad de unión de compuestos a la XIAP se determinó como describe Nikolovska-Coleska, Z. *et al.* (Analytical Biochemistry (2004), vol. 332:261-273) utilizando una variedad de sustratos fluorógenos y se presenta como un valor K_D. En resumen, diversas concentraciones de péptidos de ensayo se mezclaron con de péptido 5 nM marcados con fluorescencia (AbuRPF-K (5-FAM)-NH₂) y XIAP-BIR3 40 nM durante 15 min a T.A. en 100 µl de tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5 que contenía 100 µg/ml de γ-globulina bovina. Después de la incubación, se midieron los valores de polarización (mP) en un Victor²V utilizando un filtro de excitación a 485 nm y un filtro de emisión a 520 nm. Se determinaron los valores de Cl₅₀ del gráfico usando análisis no lineal de mínimos cuadrados GraphPad Prism. Los compuestos descritos en la presente memoria proporcionan valores K_D en los intervalos siguientes:

40 K_D < 0,1 µM (A), K_D = 0,1-1 µM (B), K_D = 1-10 µM (C) y K_D > 10 µM (D).

Esquema I



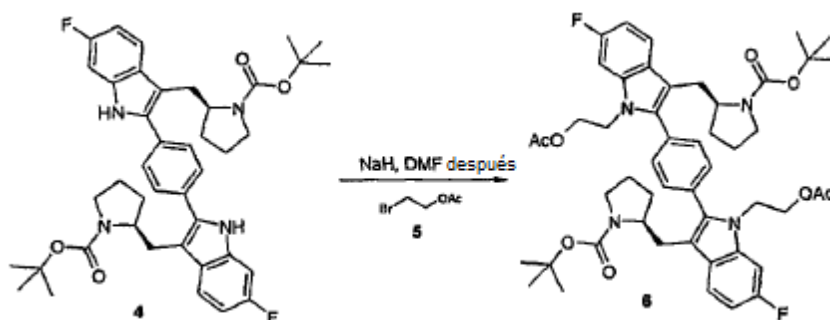
Éster terc-butílico del ácido 2-(2-bromo-6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico (**2**):

Se añadió NBS (3,2 g, 17,9 mmol) a una solución que contenía **1** (5,4 g, 17,0 mmol) en CCl₄ (50 ml). La mezcla de reacción heterogénea se calentó a reflujo (80-85°C) durante 2 h en cuyo momento el análisis TLC dio a conocer el consumo completo de **1**. [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 4:1, R_f (**8**) = 0,4, R_f (**2**) = 0,5]. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y después se vertió en una columna de gel de sílice. El producto se eluyó con 10-15% de EtOAc/hexano para dar 4,4 g (65%) de **2** en forma de un sólido blanco. ¹H RMN (DMSO, 300 MHz) δ 11,74 (s, 1H), 7,56 (m, 1H), 7,02 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 6,88 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,22 (m, 2H), 2,97 (m, 1H), 2,58 (dd, J = 13,5, 9,3 Hz, 1H), 1,9 a 1,5 (4H), 1,40 (s, 9H) ppm.

1,4-bis-[éster terc-butílico del ácido 2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico]benceno (**4**)

Una solución que contenía **2** (3,3 g, 8,3 mmol) en tolueno (25 ml), EtOH (25 ml) y agua (1 ml) se desgasificó a alto vacío. Se añadieron K₂CO₃ (4,5 g, 32,5 mmoles), **3** (0,97 g, 5,8 mmoles) y (Ph₃P)₄Pd (0,29 g, 0,25 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 100°C durante 5 h. [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 4:1, R_f (**2**) = 0,5; R_f (**4**) = 0,3]. La mezcla de reacción se filtró a través de una pequeña almohadilla de gel de sílice y se lavó con 5% de EtOAc/hexano. El filtrado se concentró y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (20% de EtOAc/hexano) para proporcionar 3,0 g (98%) de **4** en forma de un sólido blanquecino, muy fluorescente. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,6-8,4 (m, 2H), 7,65 (m, 2H), 7,57 (s ancho, 4H), 7,05 (m, 2H), 7,90 (m, 2H), 4,22 (s ancho, 2H), 3,4-3,1 (m, 6H), 2,90 (m, 2H), 1,8-1,3 (m, 26H) ppm.

Esquema II

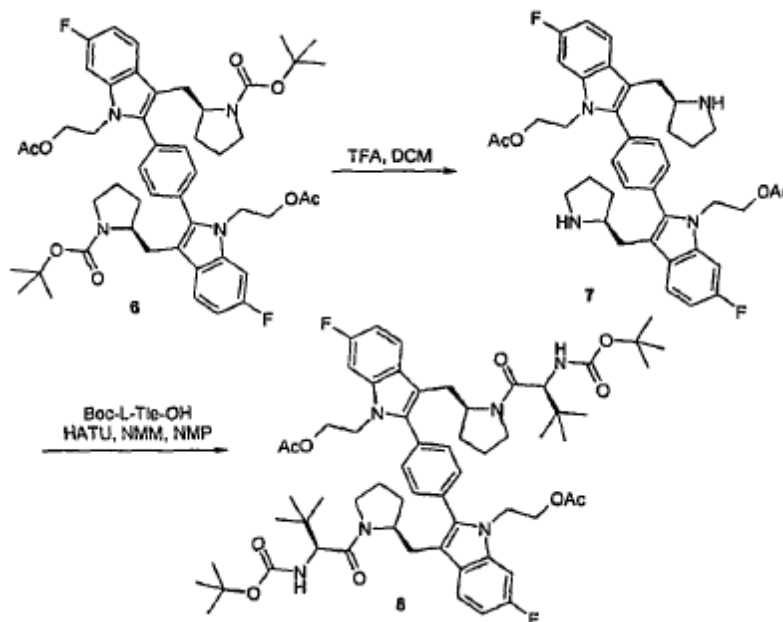


1,4-bis-[éster terc-butílico del ácido 2-[1-(2-acetoxi-etil)-6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-carboxílico]benceno (**6**)

A una suspensión de 60% de NaH (0,67 g, 17,0 mmol) en DMF anhidro (10 ml) se añadió una solución de **4** (3,0 g, 4,2 mmol) en DMF (10 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h, después se volvió a enfriar a 0°C. Una solución que contenía **5** (2,8 g, 16,8 mmoles) en DMF (5 ml) se añadió a la mezcla de reacción y se retiró el baño de hielo después de la adición. Después de 2 h a temperatura ambiente, los análisis LC/MS y TLC dieron a conocer el consumo completo de **4**. [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 2:1, R_f (**4**) = 0,4,

R_f (**6**) = 0,8]. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió una solución acuosa saturada de NH₄Cl. El producto se extrajo con éter dietílico. Los extractos de éter se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron. El producto en bruto se purificó por NP-HPLC (gel de sílice, 10-100% de EtOAc/hexano durante 30 min) para proporcionar 1,4 g de **6** en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,68 (m, 2H), 7,54 (s, 4H), 7,12 (m, 2H), 6,94 (m, 2H), 4,25 (m, 4H), 4,14 (m, 6H), 3,4-3,1 (6H), 2,60 (dd, *J* = 9,6, 13,8 Hz, 2H), 1,90 (s, 6H), 1,83 (m, 2H), 1,7-1,3 (m, 24H) ppm.

Esquema III



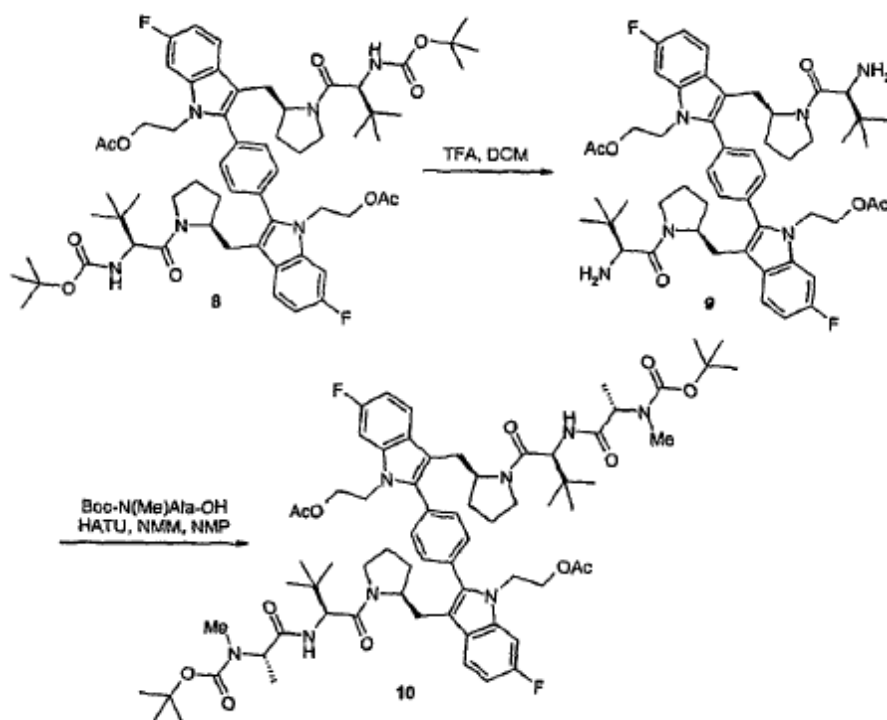
Éster de ácido acético de 2-(2-{4-[1-(2-acetoxi-etil)-6-fluoro-3-pirrolidin-2-ilmetil-1H-indol-2-il]-fenil}-6-fluoro-3-pirrolidin-2-ilmetil-indol-1-il)-etilo (**7**)

Una solución que contenía **6** (1,4 g, 1,58 mmoles) en DCM (20 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (5 ml) con una pipeta y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se controló hasta que el análisis TLC dio a conocer el consumo completa de **6** (~2 h). El análisis por TLC, 10% de MeOH/DCM, R_f (**6**) = 0,7, R_f (**7**) = 0,2. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc y los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 1,2 g (cuantitativo) de **7** en forma de un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,05 (dd, *J* = 8,4, 5,4 Hz, 2H), 7,56 (s, 4H), 7,13 (dd, *J* = 9,9, 2,4 Hz, 2H), 6,99 (m, 2H), 4,60 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 4,51 (m, 2H), 4,26 (m, 4H), 4,15 (m, 4H), 3,63 (m, 2H), 3,54 (m, 2H), 3,5-3,3 (m, 4H), 2,41 (m, 2H), 1,89 (s, 6H), 1,8-1,5 (m, 6H), 1,43 (s, 18H), 1,09 (s, 18H) ppm.

1,4-bis-{ácido acético 2-{3-[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-3,3-dimetil-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6-fluoro-indol-1-il}-éster etílico}benceno (**8**):

Una solución que contenía Boc-L-terc-Leu-OH (0,82 g, 3,54 mmol) y HATU (1,41 g, 3,70 mmoles) en NMP anhidro (15 ml) se enfrió a 0°C. Después de 15 min, se añadió N-metilmorfolina (0,46 g, 0,5 ml, 4,54 mmol) con una jeringa. Después de 15 min, se añadió una solución que contenía **7** (1,10 g, 1,61 mmoles) en DCM (10 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 h momento en el que el análisis por TLC dio a conocer el consumo completo de **7** [análisis TLC, hexano/EtOAc 2:1, R_f (**7**) = 0,01; R_f (**8**) = 0,8]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con HCl acuoso diluido, cinco veces con agua para eliminar el exceso de NMP, una vez con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por NP-HPLC (gel de sílice, 10-100% de EtOAc/hexano durante 30 min) para proporcionar 1,3 g (73%) de **8** como un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,05 (dd, *J* = 5,4, 8,4 Hz, 2H), 7,56 (s, 4H), 7,11 (dd, *J* = 2,4, 9,9 Hz, 2H), 6,98 (m, 2H), 5,43 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 4,51 (m, 2H), 4,26 (m, 6H), 4,17 (m, 6H), 3,2-3,7 (m, 8H), 2,41 (dd, *J* = 12, 13 Hz, 2H), 1,88 (s, 6H), 1,7-1,5 (m, 4H), 1,43 (s, 18H), 1,04 (s, 18H) ppm.

Esquema IV



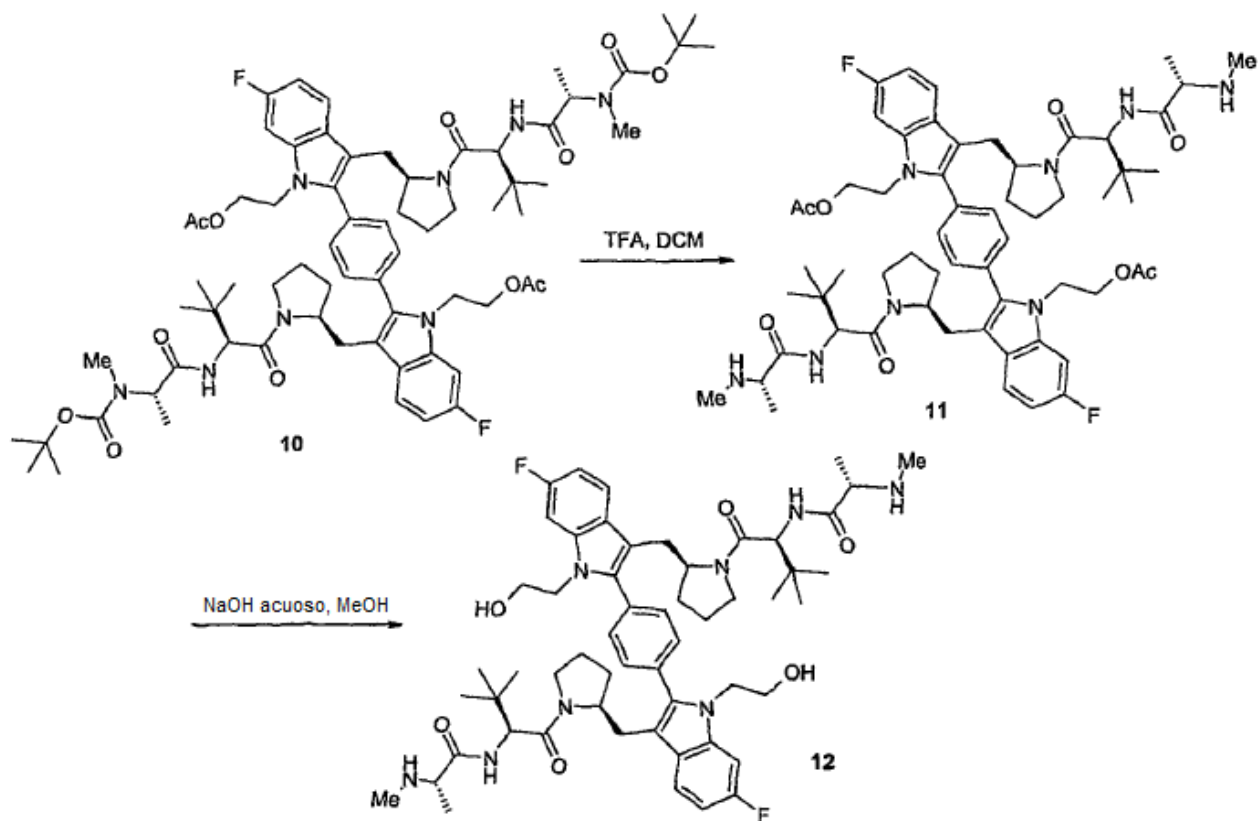
Éster de ácido acético de 2-[2-(4-{1-(2-(acetoxi-etil)-3-[1-(2-amino-3,3-dimetil-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6-fluoro-1H-indol-2-il}-fenil)-3-[1-(2-amino-3,3-dimetil-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6-fluoro-indol-1-il}-etil) (9)

- 5 Una solución que contenía **8** (1,3 g, 1,17 mmoles) en DCM (5 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió 20% de TFA en DCM (25 ml) con una pipeta y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se controló hasta que el análisis por TLC dio a conocer el consumo completo de **8** (~2 h). El análisis por TLC, 10% de MeOH/DCM, R_f (**8**) = 0,7; R_f (**9**) = 0,3. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por RP-HPLC (Método: Disolvente A: agua w/0,1% v/v de HOAc, Disolvente B: ACN w/0,1% v/v de HOAc. Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 25 cm; caudal: 40 ml/min, detector: 254 nm). Las fracciones que contienen el producto se mezclaron y se neutralizaron con NaHCO_3 acuoso saturado. El producto se extrajo con EtOAc y el extracto orgánico se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 0,80 g (75%) de **9** en forma de un sólido de color blanquecino. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,09 (dd, J = 5,1, 8,7 Hz, 2H), 7,51 (s, 4H), 7,13 (m, 2H), 7,0 (m, 2H), 4,41 (m, 2H), 4,25 (m, 4H), 4,16 (m, 4H), 3,6-3,0 (m, 6H), 2,86 (m, 2H), 2,39 (m, 2H), 1,91 (s, 6H), 1,8-1,4 (m, 12H), 1,04 (s, 18H) ppm.

{1,4-bis-{ácido acético 2-[3-(1-{2-[2-terc-butoxicarbonil-metil-amino]-propionilamino]-3,3-dimetil-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6-fluoro-indol-1-il}-éster etílico}benceno (**10**):

- Una solución que contenía Boc-LN (Me) Ala-OH (0,27 g, 1,32 mmol) y HATU (0,54 g, 1,43 mmoles) en NMP anhidro (15 ml) se enfrió a 0°C. Después de 15 min, se añadió *N*-metilmorfolina (0,17 g, 0,2 ml, 1,68 mmoles) con una jeringa. Después de 15 min, se añadió una solución que contenía **9** (0,50 g, 0,55 mmoles) en DCM (10 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 h momento en el que el análisis por TLC dio a conocer el consumo completo de **9** [análisis TLC, hexano/EtOAc 3:2, R_f (**9**) = 0,01; R_f (**10**) = 0,5]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con HCl acuoso diluido, cinco veces con agua para eliminar el exceso de NMP, una vez con solución acuosa saturada de NaHCO_3 y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El producto en bruto se purificó por NP-HPLC (gel de sílice, 10-100% de EtOAc/hexano durante 30 min) para proporcionar 0,64 g (91%) de **10** como un sólido de color blanquecino. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,05 (m, 2H), 7,58 (s ancho, 4H), 7,13 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 4,75 (m, 2H), 4,60 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,50 (m, 2H), 4,25 (m, 4H), 4,16 (m, 4H), 3,70 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,5-3,2 (m, 4H), 2,85 (s ancho, 6H), 2,42 (m, 2H), 1,88 (s, 6H), 1,8-1,4 (m, 8H), 1,52 (s, 18H), 1,33 (m, 6H), 1,04 (s ancho, 18H) ppm.

Esquema V



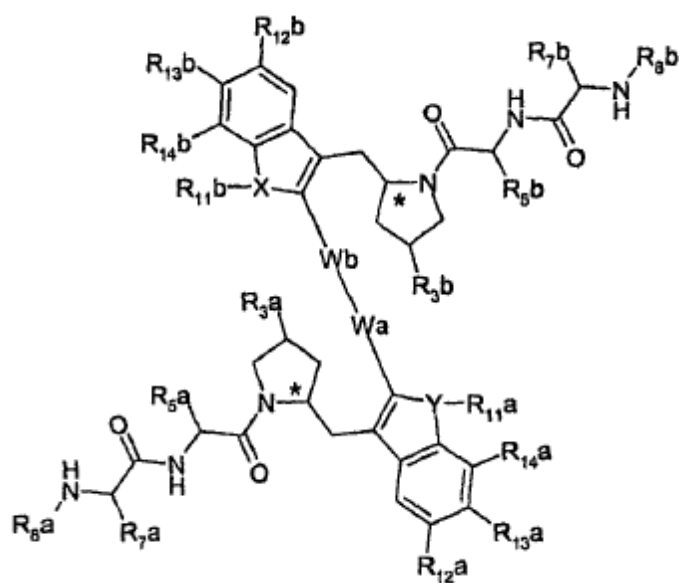
1,4-bis-{ácido acético 2-(3-{1-[3,3-dimetil-2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6-fluoro-indol-1-il)-éster etílico}benceno (**11**):

- 5 Una solución que contenía **10** (0,64 g, 0,5 mmoles) en DCM (20 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (5 ml) con una pipeta y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se controló hasta que el análisis por TLC dio a conocer el consumo completo de **10** (~2 h). El disolvente se eliminó en un evaporador rotativo y el residuo se purificó por RP-HPLC (Método: Disolvente A: agua w/0,1% v/v de HOAc, Disolvente B: ACN w/0,1% v/v de HOAc Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 25 cm; caudal: 40 ml/min; detector: 254 nm). Las fracciones que contienen el
- 10 producto se mezclaron y se neutralizaron con NaHCO₃ acuoso saturado. El producto se extrajo con EtOAc y el extracto orgánico se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 0,50 g (93%) de **11** en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,04 (m, 2H), 7,83 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,55 (m, 4H), 7,12 (m, 2H), 6,99 (m, 2H), 4,60 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,57 (m, 2H), 4,24 (m, 4H), 3,73 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,30 (m, 2H), 3,08 (m, 2H), 2,40 (s, 6H), 2,38 (m, 2H), 1,87 (s, 6H), 1,8-1,3 (m, 16H), 1,04 (s ancho, 18H) ppm.
- 15

1,4-bis-[N-(1-{2-[6-fluoro-1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-carbonil}-2,2-dimetil-propil)-2-metilamino-propionamida]benceno (**12**)

- Se añadió NaOH acuoso (1 M, 5 ml, en exceso) a 0°C a una solución que contenía **11** (0,48 g, 0,44 mmol) en MeOH (5 ml). Después de la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente
- 20 durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua/EtOAc y se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por RP-HPLC (Método: Disolvente A: agua w/0,1% v/v de HOAc, Disolvente B: ACN w/0,1% v/v de HOAc Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 25 cm; caudal: 40 ml/min; detector: 254 nm). Las fracciones que contienen el producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para proporcionar 0,19 g de **12** en forma de sólido floculante, blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,8-7,4 (m, 8H), 7,11 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 4,57 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,4-4,0 (m, 6H), 3,8-3,4 (m, 8H), 3,2-3,0 (m, 3H), 2,6-2,4 (m, 14H), 2,38 (m, 6H), 2,2-1,5 (m, 12H), 1,29 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 1,00 (s, 18H) ppm.
- 25

Ejemplo 1



Entrada	R8a	R7a	R5a	Estereoquim. en la posición α	X	Y	R11	Wa-Wb	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	intervalo de Kb
1	H	S-Me	S-iPr	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	H	H	A
2	H	S-Me	S-iPr	S	O	O	na	trans- (CH=CH)	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	H	H	A
3	H	S-Me	S-iPr	S	O	O	na	CH ₂ CH ₂	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	H	H	A
4	H	S-Me	S-iPr	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-iPr	H	H	H	H	H	A
6	H	S-Me	S-iPr	S	N	N	NH	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	H	H	A
7	H	S-Me	S-tBu	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	H	H	H	H	A
8	Me	S-Me	S-tBu	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A
9	H	S-Et	S-tBu	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Et	H	H	H	H	B
10	Me	S-Me	S-iPr	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	A
11	H	S-Et	S-iPr	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Et	H	H	H	H	A
12	H	S-Me	S-cHex	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	H	H	H	H	A
13	Me	S-Me	S-cHex	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
14	H	S-Et	S-cHex	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Et	H	H	H	H	B
15	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	H	H	A
16	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
17	H	S-Me	S-iPr	S	N	N	H	2,5-tiofenil	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	F	H	A
18	Me	S-Me	S-cHex	S	N	N	H	2,5-tiofenil	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	F	H	A
19	H	S-Me	S-cHex	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	H	H	F	H	A
20	Me	S-Me	S-cHex	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	F	H	A
21	Me	S-Me	S-iPr	R	N	N	H	1,4-fenil	R-O H	R-O H	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	B
22	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	R-O H	R-O H	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	B
23	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	A
24	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	S-O	S-O	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A

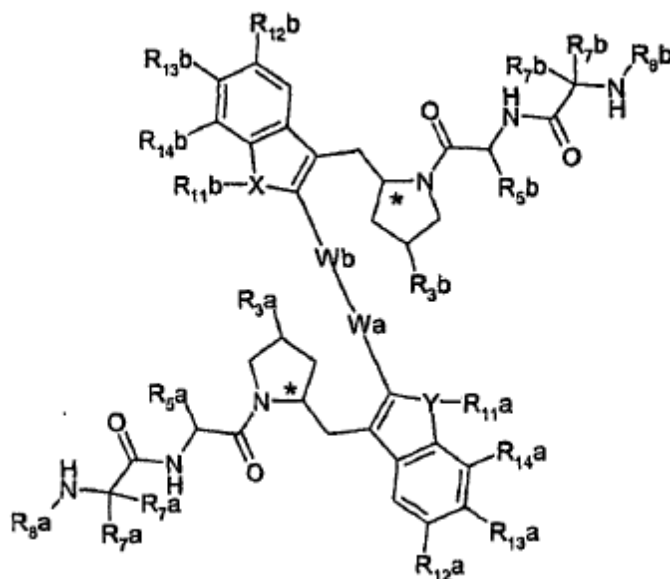
									H	H							
25	Me	S-Me	S-(2R-EtOBn)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOBn)	S-Me	Me	H	F	H	A
26	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOBn)	S-Me	Me	H	F	H	A
27	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
28*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
29*	Me	S-Me	S-iPr	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
30*	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
31*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
32*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOBn)	S-Me	Me	H	F	H	A
33*	Me	S-Me	S-(2R-EtOBn)	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOBn)	S-Me	Me	H	F	H	A
34*	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A
35*	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	A
36*	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	R-OH	R-OH	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	B
37*	Me	S-Me	S-iPr	R	N	N	H	1,4-fenil	R-OH	R-OH	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	B
38*	Me	S-Me	S-cHex	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	F	H	A
39*	H	S-Me	S-cHex	S	N	N	H	1,4-fenil	H	H	S-cHex	S-Me	H	H	F	H	A
40*	Me	S-Me	S-iPr	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	B
41*	Me	S-Me	S-tBu	R	N	N	H	1,4-fenil	S-OH	S-OH	S-tBu	S-Me	Me	F	H	H	A
42*	H	S-Me	S-(2R-	S	N	N	CH ₂ CH ₃	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOB	S-Me	Me	H	F	H	A

