

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 444**

51 Int. Cl.:

C07D 498/22 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2012 PCT/US2012/033715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2012 E 12774761 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2699580**

54 Título: **Análogos de diazonamida**

30 Prioridad:

22.04.2011 US 201161478059 P

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

02.02.2018

73 Titular/es:

**JOYANT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
Sanderling Ventures 400 S. El Camino Real Suite
1200
San Mateo, CA 94402, US**

72 Inventor/es:

**WEI, QI;
ZHOU, MING;
XU, XIAOMING;
CALDWELL, CHARLES;
HARRAN, SUSAN y
WANG, LAI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 652 444 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

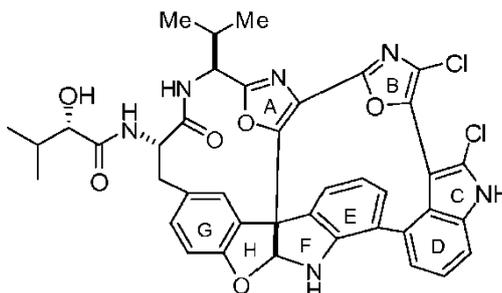
Análogos de diazonamida

5 Campo técnico

Esta solicitud se refiere a análogos de diazonamida, y a sales, composiciones farmacéuticas y conjugados de los mismos, que son útiles como agentes antiproliferativos.

10 INTRODUCCIÓN

La diazonamida A es un agente interruptor del huso mitótico aislado por primera vez del organismo marino *Diazona angulata*, que tiene la estructura:



15

La preparación de análogos de diazonamida a través de compuestos intermedios de indolina macrocíclicos que tienen un grupo amino protegido con carbenciloxi (Cbz) o o-nitrofenilsulfonilo se ha descrito previamente. Los documentos US 7.022.720y US 7.517.895 describen correctamente la estructura de diazonamida A y describen la síntesis de algunos de sus análogos. El documento US 7.851.620 (continuado con el documento US N.º de Ser. 12/896.898) describe métodos sintéticos para la preparación de análogos de diazonamida a través de intermedios de indolina. El documento US 7.538.129 describe análogos de diazonamida A. El documento US N.º de Ser. 12/432.615 es una solicitud pendiente relacionada que describe indolina, que carece de la estructura macromocíclica rígida que une los anillos A y E de la estructura de diazonamida. Aquí se describen compuestos y novedosos análogos de diazonamida que poseen una potente actividad citotóxica y son útiles para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares.

El documento WO 2009/134938 describe compuestos de indolina que tienen actividad antimitótica, útiles para el tratamiento del cáncer y otros trastornos proliferativos.

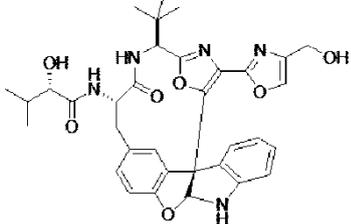
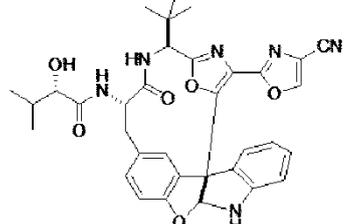
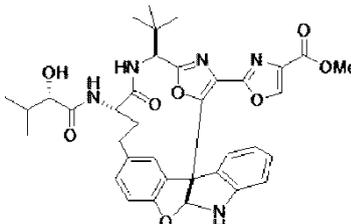
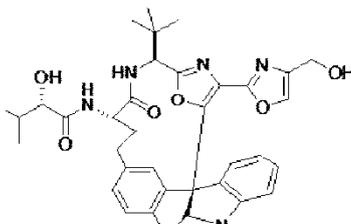
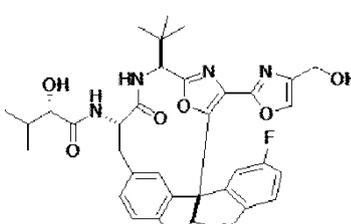
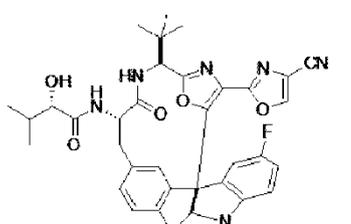
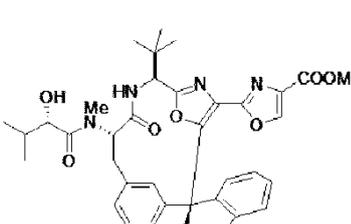
30

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un compuesto seleccionado de los compuestos en la siguiente tabla y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

35

26		48	
57		62	

			
73		75	
85		87	
90			

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención en forma de dosificación unitaria con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso como agente antiproliferativo.

Los compuestos de la invención son típicamente para su uso en un método para tratar o mejorar un trastorno proliferativo celular, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica del mismo. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es suficiente para inhibir la proliferación celular. En otras realizaciones, la cantidad es suficiente para ralentizar el crecimiento tumoral o reducir el tamaño del tumor. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se usa en combinación con otro agente o enfoque quimioterapéutico.

15 Los compuestos de la invención también se pueden proporcionar para su uso en métodos para inhibir la proliferación celular en una célula, que comprenden poner en contacto la célula con un compuesto de la invención, en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación celular. En algunas realizaciones, las células están en una línea celular, tal como una línea celular cancerosa (por ejemplo, una línea celular derivada de cánceres de mama, próstata, páncreas, pulmonares o hematopoyéticos, etc.). En algunas realizaciones, las células están en un tejido, y en algunas de tales realizaciones, el tejido puede estar en un sujeto. En otras realizaciones, las células están en un

20 tumor, y algunas veces están en un tumor en un sujeto.

Los compuestos de la invención también se pueden proporcionar para su uso en métodos para tratar el cáncer en un

sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, como se describe en el presente documento, en una cantidad que es eficaz para tratar o mejorar dicho cáncer.

5 Los compuestos de la invención también se pueden proporcionar para su uso en métodos para tratar o mejorar una afección relacionada con la proliferación celular aberrante. Por ejemplo, dichos métodos son métodos para tratar o mejorar un trastorno proliferativo celular en un sujeto, que comprende administrar un compuesto de la invención como se describe en el presente documento, a un sujeto que lo necesite en una cantidad eficaz para tratar o mejorar la afección.

10

En los métodos descritos en el presente documento, el sujeto puede ser un animal de investigación (por ejemplo, roedor, perro, gato, mono), que contiene opcionalmente un tumor tal como un tumor de xenoinjerto (por ejemplo, tumor humano), por ejemplo, o puede ser un ser humano.

15 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los datos para los compuestos objeto en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón humano HCC461 en ratones.

La Figura 2 muestra los datos de los compuestos objeto en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático Miapaca en ratones.

20

Descripción detallada de las realizaciones particulares

La presente invención puede comprenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento. Se entenderá que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones específicas solamente y no pretende ser limitante. Además, debe entenderse que a menos que se defina específicamente en el presente documento, a la terminología utilizada en la presente memoria se le debe dar su significado tradicional como se conoce en la técnica pertinente.

30

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto humano o animal. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

35

Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" en referencia a una enfermedad o trastorno particular incluyen la prevención de la enfermedad o trastorno, y/o disminuir, mejorar, mitigar, aliviar o eliminar los síntomas y/o la patología de la enfermedad o trastorno.

40

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" pretende significar la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará una respuesta biológica o médica de una célula, tejido, sistema, animal o ser humano que se busca por un investigador, veterinario, médico u otro especialista. Los términos también pueden referirse a la reducción o detención de una tasa de proliferación celular (por ejemplo, ralentización o detención del crecimiento tumoral) o a la reducción del número de células cancerosas proliferantes (por ejemplo, eliminación parcial o total de un tumor). A veces, la tasa o la proliferación celular se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % o más. A veces, el número de células en proliferación se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % o más.

45

La invención incluye isómeros de los compuestos objeto, particularmente estereoisómeros, tales como donde un átomo de carbono tiene la configuración (S).

50

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento o la mejora de trastornos proliferativos, en particular, cáncer.

55

Los compuestos de la invención se pueden suministrar en forma de base libre, o se pueden suministrar como una sal farmacéuticamente aceptable, o como una mezcla de la forma de base libre y la sal correspondiente. Los compuestos de la invención pueden aislarse como sales donde está presente un grupo ionizable, tal como una amina básica o un ácido carboxílico. La invención incluye las sales de estos compuestos que tienen contraiones farmacéuticamente aceptables. Dichas sales se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, sales de grupos

60

ácidos formadas por reacción con bases orgánicas o inorgánicas, y sales de grupos básicos formadas por reacción con ácidos orgánicos o inorgánicos, siempre que los contraiones introducidos por la reacción sean aceptables para usos farmacéuticos. Ejemplos de bases inorgánicas con hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etc.), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, de calcio, magnesio, etc.) e hidróxidos de aluminio, amonio, etc. Los ejemplos de bases orgánicas que podrían usarse incluyen trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, etc.

Las sales adecuadas incluyen aquellas de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, hidrosulfatos y similares, o sales de adición de ácidos orgánicos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos que podrían usarse incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido fórmico, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc. También se incluyen sales con aminoácidos básicos tales como arginina, lisina, ornitina, etc., y sales con aminoácidos ácidos tales como ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

Además, los compuestos de la invención se pueden acoplar o conjugar a restos tales como un agente de direccionamiento. Entre dichos agentes de direccionamiento se encuentran los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos, incluyendo formas de anticuerpos monocatenarios dirigidos contra antígenos tumorales o contra receptores o integrinas asociadas con tumores, peptidomiméticos dirigidos contra estos restos, y similares. Además, los compuestos de la invención se pueden acoplar o conjugar a un excipiente, tal como un excipiente polimérico, tal como polietilenglicol, para alterar la farmacocinética, tal como se describe en Advanced Drug Delivery Reviews theme issue (Vol 61, noviembre de 2009) titulado, Polymer Therapeutics: Clinical Applications and Challenges for Development, including Pasut and Veronese, Adv Drug Delivery Rev 61 (13):1177-1188, 2009. El PEG seleccionado puede ser de cualquier peso molecular conveniente, y puede ser lineal o ramificado, y puede estar opcionalmente conjugado a través de un enlazador. El peso molecular promedio de PEG variará preferiblemente de aproximadamente 2 kiloDalton (kDa) a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa.

Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento o la mejora de enfermedades proliferativas celulares. En particular, los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para el tratamiento o mejora de tumores y neoplasias asociadas con mama, ovario, pulmón (SCLC y NSCLC), colon, recto, próstata, testículos, piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas), páncreas, hígado, riñón, cerebro (por ejemplo, glioma, meningioma, schwannomas y meduloblastomas), y el sistema hematopoyético y sanguíneo, incluyendo, por ejemplo, leucemia, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple.

En los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, la proliferación celular puede reducirse, y/o puede inducirse la muerte celular, tal como la apoptosis o muerte celular apoptótica. El trastorno proliferativo celular puede ser un cáncer tumoral o no tumoral en un sujeto humano o animal.

Los compuestos y métodos proporcionados en el presente documento para reducir la proliferación celular y/o inducir la muerte celular se pueden usar en solitario, o junto con o en combinación con métodos quirúrgicos, de radiación, quimioterapéuticos, de inmunoterapia y de trasplante de médula ósea y/o células madre, o con otros agentes paliativos, tales como compuestos que ayudan en la nutrición o la salud general, agentes antieméticos y similares.

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención se administran junto con un agente quimioterapéutico, y se usan para reducir la proliferación celular, inducir la muerte celular, y/o tratar o mejorar un trastorno proliferativo celular.

Los compuestos descritos en el presente documento son también útiles contra ciertos tumores resistentes a fármacos y líneas celulares de cáncer, en particular contra cánceres que son resistentes a TAXOL® y/o agentes anticancerosos de alcaloides de vinca.

Cuando se administra un fármaco quimioterapéutico adicional, típicamente se conoce uno que tiene actividad citostática, citotóxica o antineoplásica. Estos agentes incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato); agentes activos de ADN (por ejemplo, bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida); agentes intercalantes (por ejemplo, adriamicina y mitoxantrona); inhibidores de la síntesis de proteínas (por ejemplo, L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina); inhibidores de topoisomerasa tipo I (por ejemplo, camptotecina, topotecán o irinotecán); inhibidores de topoisomerasa tipo II (por ejemplo, etopósido, tenipósido antraquinonas, antraciclinas y podofilotoxina); inhibidores

de microtúbulos (por ejemplo, taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel, colcemid, colchicinas, o alcaloides de vinca, tales como vinblastina y vincristina); inhibidores de cinasas (por ejemplo, flavopiridol, estaurosporina e hidroxiestaurosporina), fármacos que afectan a Hsp90 (por ejemplo, geldanomicina y derivados de geldanomicina, radicicol, derivados de purina y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a Hsp90),
 5 TRAIL, un anticuerpo del receptor TRAIL, TNF- α o TNF- β y/o radioterapia.

