

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 981**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2017 PCT/US2017/035097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17213919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2017 E 17728990 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3468965**

54 Título: **Compuestos de 1-tetrahidropiranylcarbonil-2,3-dihidro-1h-indol para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

10.06.2016 US 201662348457 P

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

04.12.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BASTIAN, JOLIE ANNE;
CHEN, JIEHAO;
COHEN, JEFFREY DANIEL;
HENRY, JAMES ROBERT;
MCMILLEN, WILLIAM THOMAS;
REAMAN, BRADLEY EARL;
RUBIO, ALMUDENA;
SALL, DANIEL JON y
ZHAO, GAIYING**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 797 981 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

Compuestos de 1-tetrahidropiranylcarbonil-2,3-dihidro-1H-indol para el tratamiento del cáncer

La presente invención se refiere a novedosos compuestos de 2,3-dihidro-1H-indol que inhiben la conversión de triptófano a quinurenina, algunos de los cuales se ha confirmado que se unen a la 2,3-dioxigenasa de indoleamina (IDO1). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y procedimientos para su uso de estos compuestos para tratar trastornos fisiológicos, más particularmente para el tratamiento de cáncer tal como melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompa de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

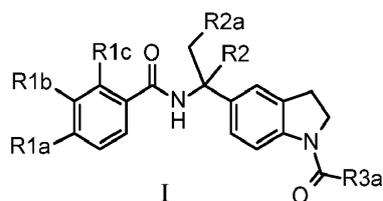
El triptófano es un aminoácido esencial requerido para la biosíntesis de proteínas, el crecimiento celular, la generación de metabolitos neuroactivos tales como la serotonina (5-hidroxitriptamina), la melatonina y la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). El triptófano se cataboliza por la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), una enzima hemodependiente que cataliza la primera etapa limitante de la tasa en el catabolismo del triptófano a N-formil-kinurenina, que luego se desformila para generar kinurenina. Durante la infección, la expresión de IDO1 es inducida por interferón gamma para agotar localmente el triptófano, lo cual inhibe el crecimiento de patógenos intracelulares dependientes de triptófano tal como *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* y virus. Además, IDO1 desempeña un papel en la prevención del daño oxidativo en las células, varias neuropatologías, regulación del sistema inmune y cáncer. Aunque la actividad IDO1 es un componente crítico de la respuesta inmune a los patógenos, la actividad prolongada da como resultado el agotamiento del triptófano extracelular con la producción concomitante de quinurenina, siendo los dos inmunosupresores. La expresión de IDO1 en cáncer está bien documentada y ocurre a través de la activación intrínseca de la expresión del gen IDO1 y/o a través la activación del eje IFN- γ -a-IDO1, un resultado de la activación de las células inmunes. Adicionalmente, las células inmunes innatas, tales como las células dendríticas, los monocitos y los macrófagos, que son reclutados en los sitios de inflamación y el microentorno tumoral, son inmunosupresores cuando expresan IDO1. En conjunto, el agotamiento dependiente de IDO1 de triptófano y la producción de quinurenina se han relacionado con la supresión de la activación y proliferación de células T y la función de las células NK. Adicionalmente, el agotamiento del triptófano y la producción de kinurenina son críticos para la formación de células T reguladoras (Treg) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), que funcionan para amortiguar la activación de las células inmunes. Estos mecanismos inmunosupresores dependientes de IDO1 son componentes que permiten a los tumores evadir el sistema inmunitario.

Los inhibidores potenciales de la producción de kinurenina a través de la inhibición de IDO1 ya son conocidos en la literatura. Véanse, por ejemplo, WO2010005958, WO2012142237 y WO2014150646 y Journal of Medicinal Chemistry (2016), 59 (1), 419-430. Ciertos compuestos de 2,3-dihidro-1H-indol son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los números de registro CAS 1359420-19-1, 1358912-57-8, 1358648-68-6, 1357815-05-4, 1359035-89-4 y 1359002-77-9.

Existe la necesidad de nuevos tratamientos contra el cáncer. En particular, existe la necesidad de nuevos tratamientos contra el cáncer para el melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Sigue existiendo la necesidad de proporcionar inhibidores alternativos de la producción de kinurenina útiles en el tratamiento del cáncer. Preferentemente, tales compuestos tienen propiedades que permiten una dosificación óptima requerida para la inhibición máxima del crecimiento de células tumorales mientras que tienen una tolerabilidad aceptable para el paciente. Preferentemente, tales compuestos también estarían biodisponibles por vía oral. Preferentemente, tales compuestos también tendrían la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, tener exposición cerebral. Preferentemente, tales compuestos también tendrían la capacidad de superar potencialmente la resistencia a los inhibidores de kinurenina existentes al tener un mecanismo de acción alternativo.

La presente invención proporciona ciertos compuestos novedosos de 2,3-dihidro-1H-indol que son inhibidores de la producción de kinurenina. La persona experta apreciará que los inhibidores de la producción de kinurenina pueden tener utilidad clínica como agente único o en combinación con otros agentes anticancerígenos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y en particular melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:



en la que:

R1a es hidrógeno, metilo, etenilo, ciano, fluoro, cloro, fluorometilo, o difluorometilo;

R1b es hidrógeno, fluoro, o cloro;

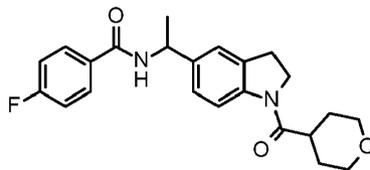
5 R1c es hidrógeno, hidroxilo, fluoro, benciloxi, o hidroxietilamino;

R2 es hidrógeno o metilo;

R2a es hidrógeno o metilo; y

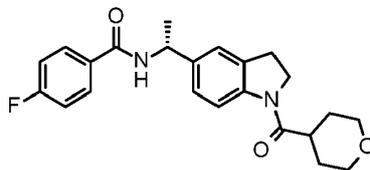
R3a es tetrahidropiranilo.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula:



10

La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula:



La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula:



15 La presente invención también proporciona un compuesto que es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-ilo]etil)benzamida. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida en una forma cristalina. Preferentemente, el
 20 un pico a 17,38° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 12,51°, 15,65°, 16,37°, 17,56°, 21,48° y 25,23° (2θ ± 0,2°).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida.

25 La presente invención proporciona un procedimiento para tratar a una paciente con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto
 30 de la presente invención. Preferentemente el cáncer es melanoma. Preferentemente el cáncer es cáncer colorrectal.

Preferentemente el cáncer es carcinoma de células renales. Preferentemente el cáncer es cáncer de mama. Preferentemente, el cáncer es cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferentemente el cáncer es cáncer de ovario. Preferentemente el cáncer es glioma. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida.

5 Esta invención también proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en terapia. Además, esta invención proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Preferentemente el cáncer es melanoma. Preferentemente el cáncer es cáncer colorrectal. Preferentemente, el cáncer es carcinoma de células renales, preferentemente el cáncer es cáncer de mama. Preferentemente, el cáncer es cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferentemente el cáncer es cáncer de ovario. Preferentemente el cáncer es glioma. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida.

Esta invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de la presente invención y LY3300054 para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de colon. Preferentemente, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferentemente el cáncer es cáncer de colon. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida y el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferentemente, el compuesto es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil)benzamida y el cáncer es cáncer de colon.

25 Los siguientes párrafos describen las clases preferidas de Fórmula I:

- a) R1a es hidrógeno, metilo, ciano, fluoro, o cloro;
- b) R1b es hidrógeno, fluoro, o cloro;
- c) R1c es hidrógeno o hidroxilo;
- d) R2 es hidrógeno o metilo;
- 30 e) R2a es hidrógeno o metilo;
- f) R3a es tetrahidropirano; y
- g) R1a es fluoro, R1b es hidrógeno, R1c es hidrógeno, R2 es hidrógeno, R2a es hidrógeno, y R3 es tetrahidropirano.

35 Ciertos de los compuestos de la presente invención son cristalinos. Es bien sabido en la técnica de cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tales como la morfología y el hábito de los cristales. Cuando están presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades máximas se alteran, pero las posiciones máximas características del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo la Farmacopea de los EE. UU. 38-Formulario nacional 35 Capítulo <941> Caracterización de sólidos cristalinos y parcialmente cristalinos por difracción de rayos X en polvo (XRPD) Oficial 1 de mayo de 2015. Adicionalmente, también es bien conocido en la técnica de la cristalografía que para cualquier cristal dado las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico se pueden desplazar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición pico de $\pm 0,2$ en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer con base en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de 2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustaron con base en los picos estándar NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2θ .

50 Como se usa en el presente documento, "trato", "tratar" o "tratamiento" se refiere a restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero, en particular un humano, que padece una enfermedad, trastorno o afección particular.

Un experto en la técnica apreciará que los compuestos y ciertos intermedios de la invención pueden existir en formas tautoméricas. Cuando se da alguna referencia en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se entiende que abarca tanto las formas tautoméricas como todas sus mezclas.

5 Algunos intermedios o compuestos de la presente invención divulgados en la presente memoria pueden tener uno o más centros quirales o estereogénicos. Se contemplan todos los estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de todos los compuestos o intermedios de la presente invención mencionados anteriormente, incluidos los racematos. Se prefiere que los compuestos o intermedios de la presente invención divulgados en este documento que contienen al menos un centro quiral existan como enantiómeros o diastereómeros individuales. El enantiómero o diastereómero único puede prepararse comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas sintéticas estereoselectivas o estereoespecíficas (como se ilustra en las preparaciones y ejemplos). Alternativamente, el enantiómero o diastereómeros individuales pueden aislarse de mezclas mediante cromatografía quiral estándar (como se ilustra en las preparaciones y ejemplos) o técnicas de cristalización. El experto en la técnica apreciará que, en algunas circunstancias, el orden de elución de los enantiómeros o diastereómeros puede ser diferente debido a las diferentes columnas cromatográficas y fases móviles.

15 La designación de "Isómero 1" en un nombre compuesto representa que el intermedio o compuesto correspondiente de la presente invención es el primero de dos enantiómeros eluyentes cuando una mezcla de un par de enantiómeros se separa por cromatografía quiral. La designación de "Isómero 2" en el nombre de un compuesto representa que el intermedio o compuesto correspondiente de la presente invención es el segundo de dos enantiómeros eluyentes cuando la mezcla de un par de enantiómeros se separa por cromatografía quiral.

20 La designación de "Isómero A" en un nombre de compuesto representa que el intermedio o compuesto correspondiente de la presente invención es un isómero único de una síntesis quiral de configuración absoluta desconocida.

Como se usa en el presente documento, "LY3300054" es un anticuerpo que se une a PD-L1 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en la que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), y en la que la LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3, donde la secuencia de aminoácidos de LCDR1 es SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 5), la secuencia de aminoácidos de LCDR2 es YGNSNRPS (SEQ ID NO: 6), y la secuencia de aminoácidos de LCDR3 es QSYDSSLSGSV (SEQ ID NO: 7), y en la que la HCVR comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3, donde la secuencia de aminoácidos de HCDR1 es KASGGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2), la secuencia de aminoácidos de HCDR2 es GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3), y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 es ARSPDYSPPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

En algunas realizaciones de LY3300054, el LY3300054 se une a PD-L1 humano, y comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en la que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR), en la que la secuencia de aminoácidos de la LCVR es SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácidos de la HCVR es SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones de LY3300054, el LY3300054 se une a la PD-L1 humana, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en la que la secuencia de aminoácidos de la LC es SEQ ID NO: 10 y la HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 11. En unas realizaciones de LY3300054, el LY3300054, comprenden dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en la que cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 11, y cada cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 10.

Como se usa en el presente documento, el término "región variable de la cadena ligera" o "LCVR" significa una porción de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácidos de las CDR y FR.

45 Como se usa en el presente documento, el término "región variable de la cadena pesada" "HCVR" significa una porción de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácidos de las CDR y FR.

Como se usa en el presente documento, los términos "región determinante de complementariedad" y "CDR" significan los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos de LC y HC de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Estas regiones particulares han sido descritas por otros, incluidos Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); MacCallum, et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); y North, et al., J. Mol. Biol., 406, 228-256 (2011), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí.

55 Las CDR están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco ("FR"). Cada LCVR y HCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las tres CDR de la cadena ligera se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3" y las tres CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y el posicionamiento

de los residuos de aminoácidos de CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR está de acuerdo con convenciones conocidas (por ejemplo, Kabat (1991), Chothia (1987) y/o North (2011)). En diferentes realizaciones de la invención, las FR del LY3300054 pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse natural o artificialmente.

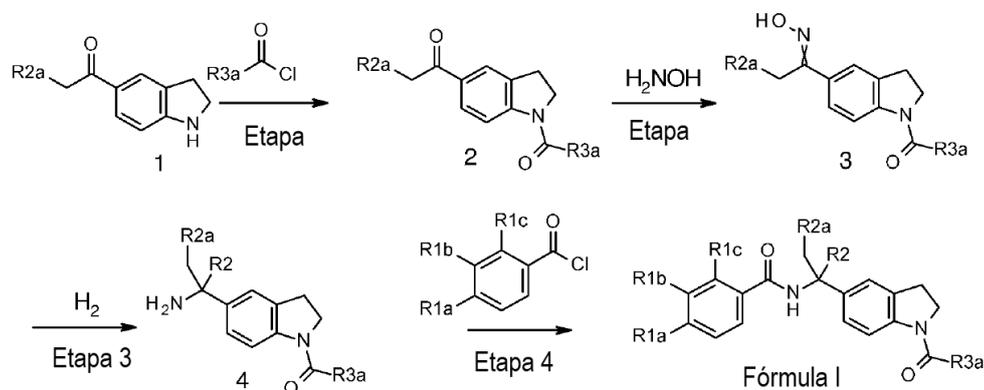
- 5 Como se usa en el presente documento, el término " K_D " significa la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular o fragmento de anticuerpo-antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "se une" significa que la afinidad de un anticuerpo por PD-L1 humano significa, a menos que se indique lo contrario, una K_D de menos de aproximadamente 1×10^{-6} M, preferentemente, menos de aproximadamente 1×10^{-9} M como se determina por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo el uso de un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) a 37 °C esencialmente como se describe en este documento.

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "APCI" se refiere a la ionización química a presión atmosférica; "BTI" se refiere a [bis (trifluoroacetoxi)yodo]benceno; "CDI" se refiere a carbonildiimidazol; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DPBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; "ES" se refiere a ionización por electrodispersión; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "iPrOH" se refiere a isopropanol; "LC/MS-MS" se refiere a espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida; "L-kinurenina-d4" se refiere al ácido (2S)-2-amino-4-(2-amino-3,4,5,6-tetradeuterio-fenil)-4-oxo-butanoico; "MES" se refiere a ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; "MS" se refiere a espectroscopía de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "TEA" se refiere a trietilamina; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; y "UVW" se refiere a la longitud de onda ultravioleta.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con los siguientes Esquemas, preparaciones y ejemplos por procedimientos bien conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estas preparaciones y ejemplos son bien conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de disolventes y correctivos están dentro de la habilidad de la técnica. Del mismo modo, los expertos en la técnica apreciarán que los intermedios sintéticos pueden aislarse y/o purificarse mediante diversas técnicas bien conocidas según sea necesario o deseado, y que con frecuencia, será posible utilizar diversos intermedios directamente en etapas sintéticas posteriores con poca o ninguna purificación. Adicionalmente, el experto en la técnica apreciará que, en algunas circunstancias, el orden en que se introducen las unidades estructurales no es crítico. El orden particular de las etapas requeridas para producir los compuestos de la presente invención depende del compuesto particular que se sintetiza, el compuesto de partida y la responsabilidad relativa de las unidades estructurales sustituidas, como bien aprecia el químico experto. Todos los sustituyentes, a menos que se indique otra cosa, son como se definieron previamente, y todos los reactivos son bien conocidos y apreciados en la técnica.

