

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 337**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10794587 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2448923**

54 Título: **Mimético de SMAC**

30 Prioridad:

02.07.2009 US 222668 P

20.06.2010 US 819221

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

04.04.2016

73 Titular/es:

TETRALOGIC BIRINAPANT UK LTD (100.0%)
Two Snowhill
Birmingham, West Midlands B4 6WR, GB

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 565 337 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

Mimético de SMAC

Área de la invención

5 La presente invención hace referencia al área de los miméticos de SMAC y composiciones para tratar trastornos proliferativos incluyendo el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, por sus siglas en inglés) son proteínas intracelulares de origen natural que suprimen la apoptosis dependiente de caspasas. La SMAC, también conocida como DIABLO, es otra proteína intracelular que funciona para antagonizar, es decir, inhibir la actividad de las IAP. En células saludables normales, la SMAC y las IAP funcionan juntas para mantener las células saludables. Sin embargo, en determinados estados de enfermedad, por ejemplo, cáncer y otros trastornos proliferativos, las IAP no se antagonizan de forma adecuada y por lo tanto evitan la apoptosis y causan o agravan una proliferación y supervivencia anormal.

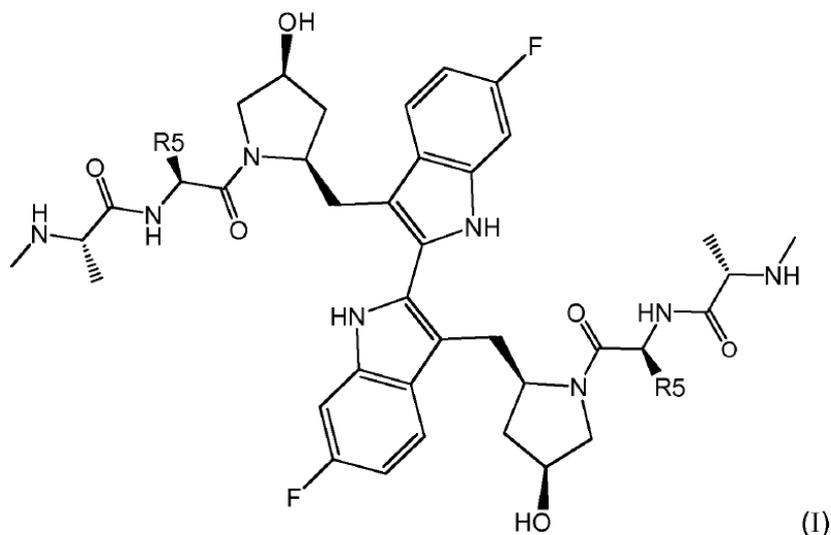
15 Los miméticos de SMAC, también conocidos como antagonistas de IAP, son moléculas pequeñas sintéticas que imitan la estructura y la actividad como antagonista de IAP de los cuatro aminoácidos N-terminales de SMAC. (Los miméticos de SMAC se denominan en ocasiones antagonistas de IAP). Cuando se administran a animales que sufren trastornos proliferativos, los miméticos de SMAC antagonizan las IAP, lo que causa un incremento de la apoptosis entre las células que proliferan de forma anómala.

20 Ejemplos de péptidos miméticos de SMAC son los revelados en US 7,517,906; US 7,309,792; US 7,419,975; US 2005/0234042; US 2005/0261203; US 2006/0014700; US 2006/0025347; US 2006/0052311; US 2006/0128632; US 2006/0167066; US 2007/0042428; US 2007/032437; US 2008/0132485; WO 2005/069888; WO 2005/069894; WO 2006/010118; WO 2006/122408; WO 2006/017295; WO 2006/133147; WO 2006/128455; WO 2006/091972; WO 2006/020060; WO 2006/014361; WO 2006/097791; WO 2005/094818; WO 2008/045905; WO 2008/016893; WO 2007/136921; WO 2007/021825; WO 2007/130626; WO 2007/106192; y WO 2007/101347.

Resumen de la Invención

25 Esta invención, en un aspecto, es N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil)-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidroxi-pirrolidina-1-carbonil]-propil}-2S-metilamino-propionamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, además de diversas formas de dicho compuesto y sales del mismo según se describe en mayor detalle más adelante en la presente patente.

Este compuesto tiene la siguiente estructura:



30

En donde R5 es -CH₂CH₃. Este compuesto se denomina también en la presente patente como compuesto 15.

La invención, en aspectos relacionados, comprende una composición farmacéutica que comprende un compuesto de este tipo y su uso en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo en un sujeto mamífero humano o no humano en necesidad del mismo que comprende administrar internamente al sujeto una cantidad efectiva de dicho compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otros aspectos, la invención comprende un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero en necesidad del mismo, por ejemplo, un humano, o un animal de compañía, un animal de uso alimenticio, o un animal destinado a actividades deportivas, que comprende administrar internamente al animal una cantidad efectiva del Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otra realización ilustrativa, la invención comprende un compuesto para su uso en un método para inducir la apoptosis en una célula que comprende poner en contacto la célula con el Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En esta realización, la célula puede ser, por ejemplo, una célula cancerosa.

15 En realizaciones ilustrativas, la invención comprende un compuesto para su uso en cualquiera o en más de los métodos anteriores, en donde dichos métodos comprenden además administrar una segunda terapia relacionada con el cáncer, tal como, por ejemplo, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica, y combinaciones de las mismas.

20 En una realización ilustrativa adicional, la invención comprende un compuesto para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune, en la que dicha condición es causada o agravada por la regulación anormal de la apoptosis, en un mamífero en necesidad del mismo, que incluye, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, y púrpura trombocitopénica idiopática (enfermedad de Werlhof) que comprende administrar internamente al animal una cantidad efectiva del Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el porcentaje medio de la pérdida de peso corporal en ratas después de 4 días de dosificación de bolo intravenoso con miméticos de SMAC, sustancialmente como se describe en el Ejemplo 4.

25 La Figura 2 muestra el volumen tumoral medio (2A) y el cambio del peso corporal (2B) que es resultado del tratamiento de xenoinjertos humanos en ratones desnudos con miméticos de SMAC, sustancialmente como se describe en el Ejemplo 5.

Descripción detallada de la invención

30 El compuesto de la invención es un mimético de SMAC que puede ser utilizado en el tratamiento de trastornos proliferativos, por ejemplo: diversos tumores benignos o tumores malignos (cáncer), enfermedades proliferativas benignas (por ejemplo, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, y reestenosis), o enfermedades autoinmunes (por ejemplo, glomerulonefritis proliferativa autoinmune, respuestas autoinmune linfoproliferativas). Entre los tipos de cáncer que pueden tratarse potencialmente con antagonistas de IAP se incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de los siguientes: adenocarcinoma de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de ovarios, cáncer de mama, mesotelioma, neuroma periférico, cáncer de vejiga, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de vejiga, meningioma, glioma, astrocitoma, cáncer de mama, cáncer cervical, trastornos mieloproliferativa crónica (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica), cáncer de colon, tipos de cáncer endocrino, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales extracraneales, tumores de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores trofoblásticos gestacionales, leucemia por tricoleucitos, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma insular, sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeo, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, cáncer de labios, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer escamoso metastásico de cuello, mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide y síndrome de Sezary, síndromes mielodisplásicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer orofaríngeo, cáncer de huesos, incluyendo osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno del hueso, cáncer epitelial de ovario, tumores de células germinales del ovario, tumores de ovario de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, cáncer del seno paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores hipofisarios, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivares, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, pineoblastoma, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y del uréter, cáncer uretral, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, y tumor de Wilm y otros tumores de riñón de la infancia.

Algunas realizaciones de la invención incluyen un compuesto para su uso en inducir la apoptosis de células, en particular células que proliferan de forma patológica. Los métodos pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*.

5 Los métodos pueden incluir la administración del compuesto de la invención por sí solo, la administración de una combinación de antagonistas de IAP, o la administración del compuesto de la invención, con o sin uno o más antagonistas de IAP adicionales, y uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. La administración de múltiples agentes puede ser simultánea o secuencial. Entre los agentes quimioterapéuticos útiles se incluyen, pero sin limitarse a, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, clorambucilo, melfalán), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina), disruptores citoesqueléticos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), epotilonas (por ejemplo, epotilona A, epotilona B, epotilona D), inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido, taflupósido), análogos de precursores de nucleótidos (por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina), antibióticos peptídicos (por ejemplo, bleomicina), agentes a base de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino), retinoides (por ejemplo, ácido transretinoico), y alcaloides de la vinca y derivados (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina). En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos incluyen fludarabina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, camptotecina, etopósido, topotecán, irinotecán, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, amsacrina, mitoxantrona, 5-fluoro-uracilo, o gemcitabina.

20 En algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención, por sí solo o en combinación con uno o más distintos ingredientes farmacéuticos activos, se administra a un sujeto humano o animal. Las composiciones farmacéuticas comprenden habitualmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un soporte o diluyente, y pueden ser administradas de forma convencional por vías que incluyen las vías sistémicas, tópica, u oral. La administración es habitualmente mediante inyección intravenosa, ya sea como un bolo o por infusión, pero no se excluyen otras vías de administración. Una formulación intravenosa puede ser 1 mg/mL del Compuesto 15 en 0,05M de solución tampón PBS-citrato, pH5. Los modos de administración específicos dependerán de la indicación y otros factores, incluyendo el compuesto en particular que está siendo administrado. La cantidad de compuesto a ser administrado es aquella cantidad que sea terapéuticamente efectiva. La dosis a ser administrada dependerá de las características del sujeto que está siendo tratado, por ejemplo, el paciente tratado en particular, la edad, peso, salud, tipos de tratamiento concomitante, si hubiera alguno.

30 La frecuencia de tratamientos puede determinarse fácilmente por un experto en el arte (por ejemplo, por el médico interno).

Habitualmente, el compuesto de la invención será administrado mediante inyección intravenosa, incluyendo, por ejemplo, infusión durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 minutos, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos.

35 La composición farmacéutica de la invención es una composición en la que el ingrediente farmacéutico activo, es decir, el compuesto de la invención, es suficientemente puro, y la composición es por lo demás adecuada, para su administración interna a un humano u otro mamífero. Puede ser preparado en una forma de dosis unitaria, es decir, una forma adecuada para una administración única a un sujeto. De modo que, por ejemplo, una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria intravenosa puede comprender un vial o jeringuilla rellena previamente, donde cada uno comprende una cantidad efectiva o una fracción conveniente de una cantidad efectiva, de tal manera que se administre uno de los contenidos de un vial o una jeringuilla en un momento determinado. Dicha administración puede repetirse hasta 4 veces por día durante un periodo de tiempo, si fuera necesario para lograr una dosis efectiva acumulativa, por ejemplo, regresión tumoral. Un régimen de dosificación puede ser, por ejemplo, inyecciones intravenosas diarias o dos veces en semana, o, por ejemplo, inyecciones semanales en ciclos de tres semanas con medicación y una de descanso durante tanto tiempo como sea efectivo el tratamiento, por ejemplo, hasta que la enfermedad progrese o el fármaco no sea tolerado. La dosis efectiva administrada en cada inyección es una cantidad que sea efectiva y tolerada; puede ser, por ejemplo, 0,01 a 30 mg/m², por ejemplo, 0,2 a 10 mg/m², o, por ejemplo, 0,5 a 5 mg/m².

50 El compuesto de la invención puede también ser aplicado localmente, tal como en una perfusión de una extremidad aislada. El compuesto de la invención puede además ser aplicado por vía tópica, por ejemplo, como en una crema, gel, loción, o ungüento, o en un parche de tipo depósito o matricial, o en un sistema de administración transdérmico activo.

55 Una dosis efectiva es un que durante el transcurso de la terapia, que puede ser, por ejemplo, 1 o más semanas, múltiples periodos de 3 semanas con tratamiento/1 semana de descanso, da como resultado el tratamiento de un trastorno proliferativo, es decir, una disminución en la tasa de la progresión de la enfermedad, la terminación de la progresión, o la regresión o remisión de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas a ser utilizadas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva según se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable u otra forma de las mismas, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "composición farmacéutica" hace referencia a una composición adecuada para su administración en el uso médico. Debe apreciarse que las determinaciones de formas de dosificación apropiadas, cantidades de dosificación, y vías de administración para un paciente en particular se encuentran en el nivel de los expertos habituales en el arte médico y farmacéutico.

Las composiciones adecuadas para la administración por vía parenteral comprenden, convenientemente, una preparación acuosa estéril del compuesto de la invención, que es preferiblemente isotónica con la sangre del recipiente. Esta preparación acuosa puede ser formulada de acuerdo a métodos conocidos utilizando soportes adecuados o diluyentes que pueden incluir un tampón.

Cuando se practica la terapia conjunta o de combinación descrita en más detalle más adelante, la administración del compuesto y las composiciones de la presente invención pueden ocurrir simultáneamente con, posteriormente a, o previamente a, la quimioterapia o radiación, siempre que el agente quimioterapéutico o la radiación sensibiliza el sistema frente al compuesto y composiciones de la presente invención.

La presente invención además está dirigida al uso del compuesto y composiciones como agente quimiopotenciador con otras aproximaciones del tratamiento. El término "agente quimiopotenciador" hace referencia a un agente que actúa para aumentar la sensibilidad de un organismo, tejido, o célula ante un compuesto químico o tratamiento principalmente "agentes quimioterapéuticos" o "fármacos quimioterapéuticos" o un tratamiento de radiación. Por tanto, el compuesto y las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para inhibir el crecimiento tumoral in vivo administrándolos en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico o utilizándolos en combinación con radiación. En estas aplicaciones, la administración del compuesto y las composiciones de la presente invención pueden ocurrir previamente a, y con suficiente tiempo, para ocasionar una sensibilización del sitio a ser tratado. De forma alternativa, el compuesto y las composiciones de la presente invención pueden utilizarse simultáneamente con radiación y/o agentes químicos anticancerígenos adicionales (infra). Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas del compuesto y las composiciones de la presente invención, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas composiciones de la presente invención.

Los agentes y biológicos y quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y la radiación inducen la apoptosis activando las vías apoptóticas, y, ya que el compuesto y las composiciones de la presente invención liberan antagonistas de las proteínas apoptóticas (las IAP) y, por tanto, eliminan el bloqueo de la apoptosis, la combinación de agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y la radiación con el compuesto y las composiciones de la presente invención trabajarían adicional o sinérgicamente para facilitar la apoptosis.

Una combinación del compuesto de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o la terapia con radiación de cualquier tipo que active la vía extrínseca o intrínseca, puede proporcionar una aproximación más efectiva para destruir las células tumorales. El compuesto de la presente invención interactúa con las IAP, tales como XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP, etc., y elimina el bloqueo de la apoptosis mediado por IAP. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y/o terapia de radiación destruye células que se dividen de forma activa activando la vía apoptótica intrínseca, lo que conduce a la apoptosis y a la muerte celular. Los agentes antitumorales biológicos tales como TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF), activan las vías apoptóticas extrínsecas. Según se describe en más detalle más adelante, las realizaciones de la invención proporcionan combinaciones del compuesto de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o radiación que proporciona una acción sinérgica contra la proliferación celular no deseada. Esta acción sinérgica entre el compuesto de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o terapia de radiación, puede mejorar la eficacia del agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o de las terapias de radiación. Esto permitirá un incremento de la efectividad de los agentes biológicos o quimioterapéuticos/anti-neoplásicos o de los tratamientos con radiación, lo que permite un porcentaje más elevado de tumores que responden a la terapia, una mejora de la respuesta tumoral, y, potencialmente, una reducción de la dosis del agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico que se necesita para tratar un tumor, proporcionando de ese modo el uso de una dosis más tolerable del agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o de la radiación.

El paciente es tratado mediante la administración del compuesto o de una composición farmacéutica de la presente invención en el momento en el que el paciente está sometido a radiación o quimioterapia concomitante o previa para el tratamiento de una patología neoproliferativa de un tumor tal como, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovarios, cáncer renal, hepatoma, melanoma, linfoma, sarcoma, y combinaciones de los mismos. En otra realización de la presente invención, el compuesto o una composición de la presente invención pueden administrarse en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico y/o para su uso en combinación con radioterapia, inmunoterapia, y/o terapia fotodinámica, promoviendo la apoptosis y aumentando la efectividad de la terapia quimioterapéutica, radioterapia, inmunoterapia, y/o terapia fotodinámica.

Las realizaciones de la invención también incluyen un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un paciente que sufre un cáncer mediante la administración simultánea o concurrente de un agente biológico o quimioterapéutico. Tales agentes biológicos o quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a los agentes quimioterapéuticos descritos en "Modern Pharmacology with Clinical Applications", Sexta Edición, Craig & Stitzel, Chpt. 56, pg 639-656 (2004), incorporadas a la presente patente a modo de referencia. El agente quimioterapéutico puede ser, pero no se limita a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos anti-tumorales, productos derivados de plantas tales como taxanos, enzimas, agentes hormonales, diversos agentes tales como cisplatino, anticuerpos monoclonales, glucocorticoides, inhibidores mitóticos, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, agentes inmunomoduladores tales como interferones, factores del crecimiento celular, citocinas, y compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), factores de crecimiento celular e inhibidores de quinasas. Otras clasificaciones para los agentes quimioterapéuticos incluyen inhibidores mitóticos, y agentes anti-estrogénicos.

Ejemplos específicos de agentes biológicos y quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, carmustina (BCNU), 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), gemcitabina, metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, dexametasona, topotecán, etopósido, paclitaxel, vincristina, tamoxifeno, TNF-alfa, TRAIL y otros miembros, es decir, otros distintos de TRAIL y TNF-alfa, de la superfamilia de TNF de moléculas, interferón (en ambos sus formas alfa y beta), talidomida, derivados de talidomida tales como lenalidomida, melfalán, e inhibidores de PARP. Otros ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, etileniminas, triacenos, antagonistas de folato, análogos de purina, análogos de pirimidina, antraciclina, bleomicinas, mitomicinas, dactinomicinas, plicamicina, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos, glucocorticoides, L-asparaginasa, estrógenos, andrógenos, progestinas, hormonas luteinizantes, acetato de octreotida, hidroxurea, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina, carboplatino, mitoxantrona, anticuerpos monoclonales, levamisol, interferones, interleucinas, filgrastim y sargramostim.