En algunas realizaciones preferidas, el agente terapéutico contra el cáncer adicional es TRAIL, un anticuerpo del receptor TRAIL, TNF- α o TNF- β . En otras realizaciones preferidas, los fármacos adicionales para la administración conjunta con los compuestos de la invención afectan a Hsp90 (proteína de choque térmico 90).

10

Los inhibidores de Hsp90 adecuados incluyen derivados de ansamicina tales como geldanomicina y derivados de geldanomicina que incluyen 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG), su derivado dihidro, 17-AAGH₂, y derivados de 17-amino de geldanamicina tales como 17-dimetilaminoetilamino-17-desmetoxi-geldanamicina (17-DMAG), 11-oxogeldanamicina y 5,6-dihidrogeldanamicina, que se describen en la Pat. de Estados Unidos N.º

15 4.261.989; 5.387.584; y 5.932.566. Otros inhibidores de Hsp90 adecuados incluyen radicicol y oximas y otros análogos de los mismos, descritos en Soga, et al., Curr. Cancer Drug Targets, 3, 359-69 (2003), y en Yamamoto, et al., Angew. Chem., 42, 1280-84 (2003); y en Moulin, et al., J. Amer. Chem. Soc., vol 127, 6999-7004 (2005); derivados de purina, tales como PU3, PU24FCI y PUH64 (véase Chiosis et al., ACS Chem. Biol. Vol. 1(5), 279-284 (2006) y los descritos en la Solicitud PCT N.º WO 2002/0236075; derivados heterocíclicos relacionados descritos en

20 la Solicitud PCT N.º WO 2005/028434; y compuestos de 3,4-diarilpirazol descritos en Cheung, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 15, 3338-43 (2005). Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a Hsp90 también se pueden administrar como fármacos para provocar la inhibición de Hsp90, y se pueden usar junto con los compuestos de la invención.

25 Cuando un compuesto descrito en el presente documento se utiliza junto o en combinación con otro agente terapéutico, los dos agentes pueden administrarse conjuntamente, o pueden administrarse por separado cuando su administración está sincronizada de manera que los dos agentes actúen concurrentemente o secuencialmente.

Por consiguiente, las composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen al
 30 menos un compuesto de la invención, y pueden incluir opcionalmente uno o más agentes terapéuticos citotóxicos o citostáticos adicionales tales como, pero sin limitación, los descritos anteriormente. De forma similar, los métodos de la invención incluyen métodos en los que un sujeto diagnosticado como en necesidad de tratamiento para cáncer se trata con al menos un compuesto o composición de la invención, y se trata simultánea o concurrentemente con uno o más de los agentes terapéuticos adicionales descritos anteriormente.

35

Formulación y administración

Las formulaciones útiles en la invención incluyen formulaciones estándar tales como las expuestas en Remington's
 40 Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Co., Easton, PA. Dichas formulaciones incluyen aquellas diseñadas para administración oral, liberación lenta, administración tópica, administración parenteral, o cualquier otra ruta adecuada según lo determine un especialista o veterinario a cargo. Por lo tanto, la administración puede ser sistémica o local. Los vehículos o excipientes adecuados incluyen liposomas, micelas, nanopartículas, matrices poliméricas, tampones, y la gama completa de formulaciones conocidas por los profesionales.

45 Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para inyección (por ejemplo, inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea) y las preparadas para administración transdérmica, transmucosa u oral. La formulación generalmente incluirá un diluyente, así como, en algunos casos, adyuvantes, tampones, conservantes y similares. Los compuestos se pueden administrar también en composiciones liposómicas o como microemulsiones.

50 Los métodos de inyección a veces son rutas apropiadas para la administración de los compuestos para tratamientos sistémicos y algunas veces también para tratamientos localizados. Estos incluyen métodos para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea y otros métodos para administración interna que puentean las barreras mucosas y dérmicas para administrar la composición directamente en los tejidos vivos del sujeto.

55 Para inyección, las formulaciones se pueden preparar en formas convencionales como soluciones o suspensiones líquidas o como formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares. Dichas composiciones también pueden contener cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, tales como, por ejemplo, acetato sódico,
 60 monolaurato de sorbitán, etc.

También se han previsto diversos sistemas de liberación sostenida para fármacos y pueden utilizarse con los compuestos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.624.677. Las presentes composiciones se pueden utilizar en dichos sistemas de administración de liberación controlada cuando sea
5 apropiado.

La administración sistémica también puede incluir métodos relativamente no invasivos tales como el uso de supositorios, parches transdérmicos, administración transmucosal y administración intranasal. La administración oral también es adecuada para los compuestos de la invención. Las formas adecuadas incluyen jarabes, cápsulas,
10 comprimidos y similares como se entiende en la técnica.

La selección de una ruta particular de administración para un sujeto e indicación dada está dentro del nivel ordinario de habilidad en la técnica. Por ejemplo, la administración rectal como un supositorio es a menudo apropiada cuando el sujeto experimenta náuseas y vómitos que impiden la administración oral eficaz. Los parches transdérmicos son
15 comúnmente capaces de administrar una dosis de liberación controlada durante varios días o a un locus específico, y por lo tanto, son adecuados para sujetos en los que se desean estos efectos.

La administración transmucosal también es apropiada para algunas de las composiciones y métodos de la invención. Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía transmucosa usando
20 tecnología y métodos de formulación que son conocidos en la técnica.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos descritos en el presente documento, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales
25 conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el
30 paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción o metabolismo del compuesto particular que se está empleando, la
35 velocidad y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares ya conocidos en la técnica médica.

Para la administración a sujetos animales o humanos, la dosificación de un compuesto de la invención es típicamente 10-2400 mg por administración. Sin embargo, los niveles de dosificación dependen en gran medida de la naturaleza de la enfermedad, la condición del paciente, el criterio del médico, y la frecuencia y el modo de administración. La selección de una dosificación de dichos compuestos está dentro de la experiencia de un experto en la materia, y se puede realizar iniciando a una dosificación relativamente baja y aumentando la dosificación hasta que se logre un efecto aceptable.
45

La frecuencia de administración de los compuestos de la invención también puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica usando técnicas ya conocidas. Por ejemplo, al paciente se le puede administrar una dosis baja de un compuesto o composición de la invención a baja frecuencia, tal como una vez al día o menos frecuentemente; y la dosificación y/o frecuencia de administración puede aumentarse sistemáticamente hasta que se logre un efecto
50 deseado en el paciente.

Procesos sintéticos

Los compuestos objeto se han preparado a través de un proceso eficiente de múltiples etapas, como se muestra en el Esquema 1. Una etapa clave en el proceso implica la ciclación oxidativa electroquímica de un intermedio fenólico para proporcionar un compuesto de indolina. La ciclación oxidativa se describió en la Solicitud de Estados Unidos N.º de Serie 12/134.984, presentada el 6 de junio de 2008, y publicada como US 2009/0005572.
55

Como se muestra en el Esquema 1, los materiales de partida dipeptídicos se prepararon en condiciones estándar conocidas en la técnica, por ejemplo, acoplado un éster de N-hidroxisuccinimida u otro éster activado de un
60

aminoácido protegido con serina. Un experto en la técnica entenderá que se puede utilizar una amplia variedad de condiciones adecuadas para formar los materiales de partida dipeptídicos, incluyendo el extenso cuerpo de la bibliografía que describe la síntesis de péptidos y miméticos de péptidos.

- 5 El dipéptido se hizo reaccionar con un indol opcionalmente sustituido y un reactivo de activación, opcionalmente en presencia de un ácido prótico, para proporcionar un dipéptido que contiene indol. Los reactivos de activación adecuados incluyen, por ejemplo, anhídridos de ácido carboxílico, anhídridos mixtos, o haluros de acilo (por ejemplo, anhídrido acético, anhídrido trifluoroacético, cloruro de acetilo, cloruro de oxalilo), anhídridos de ácido sulfónico o haluros (por ejemplo, anhídrido metanosulfónico, anhídrido trifluorometanosulfónico, cloruro de metanosulfonilo),
10 haluros de ácido mineral (por ejemplo, cloruro de tionilo o cloruro de fosforilo) y similares.

- En una realización preferida, el agente activador era anhídrido acético, y la reacción se realizó en ácido acético como disolvente prótico. En una realización particularmente preferida, el dipéptido y un indol opcionalmente sustituido se hicieron reaccionar con anhídrido acético en ácido acético a aproximadamente 80 °C, para proporcionar
15 el compuesto deseado.

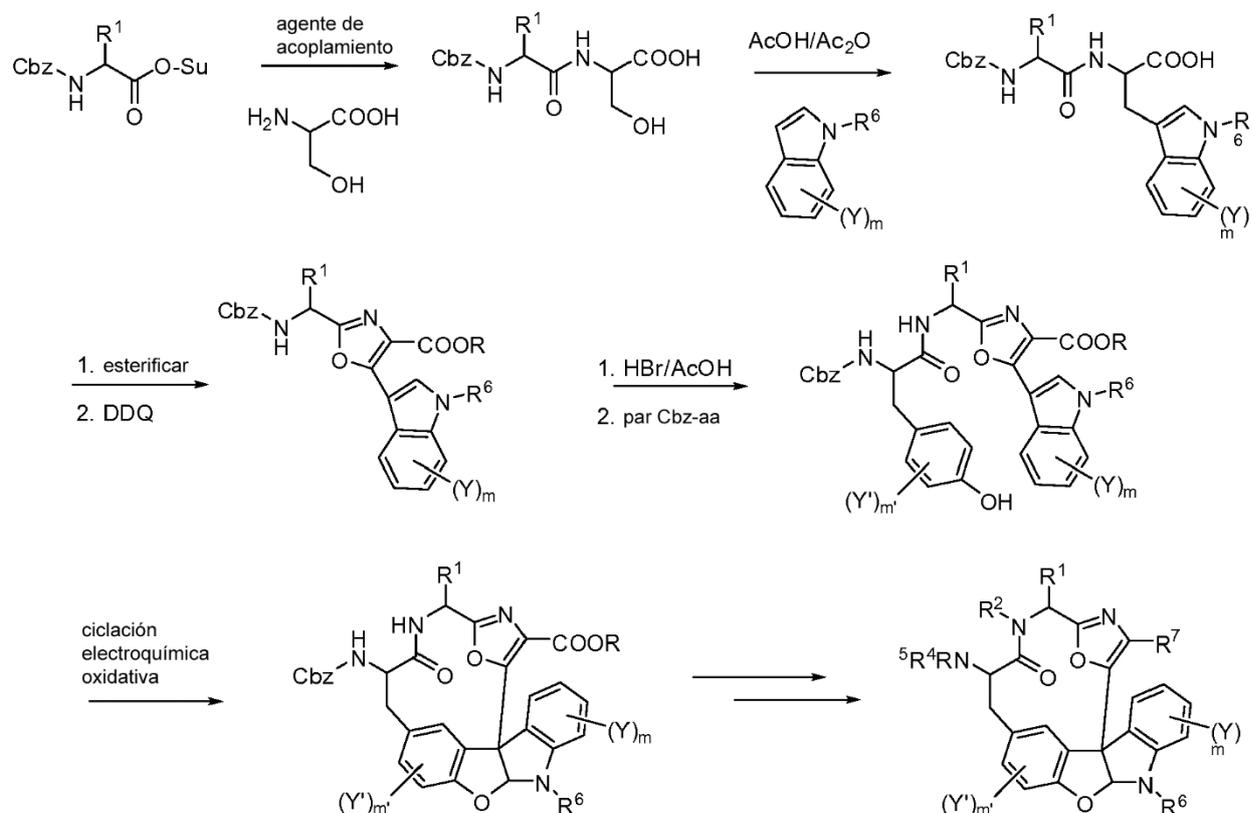
- La preparación de derivados de N-acetil-triptófano por reacción de serina o N-acetil-serina y un indol opcionalmente sustituido en anhídrido acético y ácido acético se ha indicado previamente. Y. Yokoyama, et al., Tetrahedron Letters (1999), 40: 7803; Y. Yokoyama, et al., Eur. J. Org. Chem. (2004), 1244; Y. Konda-Yamada, et al., Tetrahedron
20 (2002), 58: 7851; M. W. Orme, et al., documento US 6.872.721. Sin embargo, la preparación de otros derivados de triptófano acilados en estas condiciones, tales como los análogos de dipéptidos de la presente invención, no se ha descrito previamente, a nuestro entender.

- La esterificación del ácido carboxílico libre, seguido de la ciclación oxidativa del intermedio dipéptido con un agente oxidante, por ejemplo, DDQ, proporcionó un intermedio de oxazol. Los expertos en la técnica entenderán que
25 podrían utilizarse otras condiciones oxidativas, tales como, por ejemplo, el uso de 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ), nitrato de amonio cérico, reactivos de yoduro hipervalente, y similares.