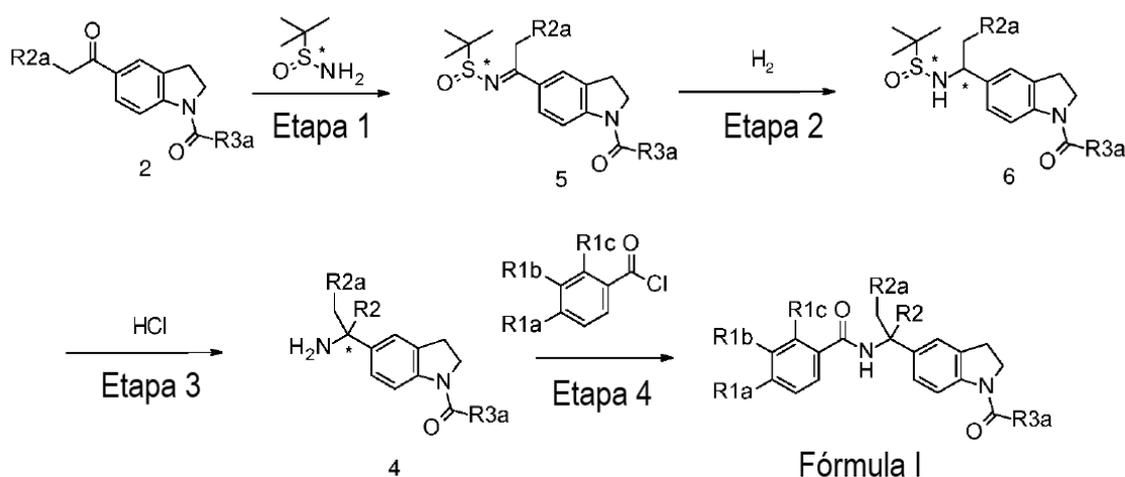
Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse como se ilustra en los siguientes Esquemas, donde R1a, R1b, R1c, R2, R2a y R3a son como se definieron previamente.



Esquema 1: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema 1 ilustra la síntesis general de los compuestos de Fórmula I, R2 es H. En la Etapa 1, un 2,3-dihidro-1H-indol (Compuesto 1) se hace reaccionar con un ácido carboxílico activado apropiado, tal como un cloruro de ácido en presencia de una base adecuada tal como TEA y en un disolvente adecuado tal como DCM o dicloroetano (DCE) a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta reflujo. Un experto en la técnica apreciará que hay muchos ácidos carboxílicos activados y muchos procedimientos para activar los ácidos carboxílicos *in situ* para lograr la reacción de

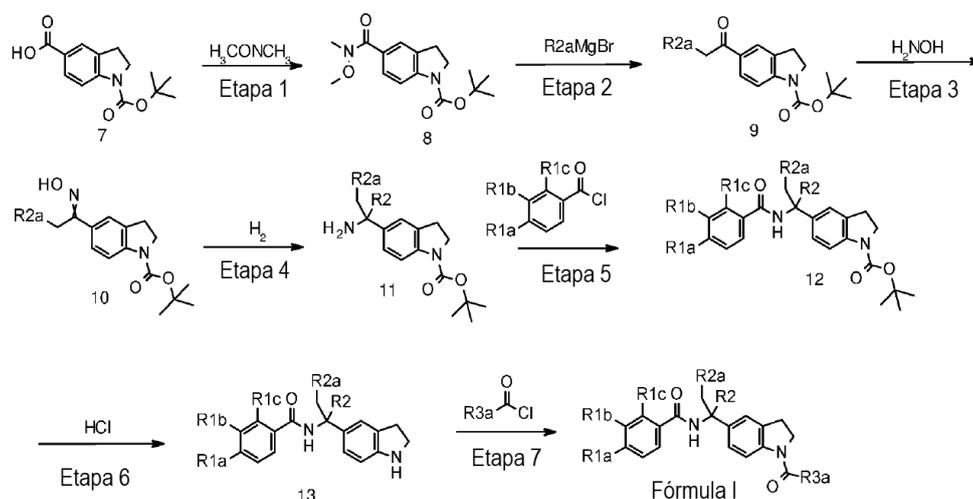
la Etapa 1. La cetona resultante (Compuesto 2) de la Etapa 1 se trata entonces con hidroxilamina en un disolvente prótico polar tal como EtOH a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta reflujo para dar la oxima como una mezcla de isómeros E y Z (Compuesto 3). La Etapa 3 muestra la reducción de la oxima (Compuesto 3) a la amina (Compuesto 4). El experto en la técnica apreciará que hay muchos procedimientos disponibles para afectar esta transformación. Por ejemplo, la oxima (Compuesto 3) se pone en contacto con un catalizador apropiado tal como níquel RANEY® en un disolvente apropiado tal como MeOH o EtOH en un reactor apropiado tal como un agitador PARR®. La mezcla se somete luego a presión de hidrógeno tal como 100-500 kPa a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta 50 °C durante un tiempo apropiado tal como una a 24 horas. El Esquema 1, Etapa 4 representa el acoplamiento de amida de la amina (Compuesto 4) con un ácido carboxílico activado apropiado tal como un cloruro de ácido en presencia de una base adecuada tal como TEA y en un disolvente adecuado tal como DCM o DCE a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta reflujo para dar un compuesto de Fórmula I. Un experto en la técnica apreciará que hay muchos ácidos carboxílicos activados y muchos procedimientos para activar los ácidos carboxílicos *in situ* para lograr la reacción de la Etapa 4. El experto en la técnica apreciará además que el Esquema 1, Etapa 3 y Etapa 4 dan como resultado productos con centros quirales. Los enantiómeros individuales pueden separarse por un experto en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la presente invención mediante procedimientos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y EL Eliel y SH Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).



Esquema 2: Síntesis de compuestos de Fórmula I

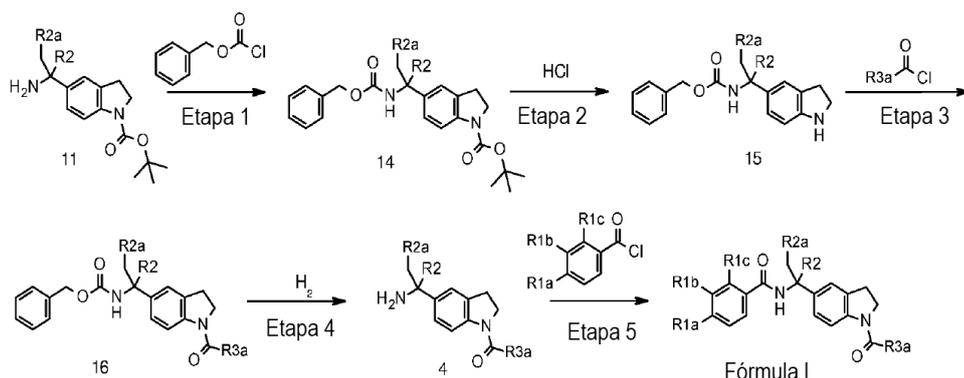
El Esquema 2 ilustra una síntesis general alternativa de compuestos de Fórmula I, R2 es H. En la Etapa 1, la cetona (Compuesto 2) se hace reaccionar con una sulfonamida quiral apropiada en presencia de un ácido de Lewis apropiado tal como etóxido de titanio (IV) en un disolvente apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta reflujo durante un tiempo apropiado tal como una a 24 horas para dar una etilidensulfonamida quiral (Compuesto 5). Un experto en la técnica apreciará que los reactivos están disponibles para generar cualquiera de los enantiómeros de la sulfonamida (Compuesto 5). La reducción quiral se representa en la Etapa 2 para generar una etilsulfonamida (Compuesto 6) a partir de una etilidensulfonamida (Compuesto 5) y se usan asteriscos para indicar centros quirales para mayor claridad. Por ejemplo, se preforma un catalizador apropiado mezclando un reactivo de rutenio apropiado tal como dímero de dicloro (*p*-cimeno)rutenio (II) con un aminoetanol apropiado tal como 2-amino-2-metil-1-propanol en un disolvente apropiado tal como *i*PrOH en presencia de un depurador de agua tal como tamices moleculares de 4Å a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta reflujo durante un tiempo apropiado tal como cinco minutos hasta aproximadamente una hora. La reacción del catalizador preformado se enfría hasta una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta 50 °C y se trata con una etilidensulfonamida (Compuesto 5) y una base apropiada tal como *tert*-butóxido de potasio. La reacción se mantiene a una temperatura adecuada, como la temperatura ambiente hasta 50 °C durante un tiempo apropiado, tal como de una hasta 24 horas. El experto en la técnica apreciará que hay muchos procedimientos catalíticos y estequiométricos que afectarán la misma transformación y que estos procedimientos pueden dar como resultado un enriquecimiento diastereomérico dependiendo de la naturaleza de los sustratos y los reactivos utilizados, hasta e incluyendo la generación de un solo diastereómero. La hidrólisis ácida de una etilsulfonamida (Compuesto 6) puede verse afectada por el tratamiento con un ácido apropiado tal como ácido clorhídrico (HCl) en un disolvente apropiado tal como dioxano, *i*PrOH, EtOAc o MeOH a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta temperatura ambiente durante un tiempo apropiado tal como de una hasta ocho horas para dar una amina (Compuesto 4). El experto en la técnica apreciará que se conocen muchos procedimientos para el aislamiento y estos pueden dar como resultado el aislamiento de la sal o la base libre de la amina (Compuesto 4). La Etapa 4 representa el acoplamiento de amida de

una amina (Compuesto 4) con un ácido carboxílico activado apropiado análogo al Esquema 1, Etapa 4 anterior para dar un compuesto de Fórmula I.



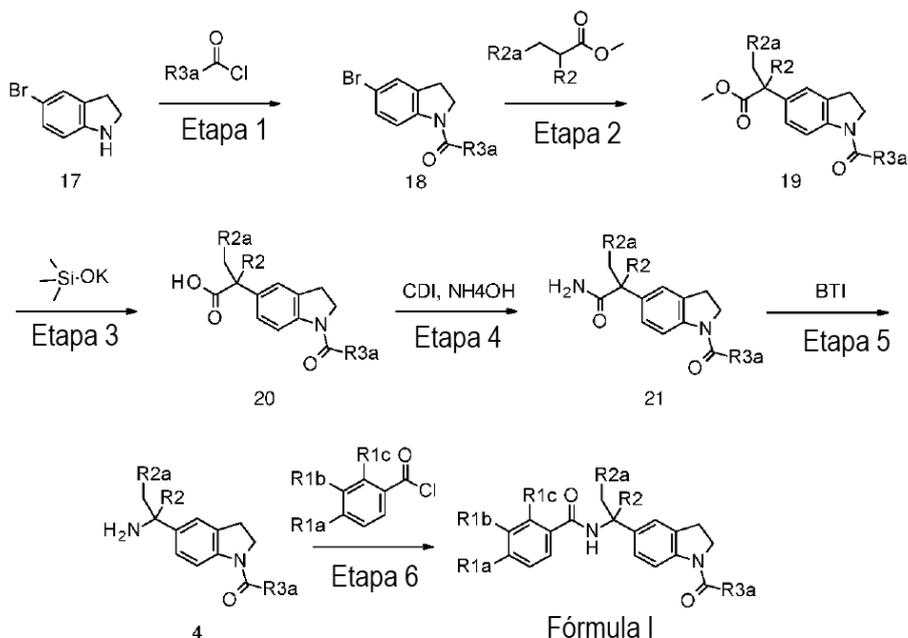
Esquema 3: Síntesis de compuestos de Fórmula I

5 El Esquema 3 representa una síntesis general alternativa de un compuesto de Fórmula I, R2 es H. La Etapa 1
 10 representa un acoplamiento de amida de un ácido carboxílico (Compuesto 7) con clorhidrato de N,O-
 15 dimetilhidroxilamina para dar una amida de Weinreb (Compuesto 8). El experto en la técnica apreciará que hay muchos
 20 procedimientos para afectar esta transformación. Por ejemplo, un ácido carboxílico (Compuesto 7) puede tratarse con
 25 un reactivo de acoplamiento apropiado tal como hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-
 30 triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido (HATU) en presencia de una base apropiada tal como N,N-diisopropiletilamina en un
 disolvente apropiado tal como DMF durante un tiempo apropiado tal como cinco a diez minutos. La mezcla es tratada
 luego con clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina y la mezcla se agita a una temperatura adecuada, como la
 temperatura ambiente, hasta 100 °C durante un tiempo apropiado, tal como de tres a 18 horas. La amida de Weinreb
 resultante (Compuesto 8) se trata luego con un reactivo de Grignard, alquil litio o alquil zinc apropiado, en la Etapa 2,
 para dar una cetona (Compuesto 9). El experto en la técnica apreciará que hay una gran cantidad de procedimientos
 disponibles para efectuar esta transformación. Por ejemplo, la amida de Weinreb (Compuesto 8) en un disolvente
 apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta -78 °C es tratada con un reactivo de metal
 alquilo apropiado tal como bromuro de etilmagnesio. La reacción continúa después de la adición durante un tiempo
 apropiado tal como de una a 18 horas para dar una cetona (Compuesto 9). Las etapas 3, 4 y 5 del Esquema 3 se
 presentan para mayor claridad. Los procedimientos son análogos a los presentados en el Esquema 1, Etapas 2, 3 y
 4, respectivamente. Un experto en la técnica apreciará que el compuesto 11 contiene un centro quiral y que la
 purificación quiral se puede realizar en el compuesto 11 o la mezcla racémica se puede llevar adelante y la separación
 se puede realizar después de cualquiera de las etapas posteriores. La Etapa 6 representa la desprotección del grupo
 protector de tert-butoxicarbonilo de un carbamato (Compuesto 12) para dar una amina (Compuesto 13). Un experto
 en la técnica apreciará que esta transformación puede realizarse bajo condiciones ácidas, básicas o térmicas. Por
 ejemplo, un carbamato (Compuesto 12) se pone en contacto con un ácido apropiado tal como HCl en un disolvente
 apropiado tal como dioxano o DCM o una mezcla de los mismos a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta
 reflujo durante un tiempo apropiado tal como una hasta 18 horas para dar una amina (Compuesto 13). El experto en
 la técnica apreciará que existen procedimientos para aislar una amina como una sal o base libre. La Etapa 7 representa
 el acoplamiento de amida de una amina (Compuesto 13) y un ácido carboxílico activado para dar un compuesto de
 Fórmula I. Las condiciones son análogas a las presentadas en el Esquema 1, Etapa 1.



Esquema 4: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema 4 representa una síntesis general alternativa de un compuesto de Fórmula I. La Etapa 1 representa la protección de una amina (Compuesto 11) con un grupo protector de carbamato de bencilo para dar un carbamato (Compuesto 14). Un experto en la técnica apreciará que hay muchos grupos protectores de amina disponibles que serían grupos protectores ortogonales para el grupo tert-butoxicarbonilo en el compuesto 14. En un procedimiento de ejemplo, una amina (Compuesto 11) en un disolvente apropiado tal como DCM y en la presencia de una base adecuada tal como N,N-diisopropiletilamina se pone en contacto con benciloxicloroformiato a una temperatura adecuada, tal como 0 °C hasta temperatura ambiente, durante un tiempo apropiado, como de 1 a 18 horas. El grupo protector de tert-butoxicarbonilo del Compuesto 14 se desprotege selectivamente para dar una amina (Compuesto 15) utilizando procedimientos análogos a los descritos para el Esquema 3, Etapa 6. La amina resultante (Compuesto 15) se somete luego a una reacción de acoplamiento de amida con un ácido carboxílico activado por procedimientos análogos a los del Esquema 1, Etapa 1 para dar una amida (Compuesto 16). La Etapa 4 representa la desprotección del grupo protector de carbamato de benciloxi del compuesto 16 para dar una amina (Compuesto 4). Un experto en la técnica apreciará que hay una variedad de procedimientos disponibles para afectar esta transformación. Por ejemplo, el compuesto 16 se somete a hidrogenación catalítica con un catalizador apropiado tal como hidróxido de paladio en un disolvente apropiado tal como EtOH bajo una presión de hidrógeno apropiada tal como 100 a 500 kPa durante un tiempo apropiado tal como una hasta ocho horas para dar la amina (Compuesto 4). Finalmente, la conversión de la amina (Compuesto 4) en un compuesto de Fórmula I es como se describe en el Esquema 1, Etapa 4.