Otra realización de la presente invención hace referencia al compuesto o a una composición de la presente invención en combinación con inhibidores de la topoisomerasa para potenciar su efecto inductor de la apoptosis. Los inhibidores de la topoisomerasa inhiben la replicación y la reparación del ADN, promoviendo de ese modo la apoptosis y se utilizan como agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de la topoisomerasa promueven el daño del ADN inhibiendo las enzimas que se requieren en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, la exportación de Smac desde la mitocondria hacia el citosol celular está causada por el daño en el ADN causado por los inhibidores de la topoisomerasa. Se espera que los inhibidores de la topoisomerasa tanto de la clase del Tipo I (camptotecina, topotecán, SN-38 (metabolito activo del irinotecán) como de la clase del Tipo II (etopósido), muestren una potente sinergia con los compuestos de la presente invención. Entre los ejemplos adicionales de los agentes inhibidores de la topoisomerasa que pueden ser utilizados se incluyen, pero sin limitarse a, irinotecán, topotecán, etopósido, amsacrina, exatecán, gimitecán, etc. Entre otros inhibidores de la topoisomerasa se incluyen, por ejemplo, Aclacinomicina A, camptotecina, daunorubicina, doxorubicina, elipticina, epirubicina, y mitoxantrona.

Otra realización de la presente invención hace referencia al compuesto o a una composición de la presente invención en combinación con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

En otra realización de la invención, el agente quimioterapéutico/anti-neoplásico para su uso en combinación con el compuesto o composiciones de la presente invención puede ser un compuesto que contiene platino. En una realización de la invención, el compuesto que contiene platino es cisplatino. El cisplatino puede tener sinergia con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una 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 carboplatino. El carboplatino puede tener sinergia con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una IAP, incluyendo, pero sin limitarse a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, MLIAP, etc. En otra realización un compuesto que contiene platino es oxaliplatino. El oxaliplatino puede tener sinergia con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una IAP, incluyendo, pero sin limitarse a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc.

Los fármacos para quimioterapia con platino pertenecen a un grupo general de agentes modificadores del ADN. Los agentes modificadores del ADN pueden ser cualquier agente químico sumamente reactivo que se enlace con varios grupos nucleófilos en ácidos nucleicos y proteínas y que cause efectos mutagénicos, carcinógenos, o citotóxicos. Los agentes modificadores del ADN funcionan mediante diferentes mecanismos, interrupción de la función del ADN y muerte celular; el daño al ADN/la formación de puentes transversales o enlaces entre átomos en el ADN; y la inducción del mal apareamiento de nucleótidos que lleva a mutaciones, para lograr el mismo resultado final. Tres ejemplos no limitativos de agentes modificadores de ADN que contiene platino son cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

Aún otra realización de la presente invención es la combinación terapéutica o el uso terapéutico en combinación del compuesto o composiciones de la presente invención con anticuerpos agonistas de TRAIL o TRAIL, u otros agentes biológicos o químicos que se unen a y activan el receptor o receptores de TRAIL. Muchos tipos de células cancerígenas son sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL, mientras que la mayoría de las células normales parecen ser resistentes a esta acción del TRAIL. Las células resistentes a TRAIL pueden surgir por una variedad de

diferentes mecanismos incluyendo la pérdida del receptor, presencia de receptores señuelo, sobreexpresión de FLIP que compite por la unión de la proenzima caspasa-8 durante la formación del DISC (siglas en inglés para el complejo de señalización inductor de muerte) y la inhibición de la caspasa-3 y/o caspasa-9 activada por la XIAP. En condiciones de resistencia al TRAIL, un compuesto o composición de la presente invención puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales al TRAIL, lo que conduce a un incremento de la muerte celular, cuyas correlaciones clínicas se espera que sean un incremento en la actividad apoptótica en los tumores resistentes a TRAIL, una mejora en la respuesta clínica, un aumento de la duración de la respuesta, y finalmente, un incremento en la tasa de supervivencia del paciente.

En otra realización de la invención, el Compuesto 15 se administra en combinación con una citocina, por ejemplo, TNF α .

El compuesto y las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para aumentar la terapia de radiación (o radioterapia), es decir, el uso médico de la radiación ionizante como parte del tratamiento contra el cáncer para controlar las células malignas. Aunque la radioterapia se utiliza a menudo como parte de la terapia curativa, se utiliza ocasionalmente como un tratamiento paliativo, en el que la cura no es posible y el objetivo es un alivio sintomático. La radioterapia se utiliza comúnmente para el tratamiento de tumores.

Puede ser utilizada como la terapia primaria. También es común combinar la radioterapia con la cirugía y/o la quimioterapia. Los tumores más comúnmente tratados con radioterapia son el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer renal, el cáncer de cabeza y cuello, tumores ginecológicos, cáncer de vejiga y linfoma. La terapia de radiación se aplica comúnmente justo en el área localizada implicada con el tumor. A menudo las áreas de radiación también incluyen el drenaje de nódulos linfáticos. Es posible pero no habitual aplicar radioterapia a todo el cuerpo, o a toda la superficie de la piel. La terapia de radiación se aplica habitualmente a diario hasta 35-38 fracciones (una dosis diaria es una fracción). Estas pequeñas dosis frecuentes permiten que las células sanas tengan un tiempo para volver a crecer, reparando el daño infligido por la radiación. Tres divisiones principales de radioterapia o teleterapia, braquiterapia o radioterapia que utiliza fuentes cerradas o selladas de material radiactivo, que son ejemplos adecuados de protocolo de tratamiento en la presente invención. Las diferencias hacen referencia a la posición de la fuente de radiación; la externa es exterior al cuerpo, mientras que la radioterapia con fuente sellada o no sellada administra material radiactivo internamente. Las fuentes selladas para la braquiterapia se extraen habitualmente más tarde, mientras que las fuentes no selladas se inyectan en el cuerpo.

El Compuesto 15 es capaz de formar sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo pero sin limitarse a sales de adición ácida y/o de adición básicas. Tales sales se incluyen en todos los aspectos de la invención.

La presente invención pretende abarcar el Compuesto 15 sintetizado in vitro utilizando técnicas de laboratorio, tales como las que son bien conocidas para los químicos sintéticos; o sintetizados utilizando técnicas in vivo, tales como a través del metabolismo, fermentación, digestión, y similares. Se contempla además que el compuesto de la presente invención puede ser sintetizado utilizando una combinación de técnicas in vitro e in vivo.

La presente invención también incluye compuestos isotópicamente enriquecidos, que son idénticos al Compuesto 15 pero por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica y un número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden ser incluidos en la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , y ^{36}Cl . También se incluyen sustituciones con isótopos más pesados tales como el deuterio, es decir, ^2H . Los compuestos de la invención enriquecidos isotópicamente pueden ser preparados en general sustituyendo un reactivo etiquetado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo enriquecido no isotópicamente. Por ejemplo, la incorporación de deuterio puede lograrse mediante sustitución de boro de sodio con d4-boro de sodio, o reemplazando yoduro de metilo con d3-yoduro de metilo. Ejemplos representativos de análogos específicos de deuterio y su preparación se describen en el Ejemplo 1.

El compuesto 15 puede existir en formas solvatadas además de formas no solvatadas, incluyendo formas hidratadas. Además, el Compuesto 15 puede existir en diversos estados sólidos que incluyen formas cristalinas, semi-cristalinas y formas amorfas (no cristalinas), y en forma de clatratos, profármacos, ésteres biohidrolizables, mezclas racémicas, mezclas no racémicas, o estereoisómeros purificados incluyendo, pero sin limitarse a, enantiómeros ópticamente puros y diastereómeros. Se tiene la finalidad en general, de incluir todas estas y otras formas de este tipo en el alcance del término Compuesto 15.

Las referencias al Compuesto 15 y al compuesto de la invención, y otras frases similares en esta especificación y en las reivindicaciones, tienen la finalidad de incluir no solamente el compuesto de la fórmula (I), sino también las sales farmacéuticamente aceptables del Compuesto 15, además de diversas formas de dicho compuesto o sales del mismo tales como las que se describen anteriormente y a continuación.

En realizaciones adicionales, la invención comprende compuestos útiles como intermediarios en la síntesis del Compuesto 15, además de en procesos para la preparación de tales intermediarios y del Compuesto 15. Por ejemplo, en tales realizaciones, la invención comprende compuestos que se muestran en los Ejemplos a continuación, tales como los Compuestos 11, 12, 13, 14, y los compuestos enriquecidos isotópicamente tales como los Compuestos 19,20,28,29,31,32. Una realización de este tipo es el Compuesto 15 en el que el sustituyente 4-OH en la fracción de pirrolidina está protegida con un grupo protector. Un grupo protector ilustrativo es un grupo acetilo, que se ilustra en los Compuestos 11-14, a continuación. Otros grupos protectores de utilidad resultarán evidentes para las personas expertas en el arte e incluyen, por ejemplo, grupos benzoilo, bencilo, trimetilsililo, y trifenilmetilo. El grupo protector se elimina, por ejemplo, poniendo en contacto el intermedio protegido con un ácido o una base, según se muestra en los Esquemas XIII y XIV, a continuación. De ese modo, la invención comprende el compuesto que tiene la estructura del Compuesto 15 además de versiones protegidas del Compuesto 15 tales como los Compuestos 13 y 14 en los que los extremos N-terminal están protegidos con fracciones de carbamato y/o los grupos hidroxilo libres están protegidos como ésteres, donde tales compuestos se denominan Compuesto 15 protegido. La invención además comprende el paso de desproteger un Compuesto protegido 15, poniendo en contacto el Compuesto protegido 15 con un ácido o base por el que el Grupo Protector se elimina para proporcionar el Compuesto 15. Los compuestos de la invención enriquecidos isotópicamente incluyen formas deuteradas del Compuesto 15 tales como los Compuestos 20, 29, y 32. Las formas protegidas de tales compuestos, por ejemplo, los Compuestos 19, 28, y 31, están también comprendidos en la invención.

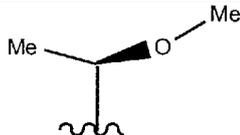
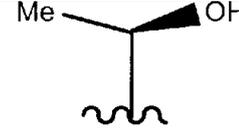
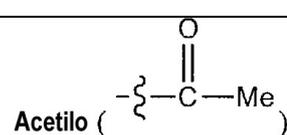
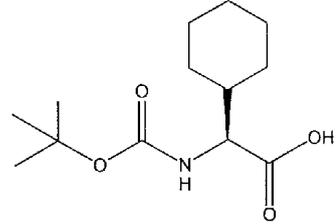
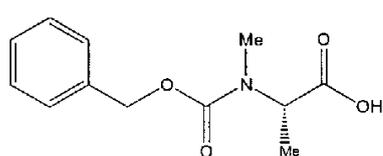
Ejemplos

Las siguientes preparaciones y esquemas ilustran la síntesis de los compuestos de la presente invención. Únicamente los compuestos reivindicados forman parte de la invención.

Las abreviaturas que se utilizan a lo largo de estos esquemas y en la aplicación en general, se identifican en la siguiente tabla:

<u>ABREVIATURA</u>	<u>SIGNIFICADO</u>	<u>ABREVIATURA</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ACN	Acetonitrilo	NMP	N-metilpirrolidinona
Ac ₂ O	Anhídrido acético	PhCOCl	Cloruro de Benzoilo
Cbz y Z	Benciloxicarbonilo	DIAD	Di-isopropil azo dicarboxilato
Boc y/o boc	terc-butiloxicarbonilo	DIBAL	Hidruro de Diisobutilaluminio
THF	Tetrahidrofurano	DMAP	4-dimetilamino piridina
DCM	Diclorometano	DMF	Dimetilformamida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona	DMSO	Dimetil sulfóxido
mCPBA	Ácido 3-cloroperbenzoico	TFA	Ácido trifluoroacético
Cbz-Cl	Cloruro de Benciloxicarbonilo	TFAA	Anhídrido trifluoroacético
Hex	Hexanos	HOAc o AcOH	Ácido acético
HPLC	Cromatografía líquida de alta rendimiento	DIPEA	Diisopropiletilamina
TLC	Cromatografía de capa fina	NMM	N-metilmorfolina
EtOAc	Acetato de etilo	NCS	N-clorosuccinimida
Ph	Fenilo	TEA (Et ₃ N)	Trietilamina
HATU	2-(7-Aza-1 H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato	MsCl	Metano-sulfonilcloruro

(continuación)

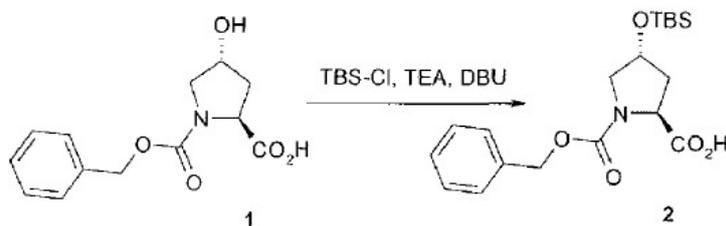
ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Me	Metilo*	Et	Etilo
iPr	Iso-propilo	tBu o terc-Bu	Terc-butilo
cPr	Ciclopropilo	cHex	Ciclohexilo
(2 <i>R</i> -EtOMe) y/o <i>R</i> -MeCHOMe		(2 <i>R</i> -EtOH) y/o <i>R</i> -MeCHOH	
TBAF	Fluoruro de tetrabutilammonio	MsCl	Cloruro de Metanosulfonilo
OMs	Metanosulfoniloxi	OTs	-O-SO ₂ -Ph-Me
TBDMSCl o TBSCl	Cloruro de terc-butil-dimetil-sililo	OTBS	terc-butil-dimetil-silaniloxi
Ph ₃ P	Trifenilfosfina	Ac	 Acetilo ($\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{-Me}$)
<i>n</i> -Bu	Butilo normal	DMA	Dimetilamina
Swern[O]	Oxidación de Swern	HWE	Reacción de Honer-Wadsworth-Emmons
TBA-Cl	Cloruro Tetra- <i>n</i> -butilo de amonio	DMS	Dimetilsulfuro
NP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento – de fase normal	Ácido de Meldrum	2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione
EDCI	Hidrocloruro de N-3-(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl	Imid.	Imidazol
Et ₂ O	Óxido de etileno 	HOBT, o HBT	Hidroxibenzotriazol
TES	Trietilsilano	RT	Temperatura ambiente
MeNO ₂	Nitrometano	MeOH	Metanol
EtOH	Etanol	NaOAc	Acetato de sodio
DCE, o EDC	Dicloroetano, dicloruro de etileno	CICO ₂ Me	Cloroformiato de etilo
NaHMDS	hexametilsililazida de sodio o bis(trimetilsilil)amida de sodio	TBSCl	Cloruro de terc-butil-dimetil-silanilo
Boc-Chg-OH (Boc-L-ciclohexilglicin0061)		Cbz-N(Me)Ala-OH ZN(Me)Ala-OH	

(continuación)

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Boc-N(Me)Ala-OH		Boc-Tle-OH	
Boc-Abu-OH		Boc-Val-OH	
Boc-Ser-OH		Cbz-Ser(tBu)-OH	
Boc-Ser(Me)-OH		Cbz-Thr(tBu)-OH	
Boc-Thr(tBu)-OH		Boc-Thr-OH	
Boc-Thr(Me)-OH		PSI	Libras por pulgadas cuadradas (Calibre)
h	hora	NaOMe	Metóxido de sodio

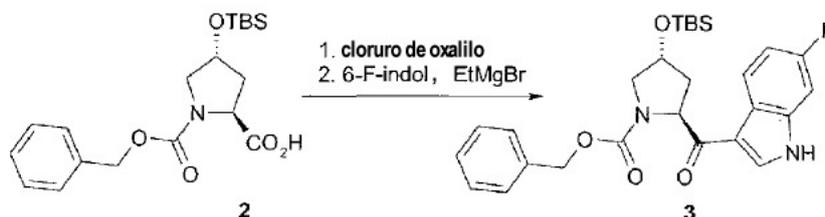
Ejemplo 1 – Síntesis

Esquema I



Éster 1-bencilico del ácido 4-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (2): Una solución de Z-Hyp-OH (1, 300 g, 1,13 mol), TEA (395 mL, 2,83 mol), y DBU (17,2 g, 1,13 mol) en DMF (1,25 L) se agitó en un baño de agua fría mientras una suspensión de TBS-Cl (188 g, 1,24 mol) en DMF (270 mL) se añadió lentamente a 21-26 °C [Nota: moderadamente exotérmica]. La suspensión fina resultante se agitó durante 22 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a 2 °C y se extinguió con agua (1,54 L) a ≤ 26 °C [Nota: el pH de la capa acuosa fue 8,5-9,0]. Se añadió MTBE (3 L) y la mezcla se acidificó a un pH de 3-4 con HCl concentrado (168 g) a 17-19 °C. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (2 X 1,5 L). La capa orgánica se concentró *en vacío* y se secó mediante destilación adicional de MTBE. Se añadió Tolueno (2 X 500 mL) y se destiló para eliminar la humedad, para proporcionar 603 g de 2 como un aceite de color amarillo [Nota: el contenido en agua por análisis KF fue de 508 ppm]. En base al secado de una pequeña muestra de 2 hasta su estado sólido, el peso contenido de 2 fue de 412 g (96% rendimiento, no corregido para determinar la pureza). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 5.24-5.11 (m, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.64-3.42 (m, 2H), 2.27-2.09 (m, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.04 (s, 3H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotómeros: δ 178.7, 178.4, 159.3, 158.9, 141.9, 141.8, 133.4, 133.3, 132.8, 132.6, 132.3, 131.9, 75.3, 74.6, 71.0, 71.0, 62.8, 62.3, 60.1, 59.7, 44.4, 43.4, 30.6, 30.6, 22.6, 22.6, 0.1, 0.0 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 379.5 [(M) $^+$; calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{Si}$: 379.5].

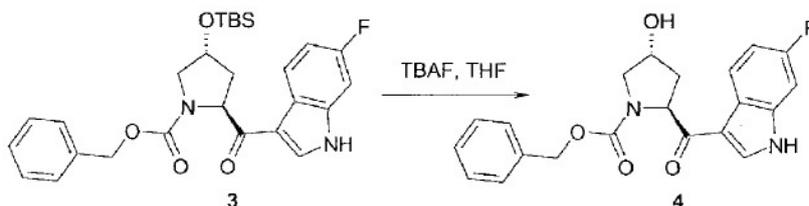
Esquema II



Ésterencilico del ácido 4-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-2-(6-fluoro-1H-indol-3-carbonil)-pirrolidina-1-carboxílico (3): Se disolvió Z-Hyp(OTBS)-OH (2, 55,5 g, 145 mmol) en tolueno (265 mL). Se añadieron DMF (0,1 mL) y cloruro de oxalilo (22,4 g, 174 mmol) a temperatura ambiente. Después de 2-3 h, el burbujeo se detuvo. Después de 4 h, la mezcla se concentró *en vacío* (baño a 65 °C, alrededor de 30 min) para proporcionar 95 g de una solución de color anaranjado claro que se confirmó que era cloruro ácido mediante análisis con ^1H RMN.