			EtOH)				OH				n)						
43*	H	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
44*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
45*	H	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OAc	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
46	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
47*	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OAc	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
48	Me	S-Me	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
49*	Me	S-Me	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OAc	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
50*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OMe	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
51*	Me	S-Me	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OMe	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
52*	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OMe	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
53*	H	S-Me	S-iPr	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OMe	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	F	H	A
54*	Me	S-Me	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	F	H	H	A
55*	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	A
56*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	F	H	H	A
57*	Me	S-Me	S-iPr	S	N	N	Me	1,4-fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
58*	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	N	N	Me	1,4-fenil	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
59*	Me	S-Me	S-tBu	S	N	N	Me	1,4-fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
60*	Me	R-	R-tBu	R	N	N	CH ₂ CH ₂	1,4-fenil	H	H	R-tBu	R-	Me	H	F	H	C

		Me					OH					Me					
61	H	R-Me	R-iPr	R	O	O	na	1,4-fenil	H	H	R-iPr	R-Me	H	H	H	H	D

* = comparativo

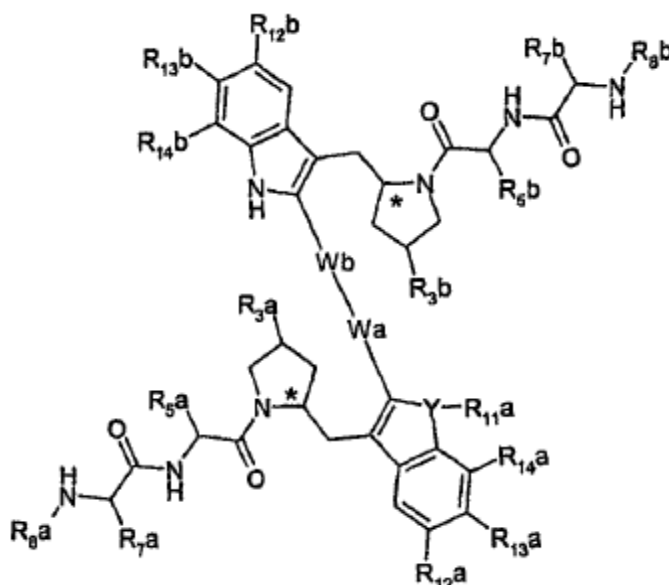
Ejemplo 2



Entrada	R8a	R7a	R5a	Estereoquí. en la posición (*)	X	Y	R11	Wa-Wb	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	intervalo de Kp
62	H	H	S-iPr	S	O	O	na	1,4-fenil	H	H	S-iPr	H	H	H	H	H	B
62	H	H	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-fenil	H	H	S-tBu	H	H	H	F	H	B
63	H	Me	S-tBu	S	N	N	CH ₂ CH ₂ OAc	1,4-fenil	H	H	S-tBu	Me	H	H	F	H	B

* Comparativo

Ejemplo comparativo I



En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7b y R7b y R7b se pueden formar de forma independiente o juntos formar un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 5 R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R8b y R7a y R7b pueden de forma independiente o juntos formar un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 10 R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquilio; o, en algunos casos, los restos de R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno puente de 2 a 12 átomos de carbono o alquilenilo, alquenileno, puente de alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituidos, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados con N, O o S;

- 15 R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H;

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxilo, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxilo, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino;

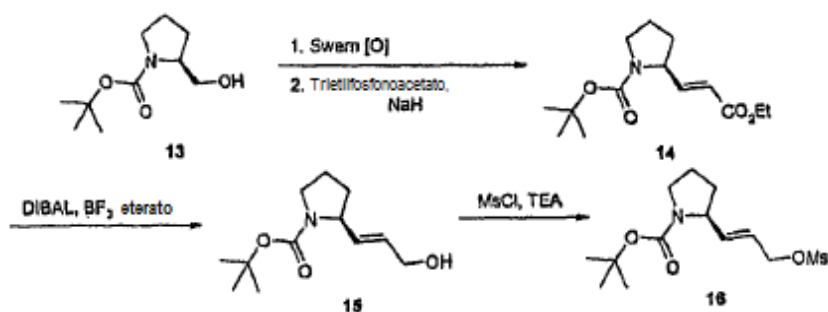
X es O, N, S o C=C;

- 20 R11a y R11b independientemente faltan, H, alquilo, alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo opcionalmente sustituidos; o R11a y R11b forman juntos una cadena de alquilenilo, alquenileno, alquenileno o de alquiloxialquileno o de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden estar sustituidos con N, O o S;

- 25 Wa y Wb juntos son un enlace, alquilenilo, alquenileno, alquinileno, arilo, heteroarilo, o una cadena de alquilenilo alquenileno, alquinileno opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O o S.

Entrada	R8a	R7a	R5a	Etereoquí. en la posición (*)	X	R11a	Wa-Wb	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	intervalo de K _D
64	Me	S-Me	S-iPr	S	N	CH ₂ CH ₂ O Ac	1,4- fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
65	H	H	S-iPr	S	N	CH ₂ CH ₂ O Ac	1,4- fenil	H	H	S-iPr	H	H	H	F	H	B
66	Me	S-Me	S-tBu	S	N	CH ₂ CH ₂ O Ac	1,4- fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
67	Me	S-Me	S-iPr	S	N	CH ₂ CH ₂ O H	1,4- fenil	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
68	H	H	S-iPr	S	N	CH ₂ CH ₂ O H	1,4- fenil	H	H	S-iPr	H	H	H	F	H	C
69	Me	S-Me	S-tBu	S	N	CH ₂ CH ₂ O H	1,4- fenil	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
70	Me	R-Me	S-iPr	S	N	CH ₂ CH ₂ O Ac	1,4- fenil	H	H	S-iPr	R-Me	Me	H	F	H	A
71	Me	R-Me	S-tBu	S	N	CH ₂ CH ₂ O H	1,4- fenil	H	H	S-tBu	R-Me	Me	H	F	H	B

Esquema VI



Véase: Macor, J.E.; Blank, D.H.; Post, R.J.; Ryan, K. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33(52), 8011-8014.

5 Éster terc-butílico del ácido 2-(2-etoxicarbonil-vinil)-pirrolidin-1-carboxílico (14):

Un matraz de 2 l, de fondo redondo de 3 bocas, equipado con una sobrecarga agitada y una entrada de nitrógeno se cargó con una solución de cloruro de oxalilo (130 ml g, 0,26 moles) en DCM (250 ml). La solución se enfrió a -78°C. Se añadió gota a gota una solución de DMSO (20 ml, 0,28 moles) en DCM (30 ml). Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de alcohol 13 (40 g, 0,20 moles) en DCM (200 ml). Después de 30 min, se añadió TEA (140 ml, 1,00 moles) a la solución. La solución se transfirió a un baño de hielo/agua (0°C) y se continuó la agitación durante 30 min [NB: la mezcla de reacción era una suspensión blanca y espesa]. El análisis por TLC dio a conocer que no quedaba material de partida [hexano/EtOAc 1:1, R_f(13) = 0,4; R_f(aldehído) = 0,6]. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (200 ml) y se lavó sucesivamente con H₂O, HCl 1 M, NaHCO₃ saturado y salmuera. La capa de

DCM se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se concentró para proporcionar éster terc-butílico del ácido 2-formil-pirrolidin-1-carboxílico (40 g) en bruto en forma de un aceite que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,50 (d, J = 24 Hz, 1H), 4,20-4,03 (m, 1H), 3,60-3,40 (m, 2H), 2,20-1,87 (m, 4H), 1,43 (s, 9H) ppm.

- 5 Un matraz de 2 l, de fondo redondo de 3 bocas, equipado con una sobrecarga agitada y entrada de nitrógeno se cargó con NaH (60%, 10,0 g, 0,25 mol) y THF anhidro (200 ml). A la mezcla agitada se añadió lentamente fosonoacetato de trietilo (53,8 g, 0,24 mol) durante 20 minutos. Se añadió gota a gota una solución de éster terc-butílico de ácido 2-formil-pirrolidin-1-carboxílico (40 g, 0,20 moles) en THF (75 ml). La solución se volvió naranja y se continuó la agitación durante 1 h hasta que no quedó aldehído por análisis de TLC [hexano/EtOAc 1:1, R_f (aldehído) = 0,6, R_f (**14**) = 0,8]. La solución se diluyó con EtOAc y salmuera y se separaron las capas. La capa de EtOAc se lavó con HCl 1 M, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar **14** (67 g) en forma de un aceite de color amarillo que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 6,92-6,76 (m, 1H), 5,82 (d, 1H), 4,56-4,32 (m, 1H), 4,25-4,12 (m, 2H), 3,48-3,27 (m, 2H), 2,20-1,98 (m, 1H), 1,91-1,72 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,25 (t, 3H) ppm.

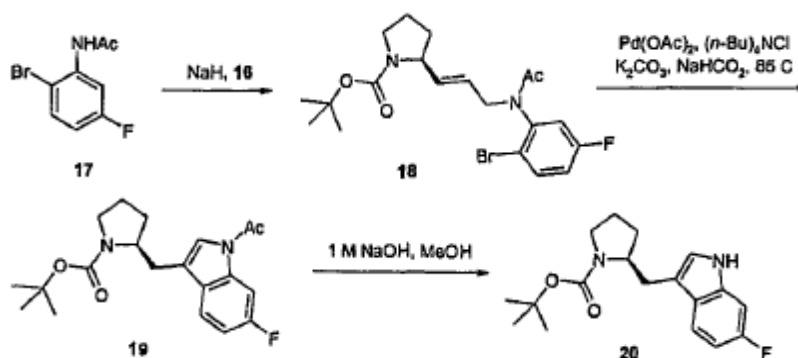
Éster terc-butílico del ácido 2-(3-hidroxi-propenil)-pirrolidin-1-carboxílico (**15**):

- 15 Un matraz de 2 l, de fondo redondo de 3 bocas, equipado con una sobrecarga agitada, se cargó con **14** (67 g, 0,20 mol) y DCM (400 ml). La solución se enfrió a -78°C . A esta solución se añadió lentamente eterato trifluoruro de boro (30 ml, 0,20 moles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Se añadió DIBAL (1 M en DCM, 600 ml, 0,6 mol) a un ritmo moderado. La solución se agitó a -78°C durante 2 h y después se trató con EtOAc (100 ml) durante 30 min para descargar el reactivo restante. La mezcla de reacción se dejó calentar a -5°C . La mezcla de reacción se enfrió cuidadosamente mediante la adición gota a gota de HCl 1 M. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y H_2O y se hizo ácida para disolver las sales de aluminio. Se separaron las capas y se lavó la fase orgánica sucesivamente con HCl acuoso diluido, agua, y salmuera. La capa de DCM se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2 , 25% a 80% de EtOAc/hexano) para dar **15** en forma de un aceite amarillo (36 g, 79%). [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**14**) = 0,8; R_f (**15**) = 0,2]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5,73-5,52 (m, 2H), 4,39-4,16 (m, 1H), 4,15-4,4 (m, 2H), 3,46-3,25 (m, 2H), 2,92 (s ancho, 1H), 2,08-1,93 (m, 1H), 1,92-1,79 (m, 2H), 1,78-1,62 (m, 1H), 1,42 (s, 9H) ppm.

Éster terc-butílico del ácido *trans*-2S-(3-metanosulfonilo-propenil)-pirrolidin-1-carboxílico (**16**):

- 30 A una solución de **15** (19 g, 84 mmoles) en DCM (100 ml) se añadió trietilamina (10 g, 13,9 ml, 100 mmoles). La solución se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota cloruro de metansulfonilo (9,6 g, 6,5 ml, 84 mmoles) en DCM (20 ml). Después de 1 h, el análisis por TLC dio a conocer el consumo completo de **15** [hexano/EtOAc 1:1, R_f (**15**) = 0,2; R_f (**16**) = 0,6]. Se añadió salmuera y el producto se extrajo con DCM (3×50 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con HCl 1 N, agua, salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 21,4 g de **16** que se usó sin purificación. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,4-4,0 (m, 2H), 3,42-3,21 (m, 3H), 3,0 (s, 3H), 2,00-1,6 (m, 4H), 1,42 (s, 9H) ppm.

- 35 Esquema VII



Éster terc-butílico del ácido 2-[3-[acetil-(2-bromo-5-fluoro-fenil)-amino]-propenil]-pirrolidin-1-carboxílico (**18**):

- 40 A una suspensión de 60% de NaH (9,2 g, 0,23 moles) en DMF anhidro (150 ml) a 0°C se añadió 2-bromo-5-fluoroacetanilida (**17**, 53,4 g, 0,23 mol) en pequeñas porciones. Después de 1 h, se añadió gota a gota una solución de mesilato en bruto **16** (aprox. 0,19 mol) en DMF (20 ml) desde un embudo de adición. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se volvió a enfriar a 0°C y se inactivó cuidadosamente mediante la adición de salmuera y se neutralizó mediante la adición de HCl acuoso diluido hasta pH = 7. La mezcla se diluyó con éter dietílico y agua y se separaron las capas. La fase orgánica se lavó varias veces con agua para eliminar la DMF seguido de lavado con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se

concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0,5% a 2% de MeOH/DCM) para proporcionar 66 g de **18** en forma de un aceite. [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**16**) = 0,5, R_f (**17**) = 0,6; R_f (**18**) = 0,4]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,64 (m, 1H), 7,01 (m, 2H), 5,52 (m, 1H), 5,39 (app dd, J = 6,0, 15,3 Hz, 1H), 4,77 (app dd, J = 4,5, 13,8 Hz, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,67 (app dd, J = 7,5, 13,8 Hz, 1H), 3,32 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,81 (m, 3H), 1,75 (m, 2H), 1,57 (m, 1H), 1,43 (m, 9H) ppm.

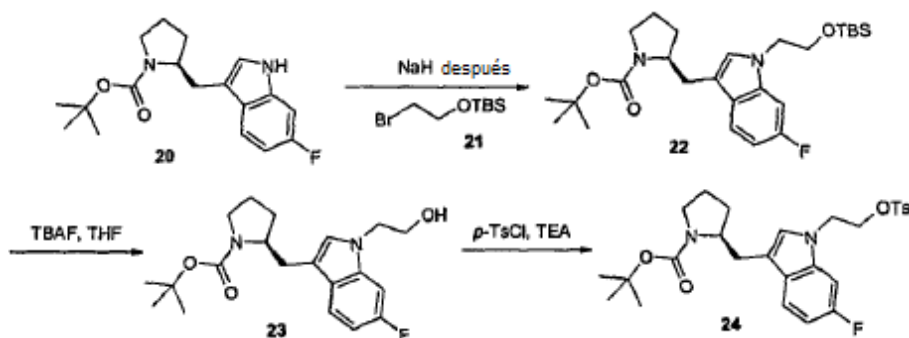
éster terc-butílico del ácido 2-(1-Acetil-6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico (**19**):

Bajo una atmósfera de nitrógeno, una solución de **18** (66 g, 0,15 moles) en DMF anhidro (350 ml) se cargó con (*n*-Bu) $_4\text{NCl}$ (41,5 g, 0,15 moles), K_2CO_3 (20,6 g, 0,15 mol), NaHCO_3 (10,2 g, 0,15 moles), y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (3,35 g, 0,015 mol) a temperatura ambiente. La mezcla heterogénea se sumergió en un baño de aceite precalentado (85°C). Después de 1 h, el análisis por TLC puso de manifiesto que quedaba algo de **18**, por lo tanto se añadió más catalizador (1 g). Después de 1,5 h, se añadió otra carga de catalizador (0,6 g). Después de una 1,5 h más de calentamiento, se había consumido completamente **18** según el análisis de TLC [análisis de TLC, 2% de MeOH/DCM, R_f (**18**) = 0,7; R_f (**19**) = 0,8]. La mezcla de reacción caliente se transfirió a un baño de agua con hielo para enfriar y después se diluyó con éter dietílico y se filtró a través de una almohadilla de celite. Los sólidos se lavaron con éter dietílico y el filtrado se lavó varias veces con agua para eliminar la DMF, después una vez con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 52,5 g de **19** en bruto, que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,18 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,18 (m, 1H), 7,05 (dt, J = 2,4, 8,7 Hz, 1H), 4,13 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 3,33 (m, 2H), 3,17 (app dd, J = 14,1, 38,1 Hz, 1H), 2,61 (s, 3H), 1,83 (m, 3H), 1,69 (m, 1H), 1,49 (s, 9H) ppm.

Éster terc-butílico del ácido 2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico (**20**):

Una solución que contenía **19** en bruto (48 g) en MeOH calidad reactivo (480 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió en una porción NaOH acuoso (1 M, 144 ml). Después de 30 min, el análisis por TLC puso de manifiesto el consumo completo del material de partida [análisis de TLC, hexano/EtOAc 3:2, R_f (**19**) = 0,7; R_f (**20**) = 0,8]. La mezcla de reacción se neutralizó con HCl 1 N y el producto se extrajo con DCM. Los extractos de DCM se lavaron con agua, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se absorbió sobre 200 ml de gel de sílice y se cromatografió (80% a 65% hexano/EtOAc) para proporcionar 31,7 g de **20** en forma de un aceite espeso. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,11 (s ancho, 1H), 7,65-7,57 (m, 1H), 7,04 (m, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,87 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 4,16-4,9 (m, 1H), 3,45-3,14 (m, 3H), 2,76-2,63 (m, 1H), 1,75 (br s, 4H), 1,58 (s, 9H) ppm.

Esquema VIII



Éster terc-butílico del ácido 2-{1-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)etil]-6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil}-pirrolidin-1-carboxílico (**22**)

Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió una solución de **20** (3,0 g, 9,42 mmol) en DMF anhidro (40 ml) con un embudo de adición a una mezcla de 60% de NaH (0,45 g, 11,3 mmoles) en DMF (10 ml) a 0°C. Después de 1 h, se añadió bromuro de **21** (2,47 g, 2,22 ml, 10,3 mmoles) en DMF (5 ml) con una jeringa. Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. más. La reacción se inactivó por adición de solución acuosa saturada de NH_4Cl y se diluyó con agua. El producto se extrajo con éter dietílico y los extractos de éter combinados se lavaron varias veces con agua para eliminar la DMF, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 4,49 g (cuantitativo) de **22** en forma de un aceite amarillo que se usó sin purificación adicional. El análisis de TLC [hexano/EtOAc 3:1, R_f (**20**) = 0,4; R_f (**22**) = 0,7]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,68 (m, 1H), 7,12 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,98 (t, J = 3,2 Hz, 1H), 4,26-4,23 (m, 3H), 4,05-3,99 (m, 2H), 3,55-3,27 (m, 3H), 2,75 (m, 1H), 1,88 (br s, 4H), 1,67 (s, 9H), 1,33 (m, 1H), 1,06-1,00 (m, 3H), 0,95 (s, 9H), 0,23-0,14 (m, 2H) ppm.

Éster terc-butílico del ácido 2-[6-fluoro-1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-carboxílico (**23**)

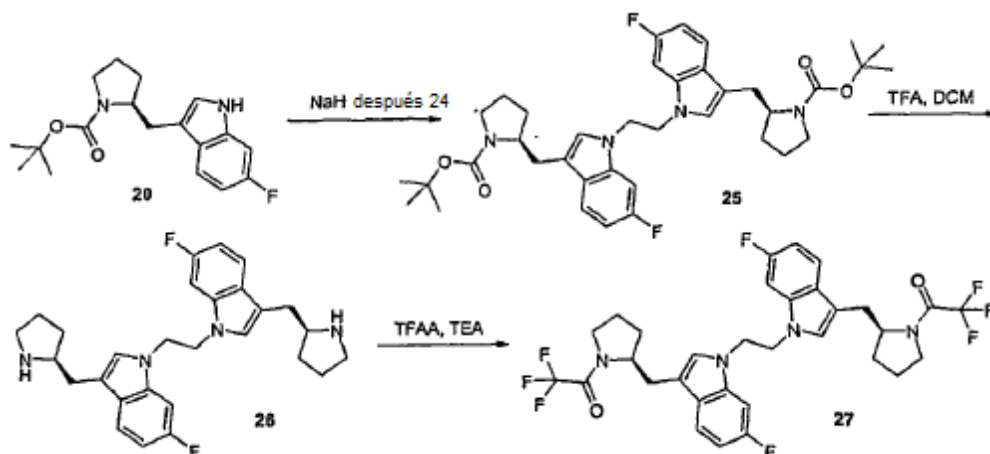
Una solución que contenía **22** (4,49 g, 9,42 mmol) en THF anhidro (50 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió fluoruro de

tetra-n-butilamonio (1 M en THF, 14 ml, 14 mmol) con una jeringa. Después de 1 h, la reacción completa por análisis de TLC [hexano/EtOAc 3:1, R_f (**22**) = 0,7; R_f (**23**) = 0,1], en consecuencia, se diluyó con EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con HCl 1 M, agua, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 3,9 g de **23** (> 100%; contaminado con algunas impurezas que contenían TBS) en forma de un aceite de color bronceado que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,59 (s ancho, 1H), 7,01-6,85 (m, 3H), 4,19-4,10 (m, 3H), 3,90 (s ancho, 2H), 3,38-3,31 (m, 2H), 3,15 (dd, J = 1,4, 4,6 Hz, 1H), 2,68 (m, 1H), 1,79-1,72 (m, 4H), 1,47 (d, J = 10,9 Hz, 9H) ppm.

Éster terc-butílico del ácido 2-[6-fluoro-1-[2-(tolueno-4-sulfonilo)-etil]-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-carboxílico (**12**):

Se añadió trietilamina (1,13 g, 1,56 ml, 11,2 mmol) a una solución de **23** (3,4 g, 9,38 mmol) en DCM anhidro (50 ml) a 0°C, seguido por la adición de p-TsCl (1,79 g, 9,38 mmol) y DMAP (0,12 g, 0,94 mmoles). Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Tras el consumo completo de **23** (~30 min a temperatura ambiente), la mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó dos veces con HCl 1 M, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El tosilato en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (hexano/EtOAc 3:1) para proporcionar 3,67 g (76%) de **24** en forma de una espuma blanca que fue homogénea por análisis de TLC [hexano/EtOAc 3:1, R_f (**23**) = 0,1; R_f (**24**) = 0,3]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,64-7,45 (m, 3H), 7,11 (t, J = 2,5 Hz, 2H), 6,85 (dd, J = 0,8, 3,3 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,73 (t, J = 3,6 Hz, 1H), 4,25 (s, 4H), 4,08 (s ancho, 1H), 3,34 (d ancho, J = 9,6 Hz, 2H), 3,20-3,9 (m, 1H), 2,64-2,57 (m, 1H), 2,36 (s, 1H), 1,75 (s ancho, 4H), 1,53 (s, 9H) ppm.

Esquema IX



1,2-bis[éster terc-butílico del ácido 2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico]etano (**25**)

A una suspensión de 60% de NaH (0,34 g, 8,50 mmol) en DMF anhidro (20 ml) a 0°C se añadió una solución de **20** (2,47 g, 7,75 mmoles) en DMF (30 ml) mediante un embudo de adición. Después de 1 h, la mezcla de reacción se transfirió a un baño a -40°C (ACN/nieve carbónica). A -40°C, una solución de tosilato **24** (3,65 g, 7,06 mmoles) en DMF (20 ml) se añadió a la solución aniónica fría de un embudo de adición. Después de 30 min, sólo se observaron por análisis TLC los materiales de partida, por lo tanto se calentó lentamente a 0°C durante 2 h. Después de 2-3 horas a 0°C, la reacción se inactivó por adición de solución acuosa saturada de NH_4Cl . La mezcla se diluyó con éter dietílico y agua y se separaron las capas. La capa de éter se lavó varias veces con agua para eliminar la DMF, después una vez con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC de fase normal (10-100% de EtOAc/hexano durante 30 min) para proporcionar 3,27 g (70%) de **25** en forma de una espuma blanca que era homogénea por análisis de TLC [hexano/EtOAc 3:1 (dos revelados), R_f (**20**) = 0,8; R_f (**24**) = 0,55, R_f (**25**) = 0,5]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,61-7,52 (m, 1H), 6,82 (t, J = 9,6 Hz, 1H), 6,68-6,61 (m, 1H), 6,48-6,46 (m, 1H), 4,34 (s, 2H), 3,93 (m, 1H), 3,34-3,26 (m, 2H), 3,17-3,01 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,70-1,58 (m, 4H), 1,50 (s, 9H) ppm.