Esquema 5: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema 5 representa una síntesis general alternativa de un compuesto de Fórmula I. La Etapa 1 representa el acoplamiento de amida de una amina (Compuesto 17) y un ácido carboxílico activado para dar una amida (Compuesto

18). Las condiciones son análogas a las presentadas en el Esquema 1, Etapa 1. La Etapa 2 representa la formación de alfa aril éster (Compuesto 19) a través del acoplamiento catalítico cruzado de un bromuro (Compuesto 18) con un éster enolato. El experto en la técnica apreciará el amplio intervalo de condiciones que pueden afectar esta transformación. Por ejemplo, una solución de una dialquilamina apropiada tal como dicitohexilamina en un disolvente apropiado tal como tolueno se trata con una base de litio apropiada tal como n-butil-litio a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta -78 °C durante un tiempo apropiado tal como 10 minutos hasta una hora. Esta solución se trata con una solución de un éster apropiado tal como 2-metilpropanoato de metilo en un disolvente apropiado tal como tolueno y la mezcla resultante se agita durante un tiempo apropiado tal como 10 minutos hasta una hora a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta -40 °C. La mezcla resultante se trata luego con un catalizador de paladio apropiado tal como di- μ -bromobis (tri-t-butilfosfina)dipaladio (I) y la mezcla se agita a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta temperatura ambiente durante un tiempo apropiado, tal como de una hasta 18 horas para dar un alfa aril éster (Compuesto 19). Un éster (Compuesto 19) puede ser hidrolizado a un ácido (Compuesto 20) por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un éster (Compuesto 19) se pone en contacto con una base adecuada tal como trimetilsilanolato de potasio en un disolvente apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta reflujo durante un tiempo apropiado tal como uno hasta siete días. La Etapa 4 representa el acoplamiento de amida de un ácido carboxílico (Compuesto 20) con amoníaco para dar una carboxamida (Compuesto 21). El experto en la técnica apreciará los muchos procedimientos disponibles para activar un ácido carboxílico, así como para introducir fuentes de amoníaco. Por ejemplo, un ácido carboxílico (Compuesto 20) se pone en contacto con 1,1'-carbonildiimidazol en un disolvente apropiado tal como DCM o DMF o una mezcla de los mismos a una temperatura apropiada tal como 0 °C hasta reflujo durante un tiempo apropiado tal como 30 minutos hasta ocho horas. Se agrega hidróxido de amonio a la mezcla y la reacción continúa durante un tiempo adicional tal como de una hasta 18 horas. La Etapa 21 representa la reorganización de Hoffman de una carboxamida (Compuesto 21) a una amina (Compuesto 4). El experto en la técnica apreciará la amplia variedad de reactivos y condiciones que pueden afectar esta transformación. Por ejemplo, una solución de una carboxamida (Compuesto 21) en un disolvente apropiado, tal como una mezcla de ACN y agua, se trata con [bis(trifluoroacetoxi)yodo]benceno a la temperatura adecuada, tal como temperatura ambiente hasta reflujo durante un tiempo apropiado, tal como de una hasta 18 horas. Finalmente, la conversión de la amina (Compuesto 4) en un compuesto de Fórmula I se describe en el Esquema 1, Etapa 4.

Preparación 1

Síntesis de 1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etanona

Agregar TEA (51,9 ml, 372,2 mmol) y cloruro de tetrahidropiran-4-carbonilo (22,1 g, 148,9 mmol) a una mezcla de 1-indolin-5-iletanona (20,0 g, 124,1 mmol) en DCM (496 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante dos horas. Diluir la mezcla de reacción con DCM (500 ml) y lavar con bicarbonato de sodio acuoso saturado. Aislar la capa orgánica y extraer la capa acuosa dos veces con DCM (500 ml). Lavar las capas orgánicas combinadas con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado para dar el compuesto del título cuantitativamente como un sólido de color amarillo claro. ES/MS (m/z): 274,0 (M+H).

Procedimiento de aislamiento alternativo:

Tratar el producto con heptano y concentrar. Repetir el tratamiento y la concentración por segunda vez. Tratar con heptano y enfriar hasta 0-5 °C. Recolectar el producto por filtración y enjuagar con heptano y secar para obtener el compuesto del título.

Preparación 2

Síntesis de [5-(N-hidroxietanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona

Agregar hidroxilamina (50 % en masa en agua, 22,8 ml, 372 mmol) a una mezcla de 1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etanona (Preparación 1) (33,9 g, 124,0 mmol) en EtOH (1240 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante tres días. Concentrar la mezcla de reacción para dar el compuesto del título como una mezcla de isómeros E/Z cuantitativamente. ES/MS (m/z): 289,0 (M+H).

Preparación 3

Síntesis de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona racémica

Agregar níquel RANEY® (suspensión en EtOH, 60 g) a una botella agitadora PARR® de 2250 ml y purgar con nitrógeno. Agregar amoníaco 2 M en MeOH (700 ml) y luego una solución de [5-(N-hidroxietanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona (Preparación 2) (35,8 g, 124,0 mmol) en amoníaco 2 M en MeOH (700 ml). Enfriar la mezcla potencialmente exotérmica hasta temperatura ambiente si es necesario, sellar, purgar con nitrógeno y luego hidrógeno. Agitar bajo hidrógeno (60 psi, o 414 kPa) durante cuatro horas a temperatura ambiente. Filtrar los sólidos y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con 7-26 % (amoníaco 7 M en MeOH) en EtOAc para dar el compuesto del título (26,5 g, 78 %) como un sólido blanquecino. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H).

Preparación 4A y BSeparación de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1 y [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 2

5 Purificar [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona racémica (Preparación 3) mediante SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). ES/MS (m/z): 275,0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, columna de 50 x 150 cm; Fase móvil: 40 % de EtOH (que contiene 0,5 % de N,N-dimetiletilamina) en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 300 g/minuto; UVW: 260 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 1,35 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: EtOH al 40 % (que contiene 0,5 % de N,N-dimetiletilamina) en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 260 nm) o por HPLC analítica quiral (97,4 % ee, Rt: 6,48 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100 % EtOH (que contiene 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm).

15 La purificación anterior también produce el segundo enantiómero eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 275,1 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítico quiral (97,2 % ee, Rt: 1,85 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: EtOH al 40 % (que contiene 0,5 % de N,N-dimetiletilamina) en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 260 nm) o por HPLC analítica quiral (97,6 % ee, Rt: 5,31 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100 % EtOH (que contiene 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm).

Preparación 520 Síntesis de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etilidenelpropano-2-sulfinamida

25 Agregar etóxido de titanio (IV) (5,0 g, 21,9 mmol) a una mezcla de 1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etanona (Preparación 1) (3,0 g, 11,0 mmol) y (R)-2-metilpropano-2-sulfinamida (1,6 g, 13,2 mmol) en THF (43,9 ml). Someter a reflujo la mezcla resultante durante 24 horas. Enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Diluir la mezcla con EtOAc (100 ml) y cloruro de sodio acuoso saturado (40 ml) y agitar vigorosamente durante 15 minutos. Aislar la capa orgánica y extraer la capa acuosa dos veces con EtOAc (100 ml). Lavar las capas orgánicas combinadas con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con 10-100 % de ACN en DCM para dar el compuesto del título (3,7 g, 87 %) como un sólido de color amarillo claro. ES/MS (m/z): 377,0 (M+H).

30 **Procedimiento de aislamiento alternativo:**

En lugar de enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, enfriar la mezcla de reacción hasta 10 °C y luego filtrar. Enjuagar el sólido con tolueno y secar para dar el compuesto del título.

Preparación 635 Síntesis de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}propano-2-sulfinamida, Isómero A

40 Calentar una mezcla de dímero de dicloro(p-cimeno)rutenio (II) (0,021 g, 0,033 mmol), 2-amino-2-metil-1-propanol (0,006 g, 0,066 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0,5 g) en iPrOH (2 ml) hasta reflujo y luego enfriar hasta 50 °C. Agregar una solución de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etiliden}propano-2-sulfinamida (Preparación 5) (0,5 g, 1,33 mmol) en iPrOH (8,8 ml) y una solución de tert-butóxido de potasio (0,019 g, 0,17 mmol) en iPrOH (1,6 ml). Calentar la mezcla resultante a 55 °C durante dos horas. Luego calentar una mezcla adicional de dímero de dicloro (p-cimeno) rutenio (II) (0,021 g, 0,033 mmol), 2-amino-2-metil-1-propanol (0,06 g, 0,66 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0,5 g) en iPrOH (2 ml) hasta reflujo, enfriar hasta 50 °C y agregar a la mezcla de reacción anterior. Agregar una solución de tert-butóxido de potasio (0,019 g, 0,17 mmol) en iPrOH (1,6 ml) a la mezcla de reacción anterior. Calentar la mezcla a 55 °C durante 20 minutos. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y agitar durante la noche. Diluir la reacción con DCM (20 ml) y filtrar a través de una almohadilla de tierra de diatomeas. Lavar la almohadilla con MeOH al 5 % en DCM y concentrar el filtrado para dar el compuesto del título cuantitativamente. ES/MS (m/z): 379,0 (M+H).

45 **Procedimiento de aislamiento alternativo:**

50 En lugar de enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, enfriar la mezcla de reacción hasta 28-32 °C y luego filtrar a través de tierra de diatomeas. Enjuagar el sólido filtrante con diclorometano y concentrar para dar el compuesto del título.

Preparación 7A y 7BSíntesis de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1

5 Añadir ácido clorhídrico (4 M en 1,4-dioxano, 1,66 ml, 6,64 mmol) a una mezcla de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonilo)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil} propano-2-sulfinamida, Isómero A (Preparación 6) (503 mg, 1,33 mmol) en MeOH (6,6 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una hora. Concentrar y purificar el residuo mediante cromatografía en fase reversa (Redisep Rf Gold High Performance C18 Columna en Fase Reversa, 0-100 % ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM). Concentrar para dar el compuesto del título (265 mg, 73 %). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico mediante HPLC analítica quiral (98,8 % ee, Rt: 6,40 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100 % EtOH (que contenía 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm). Confirmado como preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H).

Síntesis de clorhidrato de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1

- 10 Añadir ácido clorhídrico (5,5 M en iPrOH, 400 ml, 2,20 mol) a una suspensión de 5 °C de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonilo)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil} propano-2-sulfinamida, isómero A (162,3 g, 364 mmol) en EtOAc (1,2 l) gota a gota con agitación mecánica superior. Retirar el baño de enfriamiento después de la adición de 100 ml de la solución ácida. Continuar la adición y agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante tres horas. Enfriar hasta 3 °C y filtrar. Enjuagar la torta del filtro con 1-1,5 l de EtOAc, hasta que los lavados estén limpios. Secar los sólidos recolectados en un horno de vacío doméstico a 60 °C para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino (96,4 g, 82,5 %). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico por HPLC analítica quiral (98 % ee, Rt: 6,45 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100 % EtOH (que contiene 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm). Confirmado como preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H). Confirmado como preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275,1 (M+H).
- 15
- 20 Preparar los siguientes compuestos esencialmente análogos a la Preparación 1.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
8	[5-Bromo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona	ES/MS (m/z, ⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br): 310,0/312,0 (M+H)
9	{1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}carbamato de bencilo, Isómero A	ES/MS (m/z): 423,2 (M+H)

Preparación 10

Síntesis de 5-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo

- 25 Tratar una solución a 100 °C de 1-indolin-5-iletanona (1,00 g, 6,02 mmol) en tolueno (12 ml) con una solución de dicarbonato de di-tert-butilo (1,97 g, 9,03 mmol) en tolueno (12 ml) gota a gota durante 20 minutos. Continuar calentando la mezcla durante 30 minutos. Concentrar la mezcla de reacción. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con 15-35 % (1:1 EtOAc: DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (1,52 g, 97 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 262,0 (M+H).

Preparación 11

- 30 Síntesis de 5-[metoxi(metil)carbamoil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo

- 35 Tratar una solución de ácido 1-(tert-butoxicarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico (14,0 g, 53,2 mmol) en DMF (200 ml) y N,N-diisopropiltilamina (28,0 ml, 161 mmol) con hexafluorofosfato de 1-[bis (dimetilamino) metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido (23,3 g, 61,1 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante cinco minutos. Añadir clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (7,26 g, 74,4 mmol). Agitar la mezcla resultante durante la noche a temperatura ambiente. Diluir la mezcla de reacción con EtOAc y lavar con bicarbonato de sodio acuoso saturado. Aislar la capa orgánica y extraer la capa acuosa dos veces con EtOAc. Lavar las capas orgánicas combinadas dos veces con agua, agregando cloruro de sodio acuoso saturado para ayudar a la separación de fases. Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con acetona al 10-32 % en hexanos para dar el compuesto del título como un aceite transparente, incoloro y espeso con rendimiento cuantitativo. ES/MS (m/z): 307,0 (M+H).
- 40

Preparación 12

Síntesis de 5-propanoil-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo

- 45 Enfriar una solución de 5-[metoxi (metil) carbamoil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo (Preparación 11) (14,3 g, 46,7 mmol) en THF (311 ml, anhidro) hasta 0 °C. Añadir bromuro de etilmagnesio (3 M en éter dietílico, 39,0 ml, 117 mmol) gota a gota durante 25 minutos. Después de agitar a 0 °C durante 1,5 horas, inactivar cuidadosamente

la mezcla de reacción con solución acuosa saturada de cloruro de amonio. Extraer tres veces con EtOAc. Secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con 15-30 % (1:1 EtOAc: DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (11,7 g, 91 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 276,0 (M + 1).

- 5 Preparar los siguientes compuestos esencialmente análogos a la Preparación 2, excepto la Preparación 14, en la que el calentamiento a 70 °C aumenta la tasa de reacción.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
13	5-(N-hidroxietanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo	ES/MS (m/z): 277,0 (M+H)
14	5-(N-hidroxiopropanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo	ES/MS (m/z): 291,0 (M+H)

Preparar los siguientes compuestos esencialmente análogos a la Preparación 3.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
15	5-[1-aminoetil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico	ES/MS (m/z): 246,0 (M-NH ₂) ⁺
16	5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico	ES/MS (m/z): 260,1 (M-NH ₂) ⁺

10 Preparación 17A y B

Separación de 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo, Isómero 1 y 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo, Isómero 2 (para separación quiral)

- 15 Purificar 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico (Preparación 16) por cromatografía quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). MS (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD, columna 8 x 33,5 cm; Fase móvil: 100 % MeOH (que contiene 0,2 % de N,N-dimetiletetilamina); Caudal: 400 ml/minuto; UVW: 240 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por HPLC analítica quiral (> 99 % ee, Rt: 9,2 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 100 % MeOH (que contiene 0,2 % de N,N-dimetiletetilamina); Caudal: 0,6 ml/minuto; UVW: 280 nm).

- 20 La purificación anterior también produce el segundo enantiómero eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por HPLC analítica quiral (99 % ee, Rt: 14,7 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 100 % MeOH (que contiene 0,2 % de N,N-dimetiletetilamina); Caudal: 0,6 ml/minuto; UVW: 280 nm).

Preparación 18

Síntesis de 5-{1-[(4-fluorobenzoi)amino]etil}-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico

- 25 Tratar una solución de 5-[1-aminoetil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico (Preparación 15) (3,00 g, 11,4 mmol) en DCM (57 ml) con N,N-diisopropiletetilamina (4,0 ml, 57,2 mmol). Añadir cloruro de 4-fluorobenzoi (1,52 ml, 12,6 mmol) y agitar durante la noche. Inactivar la mezcla de reacción con agua y agregar una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Separar las capas y extraer dos veces con DCM. Secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con 50-75 % (acetona al 10 % en DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (4,29 g, 98 %) como un sólido de color amarillo pálido. ES/MS (m/z): 407,0 (M+Na)⁺, 383,0 (M-H).

Preparar el siguiente compuesto esencialmente análogo a la Preparación 18.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
19	5-{1-[(4-fluorobenzil)amino]propil}-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico	ES/MS (m/z): 421,0 (M+Na) ⁺ , 397,2 (M-H) ⁻

Preparación 20

Síntesis de 5-[1-1{[(benciloxi)carbonil] amino}propil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo, Isómero A

5 Tratar una solución de 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo, isómero 2 (Preparación 17B) (3,25 g, 11,8 mmol) en DCM (47,0 ml) a temperatura ambiente con N,N-diisopropiletilamina (4,53 ml, 25,9 mmol). Añadir cloroformiato de bencilo (2,12 ml, 14,1 mmol) y agitar durante la noche. Tratar la mezcla de reacción con N,N-diisopropiletilamina adicional (2,06 ml, 11,8 mmol) y cloroformiato de bencilo (0,707 ml, 4,70 mmol). Agitar durante 30 minutos. Inactivar la mezcla de reacción con agua y agregar una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Separar las capas y extraer la capa acuosa dos veces con DCM. Secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de acetona al 5-35 % en hexanos para dar el compuesto del título (4,47 g, 93 %) como una espuma blanca. ES/MS (m/z): 433,2 ((M+Na)⁺, 409,0 (M-H)⁻.