- La desprotección del grupo amino protegido, si está presente, y la formación del enlace amida proporcionan un intermedio fenólico. La ciclación oxidativa electroquímica del intermedio fenólico proporcionó un compuesto de indolina macrocíclico. Los compuestos de la invención se pueden obtener a partir de las indolinas macrocíclicas a través de una serie de transformación química directa. Por ejemplo, la eliminación del grupo Cbz y se usó acilación o formación de enlace de amida para proporcionar compuestos en los que R⁵ es un sustituyente acilo, por ejemplo, -C(O)R³. Un experto en la técnica entenderá que el orden de estas etapas podría invertirse, dependiendo de la
35 naturaleza de los grupos funcionales que se instalarán, y de los grupos protectores utilizados.

- El esquema 1 proporciona una ruta sintética general útil para la preparación de compuestos de indolina macrocíclicos de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que ciertas condiciones de reacción se pueden variar sin alterar la esencia de la presente invención. Por ejemplo, las reacciones de acoplamiento se pueden lograr
40 con una diversidad de ésteres activados, tales como, a modo de ejemplo solamente, N-hidroxibenzotriazol, éster de perfluorofenilo, ésteres de N-hidroxifalimida, ésteres activados generados por la reacción del ácido carboxílico con una carbodiimida, y otros ésteres activados convencionalmente usados para la acilación de una amina para formar enlaces amida. Además, aunque los grupos amino están protegidos convenientemente como grupo carbobenciloxi (Cbz), un experto en la técnica reconocerá que podrían utilizarse otros grupos protectores adecuados. Los grupos
45 protectores adecuados y los métodos para unirlos y eliminarlos se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en T.H. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 2^a ed.

Esquema 1

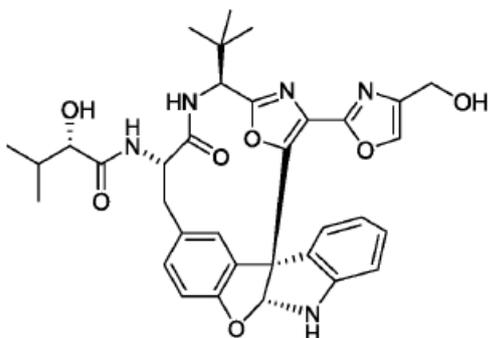


Cuando en el Esquema 1:

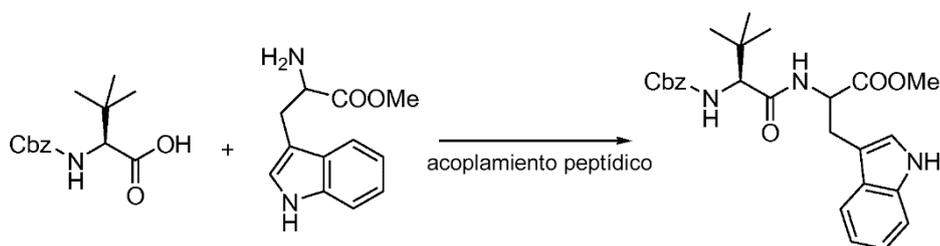
- 5 R¹ es alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido;
 R² es H, o alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido;
 R⁴ es H, o alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido;
 R⁵ es arilo C6-C12 opcionalmente sustituido o heteroarilo C5-C12 opcionalmente sustituido;
 R⁶ es H, o alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido;
- 10 cada uno de Y e Y' es independientemente halo, OH, alcoxi C1-C4, o alquilo C1-C8, alqueno C2-C8, alquino C2-C8, arilo C6-C12, o arilalquilo C7-C14, o una heteroforma de uno de estos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;
 m es 0-4; y
 m' es 0-3.
- 15 El proceso descrito en el Esquema 1 es útil para la preparación de indolinas de la invención con alto rendimiento y pureza. En particular, los compuestos de la presente invención están disponibles con buen rendimiento y con alta pureza diastereomérica, preferiblemente en más del 95 % de exceso diastereomérico, a veces del 98 % de exceso diastereomérico.
- 20 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención.

EJEMPLOS

25 Síntesis del Compuesto 57



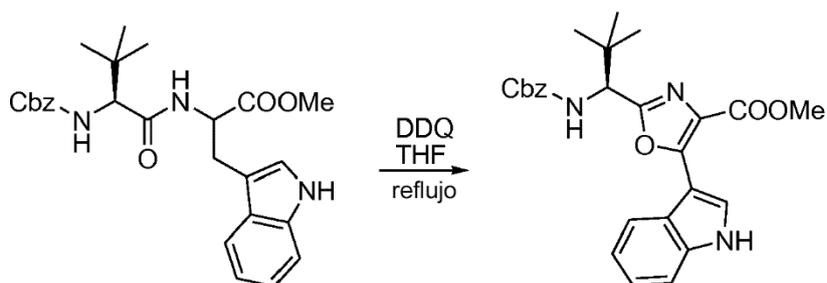
57

Etapa 1

5

En un matraz de 100 ml seco con una barra de agitación magnética se le añadieron sal Cbz-L- α -t-butilglicina DCHA (5,0 g, 11,2 mmol), clorhidrato de L-triptófano metil éster (3,14 g, 12,3 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (1,76 g, 13,4 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (30 ml) y N,N-diisopropiletilamina (2,93 ml, 16,8 mmol, 1,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (2,58 g, 13,4 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (300 ml)/agua (100 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (100 ml), agua (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

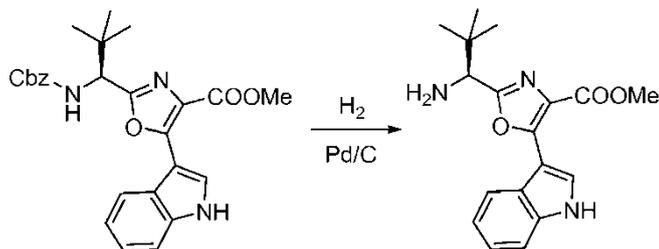
15

Etapa 2

Se añadió una solución de DDQ (6,2 g, 27,3 mmol, 2,4 equiv.) en THF (100 ml) a la solución a reflujo del compuesto sintetizado en la Etapa 1 anterior (11,2 mmol) en THF (200 ml), y la solución oscura se calentó a reflujo en un baño de aceite a 85 °C durante 1 h. Después del enfriamiento, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en acetato de etilo (500 ml), que se lavó con agua (200 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 200 ml), agua (2 x 200 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, la mezcla se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 20 % en CH₂Cl₂). Esto produjo 3,24 g (rendimiento del 64 %) de producto.

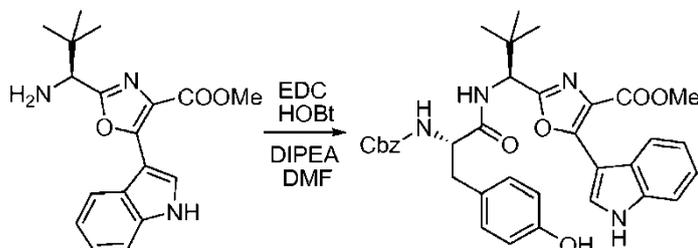
25

Etapa 3



En un matraz de 100 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 2 anterior (3,24 g, 7,02 mmol) se añadieron metanol (30 ml) y Pd/C (10 %) (650 mg, 0,61 mmol, 0,09 equiv.) en una atmósfera de N₂. Se añadió un globo de H₂ 5 y el matraz se purgó con H₂ 4 veces. Después, el globo de H₂ se abrió al sistema de reacción. Después de 3 h de agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 10 ml). El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

10 Etapa 4



En un matraz de 100 ml seco con una barra de agitación magnética se añadieron la amina sintetizada en la etapa 3 15 (2,06 g, 6,29 mmol), Cbz-L-tirosina (1,98 g, 6,91 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (0,94 g, 6,91 mmol, 1,1 equiv.), DMF anhidra (30 ml) y N,N-diisopropiletilamina (1,31 ml, 7,54 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (1,33 g, 6,91 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (300 ml)/agua (100 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se 20 lavaron con agua (100 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (100 ml), agua (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 5

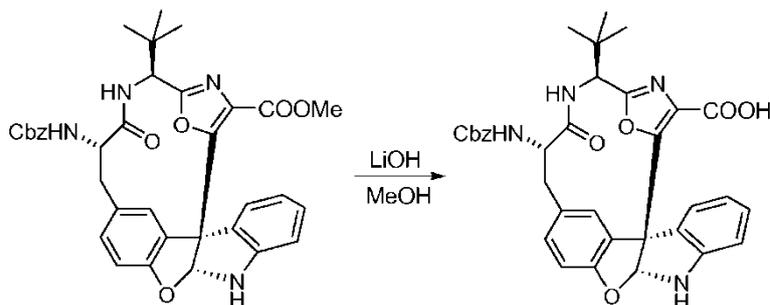
25

Se ensambló una celda electroquímica usando un cilindro de vidrio (6 cm de diámetro x 11 cm de altura) y una cremallera personalizada (polipropileno y nylon) que soportaba 9 varillas verticales de grafito (6,15 mm de diámetro x 30 12 cm de longitud). Las varillas se dispusieron en un patrón de un anillo con 6 ánodos y 3 cátodos. Los electrodos se sumergieron a una profundidad de 6,5 cm. El material fenólico sintetizado en la Etapa 4 anterior (5,00 g, 8,0 mmol), Et₄NBF₄ (4,00 g, 18,4 mmol, 2,9 equiv.) y (NH₄)₂CO₃ (1,0 g, 10,4 mmol, 1,3 equiv.) y agua ID (4 ml) se añadieron en DMF (200 ml). La solución se agitó vigorosamente en una placa de agitación (aprox. 600 rpm). La reacción electroquímica se realizó a un potencial de 1,5-1,6 voltios. Después de 3 días, la mayor parte del SM original se 35 había consumido como se determinó por integración de HPLC a 220 nM. La mezcla de reacción se concentró en un

evaporador rotatorio (temp. de baño ≤ 35 °C) y se secó adicionalmente en un colector de vacío. El residuo se repartió entre EtOAc (200 ml) y HCl acuoso 0,5 N (60 ml). La capa orgánica se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (50 ml) y después con NaCl acuoso saturado (50 ml). Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se decantaron y se evaporaron. Este material se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida con EtOAc al 20 % en CH_2Cl_2 . Esto produjo 1,24 g (rendimiento del 24,8 %) de producto en forma de una mezcla de estereoisómeros (71:29 según se mide por integración de HPLC a 254 nM).

Etapa 6

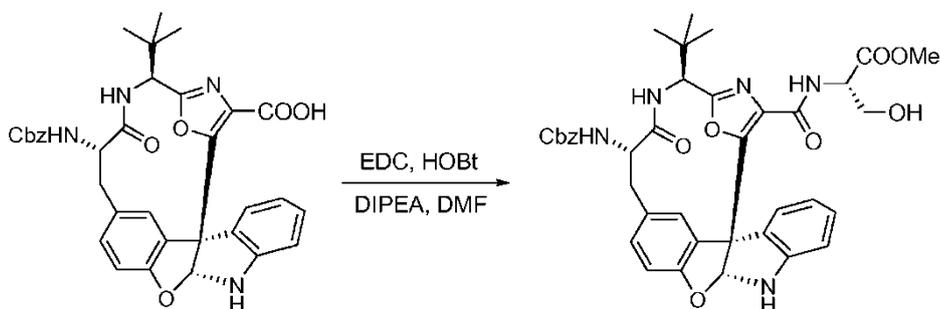
10



El compuesto sintetizado en la Etapa 6 (725 mg, 2,33 mmol) se disolvió en metanol (22 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución de LiOH (558 mg, 23,3 mmol, 10 equiv.) en agua (7,0 ml) durante 5 min. El baño de hielo se eliminó y la mezcla se agitó durante 18 h. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió agua (30 ml) seguido de HCl acuoso 1 N (24 ml), manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. La mezcla se repartió entre agua (15 ml) y EtOAc (100 ml), y la capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado. Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se decantaron, y se evaporaron para dar el producto de ácido en forma de cristales de color blanco finos.