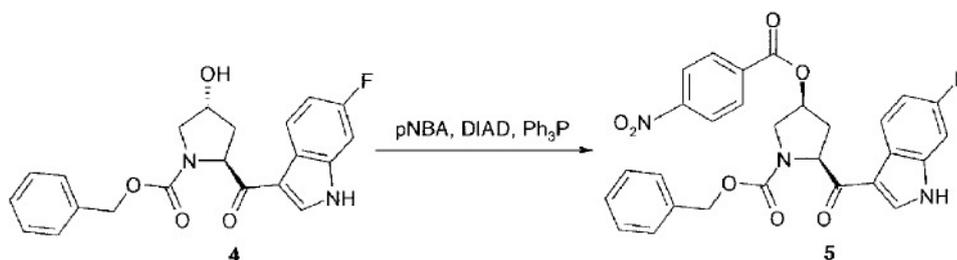
Se disolvió 6-Fluoroindol (39,2 g, 290 mmol) en clorobenceno anhidro (300 mL) y tolueno (200 mL) y la solución se enfrió a -4 °C utilizando un baño de hielo/acetona. Se añadió una solución de 3M EtMgBr en éter dietílico (101 g, 294 mmol) durante 31 minutos a $\leq 2,5$ °C dando como resultado una solución de color ambarino claro. Tras 30 min, se añadió la solución de cloruro ácido/tolueno (véase más arriba) durante 45 minutos at < 2 °C. La mezcla de reacción se mantuvo fría durante 1 h y a continuación se dejó calentar lentamente. Después de aproximadamente 4 h (10,6 °C), la mezcla de reacción se extinguió con HOAc glacial (9,0 g, exotérmica a 17,5 °C) y a continuación agua (exotérmica). Se añadió agua (200 mL) y EtOAc (300 mL) y la capa orgánica se separó y se lavó con agua (100 mL, separación lenta). La capa orgánica se concentró *en vacío* para proporcionar 227 g de 3 en forma de un aceite de color ambarino que se utilizó si purificación adicional. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), ~2:1 mezcla de rotómeros: δ 9.38 (m, 0.7H), 8.58 (m, 0.3H), 8.35 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.3H), 8.03 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.7H), 7.74 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.7H), 7.66 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.3H), 7.38-7.32 (m, 5H), 7.07 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 5.26-4.92 (m, 3H), 4.54 (m, 1H), 3.80 (app. dt, $J = 5.2, 11.1$ Hz, 1H), 3.61 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.3H), 3.55 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.7H), 2.25-2.07 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.00 (s, 3H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotómeros: δ 193.4, 193.0, 159.3 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz), 153.9 (d, $J_{\text{CF}} = 16.2$ Hz), 136.7, 136.8 (d, $J_{\text{CF}} = 34.0$ Hz), 134.6, 128.3, 127.8, 127.2, 126.6, 122.4, 113.7 (d, $J_{\text{CF}} = 13.5$ Hz), 110.2 (d, $J_{\text{CF}} = 20.2$ Hz), 98.5 (d, $J_{\text{CF}} = 25.4$ Hz), 70.6, 69.8, 65.8, 65.8, 60.6, 60.3, 55.5, 55.0, 25.7, 25.6, 17.7, 17.7, -4.8, -4.9 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 518.9 [(M-H) $^+$ Na] $^+$; calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_4\text{SiNa}$: 518.6].

Esquema III



5 Éster bencílico del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxílico (4): A una solución que contiene **3** (227 g) en THF (600 mL) se añadió 1 M de TBAF en THF (160 mL) a temperatura ambiente. Después de 9 h, se añadió otros 20 mL de la solución de 1 M de TBAF/THF. Después de aproximadamente 48 h, la mezcla de reacción se concentró *en vacío* y a continuación se redisolvió en EtOAc (600 mL). La solución orgánica se lavó con agua (310 mL) y el producto se precipitó para formar una suspensión espesa que se filtró (lentamente). Los sólidos se lavaron con EtOAc (165 mL en porciones) y se secaron para proporcionar 43 g de **4**. El filtrado combinado se concentró *en vacío* para precipitar 4,8 g adicionales de **4** después de secarlo. ¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotómeros: δ612.08 (br s, 1H), 8.43 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 8.16 (ddd, *J* = 5.4, 8.7, 14.1 Hz, 1H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.27 (app. d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.09-6.93 (m, 4H), 5.24 (dt, *J* = 8.1, 15.6 Hz, 1H), 5.14 (br s, 1H), 5.04 (app. d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.90 (app. dd, *J* = 13.4, 28.4 Hz, 1H), 4.30 (br s, 1H), 3.58-3.43 (m, 2H), 2.27 (m, 1H), 1.93 (m, 1H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotómeros: δ194.0, 193.6, 159.9 (d, *J*_{CF} = 235.2 Hz), 154.6 (d, *J*_{CF} = 9.6 Hz), 138.1, 137.5 (d, *J*_{CF} = 26.9 Hz), 136.0, 129.0, 128.5, 128.1 (d, *J*_{CF} = 40.0 Hz), 123.4, 123.3, 123.0, 122.9, 114.4 (d, *J*_{CF} = 11.7 Hz), 110.6 (d, *J*_{CF} = 23.7 Hz), 99.3 (d, *J*_{CF} = 25.2 Hz), 69.5, 68.8, 66.4, 66.3, 61.4, 61.1, 56.2, 55.7 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 382.6 [(M)⁺; calculado para C₂₁H₁₉FN₂O₄: 382.3].

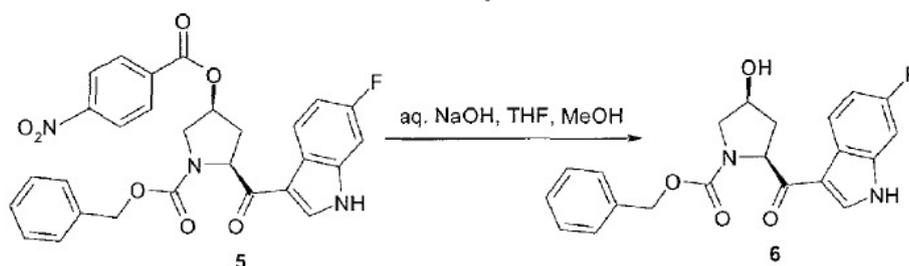
Esquema IV



20 Éster bencílico del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-(4-nitro-benzoiloxi)-pirrolidina-1-carboxílico (5): Una solución que contiene **4** (51,1 g, 134 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (27,9 g, 167 mmol) y trifenilfosfina (48,9 g, 187 mmol) en THF anhidro (700 mL) y DMF (175 mL) se enfrió a 2 °C. Se añadió DIAD (37,4 mL, 194 mmol) durante 1 h a 2-3 °C. Después de 1 h, se dejó calentar la solución a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 16 h, la mezcla de reacción se concentró *en vacío* y se añadió MeOH (250 mL) y se concentró para formar una suspensión gruesa (322 g). Se añadió MeOH adicional (250 mL) y la solución se concentró *en vacío* para proporcionar una suspensión gruesa (420 g) que se enfrió en un baño de hielo. Después de aproximadamente 1,5 h, el sólido se recogió en un filtro de vacío y se lavó con MeOH enfriado (190 mL). El producto se secó con aire seco

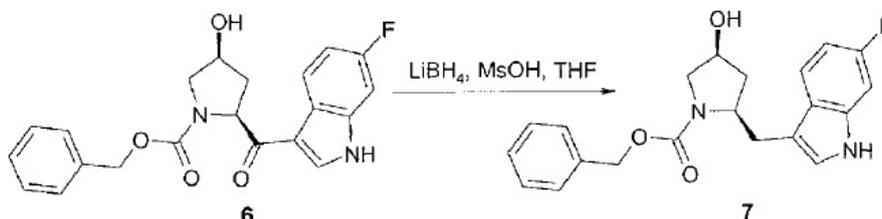
25 en el filtro para proporcionar 82,9 g (>100%) de **5** como un sólido de color amarillo claro que se utilizó directamente en la siguiente reacción. ¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotómeros: δ12.14 (br s, 1H), 8.47 (app. d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.29-8.21 (m, 3H), 8.03 (dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz, 2H), 7.43-7.33 (m, 2H), 7.28 (app. dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 1H), 7.20-7.08 (m, 4H), 5.55 (br s, 1H), 5.42 (dd, *J* = 8.4, 15.3 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 12.6, 22.2 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.36 (m, 1H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotómeros: δ192.9, 192.4, 164.2, 160.0 (d, *J*_{CF} = 235.5 Hz), 154.5 (d, *J*_{CF} = 12.0 Hz), 150.9, 137.5, 137.1 (d, *J*_{CF} = 12.6 Hz), 135.6, 135.1, 131.3, 128.9 (d, *J*_{CF} = 28.0 Hz), 128.5, 128.2, 128.1, 127.6, 124.2, 123.0, 113.5 (d, *J*_{CF} = 8.5 Hz), 110.9 (d, *J*_{CF} = 21.9 Hz), 99.1 (d, *J*_{CF} = 25.5 Hz), 75.2, 74.3, 66.7, 66.5, 62.4, 62.1, 53.6, 53.0, 38.6, 37.6 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 531.8 [(M)⁺; calculado para C₂₈H₂₂FN₃O₇: 531.5].

Esquema V



Éster bencílico del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxílico (**6**): A una suspensión de **5** (82,9 g) en THF (600 mL), MeOH (200 mL), y agua (100 mL) se añadió NaOH acuoso al 50% (16,0 g, 200 mmol) [Nota: exotérmica; aumento de la temperatura: 23,7 °C a 25,9 °C]. Después de 2 h, se añadió HOAc glacial (5,3 g) para ajustar el pH a 7-8 [Nota: la solución de color naranja cambió a amarillo claro] y la mezcla de reacción se concentró *en vacío*. Se añadió agua (500 mL) y el disolvente se eliminó *en vacío* hasta formar una suspensión espesa. El sólido se recogió en un filtro de vacío y se lavó con agua (400 mL en porciones). El sólido se secó en un horno de vacío a 55 °C para proporcionar 42,6 g (83%, 2 etapas) de **6** como un sólido de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO): δ8.38 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 8.14 (ddd, *J* = 5.7, 8.7, 14.1 Hz, 1H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.25 (app. dd, *J* = 2.1, 9.9 Hz, 1H), 7.10-6.95 (m, 4H), 5.16-4.98 (m, 2H), 4.90 (app. q, *J* = 13.5, 25.8 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.74 (app. ddd, *J* = 6.3, 11.1, 18.3 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 2.59 (m, 1H), 1.73 (app. ddd, *J* = 6.6, 12.9, 25.2 Hz, 1H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, *d*₆-DMSO): δ193.8, 193.3, 160.0 (d, *J*_{CF} = 235.2 Hz), 154.4 (d, *J*_{CF} = 14.5 Hz), 137.5 (d, *J*_{CF} = 26.0 Hz), 137.2 (d, *J*_{CF} = 12.3 Hz), 129.0, 128.5, 128.2 (d, *J*_{CF} = 35.4 Hz), 128.1, 127.4, 123.2, 123.1, 114.4 (d, *J*_{CF} = 11.4 Hz), 110.8 (d, *J*_{CF} = 23.7 Hz), 110.8 (d, *J*_{CF} = 23.7 Hz), 99.0 (d, *J*_{CF} = 25.8 Hz), 69.4, 68.6, 66.5, 66.4, 61.5, 61.2, 54.9, 54.6 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 383.8 [(M+H)⁺; calculado para C₂₁H₂₀FN₂O₄: 383.3].

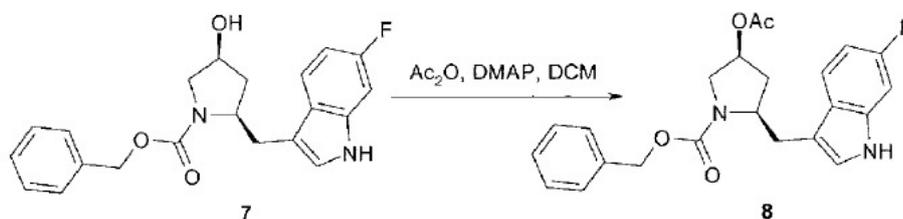
Esquema VI



Éster bencílico del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxílico (**7**): A una suspensión de **6** (10,1 g, 26 mmol) en THF anhidro (200 mL) se añadió 2M LiBH₄ en THF (26,2 mL, 52 mmol) durante aproximadamente 7 min [Nota: exotérmica; aumento de temperatura: 21,5 °C a 28,2 °C]. Después de 2,5 h, la solución de color amarillo claro se enfrió hasta aproximadamente 11 °C y se añadió ácido metanosulfónico (4,66 g, 48 mmol) durante aproximadamente 4 min [Nota: exotérmica; aumento de temperatura a 14,2 °C].

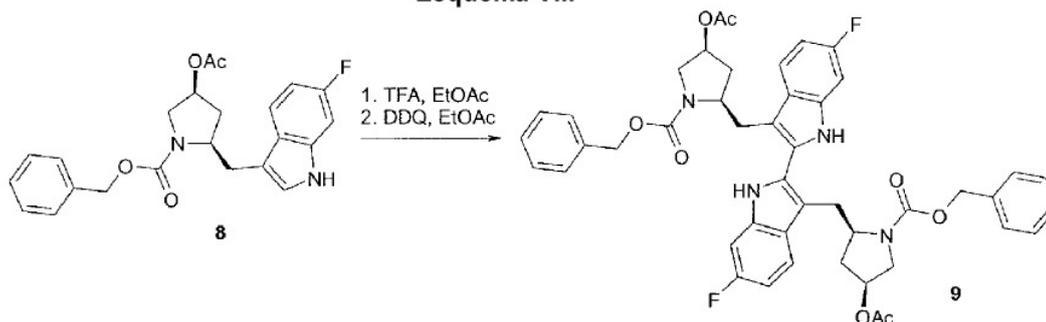
Después de 16 h, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se extinguió cuidadosamente con agua (50 mL) [Nota: la adición de agua fue exotérmica y liberó una gran cantidad de gas]. A continuación de la adición de agua, el pH se ajustó a 1 con HCl (1,9 g) concentrado. La mezcla de reacción se concentró para eliminar el THF y la solución acuosa se extrajo con EtOAc (110 mL). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (2 X 50 mL) [Nota: pH final aproximadamente 5]. La solución orgánica se concentró *en vacío* y se secó de forma azeotrópica utilizando EtOAc anhidro para proporcionar 10,2 g de **7** como una espuma blanca [Nota: 87,7 A% mediante análisis de HPLC]. ¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO), ~1:1 mezcla de rotómeros: δ10.91 (app. d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 6.0, 8.4 Hz, 0.5H), 7.48-7.30 (m, 4.5H), 7.13-7.07 (m, 3H), 6.85 (app. t, *J* = 8.4 Hz, 0.5H), 6.58 (app. t, *J* = 9.9 Hz, 0.5H), 5.19-5.10 (m, 3H), 4.25 (br s, 1H), 4.03-3.96 (m, 1H), 3.55 (dd, *J* = 5.1, 11.4 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.17-2.98 (m, 2H), 1.79 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotómeros: δ159.5 (d, *J*_{CF} = 232.1 Hz), 159.4 (d, *J*_{CF} = 232.3 Hz), 154.9, 137.7 (d, *J*_{CF} = 36.6 Hz), 136.7 (d, *J*_{CF} = 12.6 Hz), 136.6 (d, *J*_{CF} = 12.9 Hz), 129.1, 129.1, 128.7, 128.6 (d, *J*_{CF} = 26.3 Hz), 128.2, 125.0 (d, *J*_{CF} = 21.4 Hz), 124.5, 124.3, 120.1 (d, *J*_{CF} = 28.3 Hz), 120.0 (d, *J*_{CF} = 28.6 Hz), 112.4 (d, *J*_{CF} = 14.6 Hz), 107.4 (d, *J*_{CF} = 24.3 Hz), 107.3 (d, *J*_{CF} = 24.3 Hz), 69.9, 69.2, 67.1, 66.3, 58.7, 58.1, 56.1, 55.6, 38.3, 37.6, 31.2, 30.1 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 368.6 [(M)⁺; calculado para C₂₁H₂₁FN₂O₃: 368.4].

Esquema VII



Éster bencilico del ácido 4-Acetoxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidina-1-carboxílico (**8**): A una solución que contenía **7** (4,7 g, 12,8 mmol) y DMAP (81 mg, 0,66 mmol) en DCM (100 mL) se añadió anhídrido acético (2,6 g, 25,5 mmol) a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se extinguió con MeOH (aproximadamente 3 mL) y se lavó sucesivamente con Na₂CO₃ (50 mL) acuoso al 10%, HCl diluido (50 mL), y Na₂CO₃ (50 mL) acuoso al 10%. La solución orgánica se concentró *en vacío* y se filtró a través de una pequeña columna de gel de sílice (aproximadamente 25 g) [eluyente: DCM (200 mL) a 0,5% (v/v) MeOH/DCM (80 mL) a 2% MeOH/DCM (100 mL) a 5% MeOH/DCM (100 mL)]. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y se concentraron para proporcionar 3,28 g (63%) de **8** en forma de una espuma blanca [Nota: 94,3 A% mediante análisis por HPLC]. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), ~1:1 mezcla de rotómeros: δ7.99 (m, 1H), 7.75-6.61 (m, 9H), 5.28 (m, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.82 (dt, *J* = 5.4, 13.5 Hz, 1H), 3.60 (app. t, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.50 (d, *J* = 11.7 Hz, 0.5H), 3.31 (d, *J* = 12.9 Hz, 0.5H), 2.87 (dt, *J* = 5.1, 13.5 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), ~1:1 mezcla de rotómeros: δ170.8, 160.2 (*J*_{CF} = 236.4 Hz), 155.2, 136.8, 136.6, 136.4, 128.9, 128.8, 128.5 (*J*_{CF} = 24.3 Hz), 124.5 (*J*_{CF} = 21.4 Hz), 123.0, 123.0, 120.0 (*J*_{CF} = 27.1 Hz), 119.9 (*J*_{CF} = 26.0 Hz), 112.8 (*J*_{CF} = 10.5 Hz), 108.2 (*J*_{CF} = 24.3 Hz), 97.7 (*J*_{CF} = 25.7 Hz), 74.0, 73.2, 67.9, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.0, 35.4, 34.6, 30.8, 29.7, 21.5 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 410.6 [(M)⁺; calculado para C₂₃H₂₃FN₂O₄: 410.4].