Preparación 21

Síntesis de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida racémica

15 Añadir ácido clorhídrico 4 M en 1,4-dioxano (27,9 ml, 112 mmol) a una mezcla de 5-{1-[(4-fluorobenzil) amino]etil}-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo racémico (Preparación 18) (4,29 g, 11,2 mmol) en DCM (112 ml). Calentar la mezcla resultante a 40 °C durante seis horas. Neutralizar con una solución acuosa 2N de NaOH. Agregar 4:1 CHCl₃:IPA para disolver los sólidos gomosos y separar las capas. Lavar la capa orgánica con salmuera, secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de 30-60 % (25 % de acetona en DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (2,48 g, 78 %) como una espuma ligeramente blanquecina. ES/MS (m/z): 285,0 (M+H).

Preparar los siguientes compuestos esencialmente análogos a la Preparación 21.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
22	N-[1-(2,3-Dihidro-1H-indol-5-il)propil]-4-fluorobenzamida racémica	ES/MS (m/z): 299,0 (M+H)
23	[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)propil]carbamato de bencilo, Isómero A	ES/MS (m/z): 311,2 (M+H)

Preparación 24A y B

25 Separación de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida, Isómero 1 y N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida, Isómero 2 (para separación quiral)

30 Purificar la N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida racémica (Preparación 21) mediante SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). ES/MS (m/z): 285,0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AS-H, columna de 5 x 15 cm; Fase móvil: 15 % de iPrOH en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 300 g/minuto; UVW: 250 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 1,47 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 25 % de iPrOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 300 nm).

35 La purificación anterior también produjo el segundo enantiómero eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 285,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (98,5 % ee, Rt: 2,08 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 25 % iPrOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW 300 nm).

Preparación 25

Síntesis de {5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-il}(tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero A

Añadir una solución de {1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}carbamato de bencilo, Isómero A (Preparación 9) (2,12 g, 5,02 mmol) en EtOH (35 ml) a una suspensión purgada con nitrógeno de hidróxido de paladio al 20 % sobre carbono (2,12 g) en EtOH (35 ml) en una botella agitadora PARR®. Sellar, purgar con nitrógeno y luego hidrógeno. Agitar bajo una atmósfera de hidrógeno a 414 kPa (60 psi) durante 3,6 horas a temperatura ambiente. Filtrar la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas y concentrar el filtrado para dar el compuesto del título (1,36 g, 94 %) como un sólido blanco grisáceo. ES/MS (m/z): 289,2 (M+H), 272,0 (M-NH2) +.

Preparación 26

Síntesis de metil 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanoato

Añadir n-butil-litio (3,6 ml, 8,9 mmol, 2,2 M en hexanos) a una solución agitada a 0 °C de dicitohexilamina (1,9 ml, 9,6 mmol) en tolueno (25 ml) bajo nitrógeno y agitar durante 20 minutos. Añadir una solución de isobutirato de metilo (0,83 g, 8,2 mmol) en tolueno (5 ml) gota a gota a la mezcla preparada previamente y agitar durante 30 minutos a 0 °C. Añadir [5-bromo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il) metanona (Preparación 8) (2,3 g, 7,4 mmol) y desgasificar la mezcla resultante con nitrógeno. Agregar di- μ -bromobis (tri-t-butilfosfina) dipaladio (I) (50 mg, 0,06 mmol) y permitir que la mezcla resultante se caliente hasta temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de dos horas, agregar una segunda porción de di- μ -bromobis (tri-t-butilfosfina) dipaladio (I) (50 mg, 0,06 mmol) y agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Diluir con EtOAc y solución acuosa de HCl 1N y agitar durante 10 minutos. Filtrar y enjuagar los sólidos con EtOAc. Separar las capas de filtrado y lavar la capa orgánica con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera. Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel con EtOAc al 20-60 % en hexanos para dar el compuesto del título (2,3 g, 94 % de rendimiento, 89 % de pureza) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 332,2 (M+H).

Preparación 27

Síntesis de ácido 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] propanoico

Disolver 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanoato de metilo (Preparación 26) (2,2 g, 6,6 mmol) en THF (66 ml) y agregar trimetilsilanolato de potasio (1,1 g, 8,6 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante cuatro días. Filtrar los sólidos y lavar con THF. Disolver los sólidos en agua y acidificar con solución acuosa de HCl 5N. Dejar enfriar en el refrigerador durante 30 minutos. Filtrar para recoger el compuesto del título (1,20 g, 57 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 318,0 (M+H).

Preparación 28

Síntesis de 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] propanamida

Agregar 1,1'-carbonildiimidazol (126 mg, 0,763 mmol) a una solución agitada de ácido 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanoico (Preparación 27) (202 mg, 0,636 mmol) en DCM (6,4 ml) y agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 45 minutos. Añadir hidróxido de amonio (1 ml, 9,55 mmol, 25 % p/v en agua) y agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 90 minutos. Agregar DMF (3 ml) para ayudar a la solubilidad y continuar agitando a temperatura ambiente durante dos horas. Concentrar y purificar por cromatografía en columna de sílica gel con EtOH al 0-10 % en DCM para obtener el compuesto del título (180 mg, 89 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 317,0 (M+H).

Preparación 29

Síntesis de [5-(1-amino-1-metiletil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il] (tetrahidropiran-4-il)metanona

Añadir [bis(trifluoroacetoxi)yo]benceno (115 mg, 0,26 mmol) a una mezcla agitada de 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanamida (Preparación 28) (81 mg, 0,26 mmol) en ACN (0,25 ml) y agua (0,25 ml) y agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Concentrar para obtener el compuesto del título (140 mg, 94 %, material puro al 50 %) como un sólido rosa claro. ES/MS (m/z): 289,2 (M+H), 272,0 (M-NH2)*.

Preparación 30

Síntesis de metil 4-fluoro-2-[(2-hidroxietil)amino] benzoato

Calentar una mezcla de 2-amino-4-fluorobenzoato de metilo (2,81 g, 15,9 mmol) y 2-yodoetanol (0,879 ml, 11,2 mmol) hasta 90 °C durante seis horas y luego enfriar hasta temperatura ambiente. Disolver la mezcla pura en EtOAc, lavar tres veces con solución acuosa de NaOH 1N, seguido de salmuera. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado para obtener 2,94 g de aceite color marrón claro. Agregar 2-yodoetanol (1,26 ml, 15,9 mmol) y calentar la mezcla a 100 °C durante la noche. Agregar 2-yodoetanol adicional (0,314 ml, 3,99 mmol) y continuar calentando a 100 °C durante dos horas. Enfriar hasta temperatura ambiente. Disolver la mezcla pura en EtOAc, lavar tres veces con solución acuosa de NaOH 1N, seguido de salmuera. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado para obtener 2,50 g de sólidos de color marrón. Purificar por

cromatografía en columna de sílica gel con EtOAc al 20-40 % en hexanos para dar el compuesto del título (1,12 g, 33 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 214,0 (M+H).

Preparación 31

Síntesis de ácido 4-fluoro-2-[(2-hidroxietil)amino] benzoico

- 5 Agregar hidróxido de sodio (0,49 ml, 2,4 mmol, 5M en agua) a una solución agitada de 4-fluoro-2-[(2-hidroxietil) amino]benzoato de metilo (Preparación 30) (104 mg, 0,488 mmol) en 1,4 -dioxano (2,4 ml). Agitar tapado a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego calentar hasta 70 °C durante dos horas. Concentrar y acidificar a pH aproximadamente 1-2 con HCl IN acuoso, extraer dos veces con DCM. Secar la capa orgánica combinada sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado para obtener el compuesto del título (89 mg, 92 %) como sólidos de color bronce. ES/MS (m/z): 200,0 (M+H).

Preparación de referencia 1

Síntesis de 1-(2,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidro-1H-indol-5-ilmetil)urea

- 15 Agitar una mezcla de 5-(aminometil) indolina-1-carboxilato de tert-butilo (4,1 g, 17 mmol) y 2,4-difluoro-1-isocianatobenceno (3 ml, 24 mmol) en DCM (100 ml) durante una hora. Detener la reacción con MeOH y agua y concentrar. Disolver el residuo en DCM (30 ml) y agregar TFA (15 ml) y dejar reposar a temperatura ambiente durante dos horas. Concentrar y agregar bicarbonato de sodio acuoso saturado. Extraer la mezcla con MeOH/DCM (1/5, v/v). Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Recristalizar en EtOH para dar dos cultivos. Combinar los cultivos para dar el compuesto del título (3,5 g, 68 %). ES/MS (m/z): 304,0 (M+H).

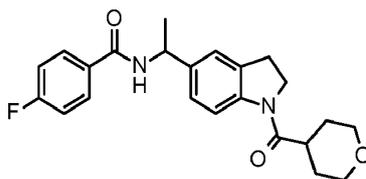
Preparación de referencia 2

20 Síntesis de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tribromobenzoil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] metil]urea

- 25 Desgasificar (N₂) una solución de 1-(2,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidro-1H-indol-5-ilmetil)urea (Preparación de referencia 1) (70 mg, 0,23 mmol), ácido 3,4,5-tribromobenzoico (170 mg, 0,24 mmol) y hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis (dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]piridinio (134 mg, 0,35 mmol) en DMF (2 ml). Agregar TEA (0,08 ml, 0,6 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante una hora. Purificar directamente la mezcla de reacción mediante purificación en fase reversa (Columna: Redisep Rf Gold High Performance C18 Columna en fase reversa; eluyente: A: bicarbonato de amonio 10 mM en agua con MeOH al 5 % (pH 10), B: ACN; gradiente: 40 % de B durante 5 minutos, luego 40-95 % de B durante 15 minutos; flujo 60 ml/minuto, UVW 219/254 nM) y aislar el producto por liofilización para dar el compuesto del título (149 mg, 54 %). ES/MS (m/z, 79Br/81Br): 644,0/646,0 (M+H).

Ejemplo 1

30 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil]benzamida racémica



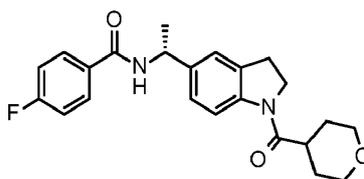
- 35 Combinar [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona racémica (Preparación 3) (420 mg, 1,53 mmol) y ácido 4-fluorobenzoico (257 mg, 1,84 mmol) en DCM (15 ml). A la solución de agitación, agregar N,N-diisopropiletilamina (534 µl, 3,06 mmol) y hexafluorofosfato de 1-[bis (dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]piridinio-3-óxido (890 mg, 2,30 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas. Evaporar el disolvente y purificar por cromatografía en columna en fase reversa (columna en fase reversa C18 Redisep Rf Gold High Performance, 25-100 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM) para dar el compuesto del título (372 mg, 61 %). ES/MS (m/z): 397,2 (M+H). ¹H RMN (d6-DMSO) δ 8,73 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,98 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J = 8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J = 8 Hz, 1H), 4,14 (t, J = 8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J = 7 Hz, 3H).

Ejemplo 1A

4-Fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil]benzamida

Procedimiento sintético 1:

45



Purificar 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica (Ejemplo 1) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente como el compuesto del título. ES/MS (m/z): 397,0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40 % de MeOH en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 1,72 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,98 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J = 8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J = 8 Hz, 1H), 4,14 (t, J = 8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J = 7 Hz, 3H).

Procedimiento sintético 2:

Agregar TEA (9,8 ml, 70,3 mmol) y luego cloruro de 4-fluorobenzilo (5,85 g, 36,9 mmol) a una solución de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahydro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1 (Preparación 4A) (9,65 g, 35,2 mmol) en DCM (176 ml) a 0 °C. Permitir que la mezcla resultante se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante la noche. Diluir la mezcla de reacción con EtOAc (300 ml), filtrar a través de una almohadilla de sílica gel y lavar con EtOAc. Concentrar el filtrado y purificar por cromatografía en columna de sílica gel con un gradiente de 25-30 % de ACN en DCM para dar el compuesto del título (9,4 g, 67,1 %) como un sólido blanquecino. MS (m/z): 397,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 1,74 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: MeOH al 40 % en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,98 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J = 8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J = 8 Hz, 1H), 4,14 (t, J = 8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J = 7 Hz, 3H).

Procedimiento sintético 3:

Añadir TEA (65 ml, 468 mmol) a una mezcla de clorhidrato [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahydro-2H-piran-4-il)de metanona, Isómero 1 (Preparación 7B) (70 g, 225 mmol) en DCM (700 ml) a 0-5 °C. Añadir cloruro de 4-fluorobenzilo (37,85 g, 239 mmol) gota a gota. Calentar la mezcla hasta temperatura ambiente y agitar durante dos horas. Agregar agua gota a gota a una tasa para mantener la temperatura por debajo de 30 °C y agitar la mezcla a 20-30 °C durante una hora. Separar las capas y lavar la capa orgánica con H₂SO₄ acuoso al 18 %. Separar las capas y lavar la capa orgánica con NaHCO₃ acuoso al 7 %. Separar las capas y lavar la capa orgánica con agua. Separar las capas y luego pasar la solución orgánica a través de un filtro de carbón. Tratar la solución con Si-Tiol (7 g) y calentar la mezcla hasta 40 °C. Agitar la mezcla resultante durante 12 horas. Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas. Concentrar la capa orgánica a 200 ml (~3 vols). Agregar acetona (140 ml, 2 vols) y concentre la mezcla resultante a 200 ml (~3 vols). Tratar con acetona adicional (280 ml, 4 vols) y agua (280 ml, 4 vols). Calentar a 65 °C durante dos horas hasta que la reacción sea una solución transparente. Enfriar lentamente hasta 30 °C durante tres horas. Agitar a 30 °C durante una hora. Agregar agua (140 ml, 2 vols) gota a gota y continuar agitando a 30 °C durante una hora. Enfriar lentamente a 3-8 °C durante aproximadamente dos horas. Agitar a esta temperatura durante seis horas. Filtrar y enjuagar los sólidos con agua (140 ml, 2 vols). Secar los sólidos a 55 °C durante cuatro a seis horas. Obtener el producto deseado como un sólido blanco (55 g, 61,6 %).

Procedimiento de recolección de difracción de rayos X en polvo para el ejemplo 1A

Los patrones de XRD de sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractómetro de rayos X en polvo Bruker D4 Endeavour, equipado con una fuente de CuKα (λ = 1,54060 Å) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se escaneó entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,0087° en 2θ y una tasa de barrido de 0,5 segundos/etapa, y con divergencia de 0,6 mm, anti-dispersión fija de 5,28 mm y rendijas de detector de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Se recolectaron los patrones de difracción de la forma del cristal a temperatura ambiente y humedad relativa.

Procedimiento de recolección de difracción de rayos X en polvo para el procedimiento 3 1A

Una muestra preparada del Ejemplo 1A (Procedimiento sintético 3) se caracterizó por un patrón de XRD que usa radiación CuKα por tener picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, el patrón contenía un pico a 17,38° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consistía en 12,51°, 15,65°, 16,37°, 17,56°, 21,48° y 25,23° con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados (2θ ± 0,2°).

Tabla 1. Picos de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 1A, procedimiento 3

Pico	Ángulo (2-Theta°)	Intensidad (%)
1	9,99	13
2	12,51	73
3	15,65	90
4	16,37	57
5	17,38	100
6	17,56	62
7	18,79	25
8	19,81	38
9	21,48	56
10	23,38	43
11	24,41	21
12	24,70	17
13	25,23	64
14	25,46	28
15	27,69	15

Determinación de la configuración absoluta para el Ejemplo 1A

Preparar un cristal individual de 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-yl-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamide suspendiendo 10 mg de 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-yl-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamide en EtOH/heptano 1:1 (1,75 ml) y suspender en un agitador orbital durante tres días. Usar un espécimen incoloro con forma de cuchilla de 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-yl-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamide, dimensiones aproximadas 0,020 mm x 0,080 mm x 0,300 mm, para el análisis cristalográfico de rayos X. Medir los datos de intensidad de rayos X utilizando una fuente de radiación $^6\mu\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) y un difractómetro goniómetro de 3 círculos basado en Bruker D8 Venture equipado con un detector de área Photon 100 SL. Recolectar un total de 8840 marcos. Integrar los marcos con el paquete de software SAINT de Bruker utilizando un algoritmo de marco estrecho. La integración de los datos usando una celda unidad monoclinica produjo un total de 7242 reflexiones a un ángulo máximo de 2θ de $68,28^\circ$ (resolución de $0,83 \text{ \AA}$), de los cuales 3059 eran independientes (redundancia promedio $2,367$, completitud = $95,9 \%$, $R_{\text{int}} = 5,83 \%$, $R_{\text{sig}} = 6,58 \%$) y 2893 ($94,57 \%$) es mayor que $2\sigma(F^2)$. Las constantes celulares finales de $a = 5,5831$ (13) \AA , $b = 5,1082$ (9) \AA , $c = 35,013$ (6) \AA , $\beta = 90,578$ (17) $^\circ$, volumen = $998,5$ (3) \AA^3 , se basan en el refinamiento de los centroides XYZ de 6280 reflexiones por encima de $2\sigma(I)$ con $10,09^\circ < 2\theta < 136,8^\circ$. Corregir los datos para efectos de absorción utilizando el procedimiento de barrido múltiple (SADABS). La relación de transmisión aparente mínima a máxima es $0,784$. Los coeficientes de transmisión mínimos y máximos calculados (basados en el tamaño del cristal) son $0,8020$ y $0,9850$. Resolver la estructura y refinar utilizando el paquete de software Bruker SHELXTL, utilizando el grupo espacial $P 2_1$, con $Z = 2$ para la unidad de fórmula, $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{O}_3$. El refinamiento anisotrópico final de mínimos cuadrados de matriz completa en F_2 con 264 variables convergen en $R_1 = 9,17 \%$, para los datos observados y $wR_2 = 23,48 \%$ para todos los datos. La bondad de ajuste fue $1,141$. El pico más grande en la síntesis de densidad electrónica de diferencia final fue $0,506 \text{ e-}\text{\AA}^3$ y el agujero más grande fue $-0,358 \text{ e-}\text{\AA}^3$ con una desviación RMS de $0,088 \text{ e-}\text{\AA}^3$. Sobre la base del modelo final, la densidad

calculada fue 1,319 g/cm³ y F(000), 420 e-. El parámetro de estructura absoluta se ajusta a 0,12 (16), verificando la estereoquímica del centro quiral. Se determina que la estructura absoluta es la configuración R en el estereocentro.