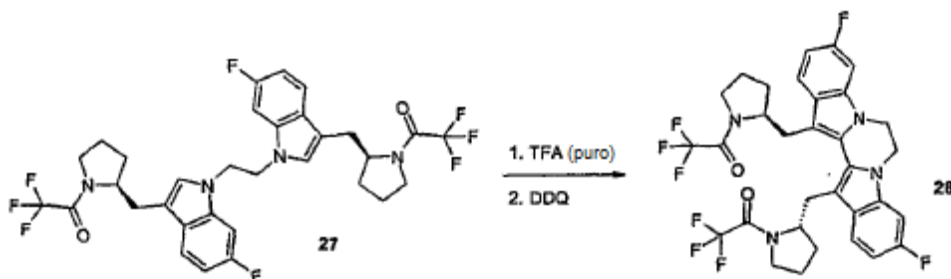
1,2-bis[2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidina]etano (**26**):

Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) a 0°C a una solución que contenía **25** (3,27 g, 4,93 mmoles) en DCM (10 ml). Después de 3 h, se añadió una porción adicional de TFA (2 ml) y la reacción se completó en 1 h. Se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en DCM y se lavó dos veces con solución acuosa saturada de NaHCO_3 , una vez con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar **26** en forma de una espuma de color amarillo que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,31 (dd, J = 5,1, 8,7 Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,77 (ddd, J = 2,4, 9,6, 11,1 Hz, 1H), 6,44 (dd, J = 2,4, 9,9 Hz, 1H), 4,41 (s, 2H), 3,65-3,55 (m, 1H), 3,24-3,16 (m, 1H), 3,01-2,96 (m, 1H), 2,92 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 2,15-1,99 (m, 1H), 1,96-1,84 (m, 2H), 1,76-1,67 (m, 1H) ppm.

1,2-bis {2,2,2-trifluoro-1-[2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-il]-etanona}etano (**27**)

A 0°C, se añadió TFAA (2,17 g, 1,44 ml, 10,3 mmol) a una solución que contenía **26** (2,28 g, 4,93 mmoles; basado en el rendimiento teórico de la etapa anterior) y TEA (2,49 g, 3,43 ml, 24,6 mmoles) en DCM (50 ml). Después de 30 min, la mezcla de reacción se diluye con DCM y se lava dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con salmuera, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra, y se concentra. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (hexano/EtOAc 4:1-1:1) para proporcionar 2,66 g (82%, 2 etapas) de **27** que era homogéneo por análisis de TLC [hexano/EtOAc 2:1, R_f (**26**) = 0,01; R_f (**27**) = 0,5]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,70 (dd, J = 5,4, 9,0 Hz, 1H), 6,84 (ddd, J = 1,8, 9,3, 10,5 Hz, 1H), 6,62 (dd, J = 1,8, 10,2 Hz, 1H), 6,44 (s, 1H), 4,36 (s, 2H), 4,29-4,28 (m, 1H), 3,60 (t ap, J = 7,2 Hz, 2H), 3,23 (dd, J = 2,4, 14,1 Hz, 1H), 2,51 (dd, J = 9,9, 14,1 Hz, 1H), 1,92-1,84 (m, 2H), 1,72-1,66 (m, 1H), 1,57-1,56 (m, 1H) ppm.

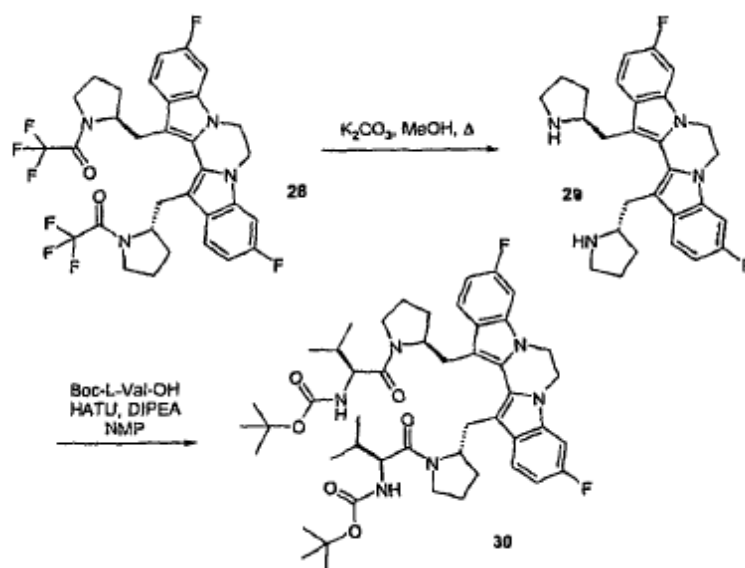
Esquema X

1-(2-(3,10-difluoro-14-[1-(2,2,2-trifluoro-acetil)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,7-dihidro-pirazino[1,2-a;4,3-a']diindol-13-ilmetil)-pirrolidin-1-il)-2,2,2-trifluoro-etanona (**28**)

Se disolvió dímero acíclico **27** (2,66 g, 4,06 mmol) en TFA puro (25 ml) a temperatura ambiente. Después de 3 h, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el residuo resultante se disolvió en EtOAc, se lavó dos veces con solución acuosa saturada de NaHCO₃, una vez con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 2,65 g (cuant.) de las indolilindolinas diastereoméricas en forma de una espuma de color amarillo. [Análisis de TLC: hexano/EtOAc 3:1, R_f (**27**) = 0,3; R_f (indolilindolinas) = 0,6-0,7].

A una mezcla de indolilindolinas en bruto (2,65 g, 4,05 mmol) en 1,4-dioxano (50 ml) se añadió DDQ (1,10 g, 4,84 mmol) en una porción. Después de 2-3 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se filtró a través de una almohadilla de celite. Los sólidos se lavaron con EtOAc y el filtrado se lavó cinco veces con NaHCO₃ acuoso saturado, a continuación una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer dos veces con EtOAc y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (hexano/EtOAc 4:1) para producir 1,94 g (73%, 2 etapas) de **28** en forma de un sólido de color blanco que era homogéneo por análisis de TLC (hexano/EtOAc 2:1, R_f (indolilindolinas) = 0,6-0,7; R_f (**28**) = 0,55]. NB: El producto 2,2'-biindol (**28**) es bastante fluorescente y se purifica fácilmente por trituración con MeOH calidad reactivo para proporcionar un sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,06 (dd, J = 5,1, 8,1 Hz, 1H), 7,03-6,93 (m, 2H), 4,49 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,12 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,75-3,69 (m, 2H), 3,57-3,51 (m, 2H), 2,85 (dd, J = 10,5, 12,9 Hz, 1H), 1,78-1,74 (m, 2H), 1,51-1,45 (m, 1H) ppm.

Esquema XI



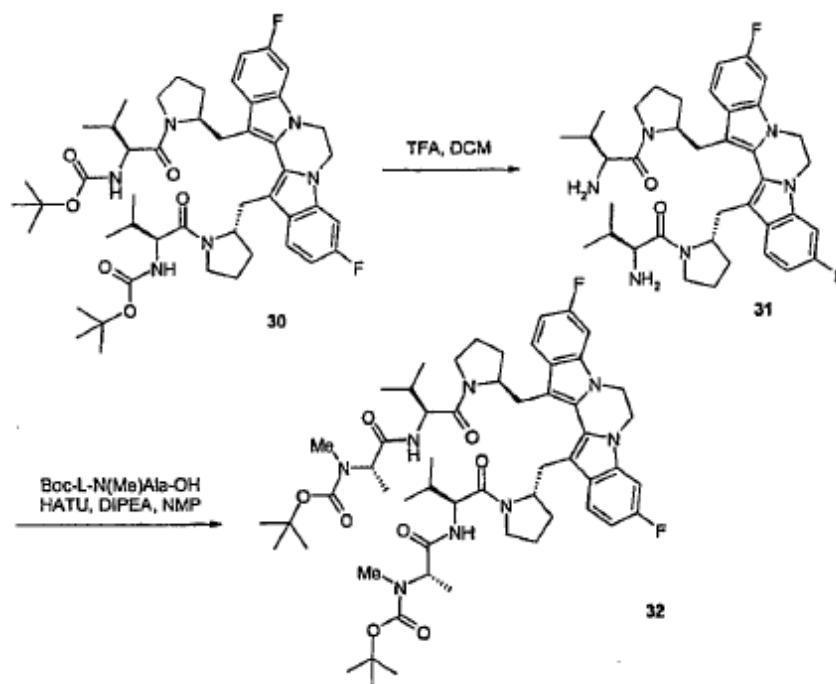
3,10-difluoro-13,14-bis-pirrolidin-2-ilmetil-6,7-dihidro-pirazino[1,2-a;4,3-a']diindol (**29**):

Una mezcla que contenía **28** (1,94 g, 2,97 mmol) y K_2CO_3 (2,05 g, 14,8 mmol) en MeOH (60 ml) se calentó a 60°C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc y agua. Se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 1,57 g (cuantitativo) de **29** en forma de un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional. Análisis de TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**28**) = 0,9; R_f (**29**) = 0,01. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,65 (m, 1H), 6,98 (d ap, J = 8,2 Hz, 1H), 6,90 (t ap, J = 8,3 Hz, 1H), 4,31 (s, 2H), 3,97 (s ancho, 3H), 3,54 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 2,97 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,42 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 160,6 (d, J_{C-F} = 238,7 Hz), 136,2 (d, J_{C-F} = 12,0 Hz), 127,1, 125,4, 120,8 (d, J_{C-F} = 10,2 Hz), 109,8, 108,9 (d, J_{C-F} = 24,6 Hz), 95,3 (d, J_{C-F} = 26,3 Hz), 59,6, 45,6, 41,6, 31,0, 30,7, 24,5 ppm.

Éster terc-butílico del ácido[1-(2-{14-[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-3,10-difluoro-6,7-dihidro-pirazino[1,2-a;4,3-a']} diindol-13-ilmetil)-pirrolidin-1-carbonil)-2-metil-propil]-carbámico (**30**):

Una solución que contenía Boc-L-Val-OH (0,69 g, 3,18 mmol) y HATU (1,27 g, 3,34 mmoles) en NMP anhidro (4 ml) se enfrió a 0°C. Después de 15 min, se añadió DIPEA (0,45 g, 0,61 ml, 3,50 mmol) con una jeringa. Después de 15 min, se añadió una solución que contenía **29** (0,70 g, 1,52 mmoles) en NMP (4 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 2 h en cuyo momento el análisis TLC puso de manifiesto el consumo completo de **29** [análisis TLC, hexano/EtOAc 02:01, R_f (**29**) = 0,01; R_f (**30**) = 0,5]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con HCl acuoso diluido, cinco veces con agua para eliminar el exceso de NMP, una vez con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (hexano/EtOAc 3:1) para producir 1,09 g (83%) de **30** en forma de un sólido de color amarillo pálido. 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8,04 (dd, J = 5,1, 8,7 Hz, 1H), 6,98 (m, 2H), 5,33 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,49 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,24 (dd, J = 7,2, 9,3 Hz, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,67 (dd, J = 3,0, 13,5 Hz, 1H), 3,56 (m, 2H), 2,73 (t ap, J = 12,9 Hz, 1H), 1,99 (dd, J = 7,2, 13,5 Hz, 1H), 1,70-1,17 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,01 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,98 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ppm. ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 171,2, 160,4 (d, J_{C-F} = 238 Hz), 155,7, 136,6 (d, J_{C-F} = 12,0 Hz), 127,2, 124,8, 122,0 (d, J_{C-F} = 9,7 Hz), 109,2, 108,5 (d, J_{C-F} = 24,0 Hz), 95,0 (d, J_{C-F} = 26,3 Hz), 79,4, 57,7, 56,9, 47,3, 41,7, 31,8, 29,7, 28,4, 28,3, 23,8, 19,7, 17,7 ppm.

Esquema XII



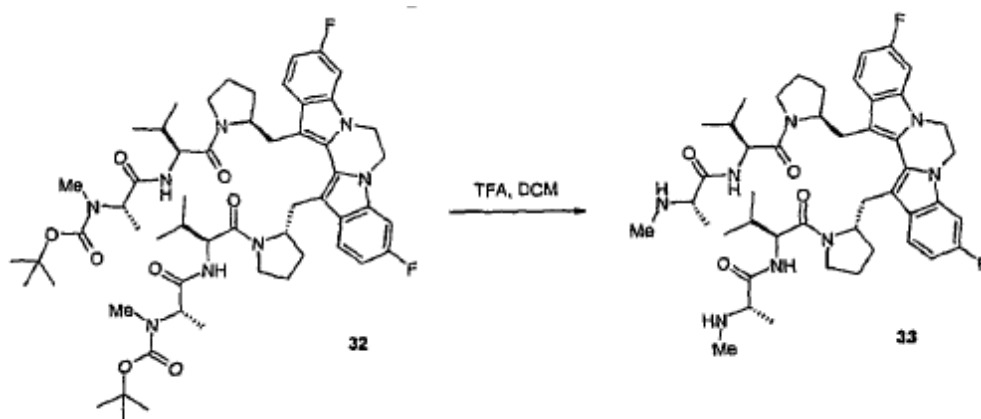
2-amino-1-(2-{14-[1-(2-amino-3-metil-butilil)-pirrolidin-2-ilmetil]-3,10-difluoro-6,7-dihidro-pirazino[1,2-a;4,3-a]diindol-13-ilmetil}-pirrolidin-1-il)-3-metil-butan-1-ona (**31**)

- 5 Una solución que contenía **30** (1,09 g, 1,27 mmoles) en DCM (20 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (4 ml) con una pipeta y la reacción se controló hasta que el análisis TLC puso de manifiesto el consumo completo de **30** (~2 h). Análisis por TLC, 10% de MeOH/DCM, R_f (**30**) = 0,5; R_f (**31**) = 0,4. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc y los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 0,83 g (cuantitativo) de **31** en forma de un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,09 (dd, J = 5,1, 8,7 Hz, 1H), 6,97 (m, 2H), 4,52 (m, 1H), 4,50 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,71 (d ancho, J = 11,1 Hz, 1H), 3,51-3,32 (m, 2H), 2,74 (t ap, J = 12,6 Hz, 1H), 2,30 (s ancho, 4H), 1,92 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,41 (m, 1H), 1,03 (m, 6H) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 174,3, 171,4, 160,6 (d, J_{C-F} = 232,5 Hz), 136,8 (d, J_{C-F} = 7,5 Hz), 127,4 (d, J_{C-F} = 3,7 Hz), 125,0, 122,4 (d, J_{C-F} = 7,5 Hz), 109,6, 108,7 (d, J_{C-F} = 22,5 Hz), 95,2 (d, J_{C-F} = 22,5 Hz), 58,0, 47,3, 41,9, 30,0, 28,5, 28,5, 24,1, 19,9, 17,6 ppm.

Penúltimo intermedio (**32**):

- Una solución que contenía Boc-LN (Me) Ala-OH (0,49 g, 2,45 mmol) y HATU (0,98 g, 2,56 mmoles) en NMP anhidro (4 ml) se enfrió a 0°C. Después de 15 min, se añadió DIPEA (0,35 g, 0,47 ml, 2,69 mmol) con una jeringa. Después de 15 min, se añadió una solución que contenía **31** (0,77 g, 1,17 mmoles) en NMP (4 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 2 h en cuyo momento el análisis TLC puso de manifiesto el consumo completo de **31** [análisis TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**31**) = 0,01; R_f (**32**) = 0,5]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con HCl acuoso diluido, cinco veces con agua para eliminar el exceso de NMP, una vez con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (hexano/EtOAc 1:1) para producir 0,92 g (76%) de **32** en forma de un sólido de color amarillo pálido. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,05 (m, 1H), 7,65-6,90 (m, 2H), 4,53 (m, 3H), 4,13 (m, 1H), 3,70-3,52 (m, 4H), 2,82 (m, 2H), 2,72 (t ap, J = 11,1 Hz, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,53 (s, 9H), 1,45-1,25 (m, 2H), 1,34 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,05-0,88 (m, 6H) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 171,3, 170,4, 160,4 (d, J_{C-F} = 232,5 Hz), 136,6 (d, J_{C-F} = 7,5 Hz), 127,2, 124,7, 122,1, 109,2, 108,5 (d, J_{C-F} = 22,5 Hz), 95,0 (d, J_{C-F} = 22,5 Hz), 57,8, 55,5, 47,4, 41,7, 31,6, 29,9, 29,7, 28,4, 23,8, 19,3, 18,0 ppm.

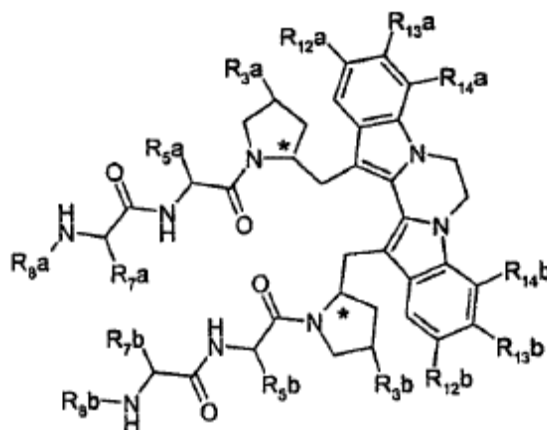
Esquema XIII



N-{1-[2-(3,10-difluoro-14-{1-[3-metil-2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,7-dihidro-pirazino[1,2-a;4,3-a]diindol-13-ilmetil)-pirrolidin-1-carbonil]-2-metil-propil}-2-metilamino-propionamida (**33**):

- 5 Una solución que contenía **32** (0,92 g, 0,89 mmoles) en DCM (15 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (3 ml) con una pipeta y la reacción se controló hasta que el análisis TLC puso de manifiesto el consumo completo de **32** (~3 h). Análisis por TLC, 10% de MeOH/DCM, R_f (**32**) = 0,4; R_f (**33**) = 0,3. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NaHCO_3 acuoso saturado y una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc y los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 0,73 g de **33** en bruto. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC (Método: Disolvente A: agua w/0,1% v/v de HOAc, Disolvente B: ACN w/0,1% v/v de HOAc Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 25 cm; caudal: 40 ml/min, detector: 272 nm). Las fracciones que contenían el producto se diluyeron con NaHCO_3 acuoso saturado y se extrajeron con EtOAc. El extracto de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de ACN, se diluyó con agua hasta que se puso turbio, se congeló y se liofilizó para producir **33** en forma de un sólido floculante, blanco. ^1H RMN (DMSO, 300 MHz) δ 8,04-7,86 (m, 2H), 7,38 (dd ap, J = 2,3, 10,5 Hz, 1H), 6,90 (dt ap, J = 2,3, 9,9 Hz, 1H), 4,68 (d ap, J = 8,7 Hz, 1H), 4,34-4,23 (m, 2H), 3,98 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 3,46 (m, 2H), 2,94 (q ap, J = 6,4 Hz, 1H), 2,70 (t, J = 12,8 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 1,94 (m, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,35 (m, 1H), 1,16-1,07 (m, 2H), 1,03 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,85 (m, 6H) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 175,0, 170,8, 160,6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 232,5 Hz), 136,8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 7,5 Hz), 127,4 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3,7 Hz), 125,0, 122,3 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 7,5 Hz), 109,5, 108,7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22,5 Hz), 95,2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22,5 Hz), 60,4, 57,9, 55,3, 47,6, 42,0, 35,2, 31,7, 30,0, 28,6, 24,0, 19,7, 19,6, 18,2 ppm. Espectro de masas, m/z = $[415,6] (M + 2)^{+}/2$.
- 10
- 15
- 20

Ejemplo comparativo 2



25

En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden

formar de forma independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar de forma independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o cada uno está opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltio; u, opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o puente de alquilenilo, alquenileno, alquinileno opcionalmente sustituidos de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden estar reemplazados por N, O o S;

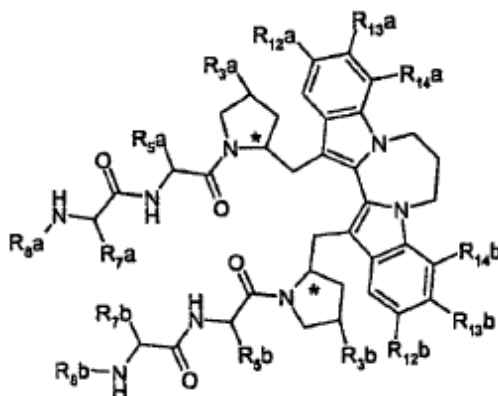
R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano, o CO₂H; y

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxilo, alquilo, ariloxi, arilalquilhidroxilo, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino.

Entrada	R8a	R7a	R5a	Esterеоquím. en la posición (*)	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K ₀
72	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
73	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
74	H	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
75	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	A
76	Me	S-Me	H	S	H	H	H	S-Me	Me	H	F	H	B
77	Me	S-Me	S-Me	S	H	H	S-Me	S-Me	Me	H	F	H	B
78	Me	S-Me	S-(2S-EtOH)	S	H	H	S-(2S-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
79	Me	S-Me	S-Et	S	H	H	S-Et	S-Me	Me	H	F	H	A
80	Me	S-Me	S-(2S-EtOH)	S	H	H	S-(2S-EtOH)	S-Me	Me	F	H	H	A
81	H	H	S-iPr	S	H	H	S-iPr	H	H	H	F	H	B
82	Me	S-Me	S-sBu	S	H	H	S-sBu	S-Me	Me	F	H	H	A
83	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	S-cHex	S-Me	Me	F	H	H	A
84	Me	S-Me	S-tBu	S	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
85	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	F	H	A
86	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	R	S-OH	S-OH	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
87	Me	S-Me	S-iPr	R	S-OH	S-OH	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A

88	Me	S-Me	S-(2 <i>R</i> -EtOMe)	<i>R</i>	S-OH	S-OH	S-(2 <i>R</i> -EtOMe)	S-Me	Me	H	F	H	A
89	Me	S-Me	S-(2 <i>R</i> -EtOtBu)	<i>R</i>	S-OH	S-OH	S-(2 <i>R</i> -EtOtBu)	S-Me	Me	H	F	H	B
90	Me	S-Me	S-(2 <i>S</i> -EtOH)	<i>R</i>	S-OH	S-OH	S-(2 <i>S</i> -EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
91	Me	<i>R</i> -Me	<i>S</i> -iPr	<i>S</i>	H	H	<i>S</i> -iPr	<i>R</i> -Me	Me	H	F	H	B
92	Me	S-Me	<i>R</i> -iPr	<i>S</i>	H	H	<i>R</i> -iPr	S-Me	Me	H	F	H	C
93	Me	<i>R</i> -Me	<i>R</i> -iPr	<i>S</i>	H	H	<i>R</i> -iPr	<i>R</i> -Me	Me	H	F	H	C

Ejemplo comparativo 3



5 En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

10 R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o cada uno está sustituido opcionalmente con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltio; u, opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o puente de alquilenilo, alquenileno, alquinileno
15 opcionalmente sustituido de 2 a 12 átomos de carbono, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O o S;

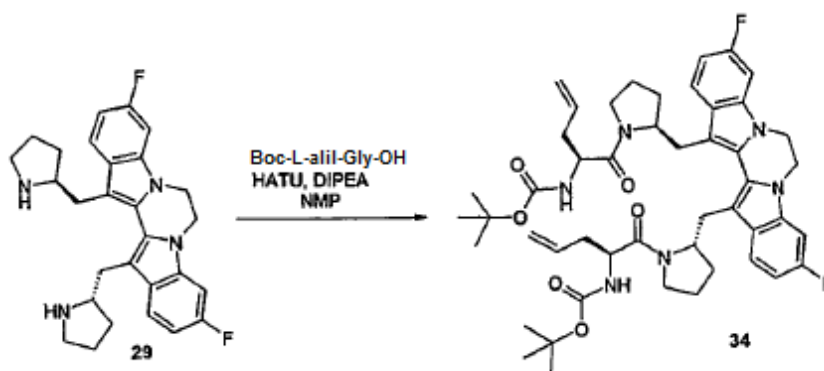
R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxi, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H; y

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxi, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxi, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino.

20

Entrada	R8a	R7a	R5a	Estereoquím. en la posición (*)	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K_D
94	Me	<i>S</i> -Me	<i>S</i> -(2 <i>R</i> -EtOH)	<i>S</i>	H	H	<i>S</i> -(2 <i>R</i> -EtOH)	<i>S</i> -Me	Me	H	H	H	A

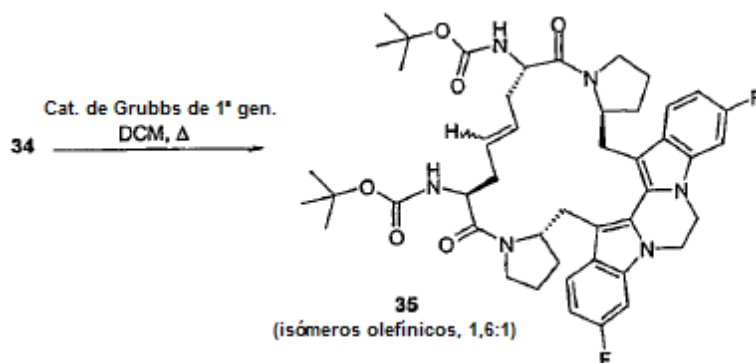
Esquema XIV



Especies que contienen bis-(Boc-alilglicina) (**34**)

- Se enfrió a 0°C una solución que contenía Boc-L-alil-Gly-OH (0,115 g, 0,53 mmol) y HATU (0,20 g, 0,53 mmoles) en NMP anhidro (3 ml). Después de 10 min, se añadió diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,58 mmoles) con una jeringa. Después de 5 min, se añadió una solución que contenía **29** (0,11 g, 0,23 mmoles) en NMP (3 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 h, momento en el que el análisis por TLC puso de manifiesto el consumo completo de **29** [análisis de TLC, 5% de MeOH/DCM, R_f (**29**) = 0,4]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con HCl acuoso diluido, y dos veces con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC (Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 250 mm; caudal 40 ml/min, detector: 254 nm, gradiente 20-100% de ACN/agua con 0,1% de AcOH durante 30 min). Las fracciones que contienen el producto se diluyeron con EtOAc, se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para producir 0,067 g (73%) de **34** en forma de un sólido de color amarillo claro. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,06 (dd, J = 5,4, 8,7 Hz, 1H), 7,02-6,92 (m, 2H), 5,88-5,79 (m, 1H), 5,42 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,19-5,11 (m, 2H), 4,49 (dd, J = 6,9, 15,9 Hz, 2H), 4,16-4,08 (m, 1H), 3,65-3,41 (m, 3H), 2,75 (t ap, J = 12,9 Hz, 1H), 2,54-2,35 (m, 2H), 1,75-1,68 (m, 3H), 1,46-1,43 (m, 9H), 1,21-1,19 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, m/z = 877,7 ($M + Na$)⁺.