Esquema VIII



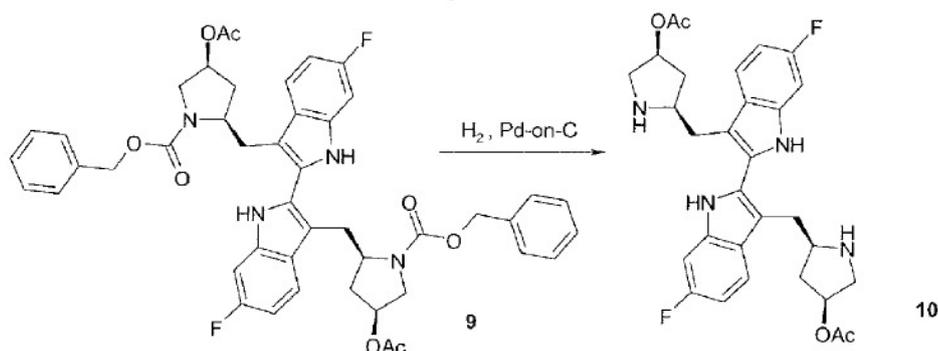
Éster bencilico del ácido 4-Acetoxi-2-[3'-(4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil]-pirrolidina-1-carboxílico (**9**): Una solución que contenía **8** (2,9 g, 7,1 mmol) en EtOAc (aproximadamente 5 mL) se enfrió en un baño de hielo y se añadió TFA enfriado previamente (20,3 mL) en una porción. La solución resultante de color amarillo se agitó a 2-4 °C. Después de 4,75 h, la mezcla de reacción fría se transfirió (mediante una cánula) con agitación a una mezcla de EtOAc (30 mL) enfriada previamente, and K₂CO₃ acuoso al 25% (80,7 g). La capa acuosa se separó y se extrajo con EtOAc (3 X 30 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con Na₂CO₃ acuoso al 10% (30 g). La solución orgánica se concentró *en vacío* y se secó de forma azeotrópica utilizando EtOAc anhidro para proporcionar 2,95 g de diastereómeros de indolilindolina en forma de una espuma de color amarillo que se utilizó directamente en la siguiente reacción. Espectro de masa (ESI), *m/z* 821.3 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₄₆F₂N₄O₈: 820.9].

A una solución que contiene los diastereómeros (2,95 g) en EtOAc (30 mL) se añadió DDQ (885 mg, 3,9 mmol) en una porción [Nota: exotérmica; aumento de temperatura: 26 °C a 31,6 °C]. Después de 3 h, la mezcla de reacción de color marrón/naranja oscuro se filtró a través de Celite® que se enjuagó posteriormente con EtOAc (50 mL). [Nota: se realizó una segunda reacción realizada a una escala de 0,5 mmol para pruebas]. El filtrado se lavó con Na₂CO₃ acuoso al 10% (2 lavados: 74 g, a continuación 58 g). La capa orgánica se concentró *en vacío* para proporcionar 2,14 g de **9** como un sólido de color marrón claro.

La almohadilla de Celite® se enjuagó adicionalmente con THF (100 mL) que se concentró *en vacío* para proporcionar otros 1,12 g de **9** en forma de un sólido de color beige. Los sólidos se disolvieron en acetato de isopropilo (iPrAc, 50 mL). La solución de iPrAc se redujo a aproximadamente 20 mL y la suspensión resultante se calentó a reflujo, se enfrió a temperatura ambiente, y a continuación se colocó en un baño de hielo. Después de 1 h, el sólido se recogió

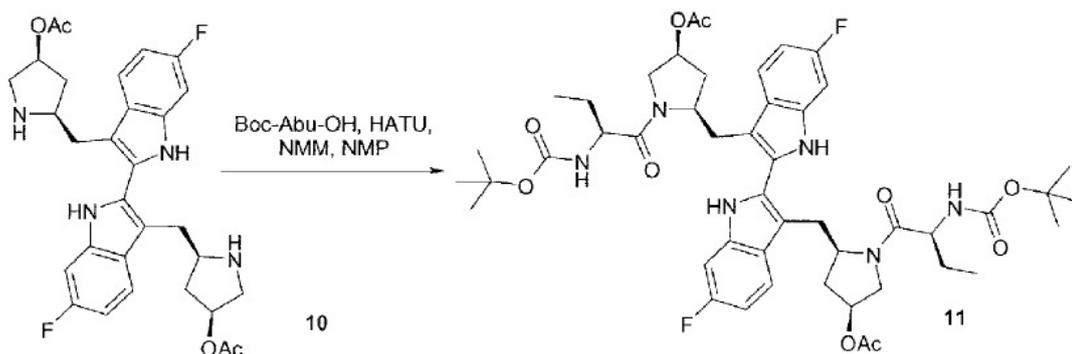
mediante filtración en vacío, se lavó con iPrAc (10 mL) y se secó en un horno de vacío para proporcionar 2,13 g (65%, 2 etapas) de **9** en forma de sólido de color beige [Nota: ~100 A% mediante análisis por HPLC]. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 11.29 (br s, 2H), 7.57-7.36 (m, 14H), 6.90 (app. dt, $J = 2.1, 9.3$ Hz, 2H), 5.39-5.30 (m, 6H), 4.28 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.84-3.73 (m, 4H), 3.66 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.40 (dd, $J = 12.0, 14.4$ Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.17 (m, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.7, 161.9, 158.8, 156.3, 137.5, 137.3, 136.5, 128.9, 128.6, 128.5, 125.9, 118.8, 118.6, 108.8, 108.5, 108.3, 98.7, 98.3, 74.4, 68.0, 60.1, 53.5, 34.5, 28.9, 21.7 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 818.2 [(M)+; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 818.8].

Esquema IX



5-[3'-(4-acetoxi-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (**10**): Una suspensión que contenía **9** (35 g, 42,7 mmol) en 1:1 EtOAc/MeOH (400 mL) se distribuyó en dos hidrogenadores Parr 500 mL (aproximadamente 200 mL/cada uno), y se cargaron con Pd sobre C al 10% (en húmedo, 5000 mg/cada uno, Aldrich®). La mezcla de reacción fue presurizada a 50 PSI H_2 y se agita durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite® y los sólidos se lavaron con EtOAc. El filtrado aclarado se concentró *en vacío* para proporcionar 24 g de **10** en forma de un sólido de color hueso que se utilizó directamente en la siguiente reacción. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 13.10 (br s, 2H) 7.45 (dd, $J = 5.2, 8.9$ Hz, 2H), 7.03 (dd, $J = 2.3, 9.8$ Hz, 2H), 6.85 (m, 2H), 5.35 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.18-3.35 (m, 4H), 2.90-3.14 (m, 4H), 2.56 (m, 2H), 2.00-2.10 (m, 2H), 2.04 (s, 6H), 1.80-1.92 (m, 2H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 171.3, 161.7, 158.6, 136.1, 135.9, 130.5, 130.4, 125.4, 119.1, 118.9, 109.6, 108.0, 107.6, 97.6, 97.5, 75.1, 57.7, 51.6, 38.7, 32.8, 21.6 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 550.9 [(M)+; calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_4$: 550.6].

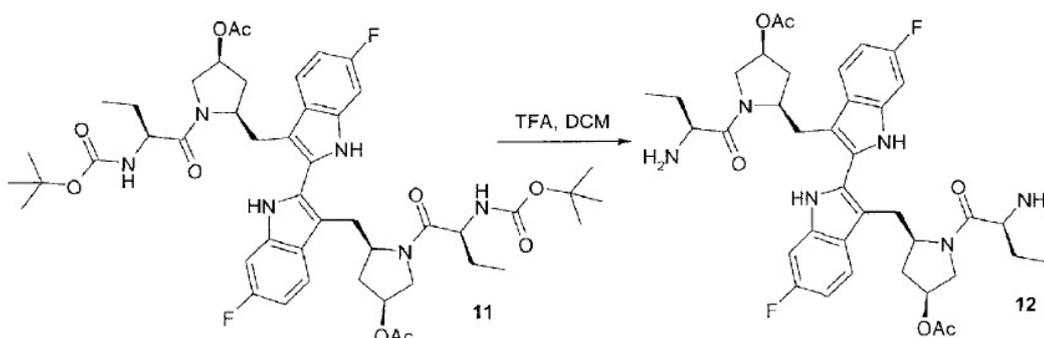
Esquema X



5-{3'-[4-acetoxi-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil}-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (**11**): A una solución que contenía Boc-Abu-OH (20,4 g, 100 mmol) y HATU (42,0 g, 110 mmol) en NMP anhidro (150 mL) a 0 °C se añadió NMM (16 mL, 150 mmol) seguido de una solución de **10** (24 g, 42 mmol) en NMP (100 mL). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con MTBE (1000 mL) y la mezcla heterogénea se lavó con agua (500 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica formó una suspensión heterogénea. Se añadió MTBE (1000 mL) y EtOAc (500 mL) y la solución ahora homogénea se lavó sucesivamente con 1 N HCl (2 X 100 mL), NaHCO_3 acuoso saturado (2 X 100 mL), salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El residuo se disolvió en 1:1 DCM/ MeOH (600 mL) y DCM (aproximadamente 200 mL) se eliminó mediante destilación a 50 °C [Nota: se observó una pequeña cantidad de precipitado de color blanco]. Se

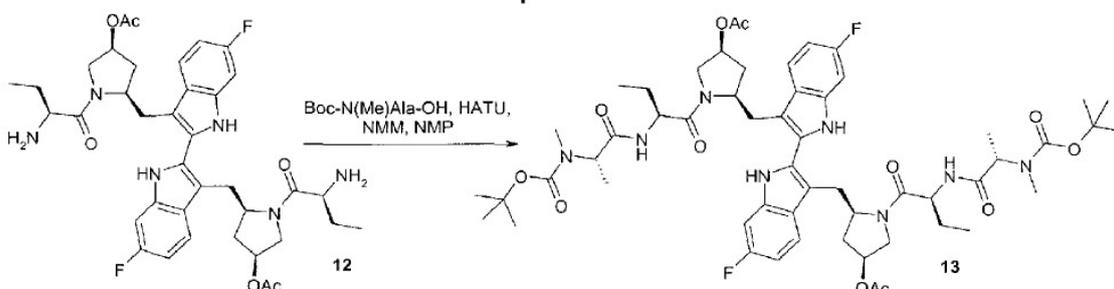
añadió MeOH (200 mL) y se eliminó el disolvente adicional (aproximadamente 200 mL) a 50 °C. La mezcla heterogénea se enfrió a -5 °C. Después de 16 h, el sólido se recogió mediante filtración en vacío y se lavó con MeOH frío. El sólido se secó bajo alto vacío para proporcionar 32 g de **11** en forma de un sólido de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ 11.22 (br s, 2H), 7.40 (dd, *J* = 5.1, 8.7 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J* = 8.40, 8.40, 2H) 6.26 (br s, 2H), 5.44 (m, 2H), 4.39 (dd, *J* = 7.5, 16.5 Hz, 2H), 4.24 (m, 2H), 4.15 (dd, *J* = 5.1, 12.9 Hz, 2H), 3.79 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 3.10-3.30 (m, 4H), 2.32 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.56 (s, 18H), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 172.2, 170.4, 161.4, 158.3, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9, 118.7, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.4, 53.8, 53.5, 34.1, 28.7, 28.6, 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 920.5 [(M)⁺; calculado para C₄₈H₆₂F₂N₆O₁₀: 921.0].

Esquema XI



5-{3'-[4-acetoxi-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil}-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (12): Una solución que contenía **11** (27,5 g, 30 mmol) en DCM (200 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA (50 mL) y la mezcla de reacción se monitorizó mediante análisis por LC/MS hasta que una conversión completa de **11** a **12** (aproximadamente 3 h). El disolvente se eliminó *en vacío* y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (aproximadamente 1 L). la solución de EtOAc se vertió cuidadosamente en una mezcla de NaHCO₃/hielo/agua saturada acuosa para neutralizar el TFA residual. La fase orgánica se separó y se lavó dos veces con NaHCO₃ saturado acuoso y a continuación con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc (2 X 100 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar 22 g de **12** crudo en forma de un sólido de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ + *d*₄-MeOH), mezcla de rotómeros: δ 11.62 (br s, 2H), 7.48-7.62 (m, 4H), 6.89 (ddd, *J* = 2.4, 9.3, 9.3 Hz, 2H), 5.48 (dd, *J* = 4.5, 4.8 Hz, 2H), 4.52 (dd, *J* = 9.3, 9.3 Hz, 2H), 4.06 (dd, *J* = 4.8, 12.3 Hz, 2H), 3.78 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.54-3.70 (m, 4H), 3.30-3.40 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.02-2.16 (m, 2H), 1.70-1.96 (m, 4H), 1.09 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃ + *d*₄-MeOH): δ 173.5, 170.9, 161.8, 158.6, 137.2, 137.1, 128.2, 128.1, 125.6, 118.7, 118.6, 108.6, 108.3, 108.0, 98.6, 98.1, 74.6, 60.1, 53.5, 33.5, 28.0, 21.4, 9.7 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 721.4 [(M)⁺; calculado para C₃₈H₄₆F₂N₆O₆: 720.8].

Esquema XII

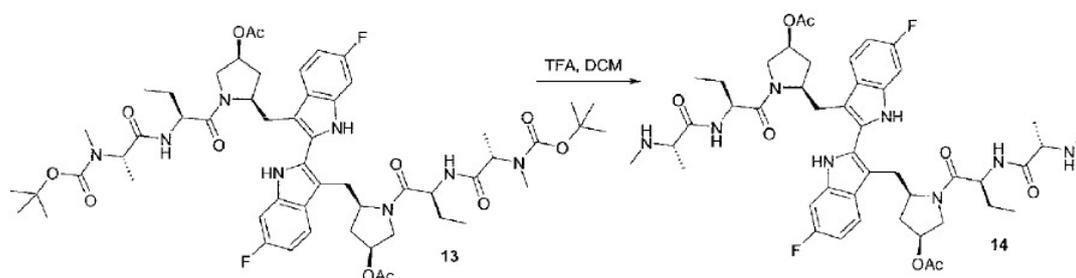


5-(3'-[4-acetoxi-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (13): A una solución que contiene Boc-N(Me)Ala-OH (14,6 g, 72 mmol) y HATU (30,4 g, 80 mmol) en NMP anhidro (150 mL) a 0 °C se añadió NMM (12 mL, 105 mmol) seguido de la adición de **12** (30 mmol) en NMP (200 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (1 L) y se lavó sucesivamente en agua (1 L), 1N HCl (2 X 100 mL), NaHCO₃ acuoso

saturado (2 X 100 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró para proporcionar 33,5 g de **13** crudo.

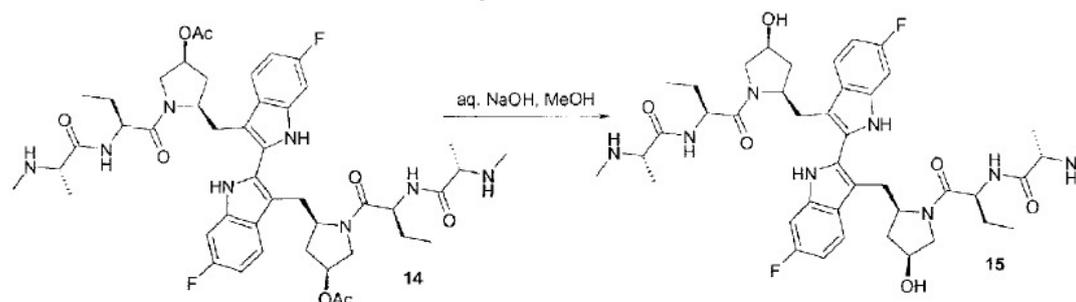
El **13** crudo se disolvió en EtOH (50 mL) y a continuación se añadió lentamente al agua (1000 mL) con agitación enérgica a 50 °C lo que dio como resultado la precipitación de un sólido blanco. La mezcla heterogénea se enfrió a -5 °C. Después de 16 h, el sólido se recogió mediante filtración por vacío y se lavó con agua. El sólido húmedo se secó bajo condiciones de alto vacío a 50 °C para proporcionar 29,9 g de **13** en forma de un sólido de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ11.57 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.89 (m, 2H), 5.50 (m, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.67 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.50 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.20 (dd, *J* = 3.9, 12.3 Hz, 2H) 3.85 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.57 (br d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 3.34 (dd, *J* = 12.0, 13.8 Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.34 (s, 6H), 2.1 (m, 2H), 1.95 (dt, *J* = 6.0, 13.8 Hz, 2H), 1.79 (dt, *J* = 7.2, 14.1 Hz, 2H), 1.52 (s, 18H), 1.39 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ174.0, 172.1, 171.9, 170.5, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.8, 108.4, 108.1, 98.8, 98.5, 81.0, 74.6, 60.1, 54.0, 52.0, 33.7, 30.5, 28.6, 28.1, 25.9, 21.6, 14.0, 9.9 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 1091.7 [(M)⁺; calculado para C₅₆H₇₆F₂N₈O₁₀: 1091.2].

Esquema XIII



5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolilmetil)-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (14): Una solución que contenía **13** (28,5 g, 26 mmol) en DCM (150 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA (50 mL). Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitorizó hasta que el análisis por LC/MS reveló la conversión completa de **13** a **14** (aproximadamente 4 h). El disolvente se eliminó *en vacío* y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (500 mL) y se vertió *cuidadosamente* en una mezcla de NaHCO₃/hielo acuosa. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 x 250 mL). Los extractos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ acuoso saturado, a continuación con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 24 g de **14** en forma de un sólido de color amarillo claro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ1.66 (br s, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 2H), 7.43 (dd, *J* = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 6.83 (ddd, *J* = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.41 (dd, *J* = 4.2, 4.5 Hz, 2H), 4.64 (dd, *J* = 7.8, 14.1 Hz, 2H), 4.36 (br d, *J* = 9.3, 9.6 Hz, 2H), 4.13 (dd, *J* = 4.8, 12.6 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.44 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 3.0-3.18 (m, 4H), 2.50 (s, 6H), 2.30 (s, 6H), 2.15 (d, *J* = 14.4 Hz, 2H), 1.90-2.08 (m, 2H), 1.76-1.90 (m, 2H), 1.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ175.3, 172.6, 170.4, 161.8, 137.5, 137.3, 128.4, 128.3, 125.9, 118.6, 118.5, 108.5, 108.1, 107.8, 98.7, 98.3, 74.5, 60.9, 59.9, 53.9, 51.3, 35.8, 33.6, 27.6, 26.2, 21.5, 20.2, 10.1 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 891.6 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₆₀F₂N₈O₈: 891.0].