Ejemplo 1B

4-Fluoro-N-{(1S)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero 2

5



Purificar 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica (Ejemplo 1) por cromatografía quiral para proporcionar el segundo enantiómero eluyente como el compuesto del título. ES/MS (m/z): 397,0 (M+H). Condiciones de purificación: Columna: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40 % de MeOH en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 por SFC analítico quiral (98,3 % ee, Rt: 2,37 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,98 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J = 8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J = 8 Hz, 1H), 4,14 (t, J = 8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J = 7 Hz, 3H).

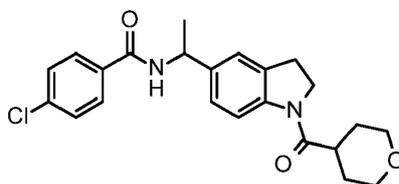
15

Preparar el Ejemplo 2 esencialmente análogo al Ejemplo 1, usando el material de partida de la Preparación 3.

Ej No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
2	4-cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 413,0 (M+H)

Ejemplo 2A y 2B

20 **4-Cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero 1 y 4-Cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero 2**



25 Purificar 4-cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica (Ejemplo 2) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). ES/MS (m/z): 413,0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40 % de iPrOH en CO₂; Caudal: 70 g/minuto; UVW: 260 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 por SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt = 1,97 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % iPrOH en CO₂; Temperatura de la columna: 40 °C; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

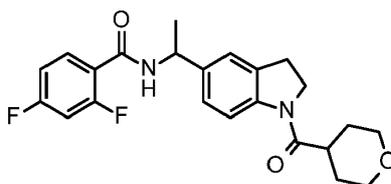
30 La purificación anterior también produjo el segundo enantiómero eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 413,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 3,04 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % de iPrOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

Preparar los Ejemplos 3 al Ejemplo 9 esencialmente análogos al Ejemplo 1, utilizando el material de partida de la Preparación 3.

Ej. No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
3	4-ciano-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 404,4 (M+H)
4	N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 379,4 (M+H)
5	4-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 393,4 (M+H)
6	4-cloro-3-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 431,4 (M+H)
7	3-cloro-4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 431,4 (M+H)
8	4-etenil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 405,4 (M+H)
9	2,4-difluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 415,0 (M+H)

Ejemplo 9A y B

- 5 **2,4-Difluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero 1 y 2,4-Difluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero 2**



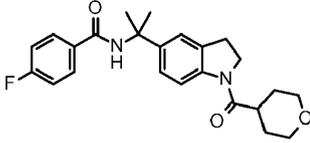
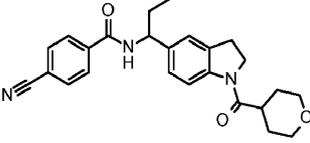
5 Purificar el 2,4-difluoro-N- {1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémico (Ejemplo 9) mediante SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). ES/MS (m/z): 415,0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40 % de MeOH en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 mediante análisis quiral (98,6 % ee, Rt: 1,72 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

10 La purificación anterior también produjo el segundo eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 415,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítico quiral (98,5 % ee, Rt: 2,60 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 40 % MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

Preparar los Ejemplos 10 al Ejemplo 13 esencialmente análogos al Ejemplo 1, utilizando el material de partida de la Preparación 7.

Ej. No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
10	4-(Difluorometil)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 429,0 (M+H)
11	4-(Fluorometil)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 411,2 (M+H)
12	2-(Benciloxi)-4-(fluoro)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 503,2 (M+H)
13	4-Fluoro-2-[(2-hidroxietil)amino]-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 456,2 (M+H)

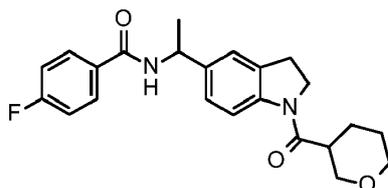
Preparar los Ejemplos 14 y 15 esencialmente análogos al Ejemplo 1A, Procedimiento sintético 2.

Ej. No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
14	4-Fluoro-N-{2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propan-2-il}benzamida		ES/MS (m/z): 411,2 (M+H)
15	4-Ciano-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 418,2 (M+H)

Ejemplo 16

4-Fluoro-N-[1-{1-[tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbonil]-2,3-dihidro-1H-indol-5-il}etil]benzamida diastereomérica (mezcla de 2 diastereómeros)

5



10

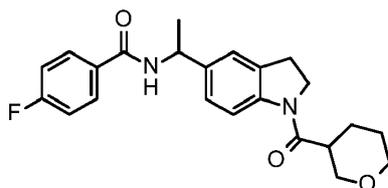
15

Tratar una mezcla de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il) etil]-4-fluorobenzamida, Isómero 1 (Preparación 24A) (150 mg, 0,528 mmol), ácido tetrahidropiran-3-carboxílico racémico (100 mg, 0,739 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,277 ml, 1,58 mmol) en DCM (5,28 ml) con hexafluorofosfato de 1-[bis (dimetilamino) metilen]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]piridinio-3-óxido (304 mg, 0,791 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Diluir la mezcla de reacción con DCM. Añadir agua y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Separar las capas y extraer la capa acuosa dos veces con DCM. Pasar la capa orgánica combinada a través de una frita hidrófoba (cartucho separador de fases ISOLUTE®) y concentrar el filtrado. Purificar por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de acetona al 20-55 % en hexanos para dar el compuesto del título (184 mg, 88 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 397,2 (M+H).

Ejemplo 16A y B

4-Fluoro-N-[1-{1-[tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbonil]-2,3-dihidro-1H-indol-5-il} etil]benzamida, Isómero 1 y 4-Fluoro-N-[1-{1-[tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbonil]-2,3-dihidro-1H-indol-5-il}etil] benzamida, Isómero 2

20



25

Purificar 4-fluoro-N-[1-{1-[tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbonil]-2,3-dihidro-1H-indol-5-il} etil]benzamida diastereomérica (Ejemplo 16) mediante cromatografía quiral para proporcionar el primer diastereómero eluyente (Isómero 1). MS (m/z): 397,2 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALCEL® OJ-H, 30 x 250 mm; Fase móvil: 100 % MeOH; Caudal: 30 ml/minuto; UVW: 225 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por HPLC analítica quiral (> 99 % de, Rt: 3,42 minutos; Columna: CHIRALCEL® OJ-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 100 % MeOH (que contiene 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm).

La purificación anterior también produjo el segundo eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 397,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 mediante HPLC analítica quiral (97,8 % de, Rt: 4,66 minutos; Columna CHIRALCEL® OJ-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 100 % MeOH (que contiene 0,2 % de isopropilamina); Caudal: 1 ml/minuto; UVW: 225 nm).

5 Ejemplo 17

4-Fluoro-2-hidroxi-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] etil}benzamida, Isómero A



10 Agregar 10 % de Pd/C (10 mg) a una solución purgada con nitrógeno de (2-(benciloxi)-4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A (Ejemplo 12) (96,0 mg, 0,19 mmol) en etanol (2 ml) e hidrogenar con 1 atm (101 kPa) de hidrógeno a temperatura ambiente durante una hora. Filtrar sobre tierra de diatomeas y concentrar el filtrado para obtener el compuesto deseado (66 mg, 84 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 413,0 (M+H).

Ejemplo 18

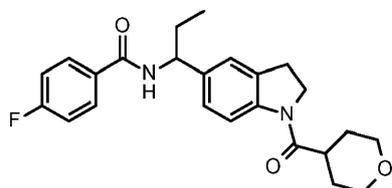
15 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] propil}benzamida racémica



20 Tratar una mezcla de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il) propil]-4-fluorobenzamida racémica (Preparación 22) (200 mg, 0,650 mmol) en DCM (6,5 ml) con N,N-diisopropiletilamina (0,228 ml, 1,30 mmol). Añadir cloruro de tetrahidropiran-4-carbonilo (110 mg, 0,715 mmol) y agitar durante 30 minutos. Diluir la mezcla de reacción con DCM. Añadir agua y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Separar las capas y extraer la capa acuosa dos veces con DCM. Pasar la capa orgánica combinada a través de una frita hidrófoba (cartucho separador de fases ISOLUTE®) y concentrar el filtrado. Purificar mediante cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de acetona al 20-60 % en hexanos para dar el compuesto del título como una espuma de color melocotón claro (244 mg, 91 %). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H).

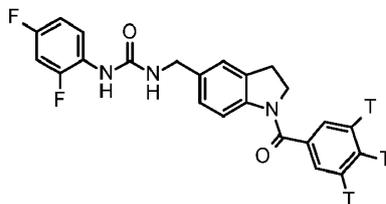
25 Ejemplo 18A y B

4-Fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] propil}benzamida, Isómero 1 y 4-Fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] propil}benzamida, Isómero 2

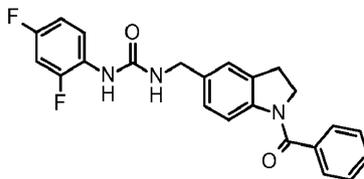


30 Purificar 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}benzamida racémica (Ejemplo 18) mediante cromatografía por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente (Isómero 1). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AS-H, columna de 21 x 150 mm; Fase móvil: 25 % de MeOH en CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Caudal: 80 g/minuto; UVW: 260 nm. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 0,92 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 25 % de MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

35 La purificación anterior también produjo el segundo enantiómero eluyente (Isómero 2). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítico quiral (> 99 % ee, Rt: 1,53 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; Fase móvil: 25 % de MeOH en CO₂; Caudal: 5 ml/minuto; UVW: 225 nm).

Ejemplo de referencia 1**1-(2,4-Difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] metil]urea**

5 En un matraz de tritaci3n, agitar 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tribromobenzoil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil]urea (3 mg, 0,005 mmol), paladio (10 % sobre carbono, 3 mg) y N,N-diisopropiletilamina (10 μ l, 0,06 mmol) en DMF (1 ml) bajo 3 Ci de tritio durante tres horas. Filtrar la reacci3n y coevaporar el filtrado con EtOH para eliminar el tritio l3bil. Disolver el residuo en EtOH y purificar por cromatograf3a en columna en fase reversa (Columna: GEMINI[®] C18 250 x 10 mm; Fase m3vil: A: agua/TFA (1000: 1), B: ACN/TFA (1000: 1); gradiente: 20-70 % de B durante 60 minutos; caudal 3 ml/minuto) para dar el compuesto del t3tulo que se disolvi3 en EtOH. EM: 414,19 (M+H) y 74 Ci/mmol.

10 Ejemplo de referencia 2**1-(2,4-Difluorofenil)-3-[[1-(fenilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il] metil]urea**

15 Disolver 1-(2,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidro-1H-indol-5-ilmetil) urea (300 mg, 0,99 mmol) en DCM (20 ml) y agregar cloruro de benzoilo (0,13 ml, 1,1 mmol) y TEA (0,27 ml, 1,9 mmol). Agitar la mezcla de reacci3n a temperatura ambiente durante dos horas. Concentrar y purificar el residuo mediante purificaci3n en fase reversa (Columna: Redisepp Rf Gold High Performance C18 Columna en Fase Reversa; Fase m3vil: A: 0,1 % de 3cido f3rmico en agua, B: ACN; gradiente: 0-80 % B durante 30 minutos; caudal: 60 ml/minuto, UVW: 219/254 nm) y aislar el producto por liofilizaci3n para dar el compuesto del t3tulo (403 mg, 79 %). ES/MS (m/z): 408,2 (M+H).

20 El sistema inmune es un punto de control cr3tico que restringe el desarrollo del tumor. Como tal, los c3nceres han desarrollado muchos mecanismos para evadir, suprimir o subvertir el sistema inmune. Si bien el tript3fano es absolutamente esencial para el crecimiento de las c3lulas cancerosas, su degradaci3n se selecciona en una amplio arreglo de c3nceres a trav3s de la expresi3n de indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO1), ya sea por la c3lula cancerosa en s3 misma (intr3nseca) o por las c3lulas en el microentorno o nodos linf3ticos de drenaje tumoral (TDLN) (extr3nsecos). La activaci3n selectiva de IDO1 en el microentorno tumoral, mientras que contrarresta el r3pido crecimiento celular, proporciona al tumor una estrategia eficaz para evitar la inmunovigilancia, un punto de control cr3tico en el desarrollo del c3ncer y la resistencia a la terapia. La actividad inmunosupresora de IDO1 es un resultado directo del agotamiento local de tript3fano y la producci3n concomitante de kinurenina, siendo los dos inmunosupresores.

30 El papel inmunosupresor de la actividad IDO1 afecta a m3ltiples tipos de c3lulas, incluida la supresi3n celular [c3lulas T (Frumento, et al. (2002) J Exp Med 196 (4): 459-468; Terness, et al. (2002) J Exp Med 196 (4): 447-457) y c3lulas NK (Della Chiesa, et al. (2006) Blood 108 (13): 4118-4125)], desarrollo celular [c3lulas T reguladoras (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117 (9): 2570-2582; Chen, et al. (2008) J Immunol 181 (8): 5396-5404; Baban, et al. (2009) J Immunol 183 (4): 2475-2483)] y c3lulas presentadoras de ant3genos supresores [c3lulas dendr3ticas supresoras y macr3fagos (Munn, et al. (2004) J Clin Invest 114 (2): 280-290; Munn, et al. (2005) Immunity 22 (5): 633-642; Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117 (9): 2570-2582)], y reclutamiento y expansi3n [c3lulas supresoras derivadas de mieloides (Yu, et al. (2014) J Immunol 193 (5): 2574- 2586; Holmgaard, et al. (2015) Cell Rep 13 (2): 412-424)]. La actividad IDO1 exhibe estos efectos a trav3s del agotamiento de tript3fano y el aumento concomitante de kinurenina en el tumor, el microentorno tumoral y los TDLN.