20

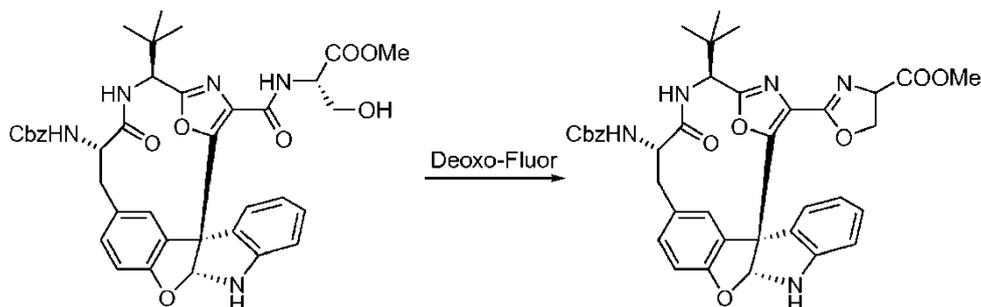
Etapa 7



En un matraz de 100 ml seco con una barra de agitación magnética se añadió el ácido carboxílico sintetizado en la etapa 6 anterior (2,33 mmol), clorhidrato de L-serina metil éster (435 mg, 2,8 mmol, 1,2 equiv.), HOBt (378 mg, 2,8 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (25 ml) y N,N-diisopropiletilamina (1,01 ml, 5,83 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (537 mg, 2,8 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mayor parte de los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (100 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (40 ml), NaHSO_4 acuoso al 10 % (40 ml), agua (40 ml), NaHCO_3 saturado (40 ml), y salmuera (2 x 40 ml), y después se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

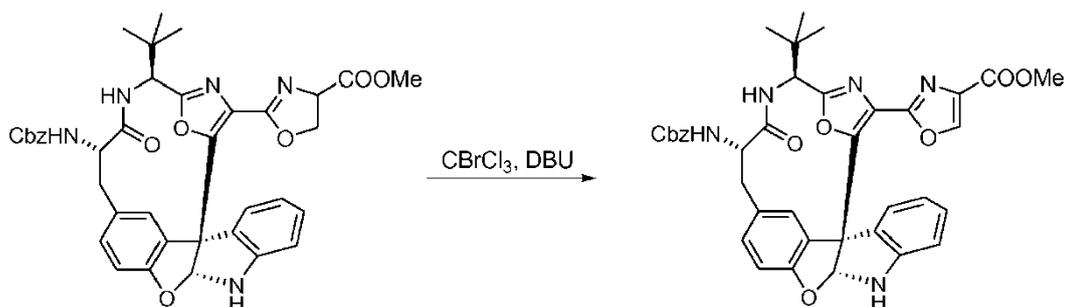
35

Etapa 8



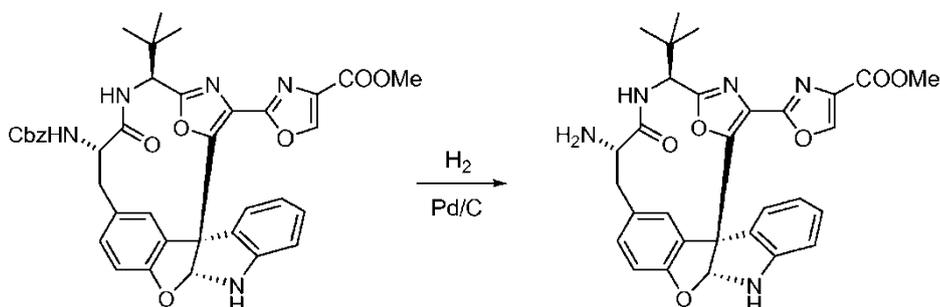
En un matraz seco se añadieron el producto en bruto de la Etapa 8 anterior (2,33 mmol) y CH_2Cl_2 anhidro (40 ml). La solución de reacción se volvió turbia a medida que se enfrió a -20°C en un baño de hielo seco/acetona/agua. Se añadió gota a gota una solución madre recién preparada de trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (0,644 ml, 0,022 mmol, 2,8 equiv.) en CH_2Cl_2 (4 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a -20°C durante 1 h, y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de NaHCO_3 acuoso saturado (20 ml), se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con agua (2 x 30 ml), así como salmuera (30 ml), y se secó sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el residuo se usó en la siguiente etapa.

10

Etapa 9

15 En un matraz seco que contenía el producto en bruto de la etapa 8 anterior (2,33 mmol) se añadió CH_2Cl_2 anhidro (40 ml). La mezcla se enfrió a 0°C . Después, se añadieron CBrCl_3 (0,345 ml, 3,5 mmol, 1,5 equiv.) y DBU (0,523 ml, 3,5 mmol, 1,5 equiv.) respectivamente. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó por NaHSO_4 al 10 % (30 ml), agua (2 x 30 ml), NaHCO_3 acuoso saturado (30 ml), agua (30 ml) y salmuera (30 ml), y se

20

Etapa 10

25

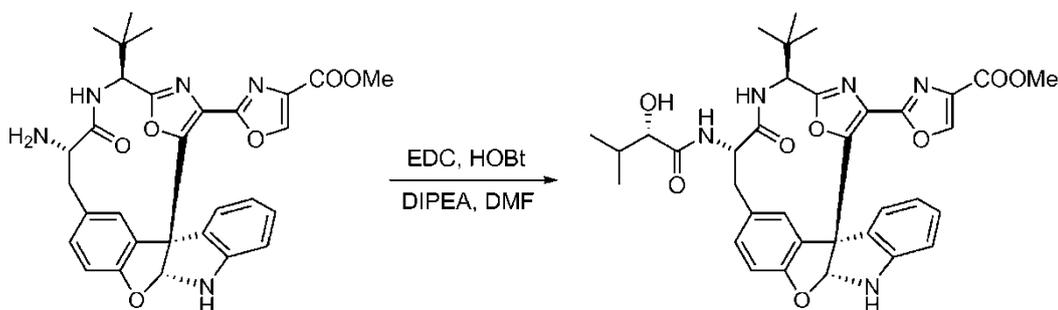
En un matraz de 50 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 9 anterior (400 mg, 0,58 mmol) se añadieron metanol (15 ml), t-butilamina (0,086 ml, 0,87 mmol, 1,5 equiv.) y Pd/C (10 %) (62 mg, 0,058 mmol, 0,1 equiv.) en una atmósfera de N_2 . Se añadió un globo de H_2 y el matraz se purgó con H_2 4 veces. Después, el globo de H_2 se abrió al sistema de reacción. Después de 4 h de agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La

30

mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 10 ml).

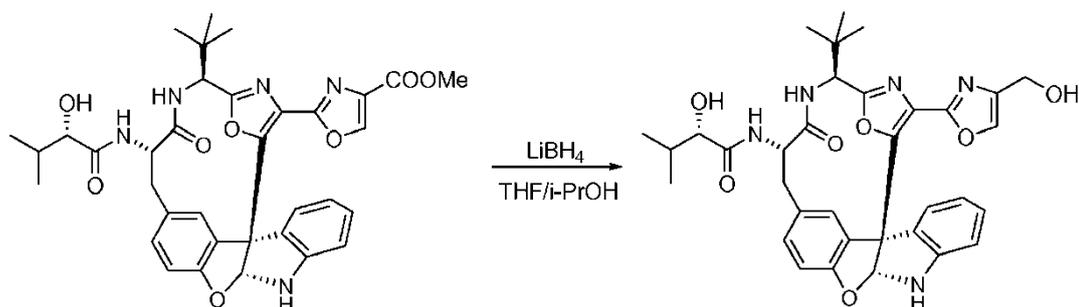
El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

Etapa 11



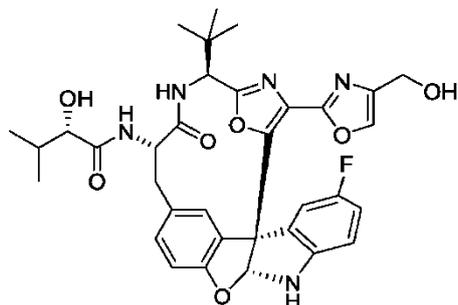
En un matraz de 25 ml seco que contenía la amina sintetizada en la Etapa 10 anterior (0,58 mmol) se añadieron ácido (S)-(+)-2-hidroxi-3-metilbutanoico (82 mg, 0,696 mmol, 1,2 equiv.), HOBt (94 mg, 0,696 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (8 ml) y N,N-diisopropiletilamina (0,152 ml, 0,87 mmol, 1,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C
 10 seguido de la adición de EDC·HCl (133 mg, 0,696 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (80 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (30 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (30 ml), agua (30 ml), NaHCO₃ saturado (30 ml), y salmuera (2 x 30 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el
 15 producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 12



En un matraz seco se añadieron el material sintetizado en la Etapa 11 (0,58 mmol), THF (4 ml) y 2-propanol (12 ml). Esta solución se enfrió a 0 °C seguido de la adición de borohidruro de litio sólido (152 mg, 6,96 mmol, 12 equiv.). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 22 h. La reacción se controló con LCMS. Casi no quedó material de partida. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadieron 2-propanol (24 ml) y
 25 agua (40 ml) seguido de la adición de NH₄Cl (3,1 g, 58 mmol, 100 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se diluyó con EtOAc (250 ml)/agua (50 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 50 ml), NaHSO₄ al 10 % (2 x 50 ml), agua (2 x 50 ml), NaHCO₃ saturado (50 ml), y salmuera (2 x 50 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc a EtOAc al 10 %/MeOH) para
 30 proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanquecino (188 mg, 0,108 mmol, 52 % durante tres etapas). MS: m/z = 627,9 (M+1).

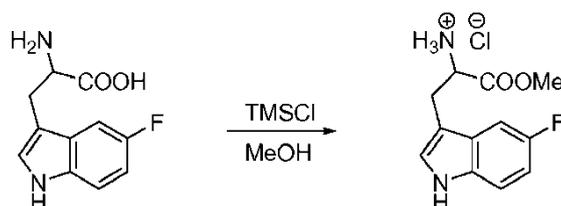
Síntesis del Compuesto 85



85

Etapa 1

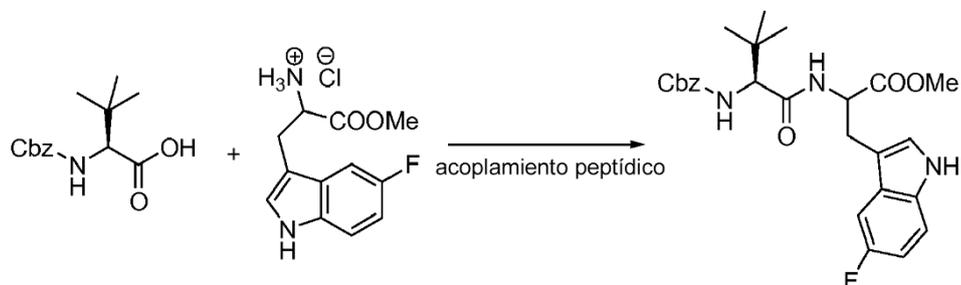
5



En un matraz de 250 ml seco se añadieron 5-fluoro-DL-triptófano (6,0 g, 27,0 mmol), y metanol anhidro (120 ml). La suspensión se enfrió a 0 °C seguido de la adición de clorotrimetil silano (15,4 ml, 121,5 mmol, 4,5 equiv.) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción por debajo de 6 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La reacción se controló por TLC. La mayor parte de las sustancias volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto se usó en la siguiente etapa.

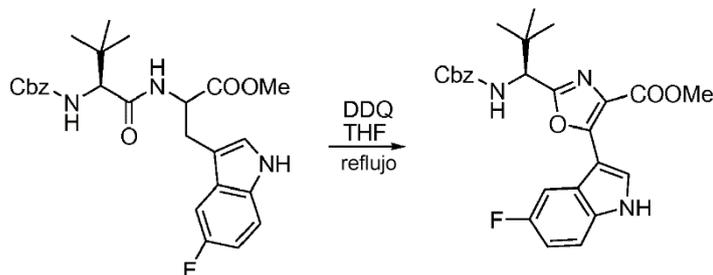
Etapa 2

15



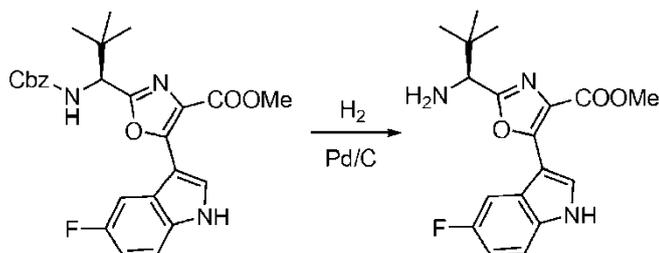
En un matraz de 250 ml seco con una barra de agitación magnética se añadieron la sal amina sintetizada en la etapa 1 anterior (27 mmol.), sal Cbz-L- α -t-butilglicina DCHA (13,26 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (4,01 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.), DMF anhidra (100 ml) y N,N-diisopropiletilamina (14,1 ml, 81 mmol, 3,0 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (5,69 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mayor parte de los disolventes se evaporaron a presión reducida. Después, el residuo se diluyó con EtOAc (700 ml)/agua (200 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (100 ml), agua (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 3



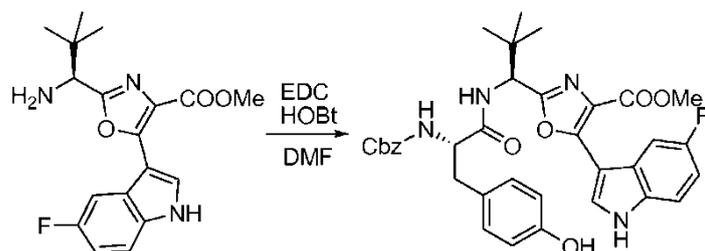
Se añadió una solución de DDQ (15,32 g, 67,5 mmol, 2,5 equiv.) en THF (100 ml) a la solución a reflujo del compuesto sintetizado en la Etapa 2 anterior (27 mmol) en THF (300 ml), y la solución oscura se mantuvo a reflujo 5 en un baño de aceite a 85 °C durante 1 h. Después del enfriamiento, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en acetato de etilo (700 ml), y se añadió NaHCO₃ (15 g). La mezcla se agitó durante 1 h seguido de filtración a través de un embudo sinterizado. El filtrado se lavó con agua (200 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 200 ml), agua (2 x 200 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, la mezcla se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 5 % en CH₂Cl₂). Esto produjo 6,42 g 10 (rendimiento del 50%) de producto.