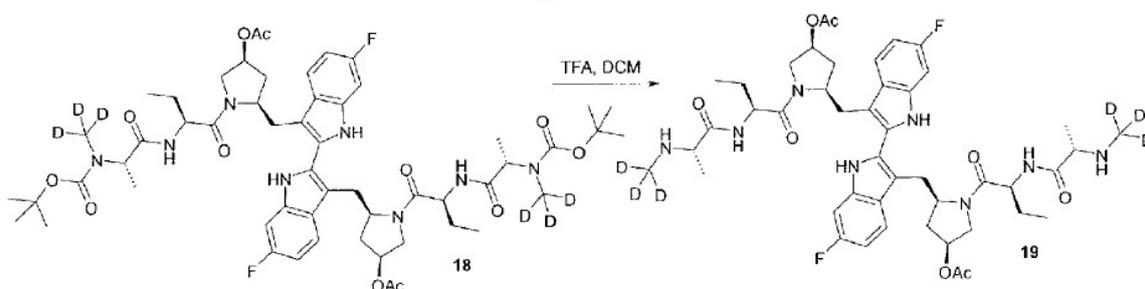
Esquema XIV



N-[1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil]-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidroxi-pirrolidina-1-carbonil]-propil]-2S-metilamino-propionamida (15): A una solución que

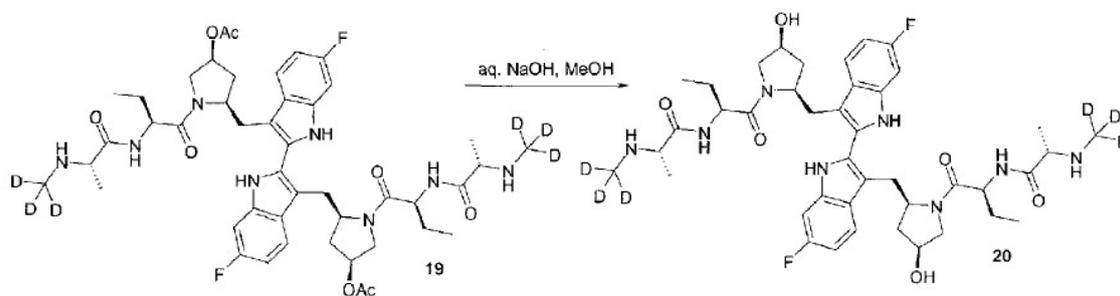
5-^{3'}-{4-acetoxi-1-[2-(2-^d₃-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindol-3-ilmetil)-1-[2-(2-^d₃-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (**18**): A una solución que contiene Boc-N(^d₃-Me)Ala-OH (17, 1,00 g, 4,83 mmol) y HATU (2,00 g, 5,30 mmol) en NMP anhidro (20 mL) a 0 °C se añadió NMM (0.8 mL, 7,20 mmol) seguido de adición de **12** (crudo, 1,73 g, 2,40 mmol) en NMP (20 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (200 mL) y se lavó sucesivamente con agua (200 mL), 1N HCl (2 X 100 mL), NaHCO₃ saturado acuoso (2 X 100 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ saturado acuoso, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contienen el producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 1,1 g de **18** (42%) en forma de un sólido de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ11.56 (br s, 2H), 7.56 (dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.10 (br s, 2H), 6.89 (ddd, *J* = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.75 (br s, 2H), 4.67 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.50 (t, *J* = 9.3 Hz, 2H), 4.18 (dd, *J* = 4.2, 11.7 Hz, 2H) 3.85 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.57 (dd, *J* = 2.1, 14.4 Hz, 2H), 3.34 (dd, *J* = 12.0, 14.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.29 (br s, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.51 (s, 18H), 1.39 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H) ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 1097.7 [(M)+; calculado para C₅₆H₇₀D₆F₂N₈O₁₂: 1097.3].

Esquema XVII



5-^{3'}-{4-acetoxi-1-[2-(2-d-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-^d₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (**19**): Una solución que contiene **18** (1,10 g, 1,00 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (5 mL). Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitorizó hasta que el análisis con LC/MS reveló una conversión completa de **18** a **19** (aproximadamente 4 h). El disolvente se eliminó *en vacio* y el residuo de color verde, oscuro se disolvió en EtOAc (100 mL) y se vertió *cuidadosamente* en una mezcla de NaHCO₃/hielo acuosa. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 X 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ saturado acuoso, y a continuación con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar **19** crudo que se utilizó sin purificación adicional. Espectro de masa (ESI), *m/z* 897.5 [(M)+; calculado para C₄₆H₅₄D₆F₂N₈O₈: 897.0].

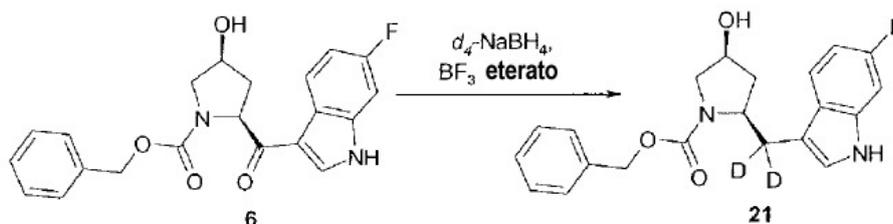
Esquema XVIII



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidroxi-1-[2S-(2S-^d₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil)-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidroxi-pirrolidina-1-carbonil]-propil}-2S-^d₃-metilamino-propionamida (**20**): A una solución que contiene **19** crudo (aproximadamente 1,00 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió 1 M NaOH (2 mL) a temperatura ambiente. Después de 35 min, se eliminó el MeOH *en vacio* y el residuo se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc (2 X 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían

el producto se combinaron, congelaron, y liofilizaron para proporcionar 0,6 g de **20** (75%) como un sólido floculante de color blanco. ^1H RMN (300 MHz, CD_3CN), mezcla de rotómeros: δ 11.86 (s, 2H), 7.91 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 5.4, 8.7$ Hz, 2H), 7.45 (dd, $J = 2.4, 9.9$ Hz, 2H), 6.83 (m, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.84 (dd, $J = 4.2, 11.1$ Hz, 2H), 3.66 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{CD}_3\text{CN} + d_4\text{-MeOH}$), mezcla de rotómeros: δ 175.2, 173.0, 162.4, 159.3, 137.8, 137.6, 128.8, 128.7, 126.8, 110.8, 120.7, 109.5, 108.7, 108.4, 98.5, 98.1, 71.6, 60.5, 60.1, 56.8, 52.6, 36.6, 28.6, 26.0, 22.7, 19.0, 10.1 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 813.4 [(M)+; calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{D}_6\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 813.0].

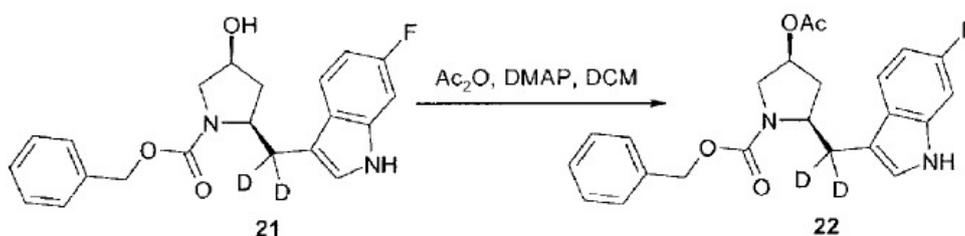
Esquema XIX



10 Éster bencílico del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-il-d₂-metil)-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxílico (**21**): Una suspensión de **6** (3,0 g, 7,85 mmol) en THF anhidro (50 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió $d_4\text{-NaBH}_4$ (0,66 g, 15,7 mmol) en una porción seguido de la adición de $\text{BF}_3\text{-eterato}$ (1,1 mL, 8,60 mmol). Después de aproximadamente 10 min, el baño de hielo se eliminó y la mezcla de reacción se calentó a reflujo.

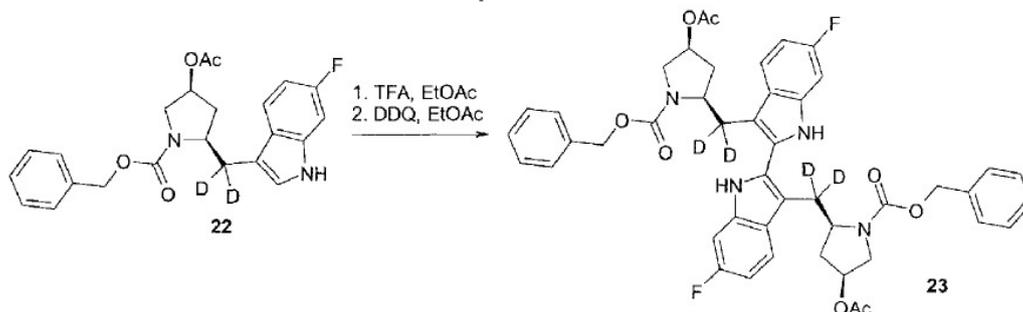
15 Después de 3 h, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se extinguió cuidadosamente con NH_4Cl acuoso saturado (50 mL). La mezcla bifásica se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se separó y se lavó con agua (2 X 50 mL) y a continuación con salmuera. La capa de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar 3,2 g de **21** crudo (>cantidad) que se utilizó sin purificación adicional. Espectro de masa (ESI), m/z 371.2 [(M+H)+; calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{D}_2\text{FN}_2\text{O}_3$: 371.4].

Esquema XX



20 Éster bencílico del ácido 4-Acetoxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-il-d₂-metil)-pirrolidina-1-carboxílico (**22**): A una solución que contiene **21** crudo (aproximadamente 7,85 mmol), Et₃N (1,2 g, 12,0 mmol), y DMAP (50 mg, cat.) en DCM (30 mL) se añadió anhídrido acético (0,74 mL, 7,85 mmol) a temperatura ambiente. Después de 3 h, la mezcla de reacción se extinguió con NaHCO_3 acuoso saturado (50 mL) y a continuación se diluyó con DCM. La capa de DCM se separó y se lavó sucesivamente con HCl diluido (50 mL), agua (50 mL), y salmuera (50 mL). La solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice [EtOAc al 30-40% en hexano] para proporcionar 2,0 g (62%, 2 etapas) de **22** en forma de una espuma de color blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), ~1:1 mezcla de rotómeros: δ 8.41 (br s, 1H), 7.80-6.50 (m, 9H), 5.25 (m, 1H), 5.21 (m, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.82 (dt, $J = 5.1, 13.2$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 11.4, 11.7$ Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.00 (m, 2H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), ~1:1 mezcla de rotómeros: δ 170.8 160.2 ($J_{\text{CF}} = 236.2$ Hz), 155.2, 136.9, 136.6, 136.5, 129.0, 128.9, 128.6 ($J_{\text{CF}} = 24.4$ Hz), 124.5 ($J_{\text{CF}} = 22.1$ Hz), 123.1, 120.1 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 119.9 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 112.8, 108.2 ($J_{\text{CF}} = 23.5$ Hz), 97.7 ($J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz), 74.1, 73.3, 68.0, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.1, 35.4, 34.6, 21.5 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 413.1 [(M)+; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{D}_2\text{FN}_2\text{O}_4$: 412.4].

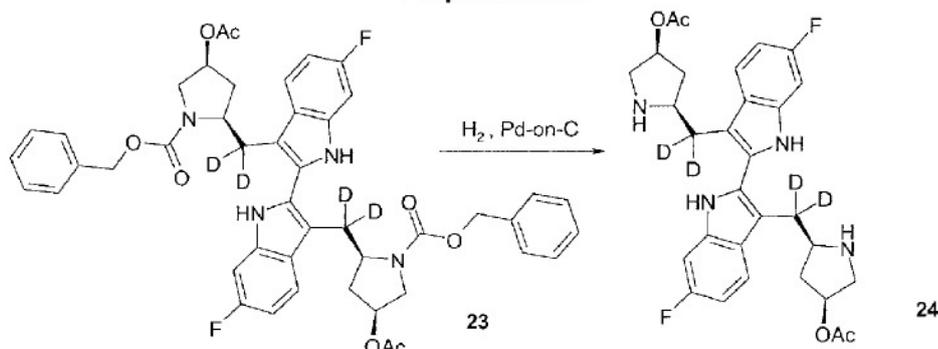
Esquema XXI



Éster bencílico del ácido 4-Acetoxi-2-[3'-(4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-pirrolidina-1-carboxílico (**23**): Se disolvió indol **22** (2,0 g, 4,80 mmol) en TFA (10 mL) enfriado previamente (-5 °C). La solución resultante de color amarillo se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró *en vacío* para eliminar el TFA y la mezcla cruda de diastereómeros de indolilindolina se utilizó directamente en la siguiente reacción. Espectro de masa (ESI), m/z 825.4 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₄₂D₄F₂N₄O₈: 824.9].

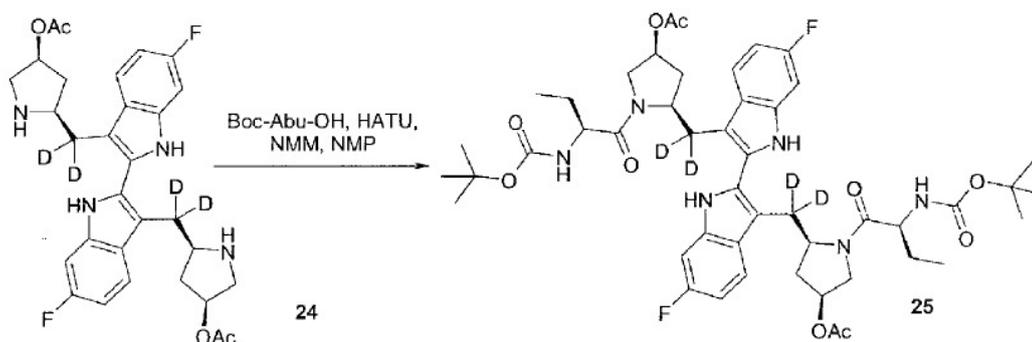
A una solución que contiene diastereómeros de indolilindolina en EtOAc (100 mL) se añadió DDQ (0,58 g, 2,5 mmol) en una parte. Después de 15 min, la mezcla de reacción de color marrón/naranja oscuro se extinguió con NaHCO₃ acuoso saturado. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó sucesivamente con NaHCO₃ acuoso saturado (3 x 50 mL) y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron. El producto crudo se disolvió en DCM (10 mL) y la solución se diluyó entonces con MeOH (50 mL). La eliminación lenta del DCM *en vacío* proporcionó un precipitado que se recogió mediante filtración de vacío, se lavó con MeOH frío, y se secó para proporcionar 1,7 g de **23** (86%, 2 etapas). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 11.30 (br s, 2H), 7.60-7.30 (m, 14H), 6.90 (app. dt, J = 2.4, 9.3 Hz, 2H), 5.40 (m, 2H), 5.36 (d, J = 3.6 Hz, 4H), 4.28 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 2.31 (s, 6H), 2.06 (m, 4H) ppm; Espectro de masa (ESI), m/z 823.3 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₄₀D₄F₂N₄O₈: 822.9].

Esquema XXII



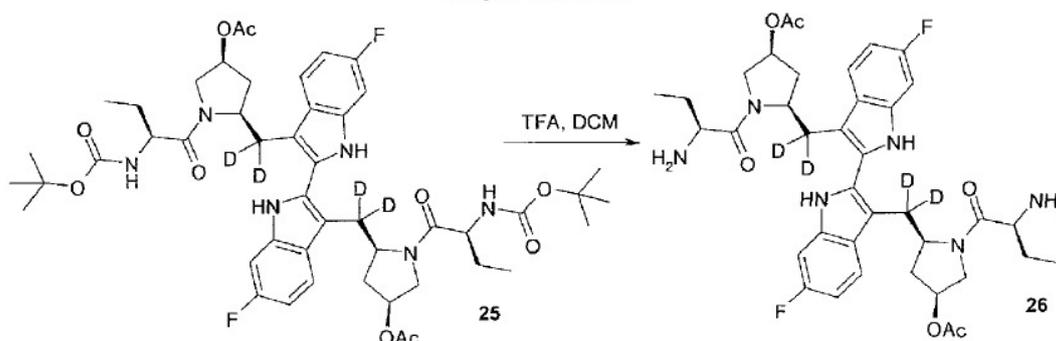
5-[3'-(4-acetoxi-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-pirrolidin-3-il éster del ácido ascético (**24**): Una suspensión que contenía **23** (0,40 g, 0,48 mmol) en 1:1 EtOAc/MeOH (40 mL) se colocó en un frasco de Parr de 500 mL y se cargó con Pd sobre C al 10% (en húmedo, aproximadamente 200 mg). La mezcla de reacción se presurizó a 50 PSI H₂ y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite® y los sólidos se lavaron con EtOAc. El filtrado aclarado se concentró *en vacío* para proporcionar **24** crudo en forma de un sólido de color hueso que se utilizó directamente en la siguiente reacción. Espectro de masa (ESI), m/z 555.2 [(M)⁺; calculado para C₃₀H₂₈D₄F₂N₄O₄: 554.6].

Esquema XXIII



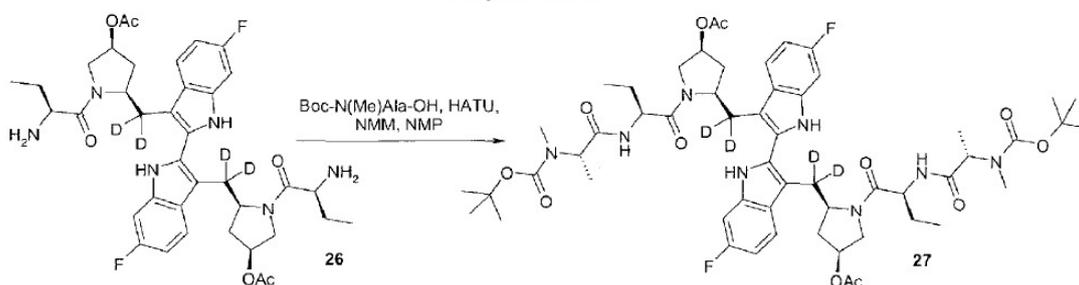
5-[3'-[4-acetoxi-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-2-il- d_2 -metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -dimetil-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (25): A una solución que contiene Boc-Abu-OH (224 mg, 1.1 mmol) y HATU (442 mg, 1.2 mmol) en NMP anhidro (10 mL) a 0 °C se añadió NMM (0,2 mL, 1,7 mmol) seguido de una solución de **24** (0,48 mmol) en NMP (10 mL). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (100 mL) y se lavó sucesivamente con agua (5 X 50 mL), 1N HCl (50 mL), NaHCO₃ saturado acuoso (50 mL), y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar 310 mg de **25** (70%, 2 etapas) en forma de un sólido floculante de color blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ 11.17 (br s, 2H), 7.39 (dd, *J* = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.75 (dd, *J* = 8.40, 8.40, 2H), 6.40 (br s, 2H), 5.44 (m, 2H), 4.40 (dd, *J* = 7.8, 16.5 Hz, 2H), 4.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.15 (dd, *J* = 5.1, 12.9 Hz, 2H), 3.80 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.57 (s, 18H), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ 172.1, 170.4, 161.4, 158.2, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9, 118.8, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.3, 53.8, 53.6, 34.1, 28.7, 28.6 (br), 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 925.4 [(M)⁺; calculado para C₄₈H₅₈D₄F₂N₆O₁₀: 925.0].