40 Tanto el agotamiento local de tript3fano como la producci3n de kinurenina por expresi3n de IDO1 en el microentorno tumoral o en TDLN apoyan el desarrollo y la activaci3n de Tregs (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117 (9): 2570-2582), MDSCs (Holmgaard, et al. (2015) Cell Rep 13 (2): 412-424), y c3lulas dendr3ticas reguladoras (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117 (9): 2570-2582) todas las cuales desempe1an funciones inmunosupresoras que apoyan el crecimiento tumoral. El agotamiento del tript3fano apoya el desarrollo de Treg mediante la activaci3n de la quinasa de respuesta al estr3s GCN2, que se estimula en respuesta a la acumulaci3n de los ARNt no cargados. Las c3lulas T que carecen de GCN2 no son susceptibles a la inhibici3n de la proliferaci3n mediada por IDO1 o la inducci3n de un fenotipo an3rgico (Munn, et al. (2005) Immunity 22 (5): 633-642). Adem3s del agotamiento del tript3fano, la actividad

IDO1 conduce a altas concentraciones del metabolito corriente debajo de kinurenina, una importante molécula inmunosupresora. Similar al agotamiento del triptófano, la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AHR) por la kinurenina es esencial para la generación de células T reguladoras (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185 (6): 3190-3198), y una producción elevada de kinurenina y la expresión de AHR se correlacionan con un mal pronóstico en el

5 cáncer de cerebro humano (Opitz, et al. (2011) *Nature* 478 (7368): 197-203). La kinurenina bloquea la proliferación de células T y células NK (Boyland, et al. (1956) *Biochem J* 64 (3): 578-582) y es un agonista del receptor AHR (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185 (6): 3190-3198; Opitz, et al. (2011) *Nature* 478 (7368): 197-203), un factor de transcripción que regula la producción innata de citoquinas inmunomediada, tales como IL-1 β , IL-6 e IL-21, y se sobreexpresa en

10 varios tipos de cáncer donde se cree que facilita la progresión tumoral y la resistencia a la terapia (Julliard, et al. (2014) *Front Immunol* 5: 458). De hecho, la expresión intrínseca de IDO1 en el cáncer está regulada, en parte, por la activación mediada por kinurenina de un bucle de señalización AHR-IL-6-STAT3 que impone la expresión de IDO1 e inhibe la proliferación de células T. La expresión de este eje de señalización IDO1 se asocia con una reducción en la supervivencia libre de recaída en pacientes con cáncer de pulmón (Litzenburger, et al. (2014) *Oncotarget* 5 (4): 1038-1051). La producción de IL-6 mediada por IDO1 también juega un papel importante en el apoyo al desarrollo de MDSCs

15 pro-tumorigénicas y la interrupción de la producción de IL-6 reducida por IDO1, actividad supresora de MDSC atenuada, crecimiento tumoral retardado y mayor supervivencia en un modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS (Smith, et al. (2012) *Cancer Discov* 2 (8): 722-735). La conexión entre el agotamiento dependiente de IDO1 de triptófano y la activación dependiente de kinurenina de AHR proporciona una llave que explica por qué el catabolismo de triptófano está íntimamente asociado con el escape inmune, un punto de control crítico que restringe la progresión del cáncer.

20 La regulación de la expresión de IDO1 en el microentorno tumoral es compleja. IDO1 fue el primer gen regulado por IFN- γ descubierto (Yoshida, et al. (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1): 129-132). De hecho, existe una fuerte correlación entre la expresión de IFN- γ e IDO1 en todas las histologías del cáncer (<http://cancergenome.nih.gov/>). Además, la expresión IDO1 está sobrerregulada por interferones tipo I, ligandos TLR, TNF, IL-1, CTLA-4, CD200, GITR, CD40 y TGF- β , todos los cuales juegan un papel importante en el sistema inmune y el desarrollo del cáncer, la

25 progresión y respuesta a la terapia. La alta actividad de IDO1 medida por la expresión de IDO1, el agotamiento de triptófano y/o el aumento en la kinurenina se ha implicado en los pronósticos pobres, las tasas de supervivencia reducidas y el potencial metastásico aumentado de una amplia variedad de tipos de tumores. Como tal, los aumentos en los niveles séricos de kinurenina con una reducción concomitante de triptófano se evidencian en los cánceres de mama, cáncer colorrectal, cabeza y cuello, pulmón y próstata (Liu, et al. (2010) *Blood* 115 (17): 3520-3530). Además,

30 IDO1 se activa crónicamente en pacientes con cáncer (Schrocksadel, et al. (2006) *Clin Chim Acta* 364 (1-2): 82-90), asociado con una enfermedad extensa (Huang, et al. (2002) *Br J Cancer* 86 (11): 1691-1696), mal resultado y/o resistencia a la quimioterapia estándar en varios tipos de cáncer, incluido el melanoma (Weinlich, et al. (2007) *Dermatology* 214 (1): 8-14), leucemia mieloide aguda (Chamuleau, et al. (2008) *Haematologica* 93 (12): 1894-1898; Corm, et al. (2009) *Leuk Res* 33 (3): 490-494), cáncer de mama y cervical (Inaba, et al. (2010) *Gynecol Oncol* 117 (3): 423-428; Yu, et al. (2011) *Clin Dev Immunol* 2011: 469135; Yu, et al. (2013) *J Immunol* 190 (7): 3783-3797; Chen, et al. (2014) *Breast Cancer Res* 16 (4): 410; *Clin Cancer Res*. 2007 1 de diciembre; 13 (23): 6993-7002; Trott et al. (2016) *Oncotarget*, 7 (41), 66540-66557, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, melanoma cutáneo, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, glioma, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, carcinoma de células escamosas laríngeas, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin,

40 carcinoma de células escamosas esofágicas y orales, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma ductal de páncreas, leucemia de células T y carcinoma de tiroides. IFN- γ es una citoquina efectora crítica secretada por las células NK y T activadas. Los circuitos reguladores negativos que se dedican a restringir la actividad de las células T, ya sea sistémicamente (CTLA-4) o localmente (PD-L1/L2), están actualmente aprobados para su uso como agentes anticancerígenos donde mejoran la inhibición del crecimiento tumoral mediada por células T. Las anulaciones genéticas de puntos de control tales como CTLA-4, PD-1 o PD-L1 dan como resultado una mejora notable de la producción de IFN- γ (Latchman, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (29): 10691-10696; Pandiyan, et al. (2007) *J Immunol* 178 (4): 2132-2140), lo cual puede acoplar el eje inmunosupresor IFN- γ -a-IDO1. La inhibición de la expresión intrínseca de IDO1 con 1-metil triptófano en un modelo de melanoma de ratón mejoró significativamente la

45 eficacia de ipilimumab, un anticuerpo bloqueador CTLA-4 (Holmgaard, et al. (2013) *J Exp Med* 210 (7): 1389-1402). Esta eficacia mejorada de ipilimumab se asoció con un aumento en las células efectoras CD8 y una disminución en Tregs. Estas observaciones se extendieron a otros anticuerpos direccionados a PD1, PD-L1 y GTR donde la inhibición de IDO1 aumentó su actividad anticancerígena. Mecánicamente, se demostró que IDO1 impide la eficacia de estos inhibidores de punto de control mediante la inducción de Tregs con el subsecuente reclutamiento de MDSC creando un entorno inmunosupresor en el tumor (Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13 (2): 412-424). Enfoques inmunoterapéuticos para tratar el cáncer, tales como IFN- γ en sí mismo, activadores inmunes innatos tales como CpG-ODN, anti-4-1BB (CD137), anti-OX40, anti-PD-1/PD-L1/PD-L2, anti-CTLA 4 todos tienen el potencial de activar la expresión IDO1 que restringe su eficacia a largo plazo en la clínica. Por lo tanto, puede haber un potencial terapéutico significativo en la combinación de inhibidores de IDO1 con estos agentes. Específicamente, la combinación de inhibidores de IDO1 con anticuerpos anti-PDI (pidilizumab, nivolumab, pembrolizumab), anticuerpos anti-PD-L1

60 (durvalumab, atezolizumab, avelumab), anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab), anticuerpos anti-OX40 (MEDI6469, KHK4083) y los anticuerpos anti-4-1BB (CD137) (PF-05082566) tienen un potencial terapéutico significativo en un amplio intervalo de tipos de tumores.

En conjunto, estos datos sugieren que los inhibidores del agotamiento de triptófano y la producción concomitante de kinurenina, tales como los inhibidores de IDO1, pueden ser útiles como un agente único o en combinación en una

variedad de tipos de cáncer tanto en pacientes con cáncer sin tratamiento como en pacientes resistentes al tratamiento. Esta utilidad ha sido demostrada por inhibidores de IDO1 conocidos tales como el epacadostat (INCB024360) y NLG919. Se sabe que el epacadostat se une al IDO1 y bloquea el catabolismo del triptófano y la subsecuente producción de kinurenina tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, el epacadostat ha demostrado la eficacia de un agente único en modelos preclínicos de ratón, CT26 y PAN02, un efecto que es dependiente de la presencia de células T. (Yue, et al. (2009) J Med Chem 52 (23): 7364-7367; Koblisch, et al. (2010) Mol Cancer Ther 9 (2): 489-498; Liu, et al. (2010) Blood 115 (17): 3520-3530; Jochems, et al. (2016) Oncotarget, Advance Publications). La eficacia preclínica del epacadostat se ha traducido en resultados de ensayos clínicos en humanos (NCT01195311).

Los resultados de los siguientes ensayos demuestran evidencia de que los compuestos ejemplificados en este documento son útiles como inhibidores de la producción de kinurenina tales como los inhibidores de IDO1 y pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, los resultados de los siguientes ensayos demuestran que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1 y que todos los compuestos ejemplificados inhiben la conversión de triptófano a quinurenina en células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ensayo de unión para IDO1

- 15 El propósito de este ensayo es demostrar que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1 *in vitro*. Específicamente, este ensayo evalúa la capacidad de los compuestos de prueba para competir con una molécula espía tritiada 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil) indolin-5-il]metil]urea y permite el cálculo de la afinidad de unión, IC₅₀.

Unión competitiva de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil) indolin-5-il] metil] urea a IDO1

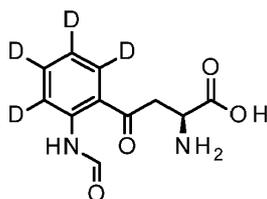
- 20 Cargar His6-IDO1 300 nM (Proteros, SwissProtID P14902, Cat # PR-0278, lote 19/59, 98 mg/ml en MES 25 mM pH 6,5, KCl 150 mM, pureza > 95 %) diluido en DPBS a cada pocillo de placa recubierta con níquel (Sigma, Cat # S5563) e incubar durante la noche a 4 °C. Retirar las proteínas no unidas lavando la placa con DPBS 300 µl cuatro veces en una lavadora de microplacas BIOTEK®. Agregar 100 µl de tampón de bloqueo (0,05 % TWEEN® 20/DPBS) por pocillo e incube durante una hora a temperatura ambiente para reducir la unión inespecífica. Mientras bloquea la placa, preparar 50 nM de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil) indolin-5-il]metil]urea (Biocair, Cat # TRQ41455) mediante dilución en DPBS, y diluir en serie la solución madre sin marcar 2,5 veces en DMSO para generar una curva de dilución de once puntos. Agregar 5 µl de compuestos no marcados diluidos en serie a 95 µl de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea 50 nM, agregar la mezcla a los pocillos en la placa, e incubar a temperatura ambiente durante cuatro horas con agitación suave. Para determinar el desplazamiento máximo de la molécula espía tritiada (1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil) indolin-5-il]metil]urea), agregar una cantidad en exceso de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(fenilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil]urea sin marcar (ChemDiv, Cat # G714-0242)) 100 µM a 50 nM de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil) indolin-5-il]metil]urea y agregar a los pocillos de control de unión no específicos en la placa. Después de cuatro horas de incubación, aspirar los pocillos utilizando un MultiMek96 y lavar la placa rápidamente una vez con 300 µl de DPBS enfriado con hielo usando una lavadora de microplacas BIOTEK®. Añadir 100 µl de imidazol 100 mM en PBS pH 7,5 a cada pocillo e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente para desplazar el complejo IDO1-ligando de la placa recubierta con níquel. Transferir el complejo desplazado de IDO1-ligando a una placa de fondo transparente blanca de 96 pocillos (Costar, Cat # 3632) que contiene 200 µl de Microscint-20 (Perkin Elmer, Cat # 6013621), por pocillo usando un MultiMek96. Cuantificar la unión total y la unión no específica (NSB) del ligando 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea usando un contador Trilux Microbeta. Utilizar los valores de unión total y NSB para calcular la IC₅₀ para el compuesto no marcado utilizando análisis de regresión no lineal en GraphPad Prism. Los resultados de este ensayo demuestran que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1. Por ejemplo, los Ejemplos 1A y 1B demuestran valores de IC₅₀ inferiores a 1,5 µM. Específicamente, la IC₅₀ para el Ejemplo 1A es 0,033 µM ± 0,0028 (n = 2).

- 45 Ensayo de producción de kinurenina (SKOV3)

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la producción de kinurenina, N-formil-kinurenina y el agotamiento del triptófano en las células cancerosas que expresan IDO1 y evaluar si los compuestos son abiertamente tóxicos para estas células. Los compuestos ejemplares se prueban para la inhibición de la actividad IDO1 en SKOV3 (ATCC, Cat # HTB-77), una línea celular de cáncer de ovario que expresa intrínsecamente IDO1. Debido a la expresión de IDO1, las células SKOV3 degradan el triptófano con la producción concomitante de kinurenina y los compuestos se prueban para determinar su capacidad de inhibir la producción de kinurenina, N-formil-kinurenina y el agotamiento del triptófano. Opcionalmente, se puede evaluar la toxicidad manifiesta de los compuestos monitorizando la viabilidad celular.

Síntesis de estándares internos

- 55 Síntesis del ácido N-Formil L-Kinurenina-d4 (2S)-2-amino-4-oxo-4-(2,3,4,5-tetradeterio-6-formamido-fenil)butanóico



Agregar una mezcla preformada de anhídrido acético (0,026 ml, 0,264 mmol) en ácido fórmico (0,052 ml, 1,32 mmol) a una mezcla de L-kinurenina-d4 (56 mg, 0,264 mmol) en ácido fórmico (0,132 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante dos horas. Diluir la mezcla de reacción con ACN y concentrar bajo una corriente de nitrógeno. Purificar el residuo mediante HPLC en fase reversa (columna: PHENOMENEX® LUNA® 5 µm C18 (2) 100Å AXIA, 30 x 75 mm; eluyente: A: 0,1 % de ácido fórmico/agua, B: 0,1 % de ácido fórmico/ACN; gradiente: 0 % de B durante 2 minutos, luego gradiente a 22 % de B durante 5 minutos; flujo: 85 ml/minutos a UVW 231/214 nm) para dar el compuesto del título 29 mg como un sólido blanco esponjoso después de la liofilización. ES/MS (m/z): 241,0 (M+H).

10 Tratamiento celular y viabilidad celular

Células SKOV3 en placa, una línea celular de cáncer de ovario que expresa IDO1, a 20.000 células por pocillo en 100 µl de medio McCoy's 5A (Gibco, Cat # 16600-082) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat # 11140-050), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, Cat # 11360-070) y suero bovino fetal al 10 %, medio completo, en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (BD Biosciences). Luego, incubar las células durante 16 horas en una incubadora a 37 °C con CO2 al 5 %. Preparar diluciones seriadas de compuestos a partir de compuestos de prueba de reserva 10 mM en DMSO. Diluir en serie la solución de reserva 3 veces en DMSO y transferir 5 µl de compuestos a una placa de dosificación intermedia que contenga 95 µl de medio completo para generar una curva de dilución de diez puntos con concentraciones finales de compuestos que varían bien sea de 1 µM hasta 0,5 pM o 10 µM hasta 0,5 nM. Decantar el medio de la placa que contiene las células y secar sobre toallas de papel. Lavar la placa dos veces con 90 µl de medio completo por pocillo y reemplazar el lavado final con 90 µl de medio completo. Después del lavado, agregar 10 µl de compuestos diluidos en serie de la placa de dosificación intermedia a cada pocillo de la(s) placa(s) e incubar durante 18 horas en una incubadora a 37 °C con CO2 al 5 %. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 0,5 %. Al final de las 18 horas de incubación, transferir 50 µl de medio de cada pocillo a una placa de fondo en V de 96 pocillos (Thermo Scientific), sellar la placa y almacenar a -80 °C para la subsecuente medición con base en espectrometría de masas de kinurenina, N-formil-kinurenina y triptófano. Opcionalmente, devolver la(s) placa(s) original(es) a la incubadora durante 24 horas adicionales y medir la viabilidad de las células agregando un volumen igual de CELLTITER-GLO® (Promega) y medir la luminiscencia en un lector de placas PERKIN ELMER® EnVision.