Esquema XV

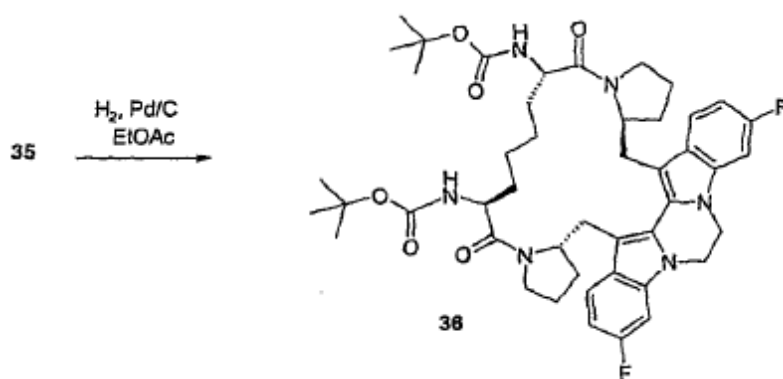


- 20 Producto de metátesis de cierre de anillo (MCA) (**35**):

A una solución de **34** (0,067 g, 0,08 mmol) en DCM anhidro (30 ml) se añadió el catalizador de Grubbs de primera generación (9,2 mg, 0,01 mmol, 12% en moles) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 h, en cuyo momento el análisis de TLC puso de manifiesto en su mayoría material de partida. Se añadió a

continuación a la mezcla de reacción más catalizador de Grubbs (7 mg, 0,009 mmol, 11% en moles). Después de 2 días, se evaporó el disolvente y se purificó el residuo en bruto por NP-HPLC (SiO₂, 20% de hexano/EtOAc a 100% EtOAc durante 20 min) para producir las olefinas deseadas **35** (isómeros olefínicos: 15 mg y 24 mg) en forma de una mezcla separable de isómeros (geometría de olefinas sin asignar) en forma de sólidos de color amarillo claro. [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**34**) = 0,7; R_f (**35**) = 0,6]. Isómero **35** A: ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,80 (t ap, J = 9,0 Hz, 1H), 7,00 (dd, J = 1,5, 11,07 Hz, 1H), 6,92 (ddd, J = 2,1, 9,3, 11,2 Hz, 1H), 5,62 (d ap, J = 7,8 Hz, 1H), 5,56 (s ancho, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,56-4,47 (m, 2H), 4,12 (d ap, J = 6,9 Hz, 1H), 3,85 (dd, J = 3,6, 13,5 Hz, 1H), 3,52-3,49 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,45-2,40 (m, 2H), 1,70-1,64 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,7-1,5 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, m/z = 849,7 (M+Na)⁺. Isómero **35** B: ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,85 (s ancho, 1H), 7,0 (dd, J = 1,5, 9,3 Hz, 1H), 6,92 (ddd, J = 2,4, 9,3, 11,1 Hz, 1H), 5,66 (s ancho, 1H), 5,56 (d ap, J = 7,5 Hz, 1H), 4,80 (s ancho, 1H), 4,62-4,51 (m, 2H), 4,17-4,09 (m, 1H), 3,75-3,52 (m, 3H), 2,69-2,60 (m, 2H), 2,47 (d ap, J = 15,3 Hz, 1H), 1,69 (m, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,18 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, m/z = 849,7 (M + Na)⁺.

Esquema XVI

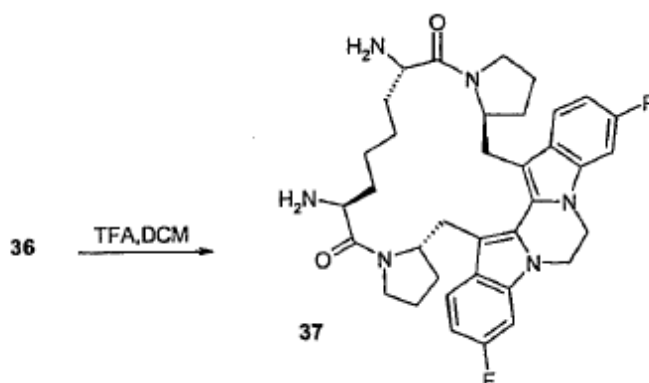


Producto unido a alquilo (**36**):

A una solución de isómero A de olefina **35** (15 mg, 0,02 mmol) en EtOAc (5 ml) se añadió 5% de Pd/C (25 mg). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de H₂ utilizando un aparato de Parr (~ 45-50 PSI). Después de 2,5 h, el análisis por TLC puso de manifiesto material de partida sin reaccionar. A continuación se añadió 5% de Pd/C adicional (20 mg) y la mezcla se sometió de nuevo a hidrogenación utilizando un aparato de Parr. Después de 1,5 h, la mezcla se filtró a través de Celite®, y los sólidos se aclararon con EtOAc. El filtrado se concentró al vacío para dar **36** en forma de un sólido de color amarillo claro.

Isómero B de **35** (24 mg, 0,03 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción y a procedimientos de preparación como los descritos para el isómero A. El producto (**36**) se combinó con el procedente de la hidrogenación del isómero A. El compuesto **36** se aisló en forma de un sólido amarillo claro (35 mg, 85%). [Análisis de TLC, hexano/EtOAc 1:1, R_f (**36**) = 0,3]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,85 (dd, J = 5,4, 8,1 Hz, 1H), 7,00 (dd, J = 1,8, 9,9 Hz, 1H), 6,92 (ddd, J = 2,4, 9,2, 11,1, 1H), 5,70 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,79-4,78 (m, 1H), 4,57-4,51 (m, 2H), 4,13-4,09 (m, 1H), 3,75 (dd, J = 3,6, 12,9 Hz, 1H), 3,53-3,41 (m, 2H), 2,49 (t ap, J = 12,3 Hz, 1H), 1,68-1,62 (m, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,08-1,02 (m, 1H), 0,93-0,89 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, m/z = 851,7 (M + Na)⁺.

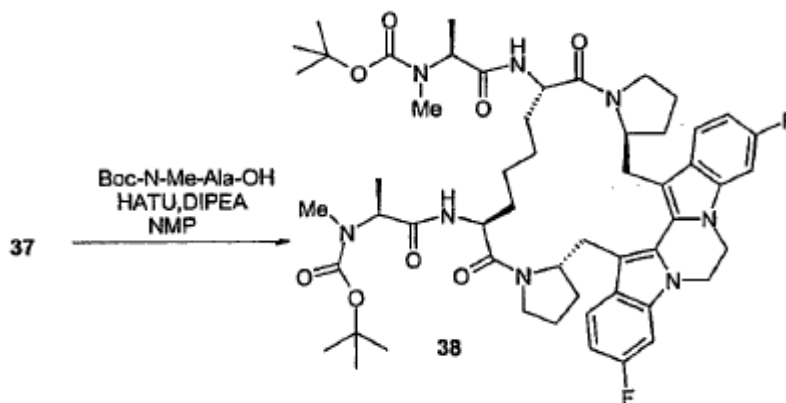
Esquema XVII



Diamina unida a alquilo libre (**37**):

Una solución que contenía **36** (0,035 g, 0,04 mmoles) en DCM (10 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (1 ml) con una pipeta y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se hizo el seguimiento hasta que el análisis TLC puso de manifiesto el consumo completo de **36** (~ 1 h). Se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc y los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para producir 0,025 g (cuantitativo) de **37** en forma de un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,92-7,87 (m, 1H), 7,00 (dd, *J* = 2,1, 9,9 Hz, 1H), 6,91 (ddd, *J* = 2,4, 9,3, 11,1 Hz, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,13-4,09 (m, 1H), 3,79-3,76 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 2,50 (t ap, *J* = 12,9 Hz, 1H), 1,89 (m, 4H), 1,65-1,61 (m, 3H), 1,33-1,24 (m, 4H), 1,9-1,03 (m, 1H), 0,94-0,82 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, *m/z* = 315,3 (*M* + *H*)⁺/2; *m/z* = 629,5 (*M* + *H*)⁺.

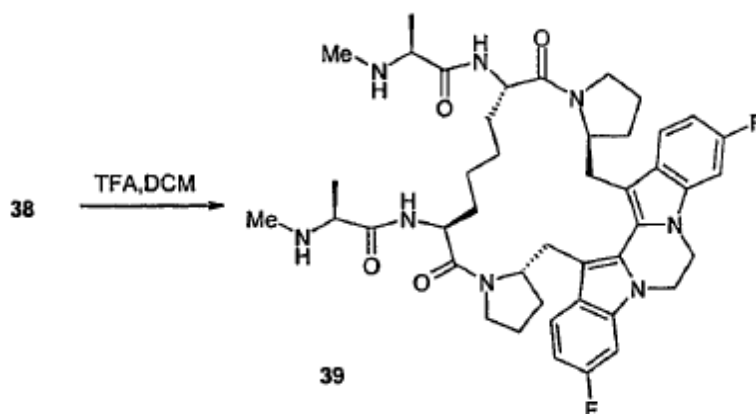
Esquema XVIII



Macrociclo que contiene bis-[Boc-N(Me)-alanina] (**38**):

Se enfrió a 0°C una solución que contenía Boc-N-metil-L-Ala-OH (0,022 g, 0,11 mmol) y HATU (0,03 g, 0,09 mmoles) en NMP anhidro (4 ml). Después de 10 min, se añadió diisopropiltilamina (0,05 ml, 0,29 mmol) con una jeringa. Después de 5 min, se añadió una solución que contenía **37** (0,025 g, 0,04 mmoles) en NMP (3 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 24 h momento en el que el análisis por TLC puso de manifiesto el consumo completo de **37** [análisis de TLC, 5% de MeOH/DCM, *R_f* (**38**) = 0,3]. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó una vez con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con HCl acuoso diluido, y dos veces con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para dar **38** en forma de un aceite amarillo (35 mg) que se usó sin purificación adicional.

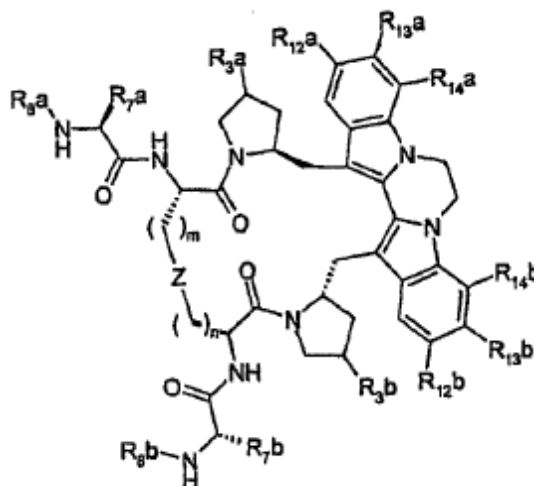
Esquema XIX



Mimético de Smac macrocíclico(**39**):

- 5 Una solución que contenía **38** (0,035 g, 0,04 mmoles) en DCM (10 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (1 ml) con una pipeta y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se controló hasta que el análisis TLC puso de
 10 manifiesto el consumo completo de **38** (~2 h). Se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en EtOAc. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc y los extractos orgánicos se secaron
 sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar **39** en forma de un sólido amarillo. El
 producto en bruto se purificó por RP-HPLC (Dynamax Microsorb C18 60 Å 8µ, 41,4 mm x 250 mm; caudal 40 ml/min, detector 254 nm, gradiente de 20-100% de ACN/agua con 0,1% de AcOH durante 30 min) . Las fracciones que
 15 contenían el producto se diluyeron con EtOAc y se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado , se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El material se disolvió en una cantidad mínima de ACN, se diluyó con agua, se congeló y se liofilizó para producir **39** en forma de un sólido floculante blanco (0,002 g). ¹H RMN (CDCl₃ , 300 MHz) δ 8,16 (d ap, J = 8,1 Hz, 1H), 7,90-7,86 (m, 1H), 7,00 (d ap, J = 8,7 Hz, 1H), 6,93 (ddd, J = 3,0, 7,5, 9,0 Hz, 1H), 4,80 (m, 2H), 4,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,79 (dd, J = 3,9, 12,9 Hz, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,44 (m, 1H), 3,11-3,09 (m, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,35-1,25 (m, 8H), 1,06 (m, 1H), 0,89 hasta 0,85 (m, 1H) ppm. Espectro de masas, m/z = 400,5 (M)⁺/2; m/z = 799,7 (M)⁺: m/z = 821,7 (M + Na⁺).

20 Ejemplo comparativo 4



En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino y nitro; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 5 Z es un enlace; un grupo alquilenos, alquilenos, alquilenos de 1 a 6 átomos; o, un grupo alquilenos, alquilenos, alquilenos de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido; un grupo sulfuro (-S-), sulfóxido (-SO-), sulfona (-SO₂-) o disulfuro (-SS-); un grupo arilo, arilalquilenos, heteroarilo, heteroarilalquilenos o un grupo arilo, arilalquilenos, heteroarilo, heteroarilalquilenos opcionalmente sustituido; un grupo amino o amino sustituido; un átomo de oxígeno;

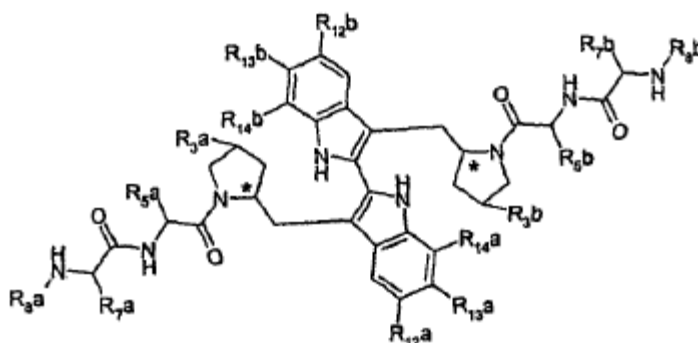
m y n son independientemente 0, 1, 2, o 3;

- 10 R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H; y

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxi, alquilo, arilo, arilalquilhidroxi, dialquilamino, amido, sulfonamido, o amidino.

Entrada	R8a	R7a	m	n	Z	R3a	R3b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K _D μ M
95	Me	Me	1	1	Z-CH=CH-	H	H	Me	Me	H	F	H	A
96	Me	Me	1	1	E-CH=CH-	H	H	Me	Me	H	F	H	A
97	Me	Me	1	1	-CH ₂ CH ₂ -	H	H	Me	Me	F	H	H	A
98	Me	Me	1	1	-CH ₂ CH ₂ -	H	H	Me	Me	H	F	H	A
99	H	Me	1	1	-SS-	H	H	Me	H	H	F	H	A
100	Me	Me	1	1	-CH(OH)CH(OH)-	H	H	Me	Me	H	H	H	A
101	Me	Me	1	1	-CH ₂ CH ₂ -	S-OH	S-OH	Me	Me	H	F	H	A

- 15 Ejemplo 3



En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 20 R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 25 R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquilitio; u, opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo

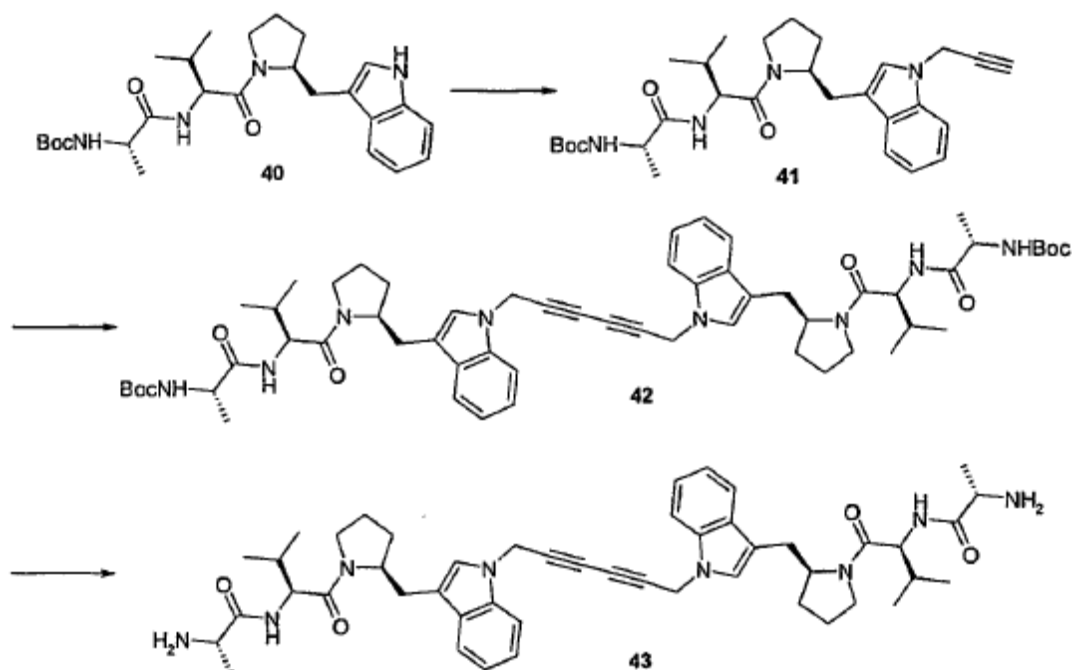
alquileo, alquilenilo, alquiniilo de 2 a 12 átomos de carbono o puente de 2 a 12 átomos de carbono de alquileo, alquilenilo, alquiniilo, opcionalmente sustituido, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O, o S;

5 R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H; y

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilhidroxilo, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino.

Entrada	R8a	R7a	R5a	Etereoquí. en la posición (*)	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K _D
102	H	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
103	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
104	H	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	A
105	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	H	H	A
106	H	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	H	H	H	H	A
107	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	A
108	H	S-Et	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Et	H	H	H	H	A
109	Me	S-Et	S-iPr	S	H	H	S-iPr	S-Et	Me	H	H	H	A
110	Me	S-Me	S-(2S-EtOH)	S	H	H	S-(2S-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
111	Me	S-Me	S-Allyl	S	H	H	S-Allyl	S-Me	Me	H	F	H	A
112	Me	S-Me	S-iPr	R	S-OH	S-OH	S-iPr	S-Me	Me	H	F	H	A
113	Me	S-Me	S-sBu	R	S-OH	S-OH	S-sBu	S-Me	Me	H	F	H	A
114	Me	S-Me	S-(2S-EtOtBu)	R	S-OH	S-OH	S-(2S-EtOtBu)	S-Me	Me	H	F	H	A
115	Me	S-Me	S-(2S-EtOH)	R	S-OH	S-OH	S-(2S-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
116	Me	S-Me	S-(2R-EtOMe)	R	S-OH	S-OH	S-(2R-EtOMe)	S-Me	Me	H	F	H	A
117	Me	S-Me	S-(2S-EtOMe)	R	S-OH	S-OH	S-(2S-EtOMe)	S-Me	Me	H	F	H	A
118	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	R	S-OH	S-OH	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A

Esquema XX



Preparación de 2-amino-*N*-[1-(2-{1-[6-(3-{1-[2-(2-amino-propionilamino)-3-metil-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-indol-1-il)-hexa-2,4-diinil]-1H-indol-3-ilmetil}-pirrolidin-1-carbonil)-2-metil-propil]-propionamida (**43**):

- 5 A. Éster terc-butílico del ácido {1S-[2-metil-1S-[2S-(1-prop-2-inil-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carbonil]-propilcarbamoyl]-etil}-carbámico (**41**):

A una solución de **40** (0,150 g, 0,319 mmol) en THF (2 ml) se añadió bromuro de propargilo [0,06 ml, 0,410 mmol, (80% en peso/tolueno)] seguido de NaH [0,015 g, 0,410 mmol, (60% dispersión en aceite mineral)]. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua (2 ml) a la mezcla de reacción y el producto se extrajo con acetato de etilo (3 × 30 ml). Los extractos de acetato de etilo se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,0 (s, 1H), 7,9 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 7,38 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 7,3-7,1 (m, 3H), 6,8 (m, 1H), 4,8 (s, 2H), 4,62 (m 1H), 4,5-4,4 (m 1H), 4,4-4,0 (m, 2H), 3,7-3,5 (m, 2H), 3,4 (m, 1H), 2,5 (m, 1H), 2,4 (s, 1H), 2,2-1,8 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,35 (d, *J* = 9,9 Hz, 3H), 1,05 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H), 0,95 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H) ppm.

- 15 B. Éster terc-butílico del ácido {1-[1-(2-{1-[6-(3-{1-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino)-3-metil-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-indol-1-il)-hexa-2,4-diinil]-1H-indol-3-ilmetil}-pirrolidin-1-carbonil)-2-metil-propilcarbamoyl]-etil}-carbámico (**42**):

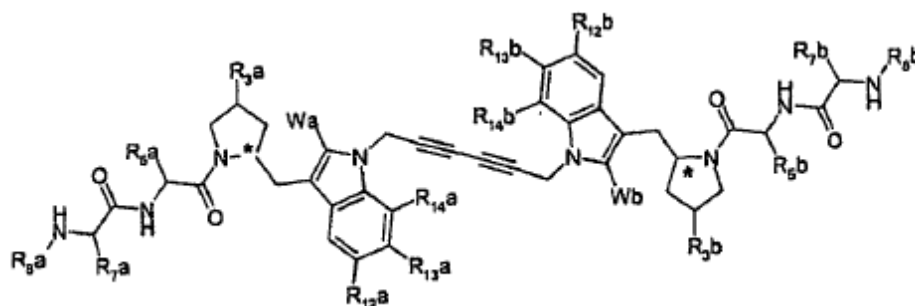
A una solución de **41** (0,040 g, 0,077 mmol) en acetonitrilo (2 ml), se añadió acetato de cobre (II) (0,070 g, 0,385 mmol) y la mezcla de reacción se sumergió en un baño de aceite precalentado (~ 100°C.) y se calentó a reflujo durante 5 min. Después se añadió agua a la mezcla de reacción (2 ml) y el producto se extrajo con EtOAc (3 × 30 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con solución acuosa de NH₄OH (5 ml), agua, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar el producto en bruto. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,0 (s, 2H), 7,9 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 7,3-7,1 (m, 6H), 6,8 (m, 2H), 4,8 (s, 4H), 4,62 (m 2H), 4,5-4,4 (m 2H), 4,4-4,0 (m, 4H), 3,7-3,5 (m, 4H), 3,4 (m, 2H), 2,5 (m, 2H), 2,2-1,8 (m, 8H), 1,48 (s, 18H), 1,35 (d, *J* = 9,9 Hz, 6H), 1,05 (d, *J* = 5,5 Hz, 6H), 0,95 (d, *J* = 5,5 Hz, 6H) ppm.

- 25 C. 2-amino-*N*-[1-(2-{1-[6-(3-{1-[2-(2-amino-propionilamino)-3-metil-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-indol-1-il)-hexa-2,4-diinil]-1H-indol-3-ilmetil}-pirrolidin-1-carbonil)-2-metil-propil]-propionamida (**43**):

A una solución de **42** (0,030 g, 0,029 mmoles) en DCM (5 ml) se añadió TFA (1 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió a continuación solución acuosa de NaHCO₃ (3 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se concentró, se diluyó con agua, y el producto se extrajo con DCM (3 × 30 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el producto se purificó por HPLC de fase inversa. ¹H RMN (DMSO, 300 MHz) δ 8,0 (s, 2H),

7,9 (d, $J = 9,9$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 9,9$ Hz, 2H), 7,3-7,1 (m, 6H), 6,8 (m, 2H), 4,8 (s, 4H), 4,62 (m 2H), 4,5-4,4 (m 2H), 4,4-4,0 (m, 4H), 3,7-3,5 (m, 4H), 3,4 (m, 2H), 2,5 (m, 2H), 2,2-1,8 (m, 8H), 1,35 (d, $J = 9,9$ Hz, 6H), 1,05 (d, $J = 5,5$ Hz, 6H), 0,95 (d, $J = 5,5$ Hz, 6H) ppm.