Etapa 4



En un matraz de 250 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 3 anterior (6,42 g, 13,4 mmol) se añadieron metanol (60 ml) y Pd/C (10 %) (1,43 g, 1,34 mmol, 0,1 equiv.) en una atmósfera de N₂. Se añadió un globo de H₂ y el matraz se purgó con H₂ 4 veces. Después, el globo de H₂ se abrió al sistema de reacción. Después de 1 h de 20 agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 15 ml). El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

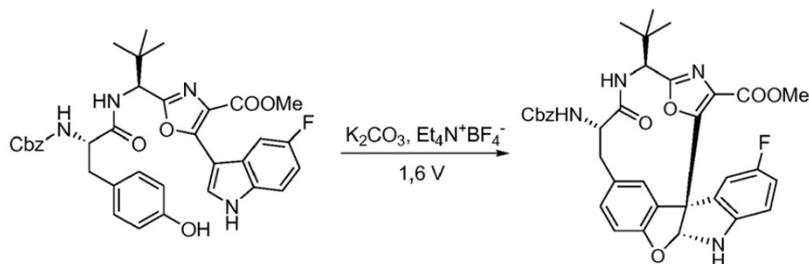
Etapa 5



En un matraz de 100 ml seco con una barra de agitación magnética se añadieron la amina sintetizada en la etapa 4 25 (13,4 mmol), Cbz-L-tirosina (4,65 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (2,0 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.), DMF anhidra (40 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (2,83 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (500 ml)/agua (150 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 30 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (150 ml), agua (150 ml), NaHCO₃ saturado (150 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

35

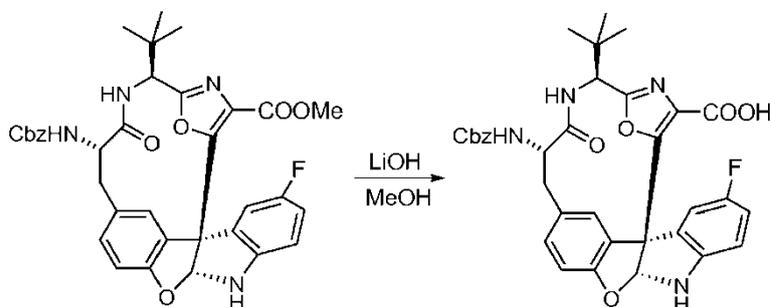
Etapa 6



- 5 Se ensambló una celda electroquímica usando un cilindro de vidrio (6 cm de diámetro x 11 cm de altura) y una cremallera personalizada (polipropileno y nylon) que soportaba 9 varillas verticales de grafito (6,15 mm de diámetro x 12 cm de longitud). Las varillas se dispusieron en un patrón de un anillo con 6 ánodos y 3 cátodos. Los electrodos se sumergieron a una profundidad de 6,5 cm. El material fenólico sintetizado en la Etapa 5 anterior (2,00 g, 3,11 mmol), Et_4NBF_4 (2,00 g, 9,2 mmol, 3 equiv.) y K_2CO_3 (0,409 g, 2,96 mmol, 0,95 equiv.) y agua ID (4 ml) se añadieron en
- 10 DMF (200 ml). La solución se agitó vigorosamente en una placa de agitación (aprox. 600 rpm). La reacción electroquímica se realizó a un potencial de 1,5-1,6 voltios. Después de 3 días, la mayor parte del SM original se había consumido como se determinó por integración de HPLC a 220 nM. La reacción electroquímica se repitió 4 veces para consumir todo el material fenólico sintetizado en la etapa 5. Las mezclas de reacción combinadas se concentraron en un evaporador rotativo (temp. de baño ≤ 35 °C) y se secó adicionalmente en un colector de vacío. El
- 15 residuo se diluyó con EtOAc (500 ml) seguido de filtración a través de un embudo sinterizado. El filtrado se lavó con agua (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml). Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. Este material se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida con MeCN al 15 % en CH_2Cl_2 . Esto produjo 553 mg del producto deseado con un rendimiento del 6,4 % en tres etapas.

20

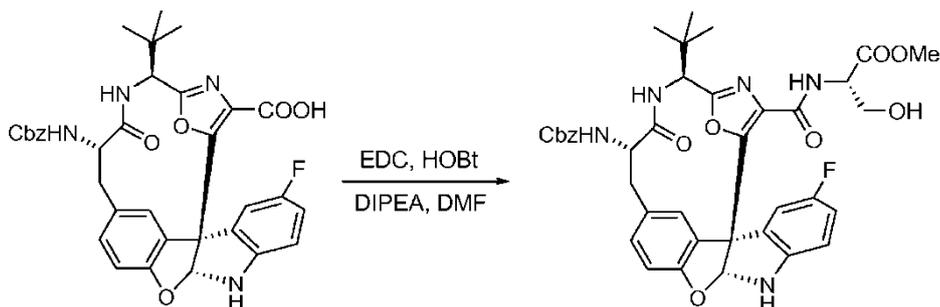
Etapa 7



- 25 El compuesto sintetizado en la Etapa 6 (553 mg, 0,863 mmol) se disolvió en metanol (17 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución de LiOH (207 mg, 8,63 mmol, 10 equiv.) en agua (2,7 ml) durante 5 min. El baño de hielo se eliminó y la mezcla se agitó a TA durante 18 h. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió agua (20 ml) seguido de HCl acuoso 1 N (8,8 ml), manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. La mezcla se repartió entre agua (15 ml) y EtOAc (100 ml), y la capa orgánica se lavó con NaCl acuoso
- 30 saturado. Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se decantaron, y se evaporaron para dar el producto de ácido en forma de cristales de color blanco finos.

Etapa 8

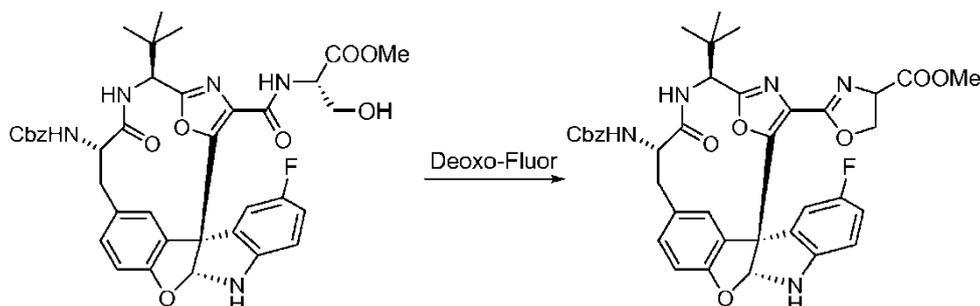
35



En un matraz de 50 ml seco con una barra de agitación magnética se añadió el ácido carboxílico sintetizado en la etapa 7 anterior (0,863 mmol), clorhidrato de L-serina metil éster (161 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), HOBT (140 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (15 ml) y N,N-diisopropiletilamina (0,346 ml, 1,99 mmol, 2,3 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (199 mg, 1,036 mmol, 1,3 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mayor parte de los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (100 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (40 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (40 ml), agua (40 ml), NaHCO₃ saturado (40 ml), y salmuera (2 x 40 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 9

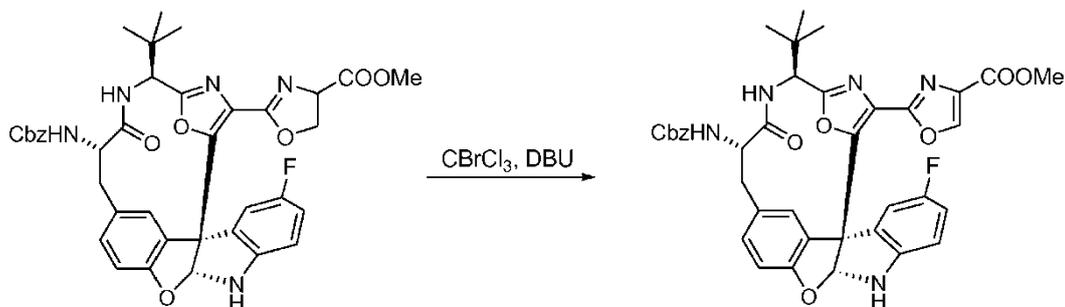
15



En un matraz seco se añadieron el producto en bruto de la Etapa 8 anterior (0,863 mmol) y CH₂Cl₂ anhidro (15 ml). La solución de reacción se volvió turbia a medida que se enfrió a -20°C en un baño de hielo seco/acetona/agua. Se añadió gota a gota una solución madre recién preparada de trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (0,239 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) en CH₂Cl₂ (2 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a -20 °C durante 1 h, y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de NaHCO₃ acuoso saturado (10 ml), se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con agua (2 x 15 ml), así como salmuera (20 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el residuo se usó en la siguiente etapa.

25

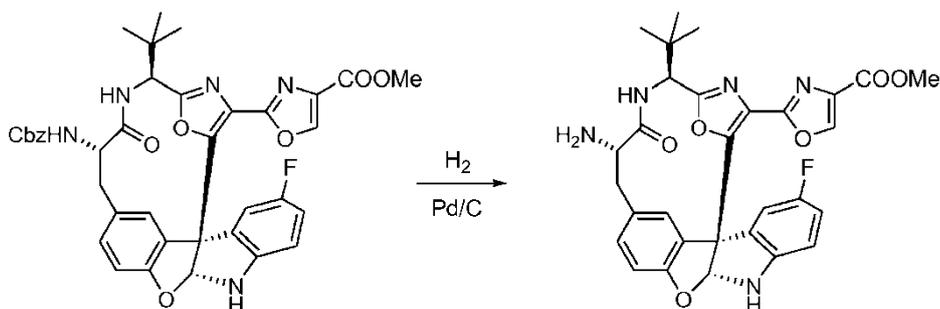
Etapa 10



30 En un matraz seco que contenía el producto en bruto de la etapa 9 anterior (0,866 mmol) se añadió CH₂Cl₂ anhidro

(15 ml). La mezcla se enfrió a 0°C. Después, se añadieron CBrCl₃ (0,128 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) y DBU (0,193 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) respectivamente. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó por NaHSO₄ al 10 % (15 ml), agua (2 x 15 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (15 ml), agua (15 ml) y salmuera (15 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el residuo se usó en la siguiente etapa.