Medición espectrométrica de masas (MS) de triptófano, N-formil-kinurenina y Kinurenina

Descongelar las muestras recolectadas del ensayo basado en células SKOV3 en hielo y eliminar cualquier residuo celular mediante una placa de centrifugación a 3220xg durante un minuto a 4 °C. Agregar 12,5 µl de estándares internos que consisten en 2,5 µg/ml L-triptófano-2',4',5',6',7'-d5 (Isótopos CDN, Cat # D-1522), sulfato de L-kinurenina-anillo-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat # DLM-7842-0,01) y N-formil L-kinurenina-d4 preparada internamente. Sellar con calor todas las placas con sellos Easy Peel (ThermoScientific) y mezclar agitando en vórtex durante 1-2 minutos y luego centrifugar durante un minuto a 3220xg a 4 °C. Generar soluciones de calibración estándar para la cuantificación de kinurenina y N-formilkinurenina disolviendo cada una en agua para obtener una concentración final de 1 mg/ml. Alícuota de 20,8 µl de kinurenina y 23,6 µl de N-formilquinurenina de su respectiva reserva de 1 mg/ml y diluir a 1 ml usando medios McCoy's 5A para dar una concentración final para cada estándar de 100 µM. Diluir en serie la solución de calibración 2 veces en medio completo para obtener una curva estándar de 5 puntos con concentraciones finales de 5 µM hasta 0,313 µM (kinurenina) y 2 µM hasta 0,125 µM (N-formilquinurenina). Inyectar 1 µl de muestra de medio (desconocida) o solución de calibración estándar en un sistema LC/MS-MS que consiste en un sistema HPLC SHIMADZU® Prominence 30A y un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple AB SCIEX® 5500. Separar analitos en una columna XBridge™ C18, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm (Waters, Cat # 186003021) mantenida a 35 °C, con un caudal en fase móvil de 0,7 ml/minuto. La fase móvil A es ácido fórmico al 0,1 % en agua, y la fase móvil B es MeOH. El perfil del gradiente es: 0 minutos, 0,5 % B; 0,8 minutos, 98 % de B; 1,10 minutos, 98 % de B; 1,11 minutos, 0,5 % de B; 1,7 minutos, y luego se detiene. Operar el espectrómetro de masas en modo de monitorización de reacción múltiple positiva APCI. Utilizar datos de muestras de curvas estándar y generar una curva de calibración de ajuste lineal para cada analito utilizando el software MultiQuan™. Usar la curva estándar generada para calcular las concentraciones de analito para los desconocidos.

Calcular los valores IC₅₀ del compuesto utilizando la medición de espectrometría de masas de kinurenina de los medios que contienen 500 µM de tratamiento estándar de referencia como cien por ciento de inhibición, y ningún compuesto excepto el tratamiento con DMSO como cero por ciento de inhibición. Las mediciones de N-formil-kinurenina y triptófano se utilizan para evaluar la validez de los datos generados al mostrar una relación directa entre la producción de kinurenina y N-formil-kinurenina con la reducción concomitante de los niveles de triptófano. Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la producción de kinurenina y N-formil-kinurenina en células cancerosas que expresan IDO1 a valores IC₅₀ para inhibir tanto la kinurenina como la N-formil-kinurenina

de menos de 0.9 μM y de los analizados (Ejemplos 1-9) en la viabilidad celular; todos los compuestos lo hicieron sin ser abiertamente tóxicos para las células hasta al menos 1 μM . Por ejemplo, la IC_{50} para el Ejemplo 1A para inhibir la kinurenina y la N-formil-kinurenina son $0,007 \mu\text{M} \pm 0,002$ ($n = 6$) y $0,007 \mu\text{M} \pm 0,002$ ($n = 6$) respectivamente. Adicionalmente, el Ejemplo 1A no inhibe la proliferación celular hasta 10 μM .

5 Ensayo de inhibición del objetivo *in vivo*

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la producción de kinurenina y el agotamiento de triptófano en células cancerosas *in vivo*. SKOV3X (Centro de Investigación y Tecnología de la Universidad de Indiana), una línea celular de cáncer de ovario, expresa intrínsecamente IDO1 y forma fácilmente tumores en la cavidad peritoneal de ratones Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). Como consecuencia de la expresión de IDO1, los tumores SKOV3X agotan localmente el triptófano con la producción concomitante de altos niveles de kinurenina en el microentorno tumoral. El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir IDO1 evidenciado por la clara reducción en los niveles de kinurenina en el tumor.

Fase viva

15 Cultivar SKOV3X en medios McCoys 5A (Gibco, Cat # 16600-082) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat # 11140-050), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, Cat # 11360-070) y FBS al 10 % e incubar a 37 °C en CO₂ al 5 %. Tripsinizar y aislar las células del cultivo y resuspender las células en la solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Implantar 2×10^6 células SKOV3X en la cavidad intraperitoneal de cada ratón Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). Aproximadamente tres semanas después de la implantación, palpar los animales para asegurar la formación de tumores y aleatorizar los ratones portadores de tumores en grupos de control de vehículos y tratamiento compuesto.

20 Administrar el compuesto formulado en un vehículo que contiene 1 % de hidroxietilcelulosa (HEC) y 0,025 % TWEEN® 80 y 0,05 % Antiespumante o vehículo solo por sonda oral. Generar un perfil de inhibición de curso de tiempo al dosificar animales portadores de tumores con una dosis única y recolectar muestras de plasma, hígado y tumor a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosis. Recolectar la sangre en tubos de recolección de sangre que contengan EDTA (Greiner bio-one, Cat # 450474) y centrifugar a 2365xg, aislar el plasma y congelar a -80 °C. Aislar los

25 fragmentos de hígado y tumor, registrar los pesos y congelar rápidamente y almacenar a -80 °C.

Generación de curva estándar, procesamiento de tejidos e inhibición de objetivos

Preparar estándares de calibración para L-kinurenina y L-triptófano generando primero matrices depuradas, que son homogeneizados de plasma y tejidos agotados en L-kinurenina y L-triptófano por diálisis. Luego, fortificar las matrices depuradas con cantidades conocidas de L-kinurenina y L-triptófano. Generar plasma de ratón depurado agregando 10 ml de plasma de ratón tratado con EDTA (BioreclamationIVT, Cat # MSEPLEDTA3) a un SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 (Spectrum Labs, Cat # G235063) y colocar este dispositivo de diálisis en 1000 ml de solución salina tamponada con fosfato y dializar durante la noche. Luego, transferir este dispositivo a 1000 ml frescos de solución salina tamponada con fosfato y repetir la diálisis. Transferir el plasma de ratón depurado a un recipiente limpio y almacenar a -20 °C para su uso futuro. Preparar el homogenato de hígado de control agregando 3 ml de MeOH/agua (1:1, v/v) por cada gramo de hígado de ratón de control y homogeneizar con una sonda ultrasónica. Preparar el homogeneizado de tumor de control de la misma manera, excepto que se usa un triturador de tejido para homogeneizar el tejido tumoral. Agregar 10 ml de los homogeneizados de tejido de control, hígado y tumor, para separar los dispositivos SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 y dializar cada noche en 1000 ml de MeOH/agua (1:1, v/v), luego transferir cada uno a 1000 ml frescos de MeOH/agua (1:1, v/v) y repetir la diálisis. Transferir los homogeneizados de tejido depurado a recipientes separados y almacenarlos a -20 °C para su uso futuro.

Preparar soluciones de reserva estándar de L-kinurenina-sulfato (Sigma Aldrich, Cat # K3750), disuelto en ACN/agua (1:1, v/v) y L-triptófano (Sigma Aldrich), disuelto en N-metil-2-pirrolidona/agua (4:1, v/v), para dar concentraciones finales de base libre de 1 mg/ml. Tomar alícuotas de 50 μl de las soluciones de reserva respectivas y diluir con MeOH/agua (1:1, v/v) para producir una solución de trabajo combinada de 50 $\mu\text{g/ml}$. Preparar seis soluciones de trabajo de calibración adicionales en MeOH/agua (1:1, v/v) mediante dilución en serie de la solución de 50.000 ng/ml para obtener una curva de calibración de 7 puntos con concentraciones finales de 25 ng/ml a 50 $\mu\text{g/ml}$.

Mezclar las muestras de hígado adquiridas de los sujetos de prueba con MeOH/agua (1:1, v/v) en una proporción de 1 gramo de tejido a 3 ml de disolvente y homogeneizar con una sonda ultrasónica. Homogeneizar muestras tumorales con la misma proporción de MeOH/agua (1:1, v/v) utilizando un triturador de tejidos. Descongelar las muestras de plasma de los sujetos de prueba y mezclar para obtener homogeneidad.

Realizar la extracción de soluciones de trabajo de calibración, la serie de dilución de 7 puntos de L-kinurenina y L-triptófano, transfiriendo 25 μl de cada muestra a pocillos separados de una placa de 96 pocillos y agregar 25 μl de la matriz de control depurada apropiada (homogeneizado de plasma, hígado o tumor) a estos pocillos dependiendo del tejido de origen de las muestras de prueba. Agregar 25 μl de MeOH/agua (1:1, v/v) a los pocillos separados, seguido de 25 μl de las muestras de prueba respectivas. A continuación, agregar 180 μl de ACN/MeOH (1:1, v/v) que contiene 250 ng/ml de L-triptófano-2',4',5',6',7'-d5 (Sigma Aldrich, Cat # 615862) y sulfato de L-kinurenina-anillo-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat # DLM-7842-0,005) a todos los pocillos y mezclar para precipitar proteínas en las muestras. Centrifugar la placa de 96 pocillos para granular el material proteico precipitado y luego diluir una porción

de cada sobrenadante al menos 10 veces con agua/TFA (100:2, v/v). Inyectar 10 µl de cada muestra extraída y estándar de calibración en un sistema LC/MS-MS que consiste en un controlador SHIMADZU® SCL-10A con bombas de HPLC SHIMADZU® LC-10ADvp, un automuestreador CTC-PAL y un espectrómetro de masa de cuadrupolo triple AB SCIEX® 4000. Separar los analitos en una columna Advantage™ Echelon™ C18, 2,1 x 20 mm, 4 µm (Ventas y servicio analítico, Cat # Sprite AE1822) mantenida en condiciones ambientales con un caudal en fase móvil de 1,5 ml/minuto. La fase móvil A es agua/TFA/bicarbonato de amonio 1 M (1000:4:1, v/v/v) y la fase móvil B es ACN/TFA/bicarbonato de amonio 1 M 1000:4:1, v/v/v). El perfil del gradiente es: 0 minutos, 0,3 % de B; 0,03 a 0,2 minutos, 7 % de B; 0,3 a 0,4 minutos, 36 % de B; 0,41 minutos, 98 % de B, luego se detiene a 0,7 minutos para volver a las condiciones originales. Operar el espectrómetro de masas en el modo de monitorización de reacción múltiple positiva TURBOIONSPRAY®. Utilizar los datos de las muestras de curvas de estándares de calibración y generar una curva de calibración de ajuste cuadrático para cada analito usando el software Analyst™. Usar la curva estándar generada para calcular las concentraciones de analito para las muestras de estudio.

Usar la concentración hepática de kinurenin de animales no portadores de tumores tratados con vehículo como inhibición máxima o nivel más bajo de kinurenina. Usar la concentración tumoral SKOV3X de kinurenina de ratones portadores de tumores tratados con vehículo como inhibición mínima o el nivel más alto de kinurenina. Calcular el porcentaje de inhibición para los grupos tratados con compuestos en relación con la inhibición mínima de IDO1 en el tumor tratado con vehículo. Los resultados de este ensayo demuestran que el Ejemplo 1A inhibe la producción de kinurenina y N-formil-kinurenina en células cancerosas que expresan IDO1 *in vivo*. Específicamente, el Ejemplo 1A dosificado a 75 mg/kg, 25 mg/kg y 5 mg/kg dio como resultado una inhibición del 79 %, 59 % y 37 % respectivamente 12 horas después de la dosificación.

Efecto antitumoral del ejemplo 1A en el modelo singeneico de colon26 de ratón para cáncer de colon y en combinación con LY3300054 en el modelo de ratón humanizado L55 establecido

Modelo singeneico de Colon 26 de ratón:

Cultivar la línea celular de cáncer de colon Colon26 derivada de BALB/c de ratón en medio RPMI 1640 suplementado con HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 nM y suero bovino fetal al 10 %. Cosechar las células subconfluentes con tripsina y enjuagar dos veces con medio de crecimiento completo que carece de suero. Iniciar tumores subcutáneos inyectando 1×10^6 células resuspendidas en HBSS en el flanco posterior de ratones BALB/c inmunocompetentes (Envigo, Indianápolis, IN). Seis días después de la implantación del tumor, se aleatorizan los animales con base en el peso corporal y se colocan en sus respectivos grupos de tratamiento utilizando el número de animales por grupo como se indica.

Modelo de tumor humanizado L55, exposición de hPBMC y tratamiento:

Cultivar la línea celular de NSCLC humano, L55, en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Recoger las células subconfluentes con tripsina y enjuagar dos veces con medio de crecimiento que carece de suero. Iniciar el cultivo de tumores subcutáneos inyectando 5×10^6 en una mezcla 1:1 de HBSS y MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en el flanco posterior de ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}SzJ más comúnmente conocidos como ratones con eliminación de la cadena NOD scid gamma (NSG) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine), que carecen de células T, células B, células NK y son deficientes en la señalización de citoquinas. Cuando el volumen tumoral medio alcanza aproximadamente 200-300 mm³, aleatorizar los animales por tamaño de tumor y peso corporal y colocarlos en sus respectivos grupos de tratamiento como se indica. Después de la aleatorización, exponer a los ratones portadores de tumores con PBS solo (sin PBMC) o con PBS que contenga 1×10^7 PBMCs humanas en la vena de la cola de los receptores.

Captura de datos, formulación de compuestos y controles del vehículo (ambos modelos)

Capturar el tamaño del tumor y el peso corporal usando el Director del estudio. Estimar el volumen del tumor (V) usando la fórmula: $V = .536 \times L \times W^2$ donde L = diámetro medido más grande y W = diámetro más pequeño perpendicular. Transformar los datos del volumen del tumor en una escala logarítmica para igualar la varianza entre los tiempos y grupos de tratamiento. Analizar los datos de volumen log con un análisis de varianza de mediciones repetidas bidireccionales por tiempo y tratamiento utilizando los procedimientos MIXED en el software SAS (Versión 9.2). El modelo de correlación para las mediciones repetidas es Spatial Power. Comparar los grupos tratados con el grupo de control en cada punto de tiempo. Utilizar el procedimiento MIXED también por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores estándar en cada punto de tiempo. Ambos análisis explican la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que ocurre cuando los animales con tumores grandes son retirados del estudio temprano. Calcular los cambios relativos en el volumen del tumor (% T/C) utilizando las mediciones del volumen del tumor tomadas más cercanas al último día de dosificación con el Ejemplo 1A, utilizando la fórmula $\% T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$, donde T = volumen tumoral medio del grupo tratado compuesto, ΔT = volumen tumoral medio del grupo tratado compuesto menos el volumen tumoral medio en el día de referencia, C = volumen tumoral medio del grupo control (vehículo), y ΔC = volumen tumoral medio del grupo control menos el volumen tumoral medio en el día de referencia. Si $\Delta T < 0$, entonces se calcula un valor de regresión tumoral en lugar de % T/C por el cual $\% \text{ Regresión} = 100 \times \Delta T/T_{\text{inicial}}$ de tal manera que T_{inicial} = volumen tumoral medio en el día de referencia.

Evaluar la eficacia antitumoral del Ejemplo 1A y LY3300054 solo, o en combinación midiendo el volumen del tumor mediante mediciones de calibre tridimensional dos veces por semana durante el transcurso del estudio. Medir el peso corporal dos veces por semana durante el transcurso del estudio, como un indicador general de tolerabilidad.

5 Formulaciones para el Ejemplo 1A y LY3300054: Formular el Ejemplo 1A semanalmente con base en 1 % HEC/0,25 % Tween 80/0,05 % Antiespumante y almacenar a 4 °C. Solubilizar LY3300054 en solución salina tamponada con fosfato y almacenar a 4 °C

10 Grupos de control: Para estudios de eficacia de agente único, administrar el vehículo para el Ejemplo 1A solo. Para estudios de combinación, administre ambos vehículos usados para el Ejemplo 1A y LY3300054 de acuerdo con la misma programación para cada compuesto, respectivamente. Para grupos de monoterapia en estudios de eficacia combinada, tratar a los animales con el compuesto deseado y el vehículo para el compuesto que no se dosifica siguiendo la programación para el compuesto no dosificado.

Modelo singénico de Colon26, tratamiento y resultados:

Ejemplo de monoterapia 1A

15 Tratar ratones BALB/c hembras (n = 10) con tumores Colon26 con el Ejemplo 1A dos veces al día durante 21 días por sonda oral a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg. Comenzar la administración del Ejemplo 1A seis días después de la implantación del tumor, y monitorizar el crecimiento del tumor y el peso corporal dos veces por semana durante el período de tratamiento.