Esquema XXIV



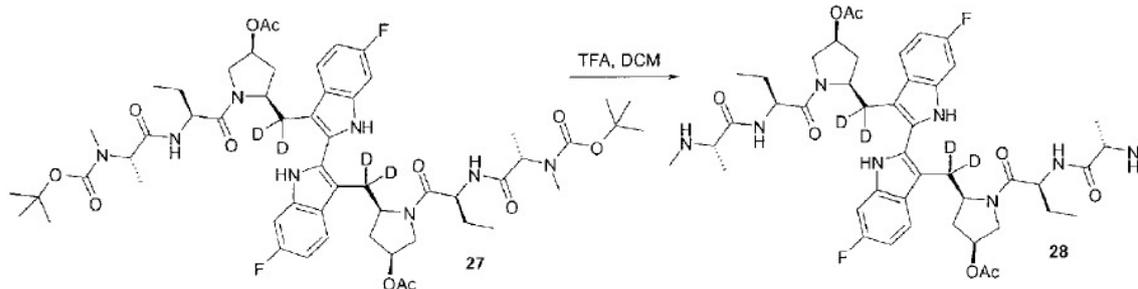
5-[3'-[4-acetoxi-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-2-il- d_2 -metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (26): Una solución que contiene **25** (310 mg, 0,34 mmol) en DCM (20 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA (5 mL) y la reacción se monitorizó mediante análisis con LC/MS hasta completar la conversión de **25** a **26** (aproximadamente 3 h). El disolvente se eliminó *en vacío* y el residuo de color verde, oscuro se disolvió en EtOAc (50 mL). La solución de EtOAc se vertió en una mezcla de NaHCO₃/hielo/agua acuosa saturada para neutralizar el TFA residual. La fase orgánica se separó y se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y a continuación una vez con salmuera. Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con EtOAc (2 X 20 mL) y los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se concentraron para proporcionar **26** crudo (250 mg) en forma de un sólido de color hueso. Espectro de masa (ESI), *m/z* 725.3 [(M)⁺; calculado para C₃₈H₄₂D₄F₂N₆O₆: 724.8].

Esquema XXV



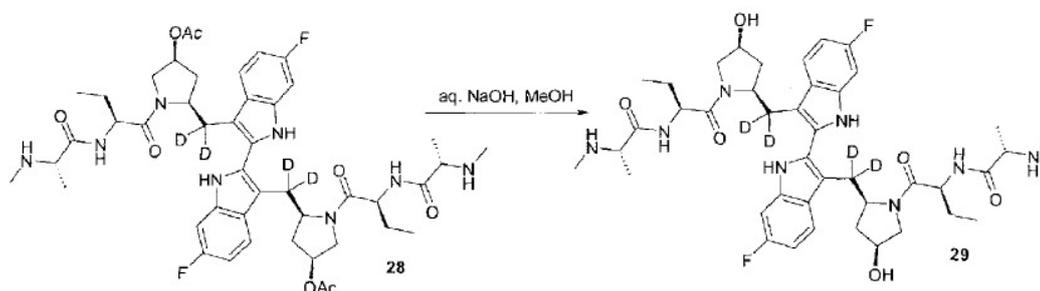
- 5 5-(3'-(4-acetoxi-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil- d_2 -metil)-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-iléster del ácido acético (27): A una solución que contiene Boc-N(Me)Ala-OH (83 mg, 0,41 mmol) y HATU (172 mg, 0,45 mmol) en NMP anhidro (5 mL) a 0 °C se añadió NMM (0,1 mL, 0,85 mmol) seguido de la adición de **26** crudo (123 mg, 0,17 mmol) en NMP (5 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (100 mL) y se lavó sucesivamente con agua (50 mL), 1N HCl (2 X 50 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 X 50 mL), y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ acuoso saturado, se filtró, y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar 170 mg de **27** (91%, 2 etapas) en forma de un sólido floculante de color hueso. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.86 (m, 2H), 5.46 (m, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.17 (dd, *J* = 4.8, 12.3 Hz, 2H) 3.82 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 2.05 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.48 (s, 18H), 1.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), mezcla de rotómeros: δ173.3, 170.2, 170.1, 170.5, 168.6, 159.9, 135.5, 135.4, 126.5, 126.4, 123.8, 116.8, 116.7, 106.8, 106.4, 106.1, 96.8, 96.5, 79.1, 72.6, 57.9, 52.1, 50.1, 31.7, 28.5, 26.6, 25.5 (br), 23.9, 19.6, 19.0, 12.1, 8.0 ppm. Espectro de masa (ESI), *m/z* 1095.5 [(M)⁺; calculado para C₅₆H₇₂D₄F₂N₈O₁₂: 1095.3].

Esquema XXVI



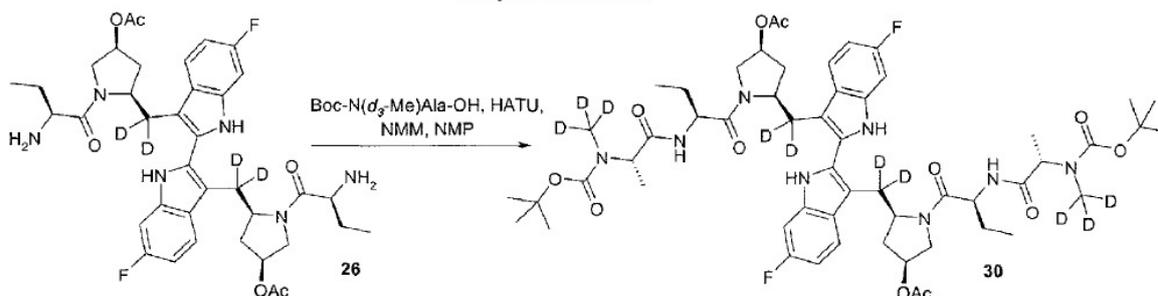
- 20 5-(3'-(4-acetoxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (28): Una solución que contenía **27** (170 mg, 0,15 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA (5 mL). Después de 30 min, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se monitorizó hasta que el análisis de LC/MS reveló la conversión completa de **27** a **28** (aproximadamente 4 h). El disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo de color verde, oscuro en se disolvió en EtOAc (100 mL) y se vertió *cuidadosamente* en una mezcla de NaHCO₃/hielo acuosa. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 X 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ acuoso saturado, a continuación con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar **28** crudo en forma de un sólido de color amarillo claro. Espectro de masa (ESI), *m/z* 895.3 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₅₆D₄F₂N₈O₈: 895.0].

Esquema XXVII



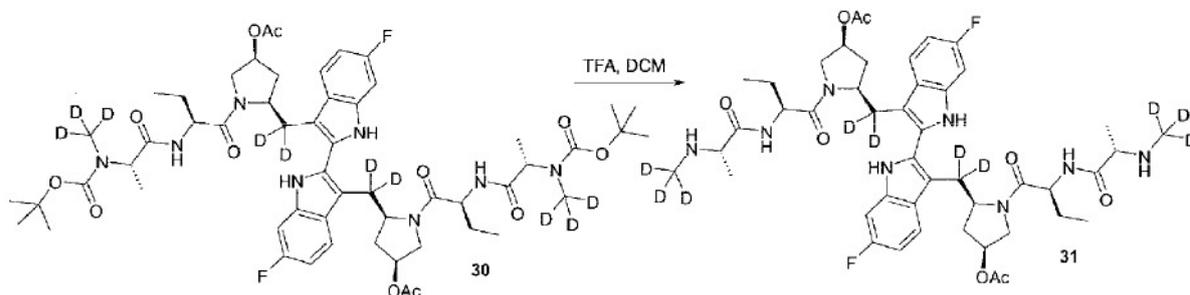
N-[1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-(4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-il- d_2 -metil)-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-4S-hidroxi-pirrolidina-1-carbonil]-propil]-2S-metilaminopropionamida (**29**): A una solución que contiene **28** crudo (0,15 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió 1 M NaOH (5 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se desgasificó y se mantuvo en atmósfera de nitrógeno envuelta en una hoja de aluminio. El baño de hielo se eliminó. Después de 60 min, el MeOH se eliminó *en vacío* y el residuo se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (50 mL). La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, y se liofilizaron para proporcionar 110 mg de **29** (90%, 2 etapas) en forma de un sólido floculante de color blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 + d_4 -MeOH), mezcla de rotómeros: δ 11.58 (s, 2H), 7.80 (dd, J = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.45 (dd, J = 2.4, 9.9 Hz, 2H), 6.87 (ddd, J = 2.4, 9.2, 9.2 Hz, 2H), 4.66 (dd, J = 5.7, 7.8 Hz, 2H), 4.60 (br s, 2H), 4.47 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.00 (dd, J = 4.8, 11.4 Hz, 2H), 3.76 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 3.43 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.19 (d, J = 14.4 Hz, 2H), 1.78-2.02 (m, 8H), 1.46 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 1.09 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 + d_4 -MeOH), mezcla de rotómeros: δ 173.6, 171.8, 161.7, 158.6, 137.1, 136.9, 128.1, 128.0, 125.9, 119.8, 119.7, 108.3, 108.2, 107.8, 97.8, 97.5, 70.9, 69.4, 59.0, 56.1, 52.0, 36.3, 35.7, 25.5, 18.5, 9.8 ppm. Espectro de masa (ESI), m/z 811.4 [(M)⁺; calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 810.9].

Esquema XXVIII



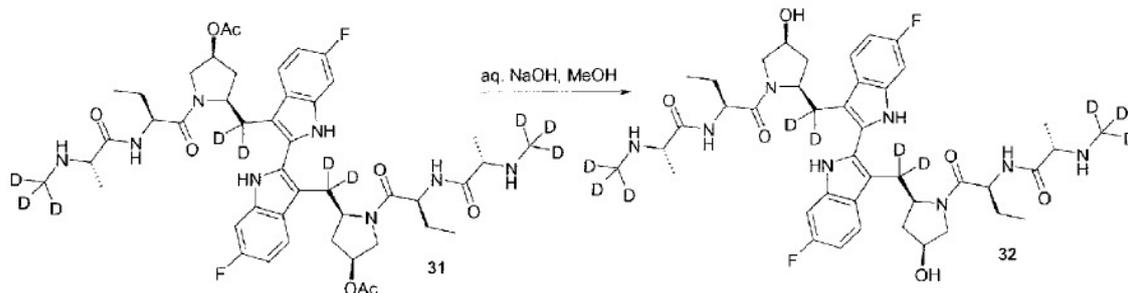
5-(3'-(4-acetoxi-1-[2-(2- d_3 -metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butil]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-1-[2-(2- d_3 -metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (**30**): A una solución que contiene Boc-N(d_3 -Me)Ala-OH (**17**, 83 mg, 0,41 mmol) y HATU (172 mg, 0,45 mmol) en NMP anhidro (5 mL) a 0 °C se añadió NMM (0,1 mL, 0,85 mmol) seguido de la adición de **26** crudo (123 mg, 0,17 mmol) en NMP (5 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (100 mL) y se lavó sucesivamente con agua (50 mL), 1N HCl (2 X 50 mL), NaHCO_3 acuoso saturado (2 X 50 mL), y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar 160 mg de **30** (85%, 2 etapas) en forma de un sólido floculante de color blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), mezcla de rotómeros: δ 11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.87 (ddd, J = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.46 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.18 (dd, J = 3.9, 11.7 Hz, 2H), 3.83 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.24 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.49 (s, 18H), 1.38 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), mezcla de rotómeros: δ 175.6, 172.2, 172.1, 170.6, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.5, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.7, 108.4, 108.0, 98.8, 98.4, 81.1, 74.6, 66.1, 59.9, 54.0, 52.1, 33.7, 28.6, 27.5 (br), 25.8, 21.6, 20.9, 14.0, 9.9 ppm; Espectro de masa (ESI), m/z 1101.5 [(M)⁺; calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{66}\text{D}_{10}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_{12}$: 1101.3].

Esquema XXIX



5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2- d_3 -metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-1-[2-(2- d_3 -metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster del ácido acético (31): Una solución que contiene **30** (160 g, 0,14 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (5 mL). Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitorizó hasta que el análisis con LC/MS reveló una conversión completa de **30** a **31** (aproximadamente 4 h). El disolvente se eliminó *en vacío* y el residuo de color verde, oscuro se disolvió en EtOAc (100 mL) y se vertió *cuidadosamente* en una mezcla de NaHCO₃/hielo acuosa. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 X 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ saturado acuoso, y a continuación con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para proporcionar **31** crudo en forma de un sólido de color amarillo. Espectro de masa (ESI), m/z 901.5 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₅₀D₁₀F₂N₈O₆: 901.1].

Esquema XXX



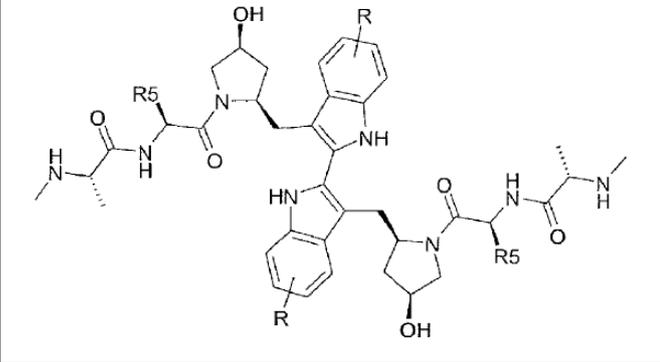
N-[1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-il- d_2 -metil]-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-4S-hidroxi-pirrolidina-1-carbonil]-propil]-2S-metilainopropionamida (32):

15 A una solución que contiene **31** crudo (0,14 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió 1 M NaOH (5 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se desgaseó y se mantuvo en atmósfera de nitrógeno envuelta en una hoja de aluminio. El baño de hielo se eliminó. Después de 60 min, el MeOH se eliminó *en vacío* y el residuo se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (50 mL). La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (Dynamax 2" C18; HOAc al 0,1% que contiene ACN/agua al 10-100% durante 30 min; 40 mL/min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, y se liofilizaron para proporcionar 100 mg de **32** (87%, 2 etapas) en forma de un sólido floculante de color blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ + d_4 -MeOH), mezcla de rotómeros: δ 11.62 (s, 2H), 7.79 (dd, J = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 7.47 (dd, J = 2.4, 10.2 Hz, 2H), 6.87 (ddd, J = 2.4, 9.2, 9.2 Hz, 2H), 4.68 (dd, J = 5.4, 7.5 Hz, 2H), 4.58 (m, 2H), 4.45 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.99 (dd, J = 4.8, 11.1 Hz, 2H), 3.75 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 3.19 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.15 (br d, J = 12 Hz, 2H), 1.78-2.02 (m, 8H), 1.39 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.07 (t, J = 7.5 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃ + d_4 -MeOH), mezcla de rotómeros: δ 175.4, 172.0, 161.8, 158.7, 137.1, 137.0, 128.2, 128.0, 126.0, 119.9, 119.7, 108.4, 108.3, 107.9, 98.0, 97.6, 71.0, 60.0, 59.6, 56.2, 51.6, 36.4, 25.8, 19.5, 9.8 ppm; Espectro de masa (ESI), m/z 817.4 [(M)⁺; calculado para C₄₂H₄₆D₁₀F₂N₈O₆: 817.0].

30 **Ejemplos 2, 3, 4, y 5**

Los compuestos sometidos a ensayo en los Ejemplos 2, 3, 4 y 5 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1



Compuesto	R5	R
15	-CH ₂ CH ₃	6-F
2	-CH(CH ₃)CH ₃	6-F
3	-R-CH(OH)CH ₃	6-F
4	-S-CH(OH)CH ₃	6-F
5	-R-CH(OCH ₃)CH ₃	6-F

Ejemplo 2A. Ensayo de degradación de cIAP

Se determinó la concentración que induce la degradación de cIAP-1 y cIAP-2 en un 50% (IC₅₀) para diversos compuestos monitorizando la desaparición de la señal de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) en células A375. En resumen, se generaron líneas celulares A375 que expresan cIAP-1 y cIAP-2 marcadas con GFP mediante transfección de un vector HA2xEGFP-pcDNA3 que contenía una región de codificación de cIAP-1 (A375Gc1) o bien de cIAP-2 (A375Gc2). 2x10⁴ of A375Gc1 o se cultivaron células A375Gc2 en placas de 96 pocillos y se trataron con diversas concentraciones de los compuestos de ensayo durante 2 h. Después de la incubación, las células se recolectaron mediante tripsinización y se suspendieron en 150 µl de DMEM-FBS al 10%. Un total de 10⁴ células se analizaron utilizando un FACScan (Becton Dickinson). Se monitorizó la fluorescencia con GFP utilizando un filtro a 488 nm y la emisión se midió con un filtro de 530 nm. Se definió el IC₅₀ como la concentración del fármaco a la que el 50% de la señal de la GFP fue inhibida.

Los resultados del ensayo de degradación de cIAP-1 y -2 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	GFP-cIAP-1 IC ₅₀ (nM)	SD	GFP-cIAP-2 IC ₅₀ (nM)	SD	Relación del IC ₅₀ de cIAP-2/cIAP-1
15	27 (n=56)	15	174 (n=61)	100	6,4
2	4 (n=3)	0,6	7 (n=3)	0,8	1,8
3	328 (n=3)	83	674 (n=3)	69	2,1
4	464 (n=12)	112	604 (n=12)	192	1,3
5	10 (n=41)	2	37 (n=38)	19	3,7

Estos datos muestran que el Compuesto 15 tiene mayor potencia relativa a la hora de degradar la cIAP-1 en relación a la cIAP-2 en comparación con los Compuestos 2, 3, 4, y 5.