Ejemplo 4

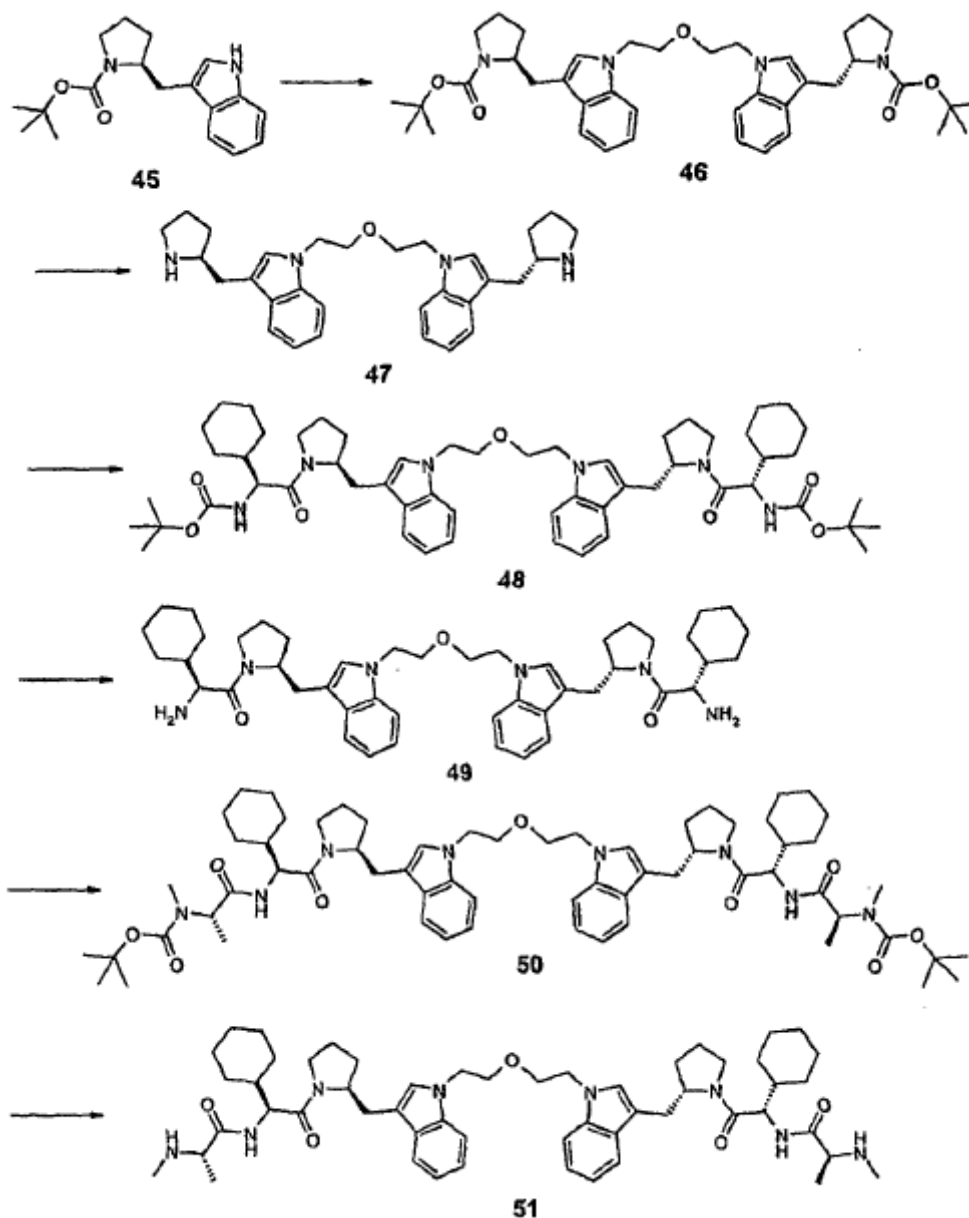


5

Entrada	R8a	R7a	R5a	Esteroequim. en la posición (*)	W _a	W _b	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K _p
119	Me	S-Me	S-tBu	S	H	H	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A
120	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
121	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	H	H	S-iPr	S-Me	Me	H	H	H	A

* Comparativo

Esquema XXI



Preparación de *N*-{1-ciclohexil-2-[2-(1-{2-[2-(3-{1-[2-ciclohexil-2(2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-ilmetil]-indol-1-il)-etoil]-etil}-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil}-2-metilamino-propionamida (**51**):

5 Compuesto (**46**):

A 0°C, se añadió NaH (60%, 0,025 g, 0,62 mmol) a una solución de indol **45** (0,17 g, 0,56 mmol) en DMF anhidro (5 ml). Después de 1 h, se añadieron en rápida sucesión éter bromoetílico (0,16 g, 0,68 mmol) y *n*-Bu₄NCl (0,021 g, 0,05 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó agitando lentamente durante 16 h. La reacción se inactivó mediante la adición de solución acuosa saturada de NH₄Cl y el producto se extrajo con éter dietílico. Los extractos de éter combinados se lavaron repetidamente con agua para eliminar el exceso de DMF y después con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se combinó con material formado en condiciones similares de reacción (0,11 g de **45**, 0,36 mmol) y se purificó por HPLC en fase normal (10-100% de EtOAc/hexano) para proporcionar 0,18 g de **46** como un aceite incoloro y 0,18 g del indol mono-alkilado. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,75-7,66 (m, 2H), 7,25-7,07 (m, 6H), 6,85-6,80 (m, 2H), 4,13 (m, 8H), 3,62 (s ancho, 4H), 3,40-3,15 (m, 4H), 2,63 (m, 2H), 2,04 (s ancho, 4H), 1,53 (s, 18H) ppm.

Compuesto (**47**):

Se enfrió a 0°C una solución que contenía **46** (0,18 g, 0,27 mmoles) en DCM (8 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y la mezcla de reacción se mantuvo a 0°C durante 1 h. La reacción se inactivó mediante la adición cuidadosa de solución acuosa saturada de NaHCO₃ y el producto se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa de NaHCO₃, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar 0,075 g de **47** en forma de un aceite de color amarillo pálido. El producto en bruto se usó directamente en la siguiente reacción. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,49 (s ancho, 2H), 7,57 (d ap., J = 8,2 Hz, 2H), 7,26-7,052 (m, 6H), 6,82 (s, 2H), 4,11 (m, 8H), 3,57 (m, 4H), 3,29-2,96 (m, 6H), 1,95-1,58 (m, 8H) ppm.

Éster terc-butílico del ácido [2-(2-{1-[2-(2-{3-[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-2-ciclohexil-acetil)-pirrolidin-2-ilmetil]-indol-1-il]-etoxi-etil]-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-carbámico (**48**):

A una solución que contenía N-Boc-ciclohexilglicina (0,09 g, 0,34 mmoles) en NMP anhidro (2 ml) se añadió HATU (0,15 g, 0,38 mmol) y N-metilmorfolina (0,042 g, 0,42 mmol). Después de 15 min, se añadió **47** (0,075 g, 0,16 mmol) en NMP anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo con éter dietílico. Los extractos de éter combinados se lavaron repetidamente con agua para eliminar el exceso de NMP, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC de fase normal (50-100% de EtOAc/hexano) para proporcionar 0,085 mg de **48** en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,87 (d, J = 7,62 Hz, 2H), 7,27-7,10 (m, 6H), 6,84 (s, 2H), 5,36 (d, J = 9,37 Hz, 2H), 4,45 (m, 2H), 4,30 (t ap., J = 6,4 Hz, 2H), 4,18-4,12 (m, 6H), 3,70-3,58 (m, 6H), 3,35 (dd, J = 14,0, 2,9 Hz, 2H), 2,41 (dt, J = 11,1, 2,3 Hz, 2H), 2,04-1,57 (m, 20H), 1,44 (s, 18H), 1,37-1,07 (m, 10H) ppm.

2-amino-1-(2-{1-[2-(2-{3-[1-(2-amino-2-ciclohexil-acetil)-pirrolidin-2-ilmetil]-indol-1-il]-etoxi-etil]-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-il)-2-ciclohexil-etanona (**49**):

Se enfrió a 0°C una solución que contenía **48** (0,085 g, 0,08 mmoles) en DCM (8 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y la mezcla de reacción se mantuvo a 0°C durante 30 min. Se añadió una porción adicional de TFA (1 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 0°C. La reacción se inactivó por adición cuidadosa de solución acuosa saturada de NaHCO₃ y el producto se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa de NaHCO₃, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar 0,068 g de **49** en forma de aceite de color amarillo pálido. El producto en bruto se usó directamente en la siguiente reacción. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,90 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,31-7,12 (m, 6H), 6,84 (t ap., J = 14 Hz, 2H), 4,47 (m, rotámero menor), 4,15 (m, 4H), 3,66-3,36 (m, 8H), 2,80 (m, 2H), 2,42 (m, 2H), 2,04-0,83 (m, 30H) ppm.

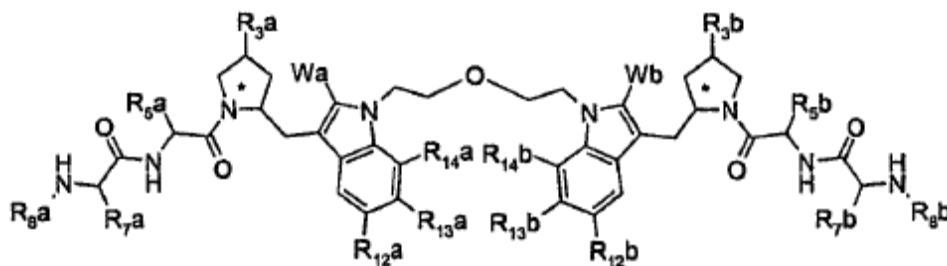
Amida (**50**):

A una solución que contenía N-Boc-N-metilalanina (0,041 g, 0,19 mmol) en NMP anhidro (2 ml) se añadió HATU (0,083 g, 0,21 mmol) y N-metilmorfolina (0,024 g, 0,23 mmol). Después de 15 min, se añadió **49** (0,068 g, 0,09 mmol) en NMP anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo con éter dietílico. Los extractos de éter combinados se lavaron repetidamente con agua para eliminar el exceso de NMP, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se combinó con material formado en condiciones similares de reacción (0,05 g **49**, 0,06 mmol) y se purificó por HPLC en fase normal (10-100% de EtOAc/hexano) para proporcionar 32 mg de **50** en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,86 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,27-7,08 (m, 6H), 6,84 (s, 2H), 4,70 (m, 2H), 4,58 (t ap., J = 7,6 Hz, 2H), 4,19 (m, 2H), 4,15-4,04 (m, 6H), 3,76-3,60 (m, 6H), 3,37 (m, 2H), 2,83 (s, 6H), 2,42 (m, 2H), 1,98-1,55 (m, 20H), 1,51 (s, 18H), 1,33 (d, J = 7,0 Hz, 6H), 1,30-0,98 (m, 10H) ppm.

N-{1-ciclohexil-2-[2-(1-[2-[2-(3-{1-[2-ciclohexil-2-(2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-ilmetil]-indol-1-il]-etoxi-etil]-1H-indol-3-ilmetil]-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]-2-metilamino-propionamida (**51**)

Se enfrió a 0°C una solución que contenía **50** (0,0062 g, 0,055 mmoles) en DCM (8 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y la mezcla de reacción se mantuvo a 0°C durante 1 h. La reacción se inactivó por adición cuidadosa de solución acuosa saturada de NaHCO₃ y el producto se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa de NaHCO₃, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto por HPLC de fase inversa (10-100% de ACN/agua w/0,1% HOAc) para proporcionar 0,047 g de **51**·2HOAc en forma de un sólido blanco después de liofilización. ¹H RMN (DMSO, 300 MHz) δ 7,91 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,05 (m, 2H), 6,99-6,92 (m, 4H), 4,39 (t ap., J = 6,6 Hz, 2H), 4,15 (m, 6H), 3,57 (m, 4H), 3,52-3,23 (m, 4H), 3,06-2,91 (m, 4H), 2,46 (s, 6H), 2,31 (m, 2H), 2,15 (s, 12H), 1,91-1,65 (m, 12H), 1,55-1,49 (m, 8H), 1,07 (d, J = 7,0 Hz, 6H), 1,16-0,93 (m, 10H) ppm.

Ejemplo 5



En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 5 R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 10 R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi o alquilio; u, opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o puente de 2 a 12 átomos de carbono alquilenilo, alquenileno, alquinileno, opcionalmente sustituido donde uno o más átomos de carbono pueden reemplazarse por N, O, o S;

- 15 R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H;

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxilo, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxilo, dialquilamino, amido, sulfonamido, o amidino; y

Wa y Wb son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, CN, CO₂H.

Entrada	R8a	R7a	R5a	Etereoquím. en la posición	Wa	Wb	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K _D
122	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
123	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	F	H	A
124	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	F	H	A
125	Me	S-Et	S-(2R-EtOH)	S	H	H	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Et	Me	F	H	H	B
126	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	F	H	H	A
127	Me	S-Me	S-cHex	S	Me	Me	H	H	S-cHex	S-Me	Me	F	H	H	A
128	Me	S-Et	S-cHex	S	Me	Me	H	H	S-cHex	S-Et	Me	F	H	H	A
129	H	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	H	Cl	H	H	A
130	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	Cl	H	H	A
131	H	S-Me	S-iPr	S	H	H	H	H	S-iPr	S-Me	H	Cl	H	H	A
132	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	H	H	S-iPr	S-Me	Me	Cl	H	H	A
133	Me	S-Me	S-iPr	S	H	H	H	H	S-iPr	S-Me	Me	F	H	H	A
134	H	H	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	H	H	H	F	H	C
135	Me	S-Me	H	S	H	H	H	H	H	S-Me	Me	H	F	H	C
136	Me	S-Et	S-(2R-EtOH)	S	H	H	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Et	Me	H	F	H	C
137	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	Me	Me	H	H	A
138	H	H	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	H	H	H	H	H	B
139	H	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	H	H	H	H	A
140	Me	S-Me	S-tBu	S	H	H	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	F	H	A
141	Me	S-Me	S-tBu	S	H	H	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A
142	H	S-Me	S-tBu	S	H	H	H	H	S-tBu	S-Me	H	H	H	H	A
143	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	S-Me	H	H	H	H	A
144	Me	S-Me	S-cHex	S	H	H	H	H	S-cHex	H	H	H	H	H	A
145 *	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	S	H	H	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	H	H	B
146 *	Me	S-Me	S-(CH ₂) ₄ NH ₂	S	H	H	H	H	S-(CH ₂) ₄ NH ₂	S-Me	Me	Me	H	H	A

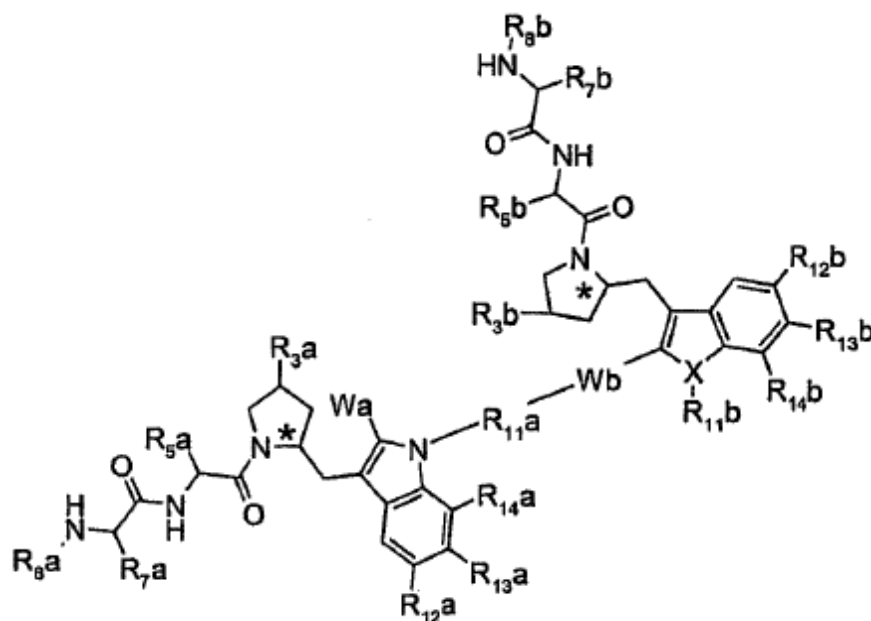
* Comparativo

Ejemplo 6

Entrada	R8a	R7a	R5a	W/a	W/b	Esteroequim. en la posición (a)	R11a-R11b	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K ₀
147	H	S-Me	S-iPr	H	H	S	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	S-iPr	S-Me	H	H	H	H	A
148*	Me	S-Me	S-cHex	H	H	S	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
149*	Me	S-Me	S-tBu	H	H	S	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	S-tBu	S-Me	Me	H	H	H	A
150*	H	S-Me	iPr	H	H	S	(R,R)- CH ₂ CH(OH) CH(OH)CH ₂	H	H	iPr	S-Me	H	H	F	H	A
151*	Me	S-Me	2R- EtOH	H	H	S	(R,R)- CH ₂ CH(OH) CH(OH)CH ₂	H	H	2R- EtOH	S-Me	Me	H	F	H	A
152*	Me	S-Me	2R- EtOH	H	H	S	(S,S)- CH ₂ CH(OH) CH(OH)CH ₂	H	H	2R- EtOH	S-Me	Me	H	F	H	A
153*	Me	S-Me	cHex	H	H	S	CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	cHex	S-Me	Me	H	H	H	B
154*	Me	S-Me	cHex	H	H	S	CH ₂ CH ₂ OCH CH ₂ OCH ₂ C H ₂	H	H	cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
155*	Me	S-Et	cHex	H	H	S	CH ₂ CH ₂ OCH CH ₂ OCH ₂ C H ₂	H	H	cHex	S-Et	Me	H	H	H	B
156*	Me	S-Me	2R- EtOH	H	H	S	CH ₂ CH ₂ OCH CH ₂ OCH ₂ C H ₂	H	H	2R- EtOH	S-Me	Me	H	H	H	A
157*	Me	S-Et	2R- EtOH	H	H	S	CH ₂ CH ₂ OCH CH ₂ OCH ₂ C H ₂	H	H	2R- EtOH	S-Et	Me	H	H	H	B
158*	Me	S-Me	cHex	H	H	S	C(O)CH ₂ CH ₂ CH ₂ C(O)	H	H	cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
159*	Me	S-Me	cHex	H	H	S	C(O)C ₆ H ₄ C O	H	H	cHex	S-Me	Me	H	H	H	A
160*	Me	S-Me	2R- EtOH	H	H	S	CH ₂ CH ₂	H	H	2R- EtOH	S-Me	Me	H	H	H	A
161*	Me	S-Me	2R- EtOH	H	H	S	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	2R- EtOH	S-Me	Me	H	H	H	B

* Comparativo

Ejemplo comparativo 5



En donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo; o R8a y R7a y R8b y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 5 R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R8b y R7a y R7b pueden formar independiente o conjuntamente un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

- 10 R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; o sustituidos opcionalmente cada uno con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltilio; o, en algunos casos, los restos de R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquilenileno, alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o puente de 2 a 12 átomos de carbono de alquilenilo, alquilenileno, alquinileno, opcionalmente sustituido donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados con N, O, o S;

- 15 R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxi, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H;

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxi, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxi, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino;

X es O, N, S, o C=C;

- 20 Wa es H, Cl, Br, F, alquilo, CN, CO₂H;

R11b falta o H, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo, alcoxialquilo.

Wb y R11a juntos son un enlace, alquilenilo, alquilenileno, alquinileno, arilo, arilalquileno, arilalquilalquileno, heteroarilo, heteroarilalquileno, o una cadena de 2 a 12 átomos de carbono de alquilenilo, alquilenileno, alquinileno opcionalmente sustituidos, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados con N, O, o S.

Entrada	R8a	R7a	R5a	Wa	R11b	Stereoquím. en la posición (*)	X	Wb-R11a	R3a	R3b	R5b	R7b	R8b	R12	R13	R14	Intervalo de K ₀
162	Me	S-Me	S-(2R-EtOH)	H	-	S	O	CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	S-(2R-EtOH)	S-Me	Me	H	H	H	D
163	Me	S-Me	S-cHex	H	-	S	O	CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	S-cHex	S-Me	Me	H	H	H	A

En células de mamífero la activación de las caspasas se consigue mediante al menos dos mecanismos independientes que son iniciados por distintas caspasas, pero dan como resultado la activación de caspasas ejecutoras comunes (efectoras). Además del mecanismo activado por el citocromo c (denominado a veces 'ruta intrínseca de muerte'), la "vía extrínseca de muerte" es un mecanismo por el cual la cascada de caspasas se activa a través de la activación de un receptor de muerte situado en la membrana celular. Ejemplos de receptores de muerte comprenden DR4, DR5 y FNT-R1 (así como otros miembros del grupo de FNT de receptores de citocina). Los ligandos correspondientes son de TRAIL y FNT- α , con respecto. La unión de la procaspasa-8 al receptor de muerte provoca la activación automática en donde el prodominio inhibidor de la procaspasa-8 se escinde y elimina. La caspasa-8 se libera en el receptor y puede entonces activar las caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7), y como en la ruta iniciada por la caspasa-9, el resultado es la división proteolítica de dianas celulares por las caspasas efectoras y la inducción de la apoptosis.

La presente invención se refiere en general a peptidomiméticos de Smac, a los métodos de preparación de estos peptidomiméticos de Smac definidos en las reivindicaciones y a sus utilizaciones. En una realización de la presente invención, peptidomiméticos de Smac (en adelante denominados miméticos de Smac) actuar como agentes quimiopotenenciadores. La expresión "agente quimiopotenenciador" se refiere a un agente que actúa para aumentar la sensibilidad de un organismo, tejido, o célula a un compuesto químico, o tratamiento es decir, "agentes quimioterapéuticos" o "quimiofármacos" o radioterapia. Una realización de la invención es la composición terapéutica de un mimético de Smac como se define en las reivindicaciones. Una realización adicional de la invención es la composición terapéutica de dicho mimético de Smac, que puede actuar como agente quimiopotenenciador y un agente biológico o quimioterapéutico o radiación. Se expone además un método para inhibir el crecimiento del tumor *in vivo* mediante la administración de un peptidomimético de Smac. Se expone además un método para inhibir el crecimiento del tumor *in vivo* mediante la administración de un mimético de Smac y un agente biológico o quimioterapéutico o quimiorradiación. Se expone además un método de tratamiento de un paciente con un cáncer mediante la administración de miméticos de Smac de la presente invención solos o en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico o quimiorradiación.

Los agentes biológicos y quimioterapéuticos adecuados que se pueden administrar simultáneamente con miméticos de Smac comprenden agentes alquilantes, alcaloides vegetales, antibióticos antitumorales, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa, agentes hormonales, FAINE, factores de crecimiento, citocinas, inhibidores mitóticos y combinaciones de éstos.

Convenientemente, las células están *in situ* o en un individuo, y la etapa de contacto se ve afectada por la administración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del mimético de Smac en donde el individuo puede estar sometido a la radiación o quimioterapia simultánea o previa para el tratamiento de una patología neoproliferativa. Las células patógenas son de un tumor tales como, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer renal, hepatoma, melanoma, linfoma, sarcoma y sus combinaciones. Sin embargo, las células también pueden ser células tumorales inmortalizadas utilizadas en el cultivo de células tumorales.

También pueden utilizarse miméticos de Smac para tratar enfermedades autoinmunitarias. Además de los defectos de la apoptosis que se encuentran en los tumores, los defectos en la capacidad de eliminar células autorreactivas del sistema inmunitario debido a la resistencia a la apoptosis se considera que desempeñan una función clave en la patogenia de enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por que las células del sistema inmunitario producen anticuerpos contra sus propios órganos y moléculas o atacan directamente los tejidos dando como resultado la destrucción de estos últimos. Un fallo de estas células autorreactivas para experimentar apoptosis conduce a la manifestación de la enfermedad. Defectos en la regulación de la apoptosis se han identificado en enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso diseminado o la artritis reumatoide.

En una realización, el patógeno comprende además células que proliferan anormalmente, tales como las de cualquier enfermedad o enfermedades autoinmunitarias que son resistentes a la apoptosis debido a la sobreexpresión de IAP o miembros de la familia Bcl-2 de proteínas. Ejemplos de dichas enfermedades autoinmunitarias comprenden pero no se limitan a las enfermedades del colágeno, tales como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso diseminado, el síndrome de Sharp, el síndrome de CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, telangiectasia), dermatomiositis, vasculitis (síndrome de Wegener) y síndrome de Sjögren, enfermedades renales tales como el síndrome de Goodpasture, la glomerulonefritis que evoluciona rápidamente y la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II, enfermedades endocrinas como la diabetes de tipo I, la poliendoocrinopatía autoinmunitaria-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED), paratiroidismo autoinmunitario, anemia perniciosa, insuficiencia gonadal, enfermedad idiopática de Addison, hipertiroidismo, tiroiditis de Hashimoto y mixedema primario, enfermedades de la piel tales como el pénfigo común, pénfigoide ampolloso, herpes gestacional, la epidermolisis ampollosa y eritema multiforme mayor, enfermedades del hígado, tales como la cirrosis biliar primaria, colangitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria tipo 1, hepatitis autoinmunitaria tipo 2, colangitis esclerosante primaria, enfermedades neuronales, como la esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuromiotonía adquirida, síndrome de Guillain-Barré (síndrome de Müller-Fischer), síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelosa, ataxia, opsoclono, neuropatía sensorial y la acalasia, enfermedades de la sangre como la anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática (síndrome de Werthof),

enfermedades infecciosas con reacciones autoinmunitarias asociadas, tales como el SIDA, la malaria y la enfermedad de Chagas.