20 Resultados: El tratamiento con 10, 50 y 100 mg/kg del Ejemplo 1A dio como resultado un efecto de respuesta a la dosis sobre el crecimiento tumoral con solo dosis de 50 y 100 mg/kg que muestran una inhibición del crecimiento estadísticamente relevante ($p < .001$) en el día 20. Los cambios en el volumen tumoral (% T/C) observados en el día 20 fueron 17,5 %, 31,2 % y 62,6 % para las dosis de 10, 50 y 100 mg/kg, respectivamente. No hubo problemas de tolerabilidad significativos con ninguna dosis probada con el Ejemplo 1A con respecto a los cambios de peso corporal durante el curso del tratamiento en comparación con los ratones tratados con vehículo. La pérdida de peso corporal se midió como el cambio porcentual respecto del peso corporal medio registrado en la línea base 6 días después del implante tumoral para cada grupo. En el día 20, los ratones tratados con vehículo promedio mostraron una reducción del 5,5 % en el peso corporal en comparación con la línea base con los grupos dosificados de 10, 50 y 100 mg/kg que mostraron una reducción del 2,5 %, 8 % y 2,5 %, respectivamente. Si bien hubo una tendencia dependiente de la dosis en la pérdida de peso corporal con respecto a la dosis, no fueron estadísticamente diferentes de los ratones tratados con vehículo.

30 Modelo de tumor humanizado L55, tratamiento y resultados:

Efecto hPBMC sobre el crecimiento tumoral L55

35 La línea celular de cáncer humano L55 NCLC es intrínsecamente resistente a la alo-respuesta asociada con la inyección de hPBMCs. El objetivo de estos estudios es evaluar la capacidad de los compuestos para potenciar la respuesta de alo permitiendo que las células T humanas se dirijan y restrinjan el crecimiento de un tumor L55 humano en un ratón que carece de un sistema inmunitario adaptativo (ratones NSG). Para evaluar la contribución de las hPBMC en la inhibición del crecimiento tumoral de los tumores L55, se simula inyectar ratones NSG con tumores L55 establecidos (n = 10) que hayan alcanzado aproximadamente 250 mm³ con PBS que carece de las hPBMC o PBS que contiene 1 x 10⁷ hPBMCs. Medir el volumen del tumor y el peso corporal dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

40 Resultados: No hubo una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral L55 en comparación con los animales que no recibieron hPBMCs en el transcurso del estudio. No se observaron problemas de tolerabilidad significativos con la inyección de PBMCs humanas en el transcurso del estudio evidenciado por la falta de pérdida de peso significativa en comparación con la línea base, que en el día 41 fue 0,1 % menor que en la línea base.

Ejemplo de monoterapia 1A

45 Para evaluar la capacidad del Ejemplo 1A para mejorar la inhibición del crecimiento tumoral L55 mediada por hPBMCs, simular inyectar ratones NSG con tumores L55 establecidos (n = 10) que han alcanzado aproximadamente 250 mm³ con PBS que carece de hPBMCs y otro grupo (n=10) con PBS que contiene 1 x 10⁷ hPBMCs. Tratar a ambos grupos con 75 mg/kg del Ejemplo 1A mediante sonda oral dos veces al día durante 21 días. Medir el volumen del tumor y el peso corporal dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

50 Resultados: en ausencia de hPBMCs, el tratamiento de tumores L55 con el Ejemplo 1A no dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral en el transcurso del tratamiento en comparación con el vehículo solo sin PBMCs. El tratamiento de animales portadores de tumor L55 con el Ejemplo 1A en presencia de hPBMCs dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control del vehículo que carece de hPBMCs. La supresión estadísticamente relevante del crecimiento tumoral fue más evidente en puntos de tiempo
55 posteriores con un % T/C de 47,6 % en el día 41 ($P < .001$). No se observaron problemas de tolerabilidad significativos

en el transcurso del estudio con hPBMCs, Ejemplo 1A, o la combinación evidenciada por la carencia de reducciones estadísticamente significativas en la pérdida de peso corporal en comparación con las mediciones de línea base.

Monoterapia LY3300054

5 Para evaluar la capacidad de LY3300054 para mejorar la inhibición del crecimiento tumoral L55 mediada por hPBMCs, inyectar dos grupos de ratones NSG que porten tumores L55 establecidos (n=10/grupo) que hayan alcanzado aproximadamente 250 mm³ con PBS que contenga hPBMCs. Tratar a un grupo con 10 mg/kg de anticuerpo de control efector de IgG nulo (IgG-EN) y al otro con 10 mg/kg de LY3300054 mediante inyección intraperitoneal una vez por semana durante 4 semanas. Medir el volumen del tumor y el peso corporal dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

10 Resultados: El tratamiento de ratones que portan tumor L55 que fueron inyectados con hPBMCs con 10 mg/kg de IgG-EN no alteró el crecimiento o la progresión del tumor en comparación con el vehículo solo con o sin hPBMCs. El tratamiento de animales portadores de tumor L55 que habían sido inyectados con hPBMCs con 10 mg/kg de LY3300064 dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con los controles tratados con vehículo que contenían o carecían de hPBMCs. El cambio en el volumen del tumor (% T/C) observado al final del período de dosificación en comparación con el vehículo solo que carece de PBMCs (día 37) fue del 75,7 %. No se observaron problemas de tolerabilidad significativos en el transcurso del estudio con LY3300054 con o sin hPBMCs evidenciado por la carencia de reducciones estadísticamente significativas en la pérdida de peso corporal en comparación con las mediciones de referencia.

Combinación del ejemplo 1A y LY3300054

20 Inyectar ratones NSG (n=10) que portan tumores L55 que hayan alcanzado aproximadamente 250 mm³ con hPBMCs y tratar con 75 mg/kg de Ejemplo 1A dos veces al día por sonda oral durante 21 días y 10 mg/kg LY3300054 por inyección intraperitoneal una vez por semana durante 4 semanas. Medir el volumen del tumor y el peso corporal dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

25 Resultados: El tratamiento combinado de 75 mg/kg del Ejemplo 1A y 10 mg/kg de LY3300054 dio como resultado una mejora en la eficacia antitumoral en comparación con cualquier grupo de monoterapia solo. Los volúmenes tumorales fueron significativamente más bajos que los grupos de vehículos solos que carecían de PBMCs o se les inyectó hPBMCs (P<.001 en todas las mediciones). Los volúmenes tumorales en los días 30, 34, 37 y 41 fueron 9,6 % T/C, 19,8 % T/C, 13,3 % T/C y 27,3 % T/C, respectivamente. La diferencia en la eficacia antitumoral entre los grupos de monoterapia en comparación con el grupo de combinación fue estadísticamente significativa (p <.001). Para evaluar si la combinación fue aditiva o sinérgica, los datos se analizaron esencialmente de la siguiente manera:

Análisis estadístico (ambos modelos):

35 El análisis estadístico de los datos del volumen del tumor comienza con una transformación de datos a una escala logarítmica para igualar la varianza a través del tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos del volumen logarítmico se analizan con un análisis de varianza de mediciones repetidas bidireccionales por tiempo y tratamiento utilizando los procedimientos MIXED en el software SAS (Versión 9.3). El modelo de correlación para las mediciones repetidas es el Spatial Power. Los grupos tratados se comparan con el grupo control en cada punto de tiempo. El procedimiento MIXED también se usa por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores estándar en cada punto de tiempo. Ambos análisis explican la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que ocurre cuando los animales con tumores grandes son retirados del estudio temprano. Las medias ajustadas y los errores estándar (s.e.) se trazan para cada grupo de tratamiento versus tiempo.

Procedimiento de análisis combinado (Bliss Independence para estudios IVEF):

45 Con los resultados del análisis de mediciones repetidas, las declaraciones de contraste se utilizan para probar un efecto de interacción en cada punto de tiempo, comparando la media del vehículo y los grupos de combinación con la media de los dos grupos de agentes individuales. Esto es equivalente al procedimiento Bliss Independence para probar la aditividad. La respuesta aditiva esperada (EAR) para la combinación se calcula en la escala de volumen tumoral como: volumen EAR = $V1 * V2/V0$, donde V0, V1 y V2 son los volúmenes tumorales medios estimados para el control del vehículo, el tratamiento 1 solo, y tratamiento 2 solo, respectivamente. Si la prueba de interacción es significativa, el efecto combinado se declara estadísticamente más que aditivo o menos que aditivo, dependiendo de que el volumen medio de combinación observado sea menor o mayor que el volumen EAR, respectivamente. De otra manera, la conclusión estadística es aditiva.

55 Usando este procedimiento de análisis, la inhibición del crecimiento tumoral no fue mejor que el aditivo hasta los días 34 y 37 donde la inhibición del crecimiento tumoral fue sinérgica con P <0,008 y p <0,001, respectivamente. No se observaron problemas de tolerabilidad significativos en el transcurso del estudio con la combinación del Ejemplo 1A y LY3300054 evidenciada por la carencia de reducciones estadísticamente significativas en la pérdida de peso corporal en comparación con las mediciones de línea base.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de rutas. Lo más preferentemente, tales composiciones son para administración oral o intravenosa. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, et al., eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo el cual, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

El médico encargado del diagnóstico, como un experto en la técnica, puede determinar fácilmente una cantidad efectiva mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, el médico tratante considera una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de participación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la presente invención son generalmente efectivos en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo diario de aproximadamente 0,05-1000 mg. Preferentemente, tales dosis caen dentro del intervalo diario de 0,1-500 mg. Más preferentemente, tales dosis caen dentro del intervalo diario de 1-200 mg. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos antes mencionados pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario dañino, y por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no están destinados a limitar el alcance la invención de ninguna manera. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición que se va a tratar, la ruta de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

Listado de secuencias

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos

SEQ ID NO: 1 (PD-L1 humana)
 MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIV
 YWEMEDKNIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA
 GVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKA
 EVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH
 TAELVIPPLAHPPNERHTLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQD
 TNSKKQSDTHLEET

30 SEQ ID NO: 2 (HCDR1 de LY3300054)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2 de LY3300054)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3 de LY3300054)

35 ARSPDYSPYYYYGMDV

SEQ ID NO: 5 (LCDR1 de LY3300054)

SGSSSNIGSNTVN

SEQ ID NO: 6 (LCDR2 de LY3300054)

YGNSNRPS

40 SEQ ID NO: 7 (LCDR3 de LY3300054)

QSYDSSLGSGSV

SEQ ID NO: 8 (HCVR de LY3300054)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPDYSPYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9 (LCVR de LY3300054)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLGSGSVFGGGIKLTVLG

SEQ ID NO: 10 (HC de LY3300054)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPDYSPYYYYG
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC de LY3300054)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLGSGSVFGGGIKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO: 12 (ADN de HC de LY3300054)

CAGGTCCAGCTGGTCCAGTCAGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGGTCATCTG
 TCAAAGTGTCTTGTAAAGGCATCCGGGGGCACATTTTCCAGCTACGCTATCTCC
 TGGGTGAGACAGGCACCAGGGCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCGGAATCATTC
 CCATCTTCGGGACCGCCAACACTACGCTCAGAAGTTTCAGGGAAGGGTCACTATT
 ACCGCCGACAAAAGCACATCTACTGCTTATATGGAGCTGTCTAGTCTGAGGTC
 TGAAGATAACCGCAGTGTACTATTGCGCCCCGAGTCCCGACTATAGCCCTTACT
 ATTACTATGGCATGGATGTCTGGGGCCAGGGAACCACAGTGACAGTCTCATC
 CGTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA
 CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
 ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
 TCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC
 AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
 AAAGTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCGTCC
 AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
 GTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC
 TGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
 AGCCCTCCCATCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
 ACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGGA
 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA

SEQ ID NO: 13 (ADN de LC de LY3300054)

CAGTCCGTCCTGACACAGCCACCCTCAGCCTCTGGCACCCCTGGGCAGCGAGT
 GACAATCTCTTGTCTGGGAGTTCCTCAAATATTGGTAGTAACACCGTGAATT
 GGTACCAGCAGCTGCCCGGCACAGCACCTAAGCTGCTGATCTATGGAAACTC
 AAATAGGCCATCCGGAGTCCCCGACCGTCTCTGGTAGTAAATCAGGCACTT
 CCGCCAGCCTGGCTATTAGCGGGCTGCAGTCTGAGGACGAAGCCGATTACTA
 TTGCCAGTCTTACGATTCCAGCCTGTCTGGAAGTGTGTTTGGCGGAGGGATCA
 AGCTGACCGTCTGGGCCAGCCTAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG
 CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAG

TGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC
 GTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAACAAAGCAACAACAAG
 TACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACA
 GAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG
 TGGCCCCCTGCAGAATGCTCT

Listado de secuencias

- <110> Eli Lilly and Company
- <120> COMPUESTOS DE 2,3-DIHI-DRO-1H-INDOL
- <130> X21056
- <150> 62/348457
- <151> 2016-06-10
- <160> 13

ES 2 797 981 T3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 1

```

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1           5           10           15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20           25           30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35           40           45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50           55           60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65           70           75           80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85           90           95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100          105          110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115          120          125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130          135          140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145          150          155          160
    
```

ES 2 797 981 T3

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 2

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

10 <210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 3

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

ES 2 797 981 T3

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 4
 Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 5
 10 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 5
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 6
 Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5
 25 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Constructo sintético
 <400> 7
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 123
 35 <212> PRT

ES 2 797 981 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 9

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

ES 2 797 981 T3

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 10

<211> 453

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

ES 2 797 981 T3

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 225 230 235 240

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

ES 2 797 981 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 11

<211> 216

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 11

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

ES 2 797 981 T3

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210 215

<210> 12

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

cagggtccagc tgggtccagtc agggggccgag gtcaaaaagc cagggtcatc tgtcaaagtg 60
tcttgtaagg catccggggg cacattttcc agctacgcta tctcctgggt gagacaggca 120
ccagggcagg gtctggagtg gatgggcgga atcattccca tcttcgggac cgccaactac 180
gctcagaagt ttcaggggaag ggtcactatt accgccgaca aaagcacatc tactgcttat 240
atggagctgt ctagtctgag gtctgaagat accgcagtgt actattgctc ccggagtccc 300
gactatagcc cttactatta ctatggcatg gatgtctggg gccagggaac cacagtgaca 360
gtctcatccg ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaga 660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaagcc 720
gagggggcac cgtcagctctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 780
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
ttcaactggt atgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca agactggctg 960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaagccc tccatcctc catcgagaaa 1020

ES 2 797 981 T3

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080
 cgggaggaga tgaccaagaa ccaagtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200
 cctccogtgc tggactccga cggctccttc ttcctctatt ccaagctcac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1320
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggcaaa 1359

<210> 13

<211> 648

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

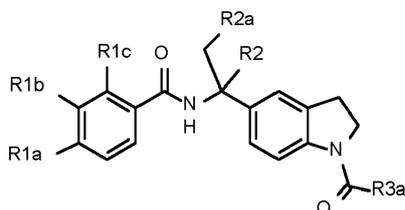
<400> 13

cagtccgtcc tgacacagcc accctcagcc tctggcacc ctagggcagcg agtgacaatc 60
 tcttgttctg ggagttcctc aaatattggt agtaacaccg tgaattggta ccagcagctg 120
 cccggcacag cacctaagct gctgatctat ggaaactcaa ataggccatc cggagtcccc 180
 gaccggttct ctggtagtaa atcaggcact tccgccagcc tggctattag cgggctgcag 240
 tctgaggacg aagccgatta ctattgccag tcttacgatt ccagcctgtc tggaaagtgtg 300
 tttggcggag ggatcaagct gaccgtcctg gccagccta aggctgcccc ctcggtcact 360
 ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata 420
 agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 480
 gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540
 tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600
 catgaagga gcaccgtgga gaagacagtg gccctgcag aatgctct 648

10

REIVINDICACIONES

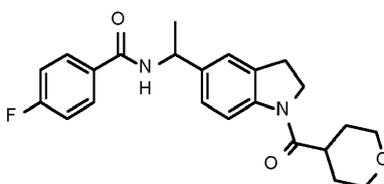
1. Un compuesto de fórmula:



en la que

- 5 R1a es hidrógeno, metilo, etenilo, ciano, fluoro, cloro, fluorometilo, o difluorometilo;
 R1b es hidrógeno, fluoro, o cloro;
 R1c es hidrógeno, hidroxilo, fluoro, benciloxi, o hidroxietilamino;
 R2 es hidrógeno o metilo;
 R2a es hidrógeno o metilo; y
 10 R3a es tetrahidropirano.

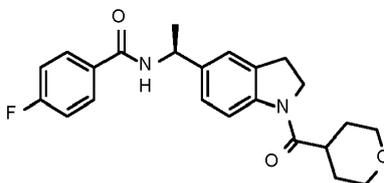
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es:



3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es:



15 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es



5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etil)benzamida cristalina.

20 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, que es 4-fluoro-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-piran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etil)benzamida cristalina **caracterizada por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (radiación de Cu, λ -1,54060 Å) que comprende al menos un pico a 17,38° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 12,51°, 15,65°, 16,37°, 17,56°, 21,48° y 25,23° ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en terapia.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento del cáncer.

5 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, glioma, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.