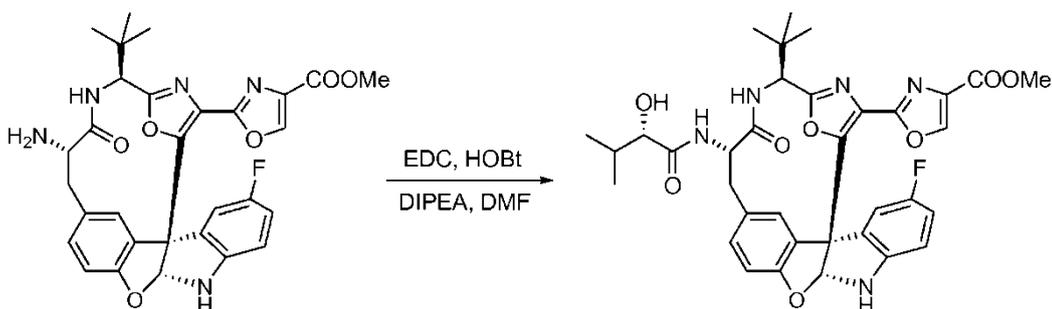
Etapa 11



10

En un matraz de 50 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 10 anterior (0,863 mmol) se añadieron metanol (12 ml), t-butilamina (0,137 ml, 1,3 mmol, 1,5 equiv.) y Pd/C (10 %) (91 mg, 0,0863 mmol, 0,1 equiv.) en una atmósfera de N₂. Se añadió un globo de H₂ y el matraz se purgó con H₂ 4 veces. Después, el globo de H₂ se abrió al sistema de reacción. Después de 4 h de agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 10 ml). El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

Etapa 12



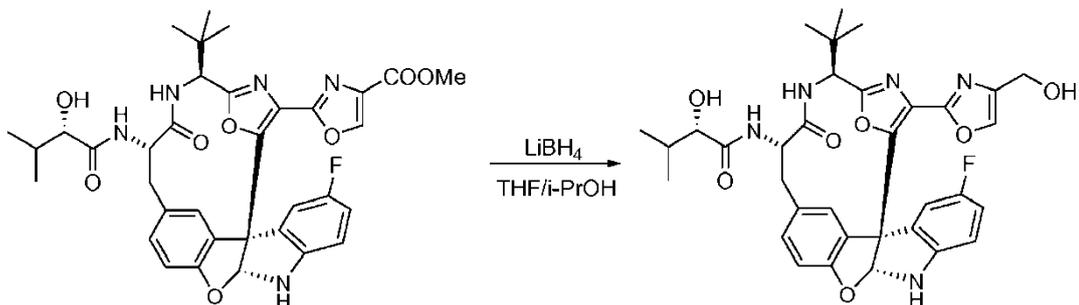
20

En un matraz de 25 ml seco que contenía la amina sintetizada en la Etapa 11 anterior (0,863 mmol) se añadieron ácido (S)-(+)-2-hidroxi-3-metilbutanoico (122 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), HOBt (140 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (10 ml) y N,N-diisopropiletilamina (0,225 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (199 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (30 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (30 ml), agua (30 ml), NaHCO₃ saturado (30 ml), y salmuera (2 x 30 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

25

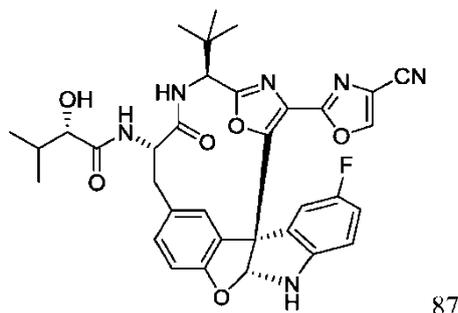
30

Etapa 13

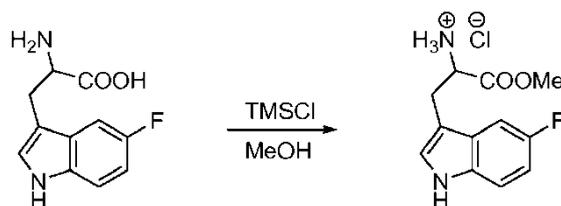


En un matraz seco se añadieron el material sintetizado en la Etapa 12 (0,863 mmol), THF (10 ml) y 2-propanol (30 ml). Esta solución se enfrió a 0 °C seguido de la adición de borohidruro de litio sólido (282 mg, 12,95 mmol, 15 equiv.). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 22 h. La reacción se controló con LCMS. Casi no quedó material de partida. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadieron 2-propanol (24 ml) y agua (40 ml) seguido de la adición de NH₄Cl (4,6 g, 86,3 mmol, 100 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se diluyó con EtOAc (250 ml)/agua (50 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 100 ml), NaHSO₄ al 10 % (2 x 100 ml), agua (2 x 100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 70 %/DCM) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanquecino (124 mg, 0,192 mmol, 22 % en siete etapas).

15 Síntesis del Compuesto 87



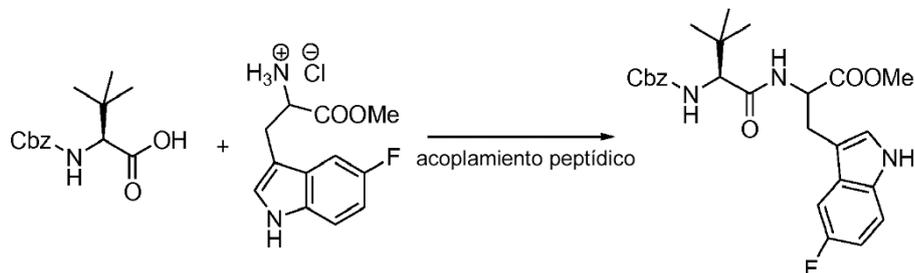
Etapa 1



20

En un matraz de 250 ml seco se añadieron 5-fluoro-DL-triptófano (6,0 g, 27,0 mmol), y metanol anhidro (120 ml). La suspensión se enfrió a 0 °C seguido de la adición de clorotrimetil silano (15,4 ml, 121,5 mmol, 4,5 equiv.) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción por debajo de 6 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La reacción se controló por TLC. La mayor parte de las sustancias volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto se usó en la siguiente etapa.

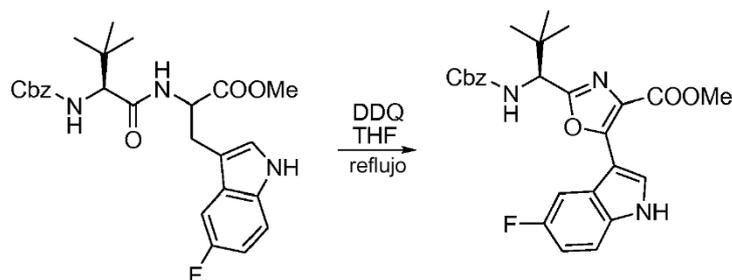
Etapa 2



En un matraz de 250 ml seco con una barra de agitación magnética se añadieron la sal amina sintetizada en la etapa 1 anterior (27 mmol.), sal Cbz-L- α -t-butilglicina DCHA (13,26 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (4,01 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.), DMF anhidra (100 ml) y N,N-diisopropiletilamina (14,1 ml, 81 mmol, 3,0 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (5,69 g, 29,7 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mayor parte de los disolventes se evaporaron a presión reducida. Después, el residuo se diluyó con EtOAc (700 ml)/agua (200 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (100 ml), agua (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 3

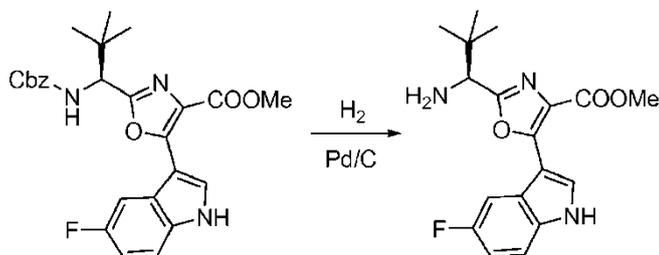
15



Se añadió una solución de DDQ (15,32 g, 67,5 mmol, 2,5 equiv.) en THF (100 ml) a la solución a reflujo del compuesto sintetizado en la Etapa 2 anterior (27 mmol) en THF (300 ml), y la solución oscura se mantuvo a reflujo en un baño de aceite a 85 °C durante 1 h. Después del enfriamiento, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en acetato de etilo (700 ml), y se añadió NaHCO₃ (15 g). La mezcla se agitó durante 1 h seguido de filtración a través de un embudo sinterizado. El filtrado se lavó con agua (200 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 200 ml), agua (2 x 200 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, la mezcla se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 5 % en CH₂Cl₂). Esto produjo 6,42 g (rendimiento del 50%) de producto.

Etapa 4

30

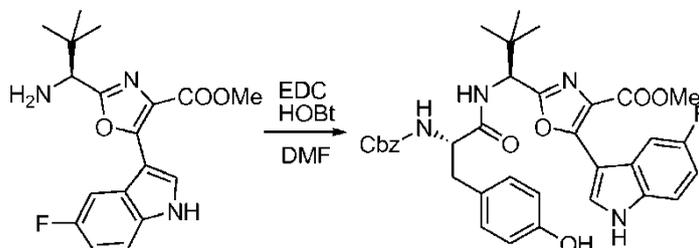


En un matraz de 250 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 3 anterior (6,42 g, 13,4 mmol) se añadieron metanol (60 ml) y Pd/C (10 %) (1,43 g, 1,34 mmol, 0,1 equiv.) en una atmósfera de N₂. Se añadió un globo de H₂ y el matraz se purgó con H₂ 4 veces. Después, el globo de H₂ se abrió al sistema de reacción. Después de 1 h de agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró a través de un

lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 15 ml). El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

Etapa 5

5



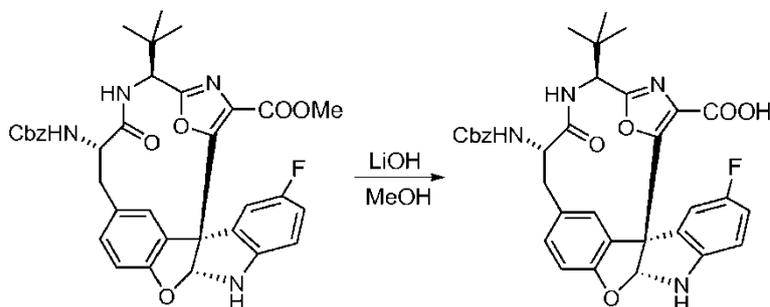
En un matraz de 100 ml seco con una barra de agitación magnética se añadieron la amina sintetizada en la etapa 4 (13,4 mmol), Cbz-L-tirosina (4,65 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.), HOBt (2,0 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.), DMF anhidra (40 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (2,83 g, 14,74 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (500 ml)/agua (150 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (150 ml), agua (150 ml), NaHCO₃ saturado (150 ml), y salmuera (2 x 100 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 6

20

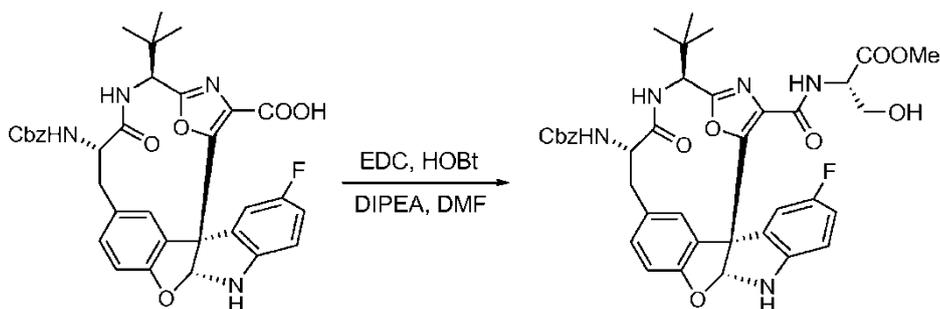
Se ensambló una celda electroquímica usando un cilindro de vidrio (6 cm de diámetro x 11 cm de altura) y una cremallera personalizada (polipropileno y nylon) que soportaba 9 varillas verticales de grafito (6,15 mm de diámetro x 12 cm de longitud). Las varillas se dispusieron en un patrón de un anillo con 6 ánodos y 3 cátodos. Los electrodos se sumergieron a una profundidad de 6,5 cm. El material fenólico sintetizado en la Etapa 5 anterior (2,00 g, 3,11 mmol), Et₄NBF₄ (2,00 g, 9,2 mmol, 3 equiv.) y K₂CO₃ (0,409 g, 2,96 mmol, 0,95 equiv.) y agua ID (4 ml) se añadieron en DMF (200 ml). La solución se agitó vigorosamente en una placa de agitación (aprox. 600 rpm). La reacción electroquímica se realizó a un potencial de 1,5-1,6 voltios. Después de 3 días, la mayor parte del SM original se había consumido como se determinó por integración de HPLC a 220 nM. La reacción electroquímica se repitió 4 veces para consumir todo el material fenólico sintetizado en la etapa 5. Las mezclas de reacción combinadas se concentraron en un evaporador rotativo (temp. de baño ≤35 °C) y se secó adicionalmente en un colector de vacío. El residuo se diluyó con EtOAc (500 ml) seguido de filtración a través de un embudo sinterizado. El filtrado se lavó con agua (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml). Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. Este material se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida con MeCN al 15 % en CH₂Cl₂. Esto produjo 553 mg del producto deseado con un rendimiento del 6,4 % en tres etapas.

Etapa 7



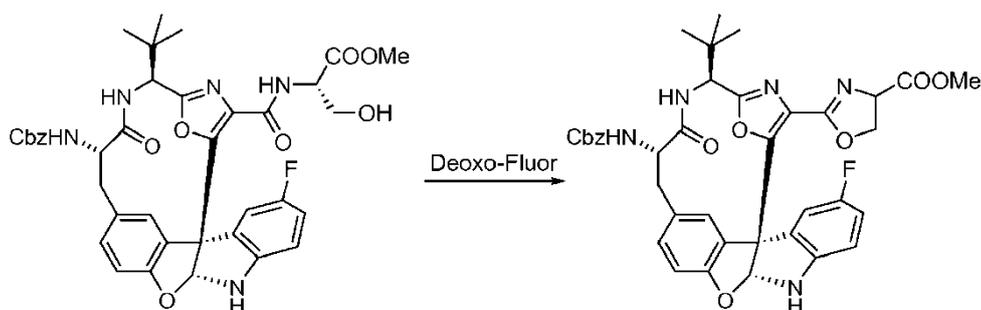
El compuesto sintetizado en la Etapa 6 (553 mg, 0,863 mmol) se disolvió en metanol (17 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución de LiOH (207 mg, 8,63 mmol, 10 equiv.) en agua (2,7 ml) durante 5 min. El baño de hielo se eliminó y la mezcla se agitó a TA durante 18 h. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió agua (20 ml) seguido de HCl acuoso 1 N (8,8 ml), manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. La mezcla se repartió entre agua (15 ml) y EtOAc (100 ml), y la capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado. Las capas acuosas se extrajeron en sucesión con EtOAc (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se decantaron, y se evaporaron para dar el producto de ácido en forma de cristales de color blanco finos.