Las composiciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un mimético de Smac de la invención en forma farmacéutica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el mimético de Smac inhibe la actividad de un IAP, estimulando por lo tanto, la apoptosis. Otra realización de la presente invención son composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del mimético de Smac en la forma farmacéutica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico y/o radioterapia, en donde el mimético de Smac inhibe la actividad de un IAP, estimulando así la apoptosis y aumentando la eficacia de la quimioterapia y/o radioterapia.

Los métodos de preparación de composiciones farmacéuticas que contienen miméticos de Smac también están abarcados en la presente invención y comprenden, pero no se limitan a la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz del mimético de Smac con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención una composición terapéutica para estimular la apoptosis tiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un peptidomimético de Smac que se une al menos a un IAP. En una realización, el IAP puede ser XIAP. En otra realización, el IAP puede ser ML-IAP. En otra realización, el IAP puede ser CIAP-1 o CIAP-2. En otra realización, el IAP puede ser múltiples tipos de IAP.

Se describe además un método de tratamiento de un paciente con una afección en necesidad del mismo, en donde la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un peptidomimético de Smac se suministra al paciente, y el peptidomimético de Smac se une al menos a un IAP. En una realización, el IAP puede ser XIAP. Convenientemente, el IAP puede ser ML-IAP. Convenientemente, el IAP puede ser CIAP-1 o CIAP-2. Convenientemente, el IAP puede ser múltiples tipos de IAP. El método puede comprender además la administración simultánea del agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser, pero no se limita a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, taxanos, agentes hormonales, anticuerpos monoclonales, glucocorticoides, inhibidores de la mitosis, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, agentes inmunomoduladores, factores de crecimiento celular, citocinas y compuestos antiinflamatorios no esteroideos.

Los miméticos de Smac se administran preferiblemente en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es aquella cantidad de un preparado que solo, o junto con otras dosis, produce la respuesta deseada. Esto puede implicar sólo retardar la evolución de la enfermedad temporalmente, aunque preferiblemente, se trata de detener la evolución de la enfermedad de forma permanente o retrasar la aparición de la enfermedad o de prevenirla o de que se produzca la enfermedad. El seguimiento de esto se puede hacer por métodos rutinarios. Generalmente, las dosis de compuestos activos serían de aproximadamente 0,01 mg/kg al día a 1000 mg/kg al día. Es de esperar que las dosis que van desde 50 a 500 mg/kg sean adecuadas, preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular o intradérmica, y en una o varias administraciones al día. La administración del peptidomimético de Smac puede tener lugar a la vez, después, o antes de la quimioterapia o la radiación siempre que el agente quimioterapéutico o la radiación sensibilice el sistema al peptidomimético de Smac.

En general, la experimentación de rutina en ensayos clínicos determinará rangos específicos para el efecto terapéutico óptimo para cada agente terapéutico y cada protocolo de administración, y la administración a pacientes específicos se ajustará a dentro de márgenes eficaces y seguros dependiendo de la afección del paciente y la capacidad de respuesta a las administraciones iniciales. Sin embargo, el protocolo de administración final se regulará según el criterio del médico considerando factores tales como edad, afección y estatura del paciente, las potencias de peptidomiméticos de Smac, la duración del tratamiento y la gravedad de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, una posología del peptidomimético de Smac puede ser la administración oral de 1 mg a 2000 mg/día, preferiblemente de 1 a 1000 mg/día, más preferiblemente de 50 a 600 mg/día, en dos a cuatro (preferiblemente dos) dosis divididas, para reducir el crecimiento del tumor. La terapia intermitente (p. ej., una de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas) puede utilizarse también.

En el caso de que una respuesta en un paciente sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, las dosis más altas (o dosis de eficacia mayor por una vía de administración diferente más localizada) se pueden emplear en la medida en que las tolere el paciente. Se contemplan múltiples dosis al día para conseguir concentraciones generales apropiadas de los compuestos. Generalmente, se utiliza una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el criterio médico razonable. Cualquier experto en la técnica entenderá, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o prácticamente por cualquier otra razón.

Se encuentran a disposición varias vías de administración. El modo concreto seleccionado dependerá, por supuesto, del fármaco quimioterapéutico concreto seleccionado, de la gravedad de la afección en tratamiento y de la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, generalmente hablando, pueden ponerse en práctica utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca concentraciones eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos secundarios clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración comprenden, pero no se limitan a, las vías oral, rectal,

tópica, nasal, intradérmica, por inhalación, intraperitoneal, intravesical o parenteral. El término "parenteral" comprende la subcutánea, intravenosa, intramuscular o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular son particularmente adecuadas por lo que respecta a la presente invención.

En un aspecto de la invención, un peptidomimético de Smac como se describe en la presente memoria, con o sin agentes biológicos o quimioterapéuticos adicionales o radioterapia, no afecta negativamente a los tejidos normales, si bien sensibiliza las células tumorales a los protocolos quimioterapéuticos/de radiación adicionales. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, parece que debido a esto la apoptosis inducida específica del tumor, marcados y los efectos secundarios adversos tales como la vasodilatación inapropiada o el choque se reducen al mínimo. Preferiblemente, la composición o el método se diseña para permitir la sensibilización de la célula o tumor a la quimioterapia o la radioterapia mediante la administración de al menos una porción del peptidomimético de Smac antes de la quimioterapia o radioterapia. La radioterapia, y/o la inclusión de agentes quimioterapéuticos, puede incluirse como parte del régimen terapéutico para potenciar aún más la destrucción de células tumorales por el peptidomimético de Smac.

En formas de realización alternativas, se administran miméticos de Smac en combinación con una segunda forma de terapia que comprende, pero no se limita a la segunda terapia seleccionada de entre radioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica, quimioterapia y una de sus combinaciones.

Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer administrados en combinación con miméticos de Smac pueden ser cualquier agente terapéutico que se dirija específicamente a tejido tumorigénico o a células y comprenden, pero no se limitan a agentes alquilantes, alcaloides vegetales, antibióticos antitumorales, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa y como por ejemplo altretamina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, melfalán, mecloretamina, oxaliplatino, procarbazona, estreptozocina, temozolomida, tiotepa, uramustine, docetaxel, etopósido, irinotecán, paclitaxel, tenisopida, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, epirubicina, hidroxiaurea, idarrubicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, azatioprina, capecitabina, cladribina, citarabina, fludarabina, fluorouracilo, floxuridina, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, nelarabina, pemetrexed, pentostatina, tioguanina, camptotecina, topotecán, BNP 1350, SN 38, 9-amino-camptotecina, lurtotecán, gimatecán, diflomotecán, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, nemorrubicina, mitoxantrona, loxoxantrona, etopósido y combinaciones de los mismos.

Los miméticos de Smac descritos en la presente memoria también se pueden administrar simultáneamente con agentes inmunoterapéuticos. La inmunoterapia comprende la administración de un agente inmunológicamente activo seleccionado de entre el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), interferón y otros agentes que activan específicamente el sistema inmunitario de los pacientes afectados y sus combinaciones.

Composiciones farmacéuticas.

Otro agente biológico, quimioterapéutico o antineoplásico (más adelante) y/o radiación se pueden añadir antes de, junto con, o tras la administración de un mimético de Smac. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se emplea en la presente memoria significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles que son adecuadas para la administración a un ser humano. El término "vehículo" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas pueden mezclarse con las moléculas de la presente invención, y entre sí, de tal manera que no hay interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Los sistemas de administración de la invención están diseñados para incluir sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada o liberación mantenida de tal manera que la liberación del peptidomimético de Smac se produce antes y con tiempo suficiente, para provocar sensibilización del sitio a tratar. Un peptidomimético de Smac puede ser utilizado junto con radiación y/o agentes químicos contra el cáncer adicionales (anteriormente). Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas del compuesto peptidomimético de Smac, aumentando la comodidad para el paciente y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas composiciones de la presente invención.

Muchos tipos de sistemas de suministro de liberación están disponibles y conocidos por cualquier experto en la técnica y pueden ser utilizados en el contexto de la presente invención como por ejemplo, pero sin limitarse a los sistemas de base de polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.075.109. Los sistemas de administración también comprenden sistemas no poliméricos que son: lípidos que comprenden esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas Sylastic; sistemas a base de péptidos; recubrimientos de cera; comprimido que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos comprenden, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el compuesto activo está contenido en una forma dentro de una matriz tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 4.452.775, n° 4.667.014,

n° 4.748.034 y n° 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo penetra a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de EE.UU. n° 3.832.253 y n° 3.854.480. Además, los sistemas de suministro de hardware a base de bomba pueden utilizarse, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

- 5 El uso de un implante de liberación mantenida a largo plazo puede ser deseable. La liberación a largo plazo, como se emplea en la presente memoria, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar concentraciones terapéuticas del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por cualquier experto en la técnica y comprenden algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.
- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos comprenden la etapa de poner el agente activo en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes o excipientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, si es necesario, dando forma al producto.
- 15

En una realización de la invención, los peptidomiméticos diméricos descritos anteriormente se combinan con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente un preparado acuoso estéril de un agente quimiopotenciador (p. ej., peptidomimético de Smac), que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Este preparado acuoso puede formularse según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. El preparado inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión. Por lo que respecta a esto, puede emplearse cualquier aceite fijo suave entre ellos mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. La formulación de vehículo adecuado para las administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. se puede encontrar en de Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.
- 25

- 30 Agentes quimioterapéuticos adicionales.

- Los agentes quimioterapéuticos adecuados para su utilización en combinación con la presente invención, comprenden, pero no se limitan a los agentes quimioterapéuticos descritos en "Modern Pharmacology with Clinical Applications", sexta edición, Craig y Stitzel, cap. 56, págs. 639-656 (2004). Esta referencia describe fármacos quimioterapéuticos para incluir agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, productos procedentes de plantas tales como taxanos, enzimas, agentes hormonales tales como glucocorticoides, agentes heterogéneos tales como cisplatino, anticuerpos monoclonales, agentes inmunomoduladores, tales como interferones, y factores de crecimiento celular. Otras clasificaciones adecuadas para los agentes quimioterapéuticos comprenden inhibidores de la mitosis y análogos antiestrógenos no esteroideos. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados comprenden inhibidores de topoisomerasa I y II, inhibidores de cinasa y cualquier agente capaz de activar la ruta apoptótica extrínseca o intrínseca o la liberación de Smac de las mitocondrias.
- 35
- 40

- Los ejemplos específicos de agentes biológicos y quimioterapéuticos adecuados comprenden, pero no se limitan a, cisplatino, carmustina (BCNU), 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), gemcitabina, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, dexametasona, topotecán, etopósido, paclitaxel, vincristina, tamoxifeno, FNT-alfa, TRAIL, interferón (tanto en sus formas alfa como beta), talidomida y melfalán. Otros ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos adecuados comprenden mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, etileniminas, triazenos, antagonistas de folato, análogos de purina, análogos de pirimidina, antraciclinas, bleomicinas, mitomicinas, dactinomycinas, plicamicina, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos, glucocorticoides, L-asparaginasa, estrógenos, andrógenos, progestinas, hormonas luteinizantes, acetato de octreotida, hidroxiurea, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina, carboplatino, mitoxantrona, anticuerpos monoclonales levamisol, interferones, interleucinas, filgrastim y sargramostim. Las composiciones quimioterapéuticas también comprenden otros miembros, es decir, aparte de TRAIL, de la superfamilia del FNT de compuestos o agentes tales como BCG que provocan la síntesis de quimiocinas después del tratamiento intravesical. Los FAINTE también pueden usarse en combinación con los miméticos de Smac de la presente invención y pueden incluir inhibidores de COX-2 selectivos y no selectivos, celecoxib y rofecoxib.
- 45
- 50

- 55 Protocolos de radioterapia

Además, el presente peptidomimético de Smac puede utilizarse en relación con la quimiorradiación u otros protocolos de tratamiento del cáncer que se utilizan para inhibir el crecimiento de las células tumorales. Por ejemplo, pero sin limitarse a, terapia de radiación (o radioterapia) es el uso médico de la radiación ionizante como parte del

tratamiento del cáncer para controlar las células malignas es adecuado para su uso en realizaciones de la presente invención. Aunque la radioterapia se utiliza a menudo como parte del tratamiento curativo, se utiliza en ocasiones como un tratamiento paliativo, cuando la curación no es posible y el objetivo es para el alivio sintomático. La radioterapia se utiliza frecuentemente para el tratamiento de tumores. Puede utilizarse como terapia primaria. También es frecuente combinar la radioterapia con cirugía y/o quimioterapia. Los tumores más frecuentes tratados con radioterapia son el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de recto, cánceres de cabeza y cuello, tumores ginecológicos, cáncer de vejiga y el linfoma. La radioterapia se aplica normalmente sólo al área localizada afectada por el tumor. A menudo, los campos de radiación también comprenden los ganglios linfáticos de drenaje. Es posible, aunque poco frecuente dar radioterapia a todo el cuerpo, o a toda la superficie de la piel. La radioterapia se administra generalmente todos los días durante un máximo de 35 a 38 fracciones (una dosis diaria es una fracción). Estas pequeñas dosis frecuentes permiten que las células sanas vuelvan, a crecer, reparando el daño infligido por la radiación. Tres divisiones principales de la radioterapia son la radioterapia de haz externo o teleterapia, braquiterapia o radioterapia de fuente sellada y radioterapia fuente no sellada, que son todos los ejemplos adecuados de protocolo de tratamiento de la presente invención. Las diferencias se refieren a la posición de la fuente de radiación; externa está fuera del cuerpo, mientras que radioterapia de fuente sellada y no sellada tiene materiales radiactivos suministrados internamente. Las fuentes selladas de braquiterapia se suelen extraer después, mientras que las fuentes no selladas se inyectan en el cuerpo. La administración de peptidomimético de Smac se puede producir antes de, simultáneamente con el protocolo de tratamiento.

La afinidad de unión relativa de un tetrapéptido de Smac (AVPI) y un potente mimético de Smac (Entrada 17) por XIAP BIR-3 se muestra en la La Fig. 1. Esta cifra pone de manifiesto el notable aumento de la afinidad de unión, un aumento de 30.000 veces, de la entrada 17 del mimético de Smac en relación con el tetrapéptido de Smac.

La vida media de 3 miméticos de Smac, entrada 1, entrada 122 y la entrada 123, se examinó en una rata. La dosis IV para cada mimético de Smac fue de 1 mg/kg. La Fig. 2 demuestra que la vida media de eliminación terminal es de hasta aproximadamente 6 horas para los miméticos de Smac, teniendo la entrada 1 la vida media más larga.

Agentes biológicos y quimioterapéuticos/antineoplásicos y la radiación provocan apoptosis al activar las rutas apoptóticas extrínseca o intrínsecas, y dado que los miméticos de Smac alivian a los inhibidores de proteínas apoptóticas (los IAP) y, por lo tanto, eliminan el bloque en la apoptosis, la combinación de agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos y radiación con miméticos de Smac deben actuar sinérgicamente para facilitar la apoptosis. Para mostrar los efectos sinérgicos de los miméticos de Smac con agentes quimioterapéuticos comunes, se seleccionó un panel de diversas estirpes de células tumorales y se ensayaron compuestos representativos de varias clases mecanicistas de agentes quimioterapéuticos, así como la radiación gamma.

Un ensayo MTT de 72 horas, como el descrito previamente por Hansen, M. B., Nielsen, S. E., y Berg, K. ((1989) *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210), se utilizó para diferenciar entre un efecto específico frente a uno no específico en la destrucción de células por miméticos de Smac. En resumen, se sembraron células SK-OV-3 en placas de 96 pocillos en medio de McCoy que contenía 10% de albúmina de suero fetal bovino (20.000 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se añadieron los compuestos de ensayo a diversas concentraciones (0,003 -10 µM) y las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas más. 50 microlitros de 5 mg/ml de reactivo MTT a continuación, se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 3 horas. Al final del periodo de incubación, se añadieron 50 microlitros de DMSO a cada pocillo para disolver las células y se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos utilizando un lector de microplacas (Victor² 1420, Wallac, Finlandia) a 535 nm. Se calculó la supervivencia celular (SC) mediante la siguiente ecuación

$$SC = (DO \text{ de pocillos tratados} / \text{media de DO de pocillos de referencia}) \times 100\%$$

Se probó la entrada 116 de mimético de Smac usando una estirpe celular de cáncer de ovario, SK-OV-3, y células MRC-5 se utilizaron como referencia de las células normales. La Fig. 3 de muestra que la entrada 116 es 100,000 veces más eficaz en la destrucción de las células tumorales después de las referencias negativas mientras que las células normales (no tumorígenas) permanecen inafectadas.

La CE₅₀, definida como la concentración de fármaco que produce 50% de CS, se obtuvo calculando el punto donde la curva de respuesta a la dosis cruza el punto 50% de CS utilizando GraphPad Prism. Estos resultados sugieren que los miméticos de Smac que se unen a XIAP pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer, ya sea como monoterapia o en combinación con agentes quimioterapéuticos.

Tinción con anexina V/yoduro de propidio

Para mostrar la capacidad de los miméticos de Smac para provocar apoptosis, se realizó la tinción con anexina V-isotiocianato de fluoresceína. En resumen como para el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA), las células se expusieron a diversas concentraciones de miméticos de Smac durante 18-24 horas. y a continuación se retiraron de la placa de ensayo por tripsinización. Se sedimentaron las células a continuación y se volvieron a poner en suspensión en tampón de ensayo (suministrado por el fabricante). Se añadieron anexina V y yoduro de propidio a los preparados celulares y se incubaron durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadió más tampón (200 µl) a cada tubo, y las muestras se analizaron inmediatamente por citometría

de flujo. En presencia de miméticos de Smac, se favoreció fuertemente la apoptosis, según lo evaluado por tinción con anexina/PI y se analizaron por citometría de flujo. La ampliación en el número de células apoptóticas (cuadrante derecho inferior anexina V positiva/yoduro de propidio negativo) por los antagonistas de IAP en comparación con la referencia era en función de la dosis y debida a la inducción de apoptosis y no por aumento de la proporción de células necróticas.

Mimético de Smac con efecto quimiopotenciador utilizando células de melanoma que se ha demostrado que son resistentes a los efectos apoptóticos de TRAIL, un fármaco quimioterapéutico (Chawla-Sarkar. *Clin. Cancer Res.* (2001). Los ensayos para la proliferación celular (ensayo MTT, Fig. 4) pusieron de manifiesto que cuando células MDA-MB-231, estirpe celular de cáncer de mama, se trataron con un peptidomimético de Smac de la invención, Entrada 1 sola, las células eran resistentes a los efectos antiproliferativos del mimético de Smac de la invención. Por el contrario, cuando se utilizó la Entrada 1 en combinación con TRAIL hubo un aumento de 1.000 veces en el efecto antiproliferativo que produce un aumento de 100 veces en la destrucción de células detectado por la pérdida correspondiente en la formación de colonias. Un peptidomimético de referencia (Entrada 62) no pudo sinergizar con TRAIL y los resultados (datos no mostrados) indican que no hay actividad antiproliferativa de la Entrada 62 sola o en combinación con TRAIL. TRAIL solo provoca poca, si es que alguna, apoptosis de las células MDA MB-231 después de 4 horas. El tratamiento con la Entrada 121 sola tampoco pudo provocar apoptosis significativa (aproximadamente del 10% del total de células). Por el contrario, una combinación de TRAIL con la Entrada 121 dio como resultado un aumento de 4 veces en la actividad apoptótica después de 4 horas.

La capacidad de las células para formar colonias viables se analizó mediante la adición de diversas concentraciones del compuesto en la presencia y ausencia de 0,4 ng/ml de TRAIL. En resumen, se sembraron células a razón de 100 células por pocillo en un formato de 12 pocillos en 2 ml de medio de crecimiento. El medio se retira después de veinticuatro horas y se reemplaza por miméticos de Smac a diversas concentraciones en medio de crecimiento con DMSO al 1%. Después de 72 horas de ensayo, las concentraciones se retiran y se reemplazan con 2 ml. de medio de crecimiento. Las placas se devuelven a la incubadora durante 7-10 días en cuyo periodo las colonias se han multiplicado por al menos 10 células por colonia que pueden contarse a simple vista. Las placas se tiñen con una solución de cristal violeta al 0,01% (peso:vol. en H₂O) durante treinta minutos. Las placas se lavan con agua del grifo para eliminar cualquier cristal violeta residual, se secan y se cuentan las colonias. Los datos de inhibición se analizaron usando la ecuación sigmoidea de dosis-respuesta (pendiente variable) en GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). El 50% de la concentración inhibidora (EC₅₀) era la concentración de fármaco que disminuyó la actividad enzimática en un 50% con respecto a las muestras de referencia sin fármaco.

Se observó sinergia con topotecán y camptotecina, dos ejemplos de inhibidores de topoisomerasas en un estudio de citotoxicidad en células T98G. La mayor cantidad de sinergia es 50-60% más muerte celular que la que sería de esperar añadir la citotoxicidad de cada compuesto solo. Los resultados demuestran que tanto topotecán como camptotecina puede actuar sinérgicamente con un mimético de Smac de la invención, tal como la Entrada 1, para una potenciación de la apoptosis. El volumen sinérgico total fue de 457, siendo el sinergismo mayor aproximadamente el 30%-40% más muerte celular que la que sería de esperar añadiendo juntas las citotoxicidades individuales de Smac y topotecán, entre la Entrada 1 y un inhibidor de topoisomerasa, tal como topotecán.

Para evaluar además las posibles interacciones fármaco-fármaco una matriz de las permutaciones de diluciones en serie dos veces de cada fármaco y un mimético de Smac se probaron, así como la actividad de cada compuesto solo usando un programa llamado MacSynergy II (Prichard, M.N., K.R. Aseltine y C. Shipman, Jr. 1993. MacSynergy II. User's manual. Univ. de Michigan, Ann Arbor). Se probó la sinergia con paclitaxel y el peptidomimético de Smac Entrada 122 en las células OVCAR3. La cantidad más alta de sinergia detectada es del 10-20%, lo que indica una muerte celular mayor que la que sería de esperar al sumar de la citotoxicidad de cualquier compuesto solo.

Los taxanos son compuestos que inhiben la mitosis obstaculizando la despolimerización del husillo a base de microtúbulos. Estos datos fueron generados ensayando varias concentraciones de un taxano común, paclitaxel, y un mimético de Smac. La dosis de paclitaxel oscilaba entre aproximadamente 0,0 y aproximadamente 500,0 nM. Para la entrada 122, el intervalo de dosis fue aproximadamente de 125,0 a aproximadamente 8.000,0 nM. El volumen sinérgico total fue aproximadamente 170.

El mecanismo de acción de los compuestos que contienen platino Se cree que es al unirse al ADN e interferir con su mecanismo de reparación, que finalmente llevan a la muerte celular. Se probó la sinergia con cisplatino y los peptidomiméticos de Smac en células OVCAR-3. La cantidad más alta de sinergia es 40-50% más muerte celular que la que sería de esperar al sumar la citotoxicidad de cada compuesto solo. Estos datos fueron generados al probar varias concentraciones de cisplatino y fármacos miméticos de Smac. Para el cisplatino el intervalo de dosificación fue de aproximadamente 0,0 a aproximadamente 166.500,0 nM. Para la entrada 122, el intervalo de dosis fue aproximadamente 500,0 a aproximadamente 32.000,0 nM. El volumen sinérgico total fue aproximadamente 434. Pruebas similares se realizaron con la combinación de carboplatino y miméticos de Smac. La sinergia entre un peptidomimético de Smac, Entrada 122, y carboplatino.

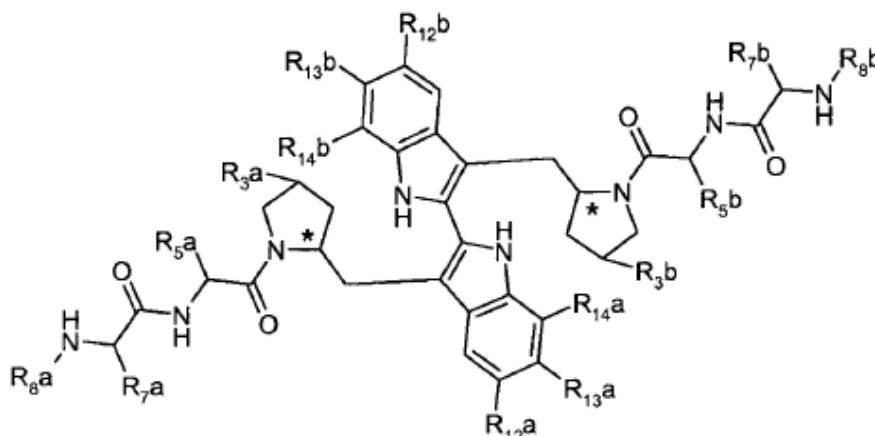
Esta potente sinergia hace posible la utilización de los peptidomiméticos de Smac, que son antagonistas de IAP, para mejorar la eficacia de los compuestos antitumorales comercializados (tales como, pero sin limitarse a paclitaxel, cisplatino y carboplatino). Esta efectuado permitirá la reducción de la dosis requerida de los compuestos

antitumorales mal tolerados y/o mejorar la velocidad de respuestas a las dosis comercializadas.