Ejemplo 2B. Ensayo de desrepresión de Caspasa-3

Se sembraron células tumorales MDA-MB-231 con crecimiento exponencial mediante tripsinización, y se recolectaron mediante centrifugación en una centrifugadora de sobremesa a 1000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular se lavó una vez resuspendiendo en un tampón de lisis hipotónico de 5 mL

(20 mM HEPES, pH7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM EDTA, 1,0 mM DTT) y se recogió mediante centrifugación. El pellet se resuspendió a continuación en 1 volumen de tampón de lisis hipotónico complementado con un comprimido inhibidor de la proteasa completo (Roche) y se deja engrosar en hielo durante 30 minutos. Las células se rompieron mediante aproximadamente 50 pasajes a través de una aguja de calibre 27. La lisis se monitorizó mediante microscopía óptica. El lisado se centrifugó a 12000xg durante 10 minutos a 4°C para eliminar la fracción de membrana, las células no lisadas y los restos. La fracción soluble se recogió para determinar la concentración de proteína y para análisis posteriores. El lisado hipotónico (25 µg de proteína), 50 µg/mL de citocromo c y 10 mM dATP se combinaron en un tubo de microcentrifugadora hasta un volumen final de 9 ml en un tampón de lisis hipotónico mediante adición del compuesto de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió un tampón de lisis hipotónico de 50 µl que contiene un sustrato zDEVD-R110₍₂₎ de caspasa-3 a base de 5 µM de rodamina-110₍₂₎ pro-fluorescente, y se monitorizó la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo. La activación del lisado mediante la adición de citocromo c y los resultados de dATP en la formación de apoptosoma y la posterior activación de las caspasas-9 y -3. La XIAP endógena inhibe gran parte de esta actividad y la adición del compuesto de ensayo al lisado activado da como resultado más actividad de caspasa que la que se genera solamente por el lisado activado según se mide mediante el incremento de la intensidad de fluorescencia después del corte de zDEVD-R110₍₂₎ por parte de la caspasa-3. Los valores de la IC₅₀ se calcularon utilizando GraphPad Prism representando el incremento de la intensidad de fluorescencia vs. diferentes concentraciones de los compuestos sometidos a ensayo y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	IC ₅₀ de la desrepresión (nm) de la XIAP Caspasa-3	SD
15	24,3 (n=3)	2,0
2	13,4 (n=3)	4,3
3	0,2 (n=3)	0
4	0,35 (n=3)	0,2
5	0,36 (n=3)	0,05

Estos datos muestran que el Compuesto 15 tiene una potencia inferior para antagonizar la función de la XIAP en comparación con los Compuestos 2, 3, 4, y 5.

Ejemplo 3- Citotoxicidad

Se generaron datos de citotoxicidad en células de tumores de ovarios SKOV-3 sustancialmente como sigue a continuación. El ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un ejemplo de un ensayo que se ha utilizado para medir el crecimiento celular tal como se ha descrito anteriormente (Hansen, M. B., Nielsen, S. E., y Berg, K. (1989) J. Immunol. Methods 119, 203-210) y se han incorporado en la presente patente a modo de referencia en su totalidad. En resumen, las células SK-OV-3 se sembraron en placas de 96 pocillos en medio de McCoy con un contenido de albúmina de suero bovino fetal al 10% (5.000 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, los compuestos de ensayo se añadieron en varias concentraciones (0,003-10 mM) y las placas se incubaron a 37°C durante 72 hrs adicionales. Este tiempo de incubación fue el óptimo para medir los efectos inhibidores de diferentes análogos. Se añadieron cincuenta microlitros de un reactivo de 5mg/mL MTT 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 de Iso pocillos (OD, por sus siglas en inglés) utilizando un lector dfe microplaca (Victor2 1420, Wallac, Finland) a 535 nm. Se calculó la supervivencia celular (CS, por sus siglas en inglés) mediante la siguiente ecuación:

$$CS = (\text{OD pocillo tratado}/\text{media OD pocillos de control}) \times 100\%$$

La CC₅₀, definida como la concentración del fármaco que da como resultado un 50% de CS, se obtuvo calculando el punto en el que la curva de respuesta a la dosis cruza el punto del 50% de CS utilizando GraphPad Prism. Estos resultados sugieren que los miméticos de Smac que se unen a cIAP-1 pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer ya sea como monoterapia o en combinación con quimioterapéuticos. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de SKOV-3 para los compuestos sometidos a prueba en este ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Compuesto	CC ₅₀ nM	Std Dev (nM)
15	0.14 (n=76)	0,02
2	0.5 (n=6)	0,1
3	13 (n=4)	4
4	2 (n=23)	0,3
5	0.13 (n=76)	0,1

Estos datos indican que el Compuesto 15 tiene potencia equivalente al Compuesto 5 y es más potente que los Compuestos 2, 3, y 4.

5 **Ejemplo 4 – Tonicidad**

Los datos de pérdida de peso corporal (BWL, por sus siglas en inglés), de mortalidad y de toxicidad adicionales se generaron sustancialmente tal como sigue a continuación. Se dosificaron ratas Sprague-Dawley diariamente (QDx4, bolo i.v. introducido lentamente) con los Compuestos 15, 4 y 5. Los pesos corporales se tomaron en el día 4 y se muestran como un cambio en el porcentaje desde el día 1. Los Compuestos 4 y 5 se administraron a razón de 0,3 mg/Kg, 1 mg/Kg, o 3 mg/Kg; el Compuesto 15 se administró a razón de 1, 5, o 10 mg/Kg.

Los resultados del ensayo de BWL se muestran en la Fig 1.

Mortalidad. Los Compuestos 4 y 5 no se toleraron en dosis de 3 mg/Kg, y causaron la muerte de los animales en estas dosis. No se observó mortalidad con el Compuesto 15 a razón de 5 mg/Kg (la mortalidad se observó en dosis de 10 mg/Kg.)

15 **Resultados clínicos.** No se observaron signos clínicos en dosis de 1 mg/kg/día con el Compuesto 15 después de 4 días de la administración. Los animales tratados con el Compuesto 15 en dosis de 5 mg/kg/día mostraron signos clínicos similares a los Compuestos 4 y 5 en dosis de 1 mg/kg/día tales como letargo, aumento/irregularidad del ritmo respiratorio y un incremento del ritmo cardíaco. Las ratas tratadas con 1 mg/kg del Compuesto 5 mostró observaciones clínicas adicionales incluyendo deshidratación, mal aspecto, cromorrinorea, alopecia (cabeza), y picor excesivo desde los días 2 a 4.

25 **Peso corporal.** En dosis de 1 mg/Kg, los animales que recibieron los Compuestos 4 y 5 sufrieron pérdida de peso mientras que los animales que reciben el Compuesto 15 en dosis de 1 mg/kg/día ganaron peso. En dosis de 5 mg/kg/día con el Compuesto 15, se observó una pérdida de peso media relacionada con el tratamiento de aproximadamente un 8% desde el día 1 al día 4. Se observó una media de pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento de aproximadamente un 4 % y un 6 % en animales tratados con los Compuestos 4 y 5, respectivamente, en dosis de 1 mg/kg/día. **Patología.** La evaluación de la patología anatómica después del tratamiento con los Compuestos 4 y 5 en dosis de 1 mg/kg/día dio como resultado las siguientes observaciones. Se produjo hipocelularidad de médula ósea de marcada a severa de la serie eritroide, de suave a moderada hiperplasia de la serie mielóide, y suave a moderada hipertrofia e hiperplasia de megacariocitos en la tibia y esternón cuando los Compuestos 4 y 5 fueron administrados en dosis de 1 mg/kg/día. Para los Compuestos 4 y 5 los pulmones presentaron hipertrofia/hiperplasia difusa de los neumocitos del tipo 2 relacionada con la dosis de suave a moderada por un aumento de los macrófagos alveolares, epitelio bronquiolar hipertrofiado, proliferación de células mononucleares perivasculares y células pleurales viscerales hipertrofiadas. En contraste, la evaluación de la patología anatómica a continuación del tratamiento con el Compuesto 15 con la misma dosis (1 mg/kg/día) identificó mínima a suave hipocelularidad de células eritroides, mínima a suave hipocelularidad de células mieloides, y mínima hipertrofia neumocítica de tipo 2 en los pulmones.

Los datos descritos anteriormente indican que el Compuesto 15 es aproximadamente 5 veces mejor toleado en ratas en comparación con los Compuestos 4 y 5 en base a cada dosis.

Ejemplo 5 – Reducción del volumen tumoral y cambio del peso corporal

40 Se generaron datos de un xenoinjerto de MDA-MB-231 sustancialmente como sigue a continuación. Se inyectaron células de tumores de mama humano MDA-MB-231 en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos hembra y se inició la dosificación doce días después a un volumen tumoral de aproximadamente 148 mm³. No se asoció ninguna carga tumoral con este modelo basado en la falta de pérdida de peso o en la morbilidad animal en los

grupos de control. Se inyectaron 1×10^7 células por vía subcutánea en ratones en el pániculo mamario adiposo, con células suspendidas en 200 μ l de 1:1 HBSS: solución con plug de Matrigel; las células inyectadas se encontraban dentro de nueve pasajes con respecto al grupo original. Se registró un estudio previo de los volúmenes tumorales empezando aproximadamente una semana antes de la fecha de comienzo estimada. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150 mm³ los animales se agrupan por volumen tumoral en los grupos de tratamiento y de control y la dosificación se inicia (Día 0); los ratones se marcan y se realiza un seguimiento de los mismos individualmente a lo largo del experimento. Los animales se dosificaron por peso (0,01 mL por gramo; 10 ml/Kg).

Comenzando en el Día 0, los animales se observaron diariamente y se pesaron dos veces en semana utilizando una escala digital (Ohaus SP601); los datos que incluyen pesos individuales y media de pesos en gramos (Media Pe \pm SD), media del porcentaje de cambio de peso versus Día 0 (%vD₀) y media del porcentaje de cambio de peso versus mediciones previa (%vD_x) se registraron para cada grupo y se representaron al final del estudio. Comenzando en el Día 0, las dimensiones de los tumores se midieron dos veces en semana mediante calibre digital (Fowler Ultra-Cal IV) y los datos que incluyen los volúmenes tumorales individuales y medios estimados (Media VT \pm SEM) se registraron para cada grupo; el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: $VT = ancho^2 \times longitud \times 0,52$. Se asignó a los ratones individuales que alcanzan el efecto final designado del estudio (un volumen tumoral estimado de aproximadamente 1 cm³) un valor de tiempo hasta el efecto final de estudio (TTE) correspondiente a ese día; el estudio del retraso en el crecimiento tumoral (TGD) se concluyó una vez que todos los ratones alcanzaron el efecto final o sesenta días después del inicio del estudio. Al completarse el estudio, se calculó el TGD y %TGD utilizando el valor TTE medio (MTTE) para cada grupo de tratamiento versus control (C) mediante las fórmulas: $TGD_{(días)} = T-C$ y $\%TGD = T-C/C \times 100$, en donde T-C es la diferencia entre el grupo MTTE- de tratamiento y MTTE-de Control. Los animales con tumores que no alcanzan el volumen del efecto final designado al terminar el estudio se consideran supervivientes a largo plazo (LTS) y se asignó un valor TTE correspondiente al día de estudio final; los animales sin tumores no se incluyen en los cálculos TGD. Se utiliza un test de rango logarítmico para determinar estadísticamente las diferencias en la supervivencia general entre cada grupo tratado en comparación con los controles. Se consideró que los ratones individuales que presentan un volumen tumoral de $\leq 50\%$ en la medición del Día 0, para dos mediciones consecutivas sobre un periodo de siete días, respondían parcialmente (PR, por sus siglas en inglés). Si la PR persiste hasta la finalización del estudio, se determinó el porcentaje de regresión tumoral (%TR) utilizando la fórmula: $\%TR = 1 - T_f/T_i \times 100$; se calculó un valor de media si aparecían múltiples ratones PR en un grupo. Se clasificó a los ratones individuales que carecían de tumores palpables ($< 4 \times 4$ mm² para dos mediciones sobre un periodo de siete días) con un criterio de respuesta completa (CR); un CR que persistía hasta un la finalización del estudio se consideró un superviviente libre de tumores (TFS); los animales TFS están excluidos de los cálculos de TGD y del análisis estadístico. Los valores MTTE de las diferencias estadísticas entre los grupos con tratamiento y los grupos de control se comparan utilizando un ensayo de rango logarítmico.

El Compuesto 15 se administró mediante inyección i.p. por sí solo en dosis de 20, 40 o 60 mg/Kg en un esquema de q3dx5 (cada tres días durante 5 ciclos). Los valores T-C de 22 días se calcularon para estos grupos, donde todos de ellos se encontraron estadísticamente significativos en comparación con el control ($p=0,005$, $p<0,0001$, o $p=0,0001$). En el grupo de 20 mg/Kg, 6/10 ratones se consideraron supervivientes de largo plazo y se indicó la regresión tumoral parcial en tres ratones. En el grupo de 40 mg/Kg, 9/10 ratones se consideraron supervivientes de largo plazo y se indicó regresión tumoral parcial en tres ratones. En el grupo de 60 mg/Kg, 8/10 ratones se consideraron supervivientes de largo plazo y se indicó regresión tumoral parcial en siete ratones.

El Compuesto 5 se administró mediante inyección i.p. por sí solo en una dosis de 15 mg/Kg bajo un esquema q3dx5. Se calculó un valor T-C de 21 días para este grupo que se encontró que era estadísticamente significativo en comparación con el control ($p=0,002$). En este grupo 3/10 ratones se consideraron supervivientes de largo plazo y se indicó regresión tumoral parcial en cinco ratones. La eficacia de este nivel de dosis produjo la mitad de la cantidad de supervivientes de largo plazo según una dosis de 20 mg/Kg del Compuesto 15. Los resultados del ensayo de xenoinjerto MDA-MB-231 se muestran en las Figuras 2A y 2B. El Compuesto 15 en dosis de 20 mg/Kg presentó una actividad anti-tumoral comparable a la del Compuesto 5 en dosis de 15 mg/Kg. Los estudios posteriores han mostrado que la dosis mínima efectiva del Compuesto 15 en este modelo es menos de 1 mg/Kg. La pérdida de peso fue mayor en los ratones administrados por el Compuesto 5 en dosis de 15 mg/Kg en comparación con los ratones dosificados con el Compuesto 15 en dosis de 20 mg/Kg. Así, el Compuesto 15 tiene una eficacia comparable con menos toxicidad en relación con el Compuesto 5 y por lo tanto presenta una mejora en el índice terapéutico.

El compuesto de la Fórmula 1 es particularmente bien tolerado y bastante adecuado para su uso en una composición farmacéutica, además de en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo o un trastorno autoinmune. En particular, la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento de un trastorno proliferativo, que comprende una cantidad efectiva del Compuesto 15 además de un excipiente farmacéuticamente aceptable, puede mejorar el índice terapéutico reduciendo las toxicidades. La reducción de las toxicidades incluyen, por ejemplo, uno de, o cualquier combinación de uno o más de:

- reducción de la pérdida de peso corporal,
- disminución de la incidencia de la mortalidad,

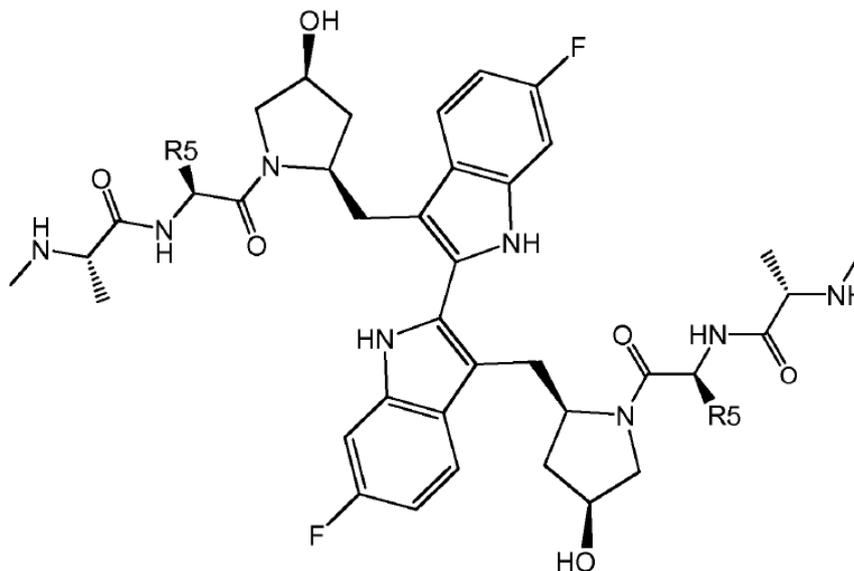
- reducción de la hipocelularidad de la serie eritroide de la médula ósea,
- reducción de la hiper celularidad de la serie mieloide,
- reducción de la hipertrofia e hiperplasia de megacariocitos,
- reducción de la hipertrofia/hiperplasia difusa de neumocitos de Tipo 2

- 5
- disminución del letargo,
 - respiración más regular,
 - menor incremento del ritmo cardiaco

10 La reducción de las toxicidades detalladas anteriormente son las observadas en los animales sometidos a ensayo. Se observará en humanos una reducción similar, adicional o diferente de las toxicidades. Las reducciones son relativas, por ejemplo, en relación al grado en que las toxicidades se observarían tras la administración interna de una composición farmacéutica en la que el ingrediente farmacéutico activo es un análogo del Compuesto 15, por ejemplo, uno o más de los análogos en los que R5 es -CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₃, -R-CH(OH)CH₃, -S-CH(OH)CH₃, y -R-CH(OCH₃)CH₃, por ejemplo, a la misma dosis o a una dosis de potencia comparable.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula:



en donde R5 es $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un cáncer.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, 3, o 4 que es un líquido estéril para inyección.
- 10 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, 3, 4, o 5 que es una forma de dosis unitaria.
7. Compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo, en donde el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de ovarios, cáncer de mama, mesotelioma, neuroma periférico, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, cáncer de vejiga, meningioma, glioma, astrocitoma, cáncer de cuello del útero, trastornos mieloproliferativos que incluyen leucemia linfocítica crónica, y leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales extracraneales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores trofoblásticos gestacionales, leucemia por tricoleucitos, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, carcinoma insular, sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeo, leucemia, cáncer de labios, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer escamoso metastásico de cuello, mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide y síndrome de Sezary, síndromes mielodisplásicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer orofaríngeo, cáncer de huesos, incluyendo osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno del hueso, cáncer del seno paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores hipofisarios, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivares, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, pineoblastoma, cáncer testicular, tímoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y del uréter, cáncer uretral, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, y tumor de Wilm y otros tumores de riñón de la infancia.
8. Compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo, en donde el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: sarcomas, cáncer de vejiga, cáncer de

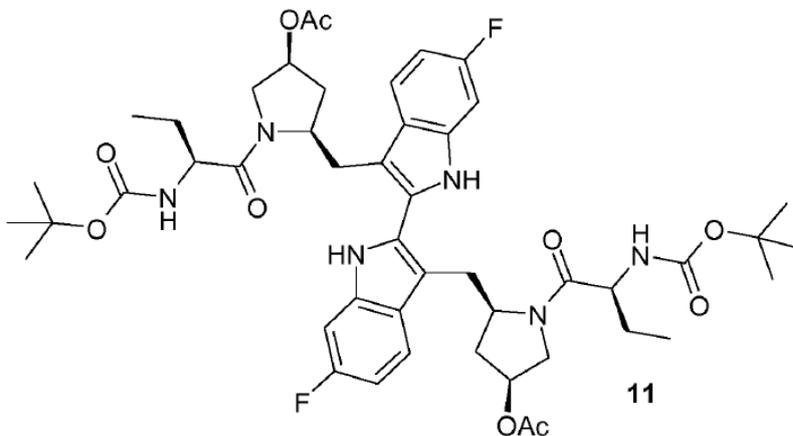
ovario, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer de pulmón, y cáncer de huesos.

9. Compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo, en donde el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado de cáncer colorrectal, carcinoma renal, carcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, melanoma, glioblastoma, leucemia mieloide aguda, carcinoma pulmón de células microcíticas, carcinoma de pulmón de células no microcíticas, rhabdomyosarcoma, y carcinoma de células basales.

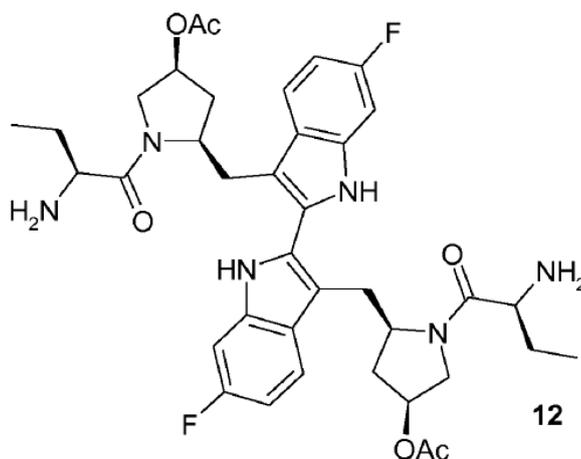
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en donde dicho compuesto es para la administración en combinación con una segunda terapia contra el cáncer seleccionada de radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica, y combinaciones de las mismas.

11. Compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en donde la enfermedad autoinmune es una en la que la condición está causada o exacerbada por la regulación anómala de la apoptosis y se selecciona del grupo que consiste en: lupus sistémico eritematoso, psoriasis, y púrpura trombocitopénica idiopática (enfermedad de Werlhof).

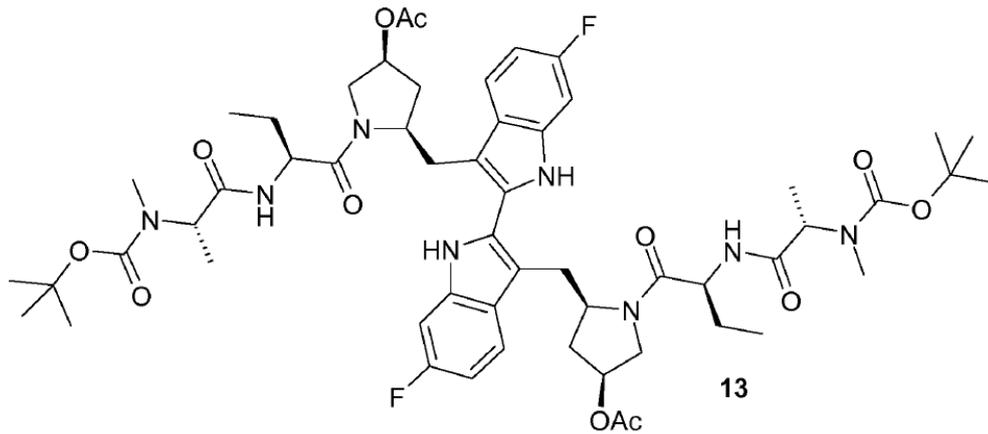
15 12. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en



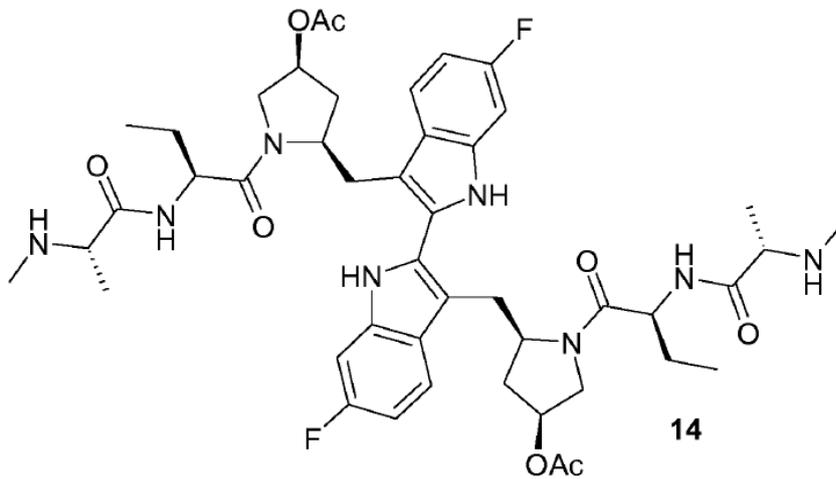
Compuesto 11,



Compuesto 12,



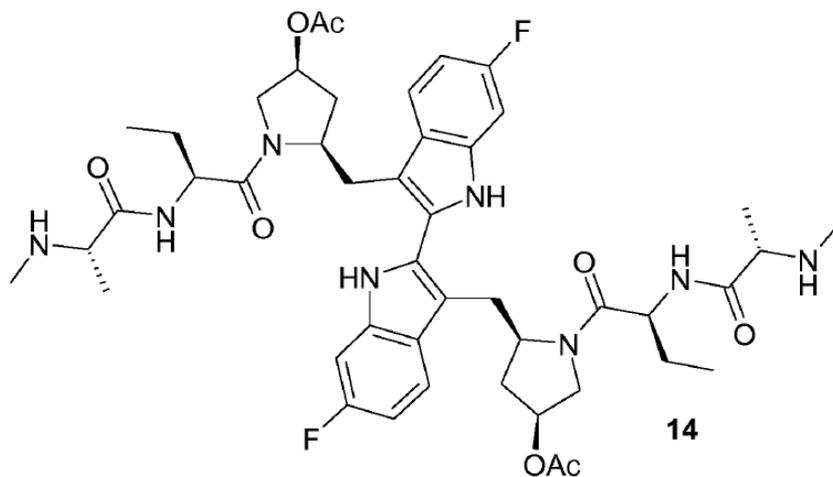
Compuesto 13, y



5

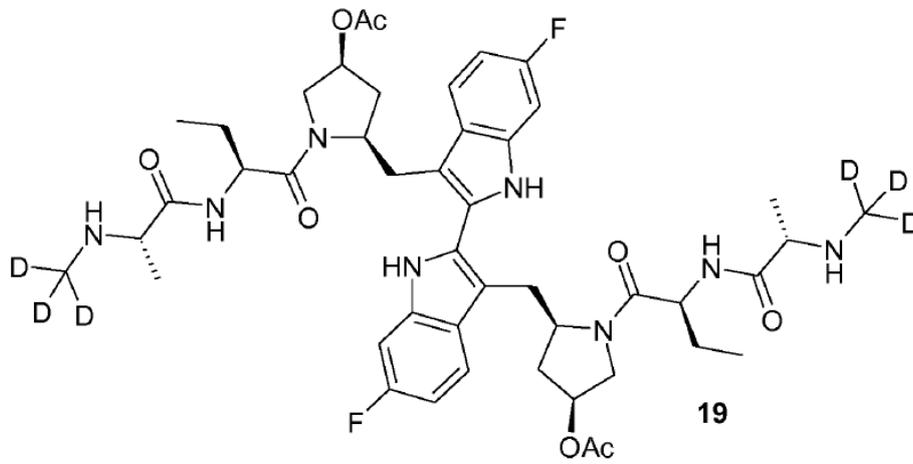
Compuesto 14.

13. Proceso para preparar el compuesto de la reivindicación 1 que comprende la desprotección del

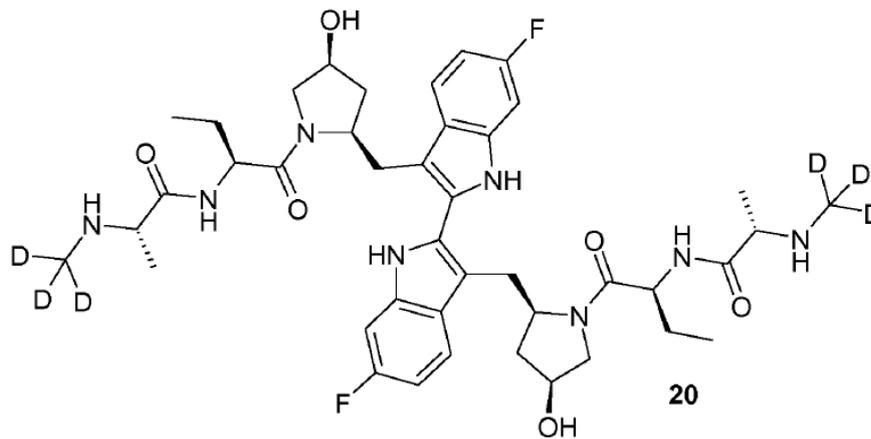


Compuesto 14.

14. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en

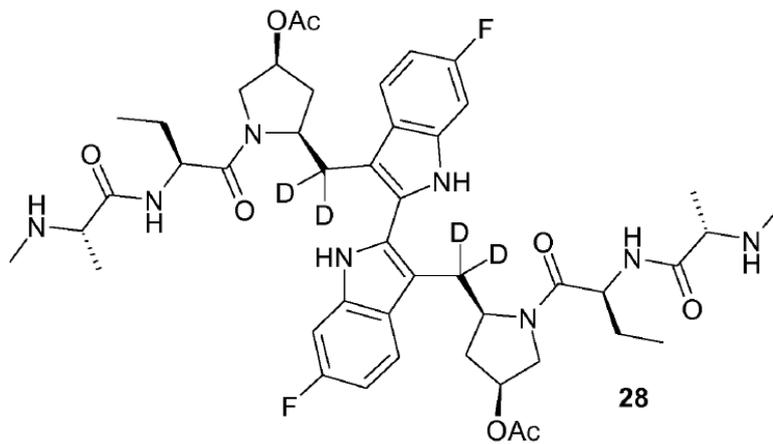


Compuesto 19,

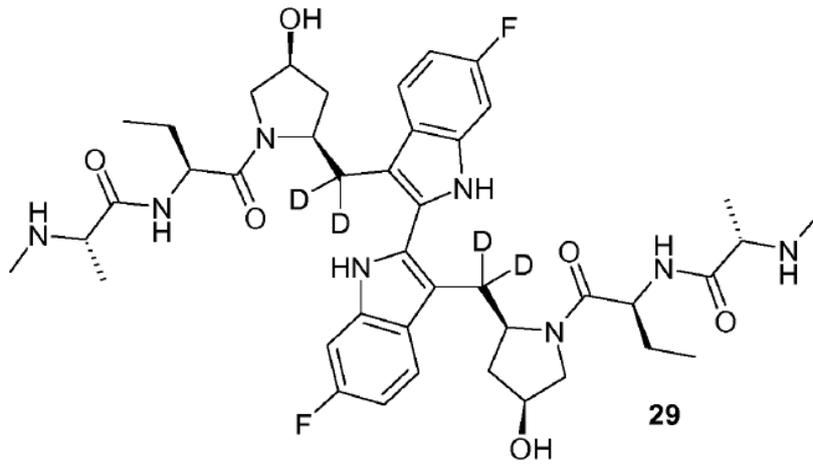


Compuesto 20,

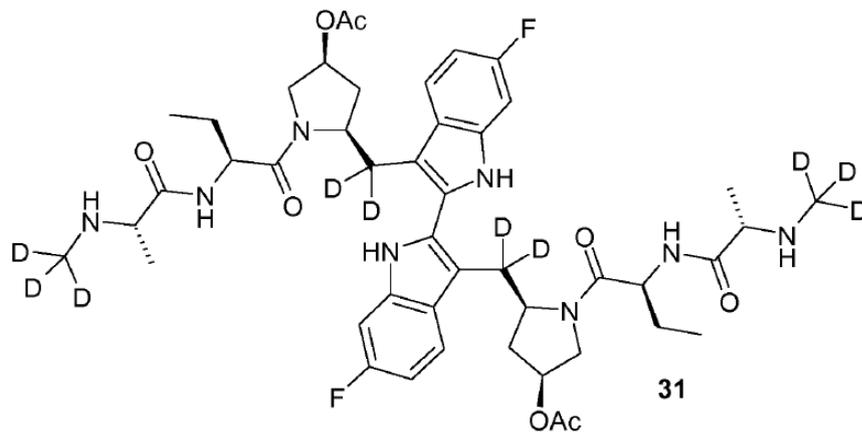
5



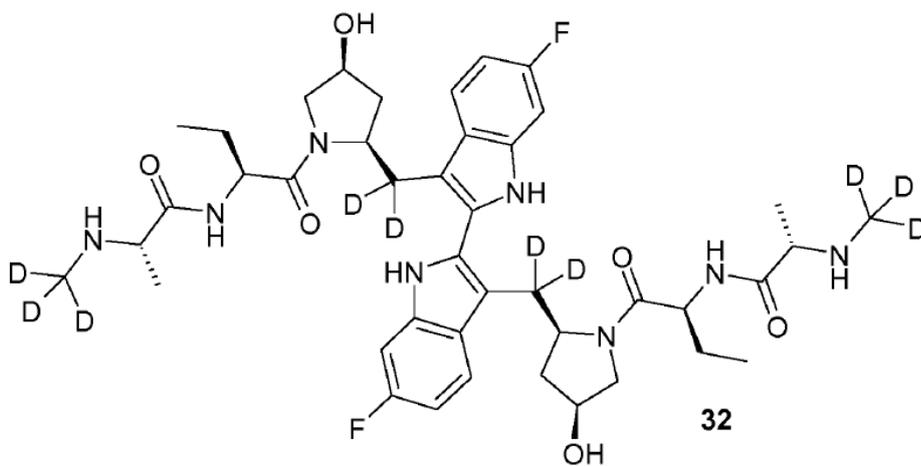
Compuesto 28,



Compuesto 29,



Compuesto 31, y



Compuesto 32.

Figura 1

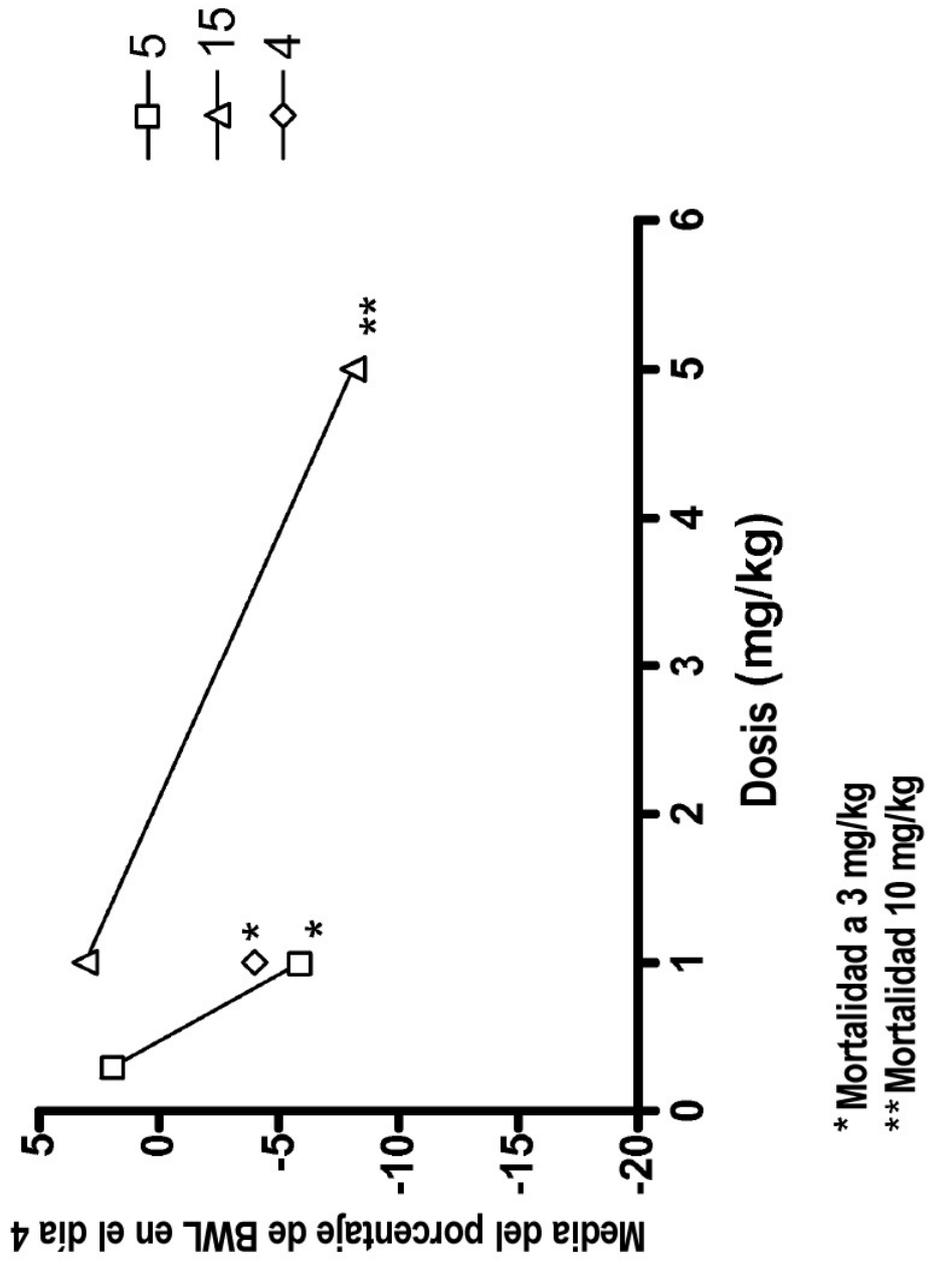


Figura 2