Etapa 8



En un matraz de 50 ml seco con una barra de agitación magnética se añadió el ácido carboxílico sintetizado en la etapa 7 anterior (0,863 mmol), clorhidrato de L-serina metil éster (161 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), HOBT (140 mg, 1,036 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (15 ml) y N,N-diisopropiletilamina (0,346 ml, 1,99 mmol, 2,3 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (199 mg, 1,036 mmol, 1,3 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mayor parte de los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (100 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (40 ml), NaHSO_4 acuoso al 10 % (40 ml), agua (40 ml), NaHCO_3 saturado (40 ml), y salmuera (2 x 40 ml), y después se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 9

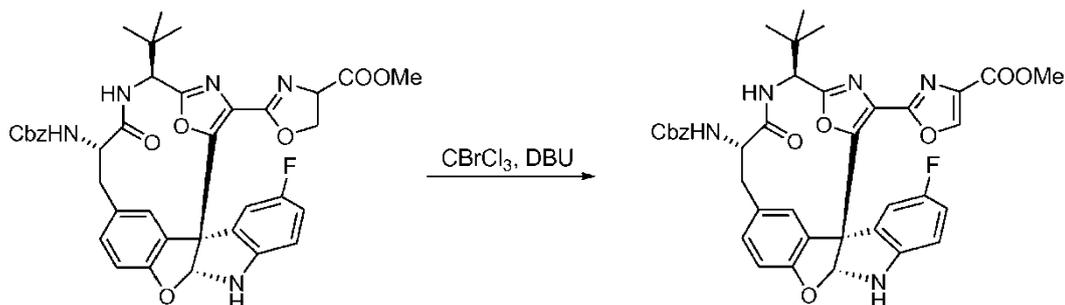


30

En un matraz seco se añadieron el producto en bruto de la Etapa 8 anterior (0,863 mmol) y CH_2Cl_2 anhidro (15 ml). La solución de reacción se volvió turbia a medida que se enfrió a -20°C en un baño de hielo seco/acetona/agua. Se añadió gota a gota una solución madre recién preparada de trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (0,239 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) en CH_2Cl_2 (2 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a -20°C durante 1 h, y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de NaHCO_3 acuoso saturado (10 ml), se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con agua (2 x 15 ml), así como salmuera (20 ml), y se secó sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el residuo se usó en la siguiente etapa.

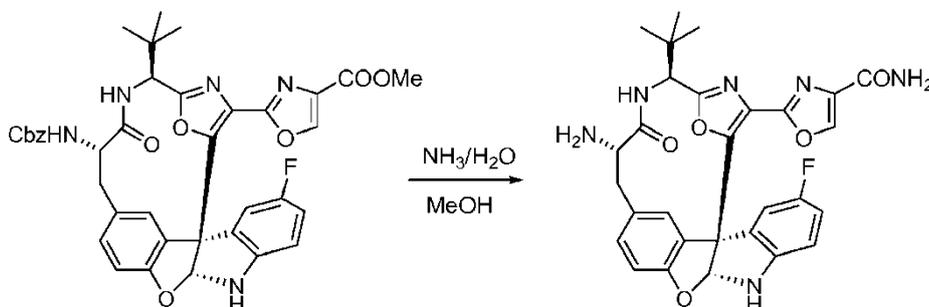
Etapa 10

10



En un matraz seco que contenía el producto en bruto de la etapa 9 anterior (0,866 mmol) se añadió CH_2Cl_2 anhidro (15 ml). La mezcla se enfrió a 0°C . Después, se añadieron CBrCl_3 (0,128 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) y DBU (0,193 ml, 1,29 mmol, 1,5 equiv.) respectivamente. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó por NaHSO_4 al 10 % (15 ml), agua (2 x 15 ml), NaHCO_3 acuoso saturado (15 ml), agua (15 ml) y salmuera (15 ml), y se secó sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el residuo se usó en la siguiente etapa.

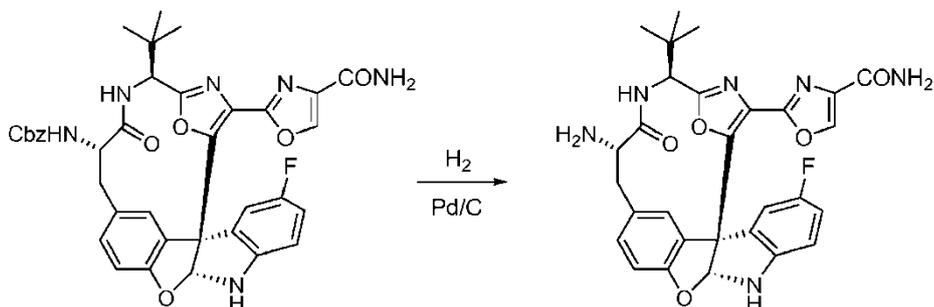
20 Etapa 11



En un matraz se añadieron el producto de la etapa 10 (0,52 mmol), metanol (25 ml), y una solución acuosa de amoníaco (28 %, 10 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se controló por TLC. La mayor parte del metanol se evaporó a presión reducida. El residuo se extrajo por acetato de etilo (3 x 30 ml), se lavó con NaHSO_4 al 2 % (30 ml), agua (30 ml), NaHCO_3 al 5 % (30 ml), salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el producto en bruto se usó en la siguiente etapa.

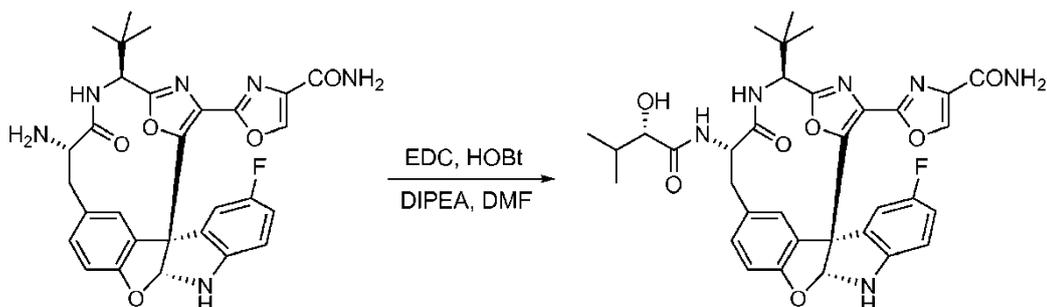
30

Etapa 12



En un matraz de 100 ml que contenía material sintetizado en la Etapa 11 anterior (0,52 mmol) se añadieron metanol (10 ml), t-butilamina (0,082 ml, 0,78 mmol, 1,5 equiv.) y Pd/C (10 %) (55 mg, 0,052 mmol, 0,1 equiv.) en una atmósfera de N₂. Se añadió un globo de H₂ y el matraz se purgó con H₂ 4 veces. Después, el globo de H₂ se abrió al sistema de reacción. Después de 4 h de agitación, casi no quedaba material de partida. La reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y la torta de color negro se lavó con metanol (3 x 15 ml). El filtrado se concentró, y el residuo se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

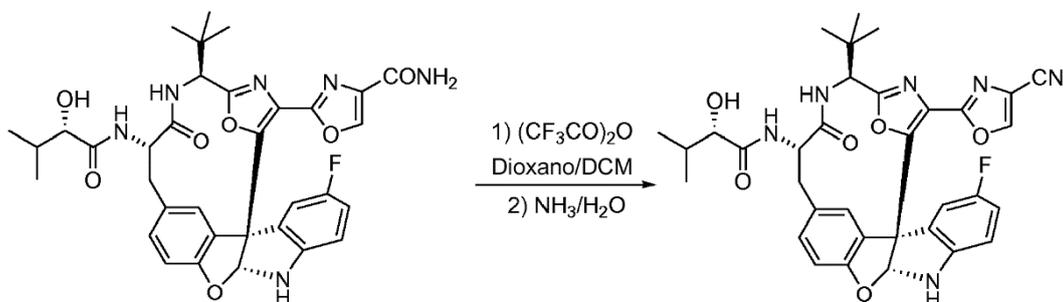
10 Etapa 13



En un matraz de 25 ml seco que contenía la amina sintetizada en la Etapa 12 anterior (0,52 mmol) se añadieron ácido (S)-(+)-2-hidroxi-3-metilbutanoico (74 mg, 0,624 mmol, 1,2 equiv.), HOBt (85 mg, 0,624 mmol, 1,2 equiv.), DMF anhidra (10 ml) y N,N-diisopropiletilamina (0,136 ml, 0,78 mmol, 1,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C seguido de la adición de EDC·HCl (120 mg, 0,624 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se controló por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml)/agua (30 ml). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo por EtOAc (2 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (50 ml), NaHSO₄ acuoso al 10 % (50 ml), agua (30 ml), NaHCO₃ saturado (50 ml), y salmuera (2 x 50 ml), y después se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, el producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 14

25



En un matraz seco se añadieron el material en bruto sintetizado en la Etapa 13 (0,52 mmol), dioxano (7 ml) y CH₂Cl₂ (7 ml) y piridina (0,841 ml, 14,7 mmol). Esta solución se enfrió a -17 °C seguido de la adición de anhídrido trifluoroacético (1,1 ml, 7,8 mmol) de -10 a -17 °C. Después de la adición, la mezcla resultante se agitó a -15 °C

durante 1 h. Después, la solución acuosa de NH_3 (28 % 7 ml) se añadió gota a gota a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ seguido de calentamiento a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La reacción se controló con LCMS. La mayor parte del disolvente se movió a presión reducida. El residuo se extrajo por acetato de etilo (3 x 20 ml), se lavó con agua (2 x 20 ml), NaHSO_4 al 5 % (20 ml), agua (20 ml), NaHCO_3 sat. (20 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de la concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (MeCN al 20 %/DCM a MeCN al 30 %/DCM) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanquecino (51 mg, 0,080 mmol, 16 % en ocho etapas).

Protocolo de ensayo de viabilidad celular

10

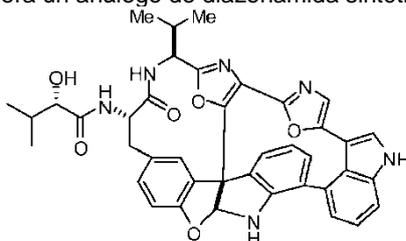
Los ensayos de viabilidad celular se realizaron usando protocolos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Las células se pusieron en placas de 96 pocillos a la densidad de 3.000-10.000 células por pocillo. Veinticuatro horas más tarde, las células se trataron con una concentración creciente de compuestos de ensayo (1 nM a 1 μM). Después de 48 horas más, se midió la supervivencia celular usando reactivo Cell-Titer-Glo® (Promega) siguiendo el protocolo proporcionado por la fabricación. El valor de CI_{50} se determinó como la concentración del compuesto de ensayo que mata al 50 % de la población celular.

15

Datos biológicos representativos

20

Se generaron datos de viabilidad celular generados de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente para compuestos representativos en células A2058 y U937. Los compuestos mostrados en la Tabla 1 se prepararon mediante los métodos descritos en el presente documento para compuestos estructuralmente similares. El compuesto de referencia era un análogo de diazonamida sintético que tenía la estructura:

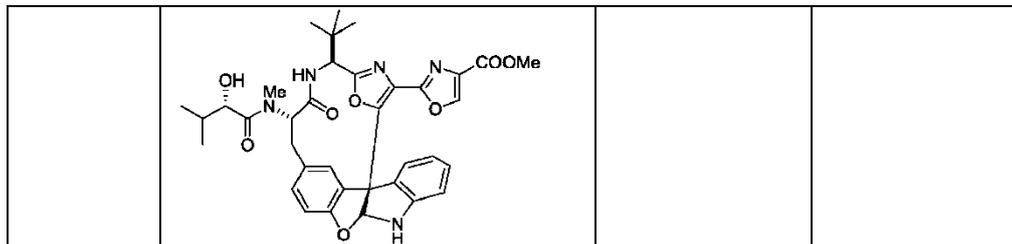


25

Tabla 1 Datos de viabilidad celular en las células A2058 y U937

Compuesto n.º	Estructura	CI_{50} (nM) en ensayo de viabilidad celular en A2058	CI_{50} (nM) en ensayo de viabilidad celular en U937
26		3,33	2,88
48		6,11	6,34
57		8,3	5,3

62		2,54	15,64
73		<0,1	<0,1
75		1,89	6,55
85		0,47	0,74
87		<0,3	1,9
90		10,4	17,12



Modelos tumorales de xenoinjerto

Los compuestos se ensayaron en modelos de tumor de xenoinjerto de carcinoma de pulmón humano HCC461 y xenoinjerto de cáncer de páncreas Miapaca en ratones Harlan atímicos sin pelo Foxnlnu de 5 a 6 semanas de edad.