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es capaz de variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula siguiente:



en donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo o haloalquilo; o R8a y R7a forman un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina y R8b y R7b forman un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, en donde cada alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo está opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, mercapto, carboxilo, alquilo, alcoxi, amino, y nitro; o R8a y R7a forman un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina y R8b y R7b forman un anillo tal como un anillo de aziridina o azetidina;

R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, carboxilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, o alquiltio; u, opcionalmente, R5a y R5b están conectados por un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno de 2 a 12 átomos de carbono o puente de 2 a 12 átomos de carbono de alquilenilo, alquenileno, alquinileno, opcionalmente sustituido, donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por N, O, o S;

R12a, R12b, R13a, R13b, R14a y R14b son independientemente H, Cl, Br, F, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, ciano o CO₂H;

y

R3a y R3b son independientemente H, halógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, amino, arilamino, arilalquilamino, hidroxilo, alquiloxi, ariloxi, arilalquilhidroxilo, dialquilamino, amido, sulfonamido o amidino,

en donde alquilo significa un grupo ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, tal como alquenilo o alquinilo, que tiene hasta 12 átomos de carbono a menos que se especifique lo contrario,

en donde amino indica aminas primarias, secundarias y terciarias,

en donde alquenil comprende un radical hidrocarburo ramificado, hidrocarburo cíclico o hidrocarburo no ramificado de 2 a 30 átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono, y

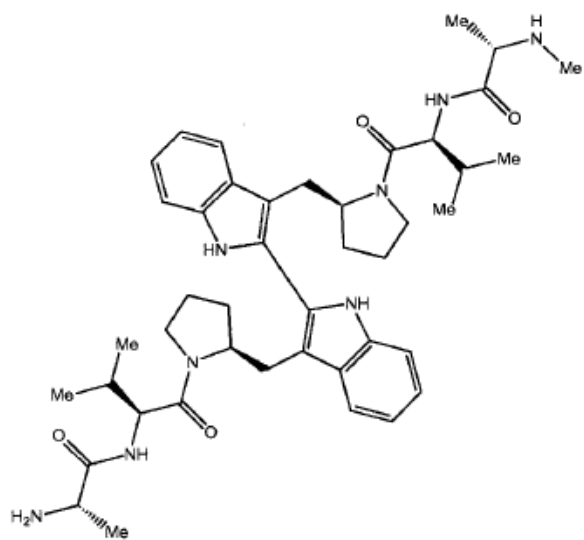
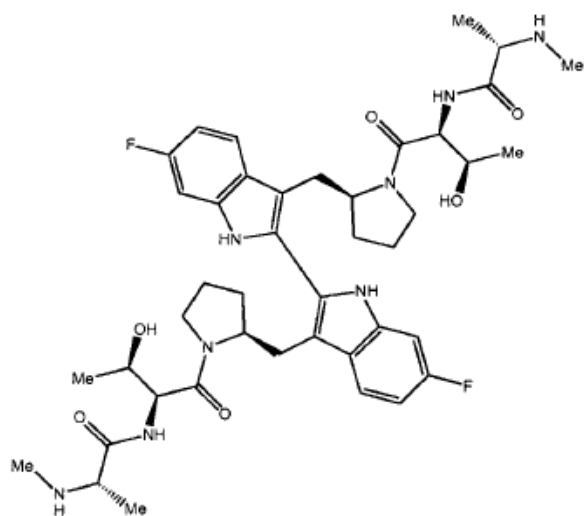
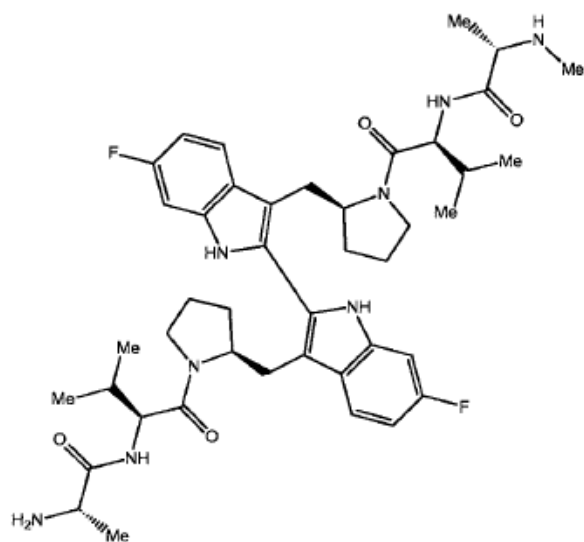
en donde alquinil se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace.

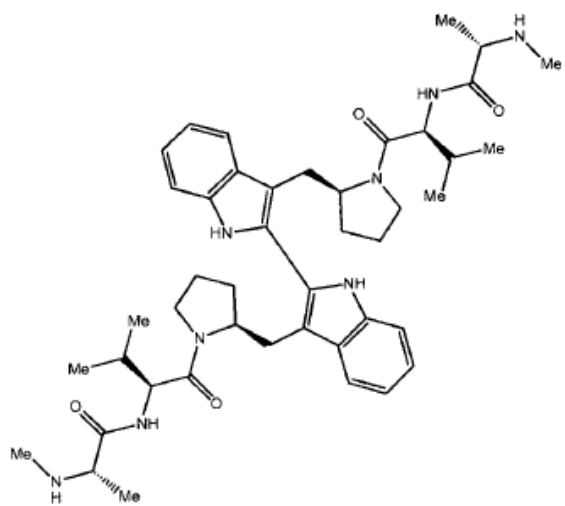
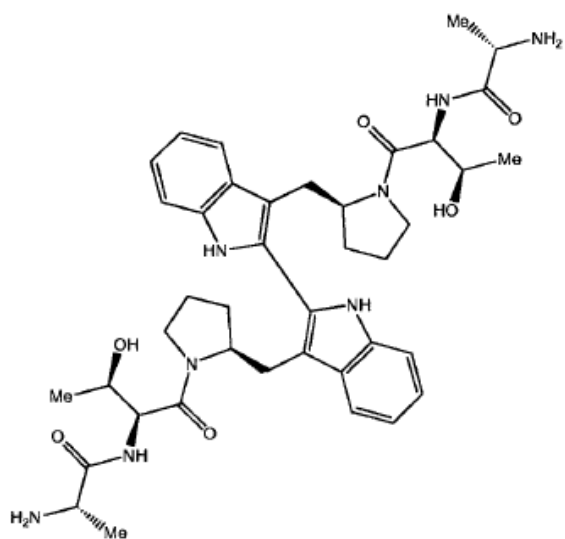
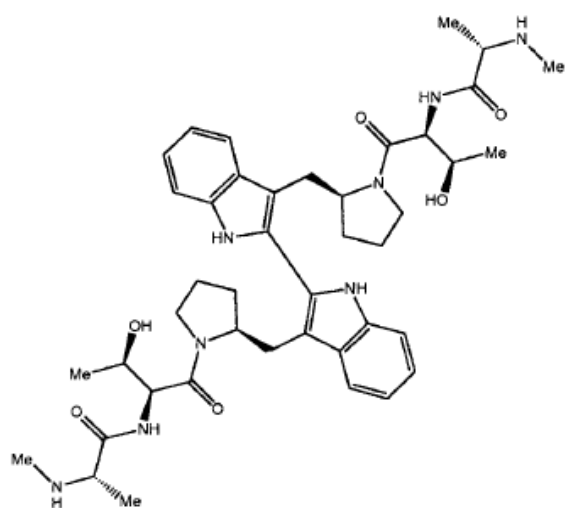
2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde R7a y R7b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo o haloalquilo.

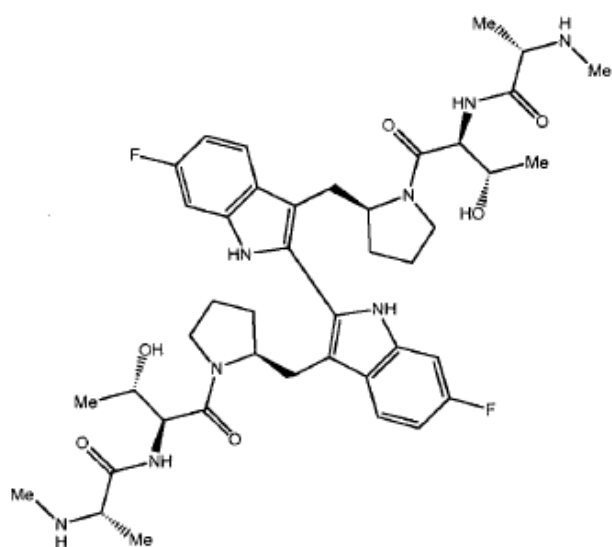
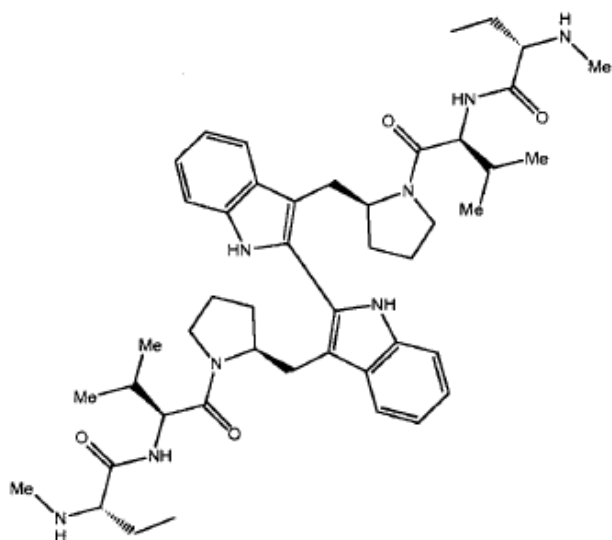
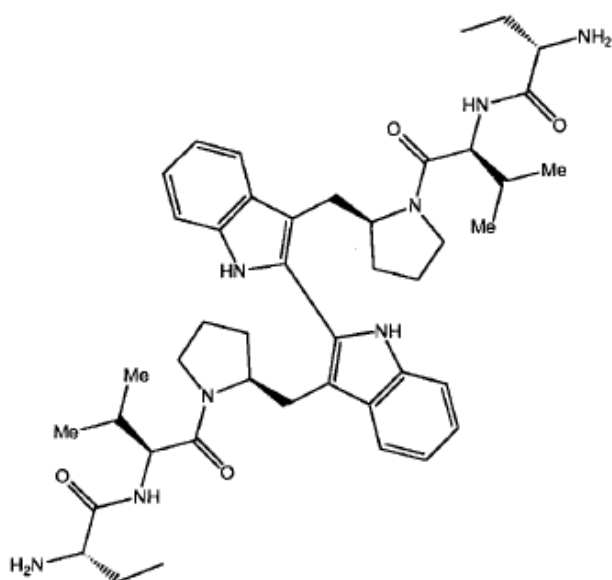
3. El compuesto según la reivindicación 1, en donde R8a y R8b son independientemente H, hidroxilo, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o heteroalquilo.

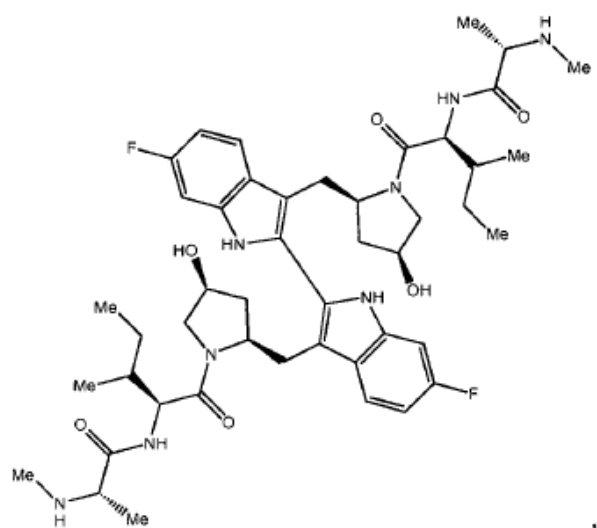
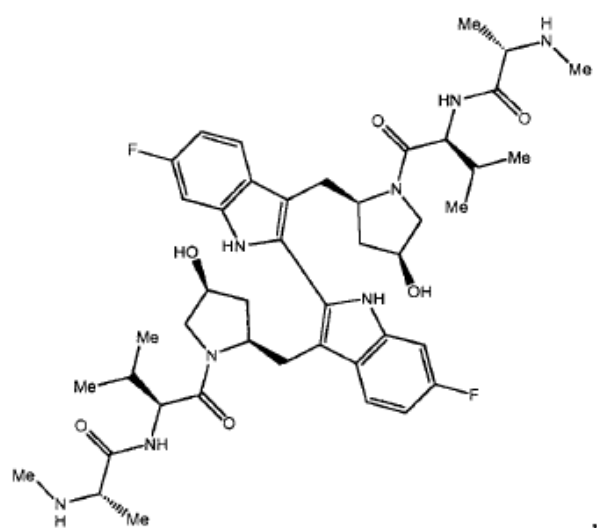
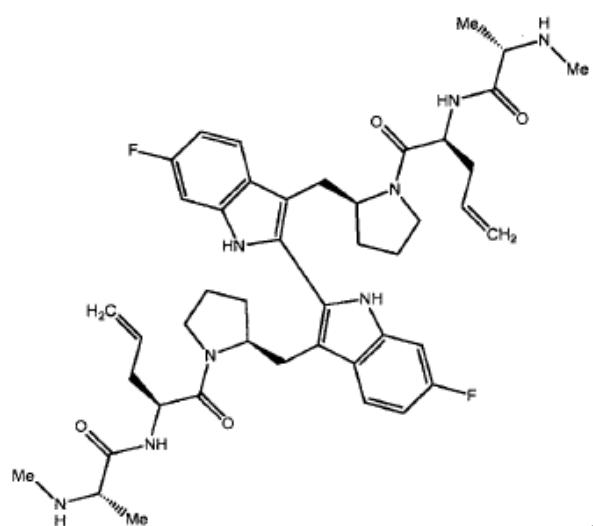
4. El compuesto según la reivindicación 1, en donde R5a y R5b son independientemente H, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

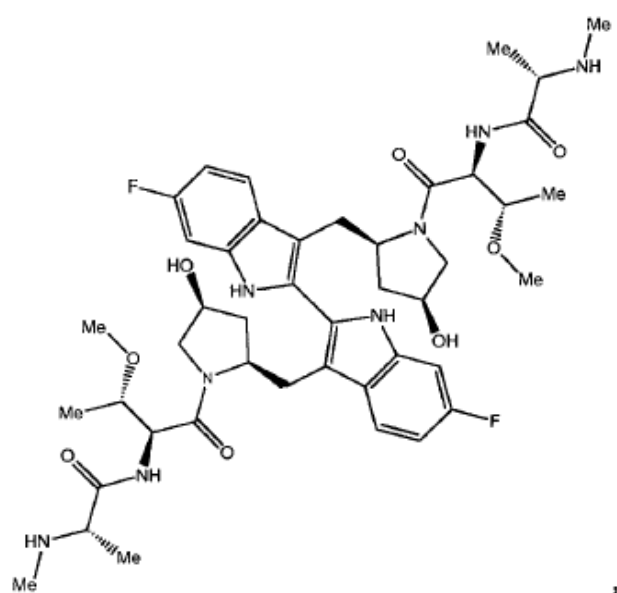
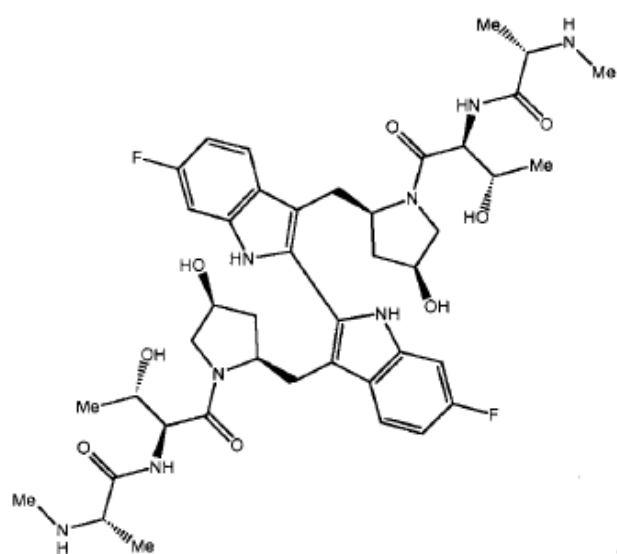
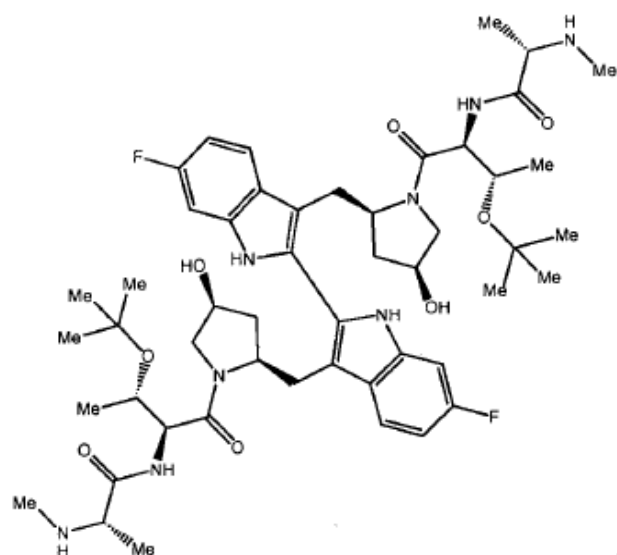
5. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo consistente en:

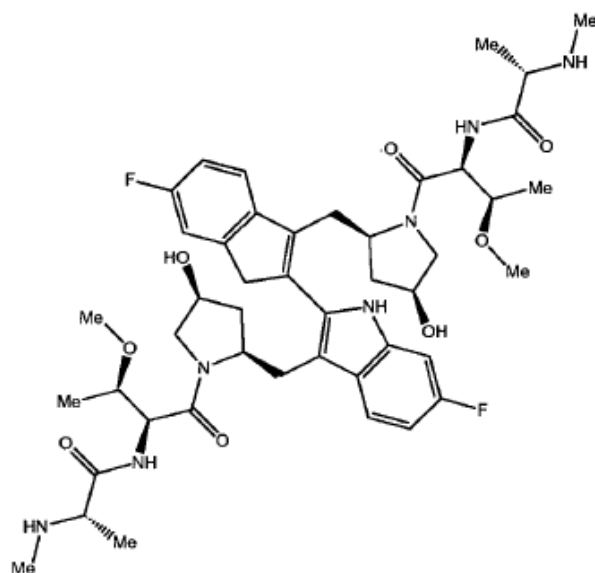




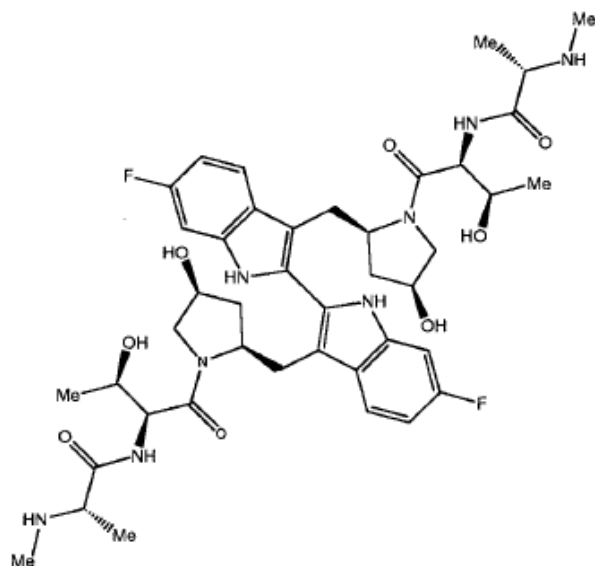








y



6. Una composición farmacéutica que comprende:

un compuesto reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 7. Un compuesto reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su utilización en la provocación de apoptosis en una célula.

8. Un compuesto según la reivindicación 7 para su utilización en el tratamiento de enfermedades seleccionadas de los trastornos del desarrollo, el cáncer, las enfermedades autoinmunitarias, enfermedades que son resistentes a la apoptosis debido a la sobreexpresión de los IAP o a miembros de la familia de proteínas Bcl-2 y trastornos neurodegenerativos.

10 9. Un compuesto según la reivindicación 8 para su utilización en el tratamiento de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer renal, hepatoma, melanoma, linfoma, sarcoma y sus combinaciones.

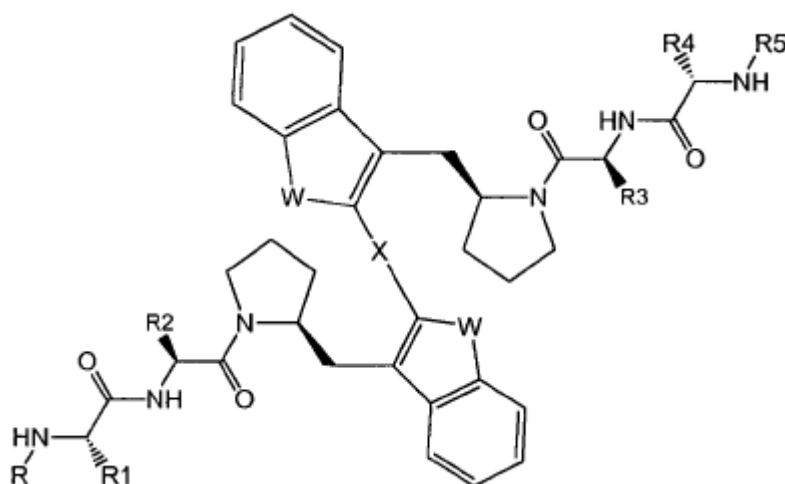
10. Un compuesto según la reivindicación 8 para su utilización en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

15 11. Un compuesto para su utilización en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias según la reivindicación 10 en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de entre enfermedades del colágeno, enfermedades renales,

enfermedades endocrinas, enfermedades de la piel, enfermedades del hígado, enfermedades neuronales, enfermedades de la sangre y enfermedades infecciosas con reacciones autoinmunitarias asociadas.

12. Un compuesto para su utilización en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias según la reivindicación 11 en donde dicha enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide, el lupus eritematoso diseminado, el síndrome de Sharp, el síndrome de CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, telangiectasia), dermatomiositis, vasculitis (síndrome de Wegener), síndrome de Sjögren, síndrome de Goodpasture, la glomerulonefritis que evoluciona rápidamente y la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II, la diabetes tipo I, la poliendocrinopatía autoinmunitaria-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED), paratiroidismo autoinmunitario, anemia perniciosa, insuficiencia gonadal, enfermedad idiopática de Addison, hipertiroidismo, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, pénfigo común, penfigoide ampolloso, herpes gestacional, epidermólisis ampollosa, eritema multiforme mayor, cirrosis biliar primaria, colangitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria tipo 1, hepatitis autoinmunitaria tipo 2, colangitis esclerosante primaria, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuromiotonía adquirida, síndrome de Guillain-Barré (síndrome de Müller-Fischer), síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelosa, ataxia, opsoclon, neuropatía sensorial, acalasia, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática (síndrome de Werlhof), SIDA, malaria o la enfermedad de Chagas.

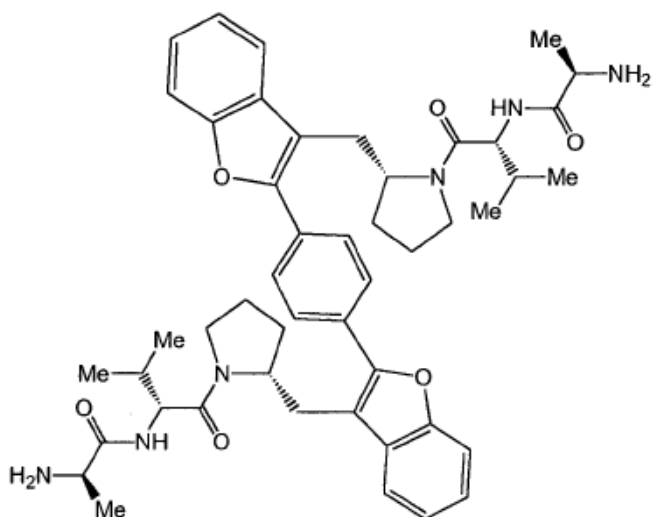
13. Un compuesto de fórmula



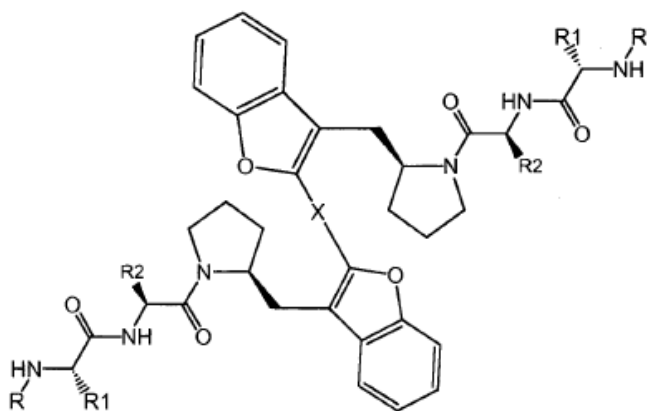
en donde los grupos R, R1, R2, W, X, R3, R4 y R5 se definen de la forma siguiente:

R	R ¹	R ²	W	X	R ³	R ⁴	R ⁵
H	Me	iPr	O	1,4-fenil	iPr	Me	H
H	Me	iPr	O	<i>trans</i> -(CH=CH)	iPr	Me	H
H	Me	iPr	O	CH ₂ CH ₂	iPr	Me	H
H	Me	iPr	O	1,4-fenil	iPr	H	H
H	Me	iPr	NH	1,4-fenil	iPr	Me	H
H	H	iPr	O	1,4-fenil	iPr	H	H

14. Un compuesto de fórmula:



15. Un compuesto de fórmula:



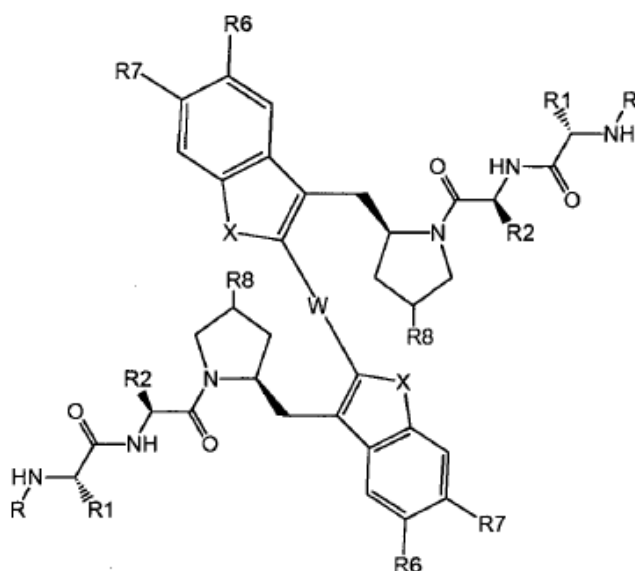
5 en donde X es 1,4-fenil;

R2 es terc-butil, R1 es metil y R es hidrógeno o metil, o

R2 es terc-butil, R1 es etil y R es hidrógeno; o

R2 es isopropil, R y R1 son ambos metil, o R es hidrógeno y R1 es etil.