Protocolo:

Preparación de células tumorales

10

Las células tumorales se cultivaron en medio RPMI completo y se excluyó cualquier contaminación. Cuando las células son confluentes al 70-80 %, se eliminó el medio y las células se lavaron con medio libre de suero, se tripsinizaron, se recogieron y se lavaron con medio sin suero tres veces mediante centrifugación. Después del lavado final, las células se contaron y se mezclaron con matrigel a una relación 1:1 en volumen. Las células se

15

suspendieron en un volumen de 200 μ l que contenía número requerido de células por inyección.

Preparación de la inyección

20

Limpiar y esterilizar el área de inoculación de los ratones con soluciones de yodo y etanol. Coger las células con una jeringa de cc. Inyectar células tumorales (1×10^7) por vía subcutánea (s.c.) en el costado inferior de los ratones. Cuando los tumores alcanzaron 200-300 mm^3 de tamaño, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de cinco ratones por grupo. Los ratones se pesaron y los tumores se midieron usando calibre de vernier dos veces por semana. El volumen tumoral en mm^3 se calcula por la fórmula: Volumen (mm^3) = (longitud x anchura²)/2.

25

Tratamiento

30

Los compuestos se disolvieron en cremophor/etanol (1:1) a 20 mg/ml como la solución madre y luego se diluyeron en solución salina a 2,5 mg/ml. Los compuestos y el vehículo (6,25 % de cremophor/6,25 % de etanol en solución salina) se administraron por vía intravenosa en un volumen total de 0,2 ml tres veces por semana para un total de seis tratamientos.

35

En el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón HCC461, los animales se inyectaron los días 7, 11, 14 y 18 después de la inyección de células tumorales.

En el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático Miapaca, los animales se inyectaron los días 6, 13 y 20 después de la inyección de células tumorales.

Resultados

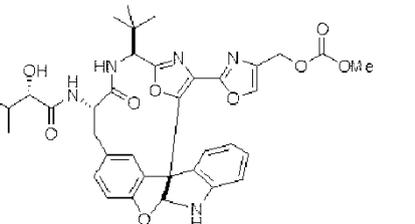
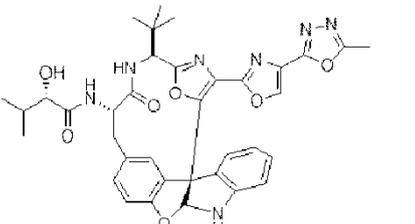
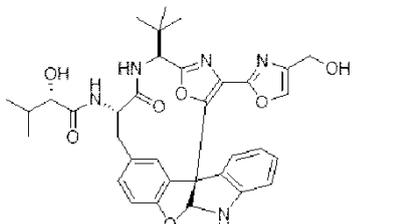
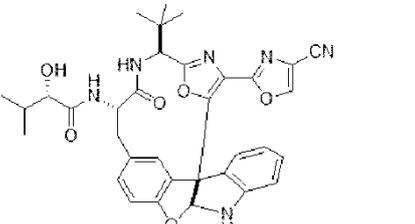
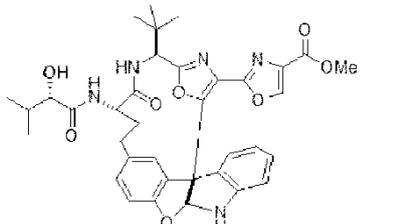
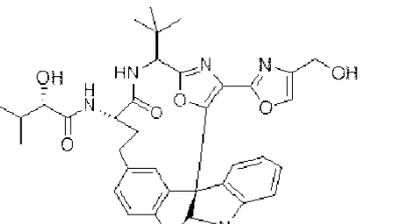
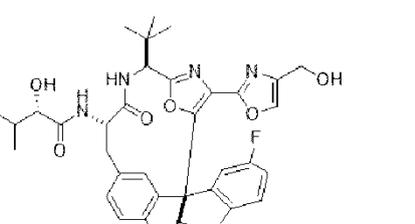
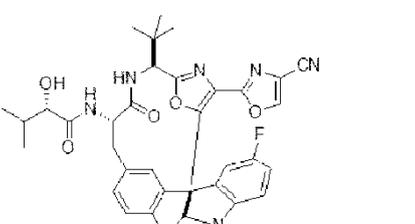
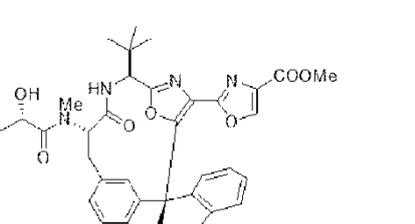
40

Las actividades de los compuestos ejemplares y las dosificaciones se muestran en las Figuras 1 y 2.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de los compuestos en la siguiente tabla y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

5

26		48	
57		62	
73		75	
85		87	
90			

2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 en forma de dosificación unitaria con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 3. Un compuesto como se define en la reivindicación 1, para su uso como un agente antiproliferativo.

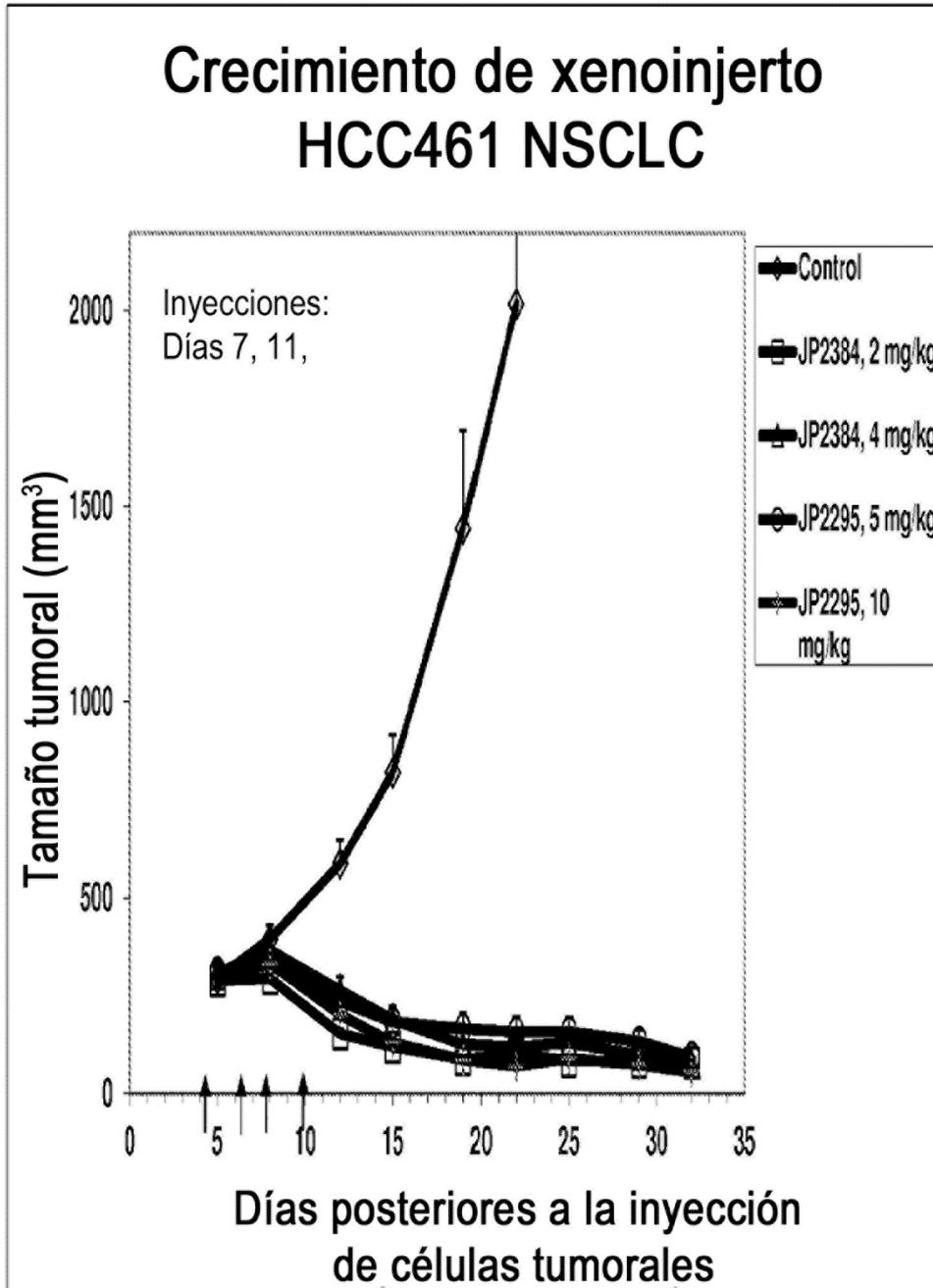


Fig.1

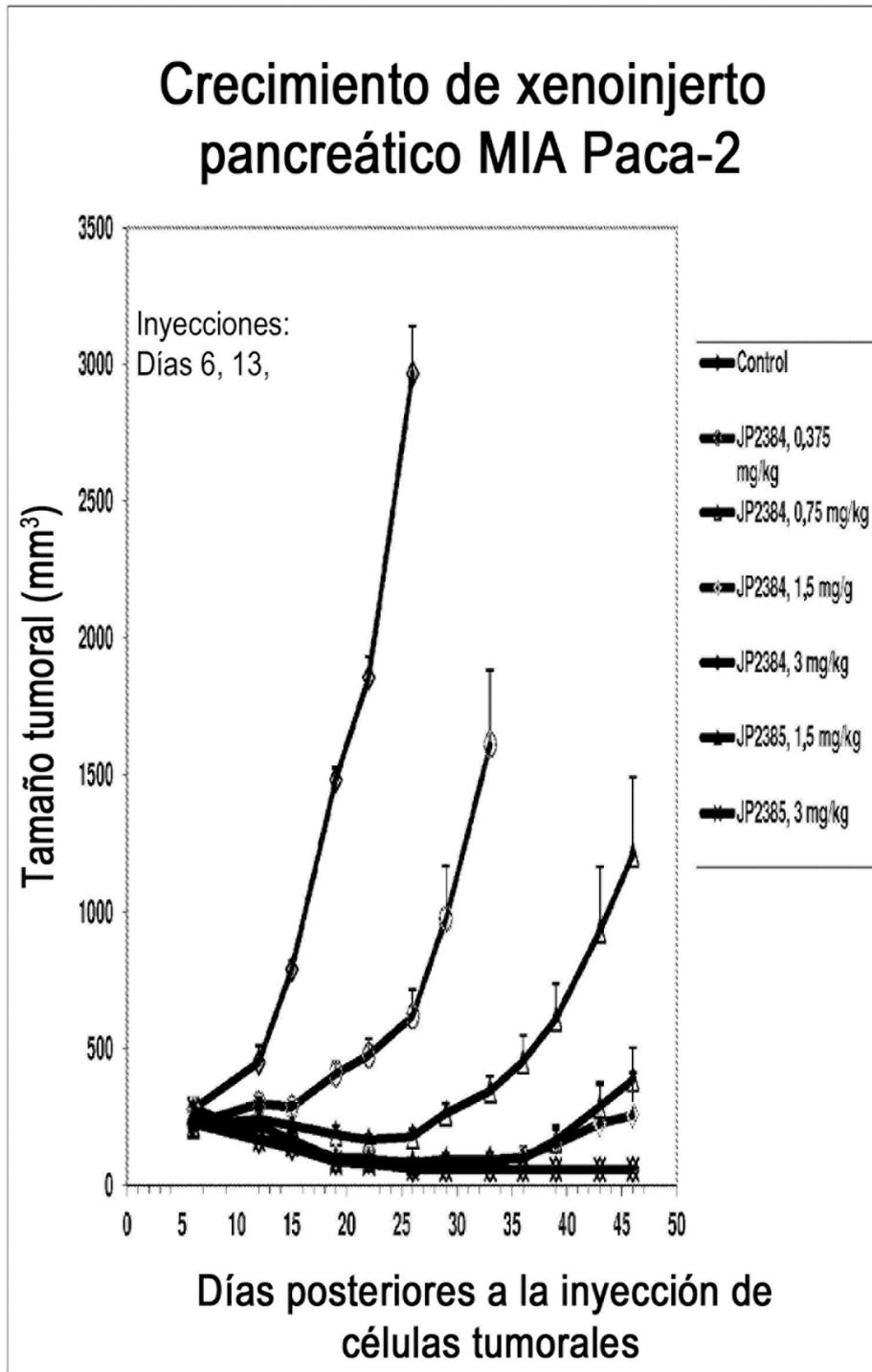


Fig. 2