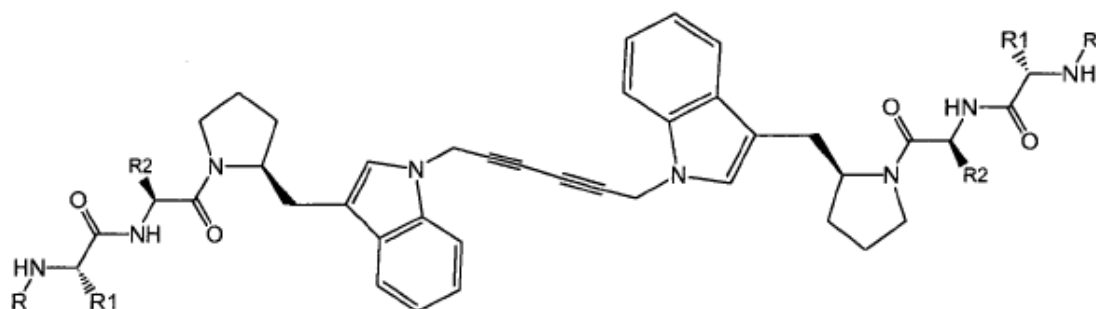
16. Un compuesto de fórmula



en donde los grupos R, R1, R2, X, W, R6, R7 y R8 son de la forma siguiente:

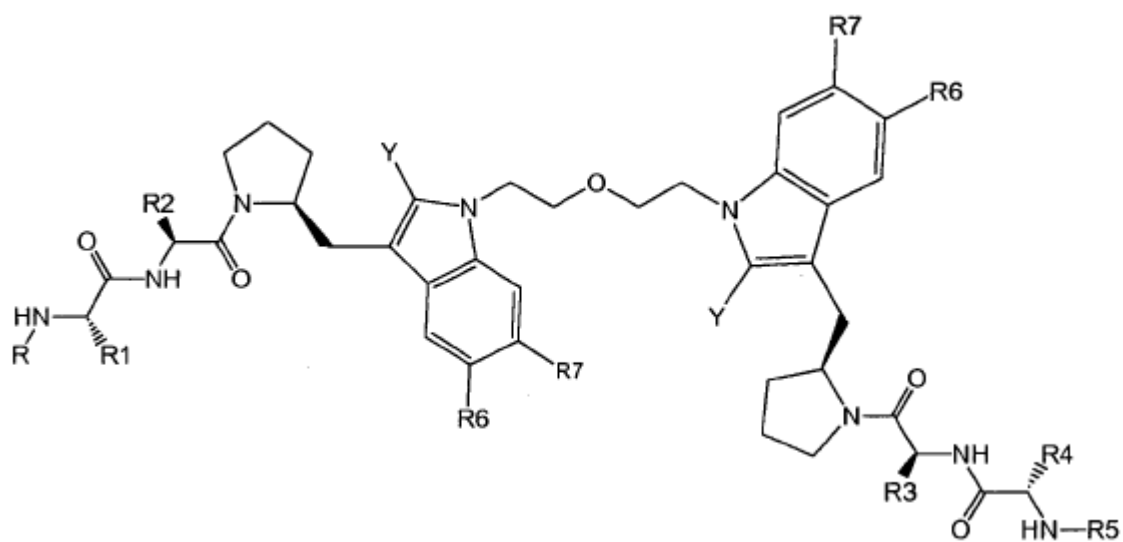
R	R1	R2	X	W	R6	R7	R8
H	Me	cHex	O	1,4-fenil	H	H	H
Me	Me	cHex	O	1,4-fenil	H	H	H
H	Et	cHex	O	1,4-fenil	H	H	H
Me	Me	(2R-EtOH)	O	1,4-fenil	H	H	H
Me	Me	iPr	NH	1,4-fenil	H	F	H
H	Me	iPr	NH	2,5-tiofenil	H	F	H
Me	Me	cHex	NH	2,5-tiofenil	H	F	H
H	Me	cHex	NH	1,4-fenil	H	F	H
Me	Me	cHex	NH	1,4-fenil	H	F	H
Me	Me	iPr	NH	1,4-fenil	H	H	R-OH
Me	Me	tBu	NH	1,4-fenil	H	H	R-OH
Me	Me	iPr	NH	1,4-fenil	F	H	H
Me	Me	tBu	NH	1,4-fenil	H	H	S-OH
Me	Me	(2R-EtOBn)	NH	1,4-fenil	H	F	H
Me	Me	(2R-EtOH)	NH	1,4-fenil	H	F	H
Me	Me	(2R-EtOH)	NH	1,4-fenil	H	F	H

17. Un compuesto de fórmula



en donde R y R1 son cada uno metil y R2 es terc-butil o c-hexil.

18. Un compuesto de fórmula

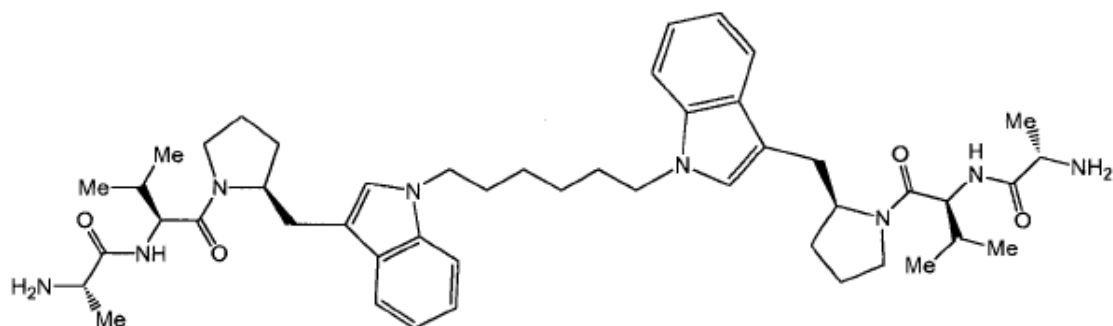


5

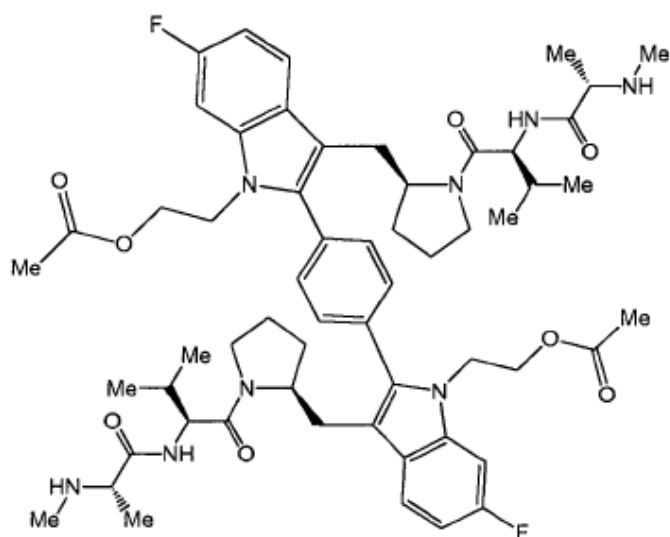
en donde los grupos R, R1, R2, Y, R3, R4, R5, R6 y R7 están definidos de la forma siguiente:

R	R1	R2	Y	R3	R4	R5	R6	R7
Me	Me	cHex	H	cHex	Me	Me	H	H
Me	Me	cHex	H	cHex	Me	Me	H	F
Me	Me	(2 <i>R</i> -EtOH)	H	(2 <i>R</i> -EtOH)	Me	Me	H	F
Me	Et	(2 <i>R</i> -EtOH)	H	(2 <i>R</i> -EtOH)	Et	Me	F	H
Me	Me	Entry	H	cHex	Me	Me	F	H
Me	Me	cHex	Me	cHex	Me	Me	F	H
Me	Et	cHex	Me	cHex	Et	Me	F	H
H	Me	cHex	H	cHex	Me	H	Cl	H
Me	Me	cHex	H	cHex	Me	Me	Cl	H
H	Me	iPr	H	iPr	Me	H	Cl	H
Me	Me	iPr	H	iPr	Me	Me	Cl	H
Me	Me	iPr	H	iPr	Me	Me	F	H
H	H	cHex	H	cHex	H	H	H	F
Me	Me	H	H	H	Me	Me	H	F
Me	Et	(2 <i>R</i> -EtOH)	H	(2 <i>R</i> -EtOH)	Et	Me	H	F
Me	Me	cHex	H	cHex	Me	Me	Me	H
H	H	cHex	H	cHex	H	H	H	H
H	Me	cHex	H	cHex	Me	H	H	H
Me	Me	tBu	H	tBu	Me	Me	H	F
Me	Me	tBu	H	tBu	Me	Me	H	H
H	Me	tBu	H	tBu	Me	H	H	H
Me	Me	cHex	H	cHex	Me	H	H	H
Me	Me	cHex	H	cHex	H	H	H	H

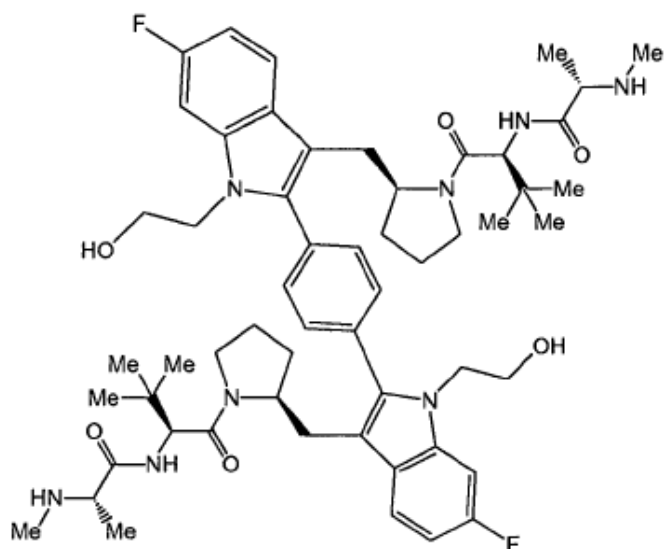
19. El compuesto de fórmula



20. El compuesto de fórmula



21. El compuesto de fórmula



22. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21; y
un excipiente farmacéuticamente aceptable.

23. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21 para su utilización en la provocación de apoptosis en una célula.

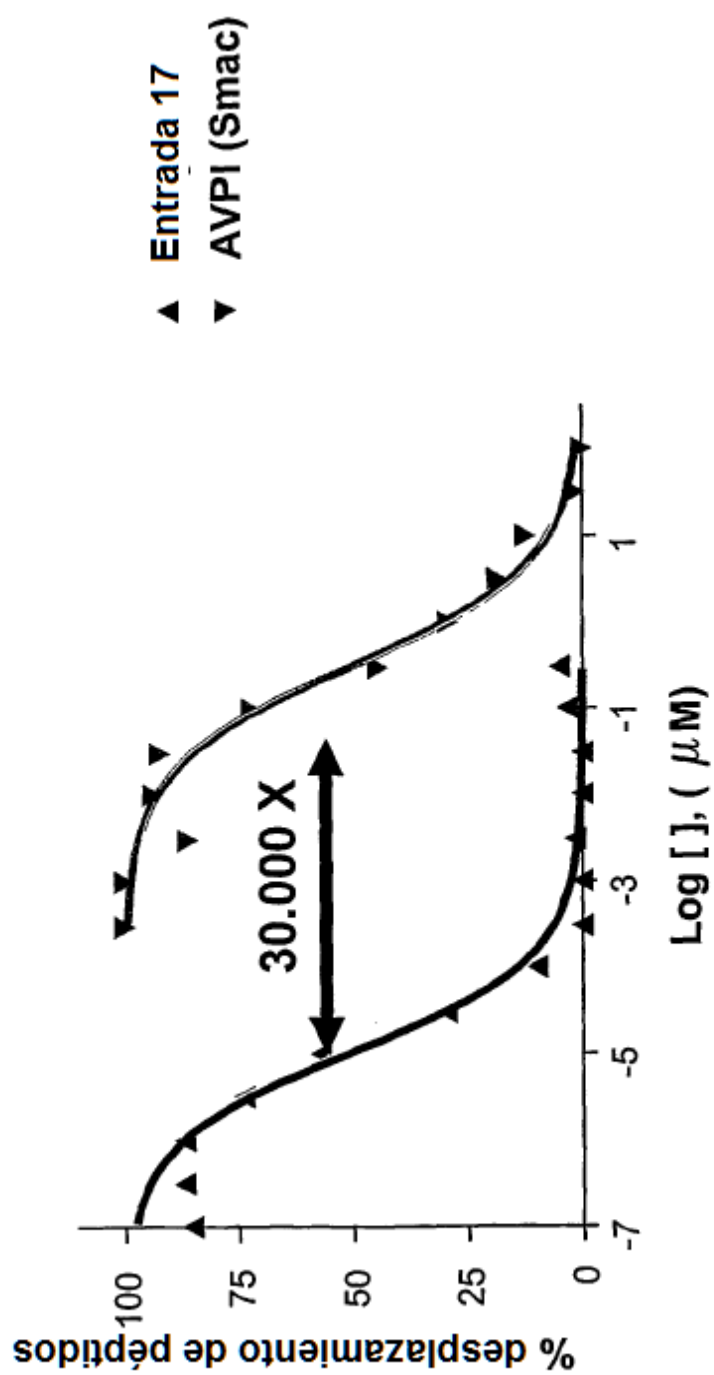


Fig. 1

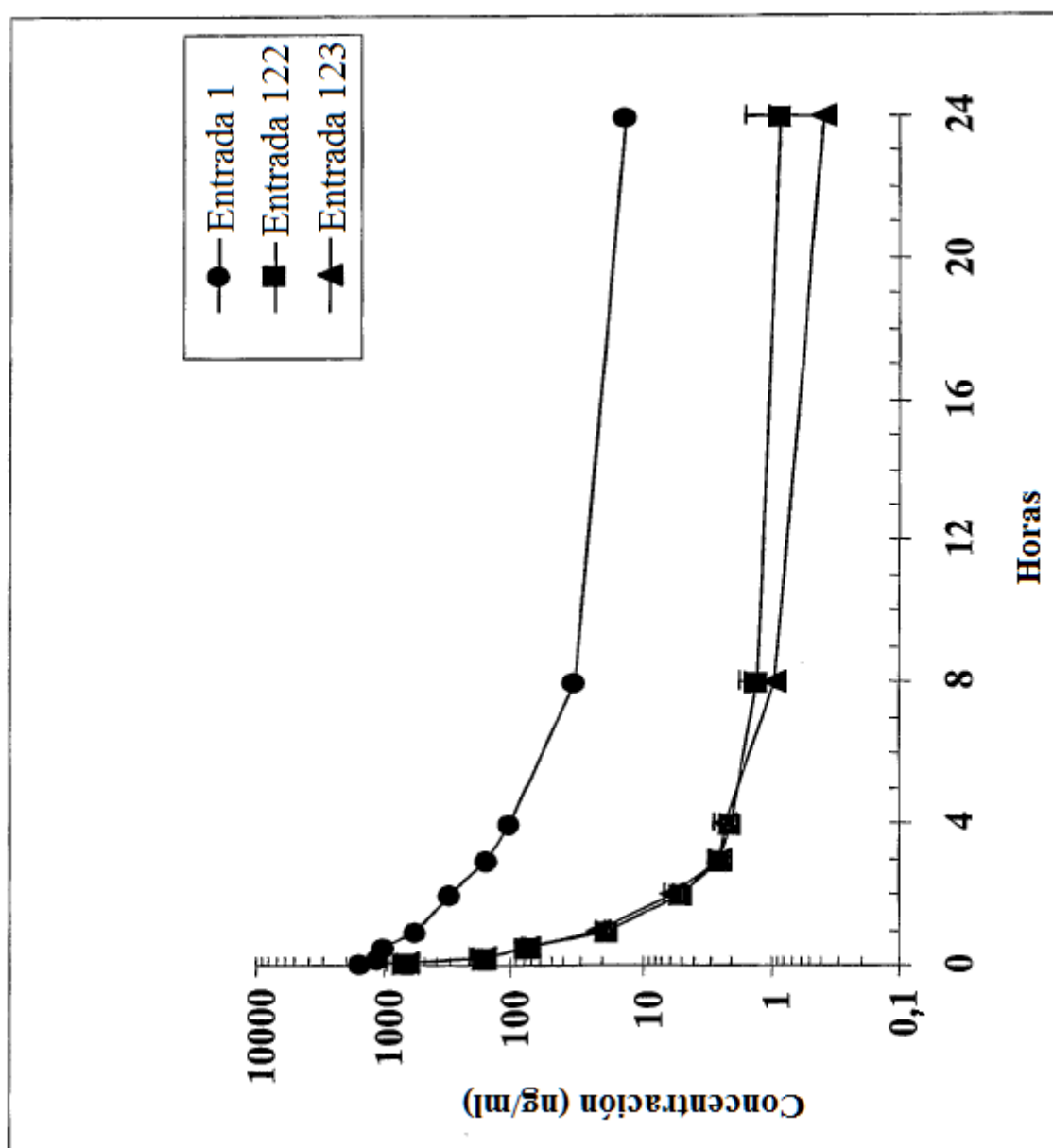


Fig. 2

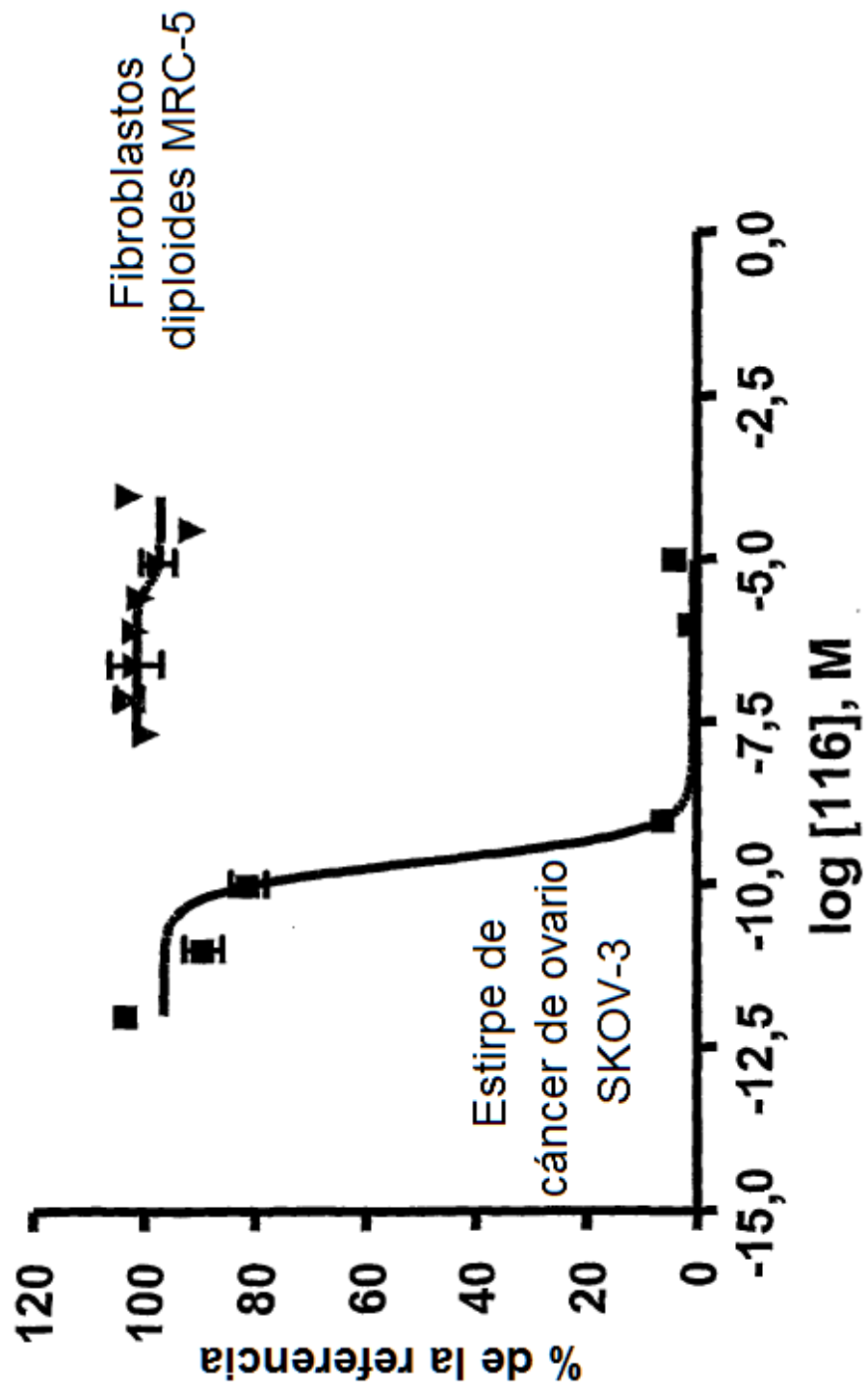


Fig. 3

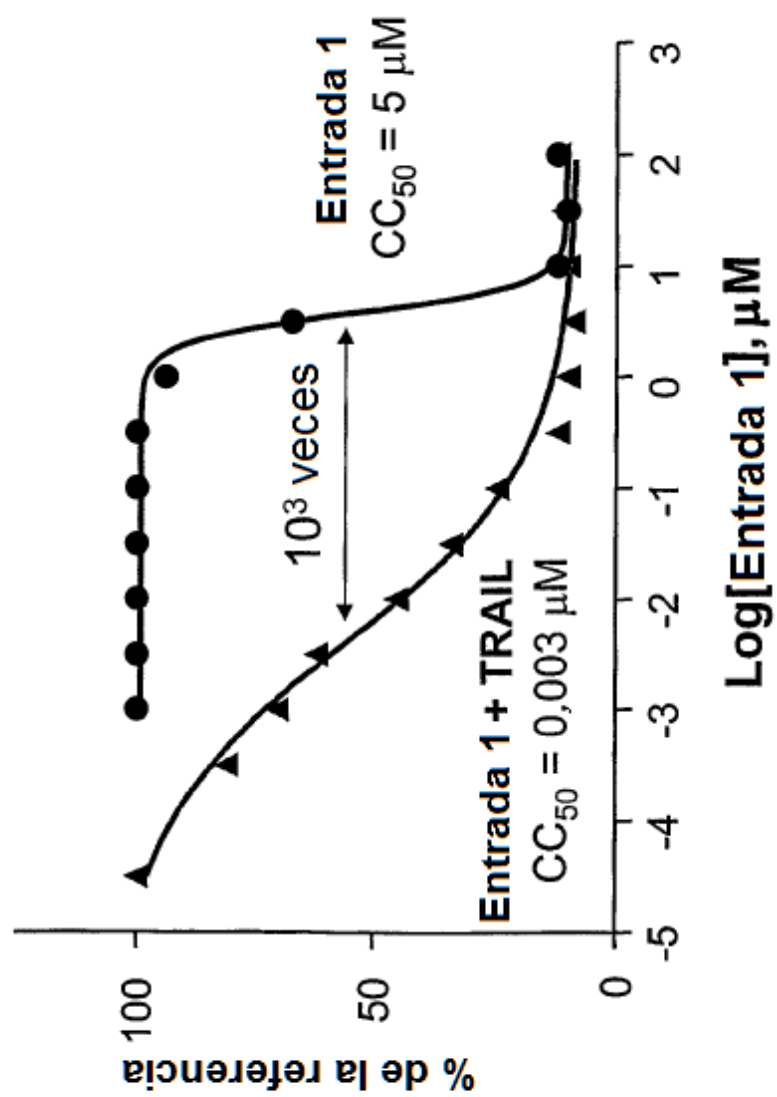


Fig. 4