

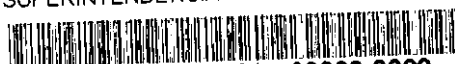


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

PROPIEDAD INDUSTRIAL

Delegatura de Propi
División de Nueva

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180821- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 14:38:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: MIMETICO DE SMAC

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07D 217/00

71. SOLICITANTE: TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORP.

DOMICILIO: 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180821-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 14:38:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

ión

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORP.**

Dirección: **343 Phoenixville Pike
Malvern, PA 19355**

Nacionalidad o Domicilio: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Malvern, PA

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Lugar de Constitución: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**

Teléfono: **756 0770** Fax: **755 0158**

E-mail: **info@castellanosyco.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número **39'779.654** TPA **70.819**

④

INVENTOR (ES) (72)

STEPHEN M. CONDON

343 Phoenixville Pike

Malvern, PA 19355

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

MATTHEW G. LAPORTE

343 Phoenixville Pike

Malvern, PA 19355

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

YIJUN DENG

343 Phoenixville Pike

Malvern, PA 19355

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

SUSAN R. RIPPIN

343 Phoenixville Pike

Malvern, PA 19355

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2010/039976

Fecha

25/06/2010

Publicación Internacional No.

WO 2011/002684 A1

Fecha

06/01/2011

⑥

Título (54)

MIMETICO DE SMAC

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07D 217/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

02/07/2009

61/222,668

US

20/06/2010

12/819,221

⑨

Comprobante de pago No.

11-124246 y 11-124247

Fecha

Diciembre 21 de 2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

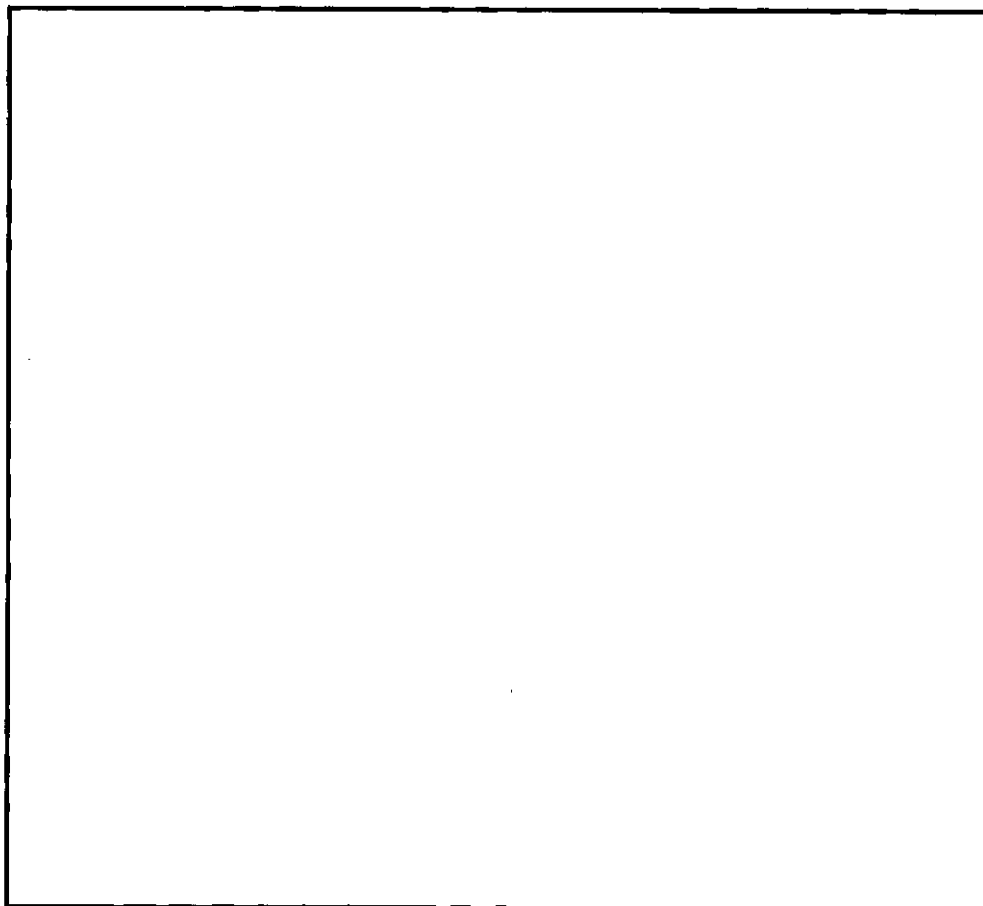
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 39.779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

29 JUL. 2011



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 124246

Bogotá D.C., Diciembre 21 de 2011 - 14:18:04

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

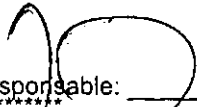
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420505551	21/12/2011	14.405.900.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180821- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 14:38:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2
- / -

0000004



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 124247

Bogotá D.C., Diciembre 21 de 2011 - 14:18:04

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420505551	21/12/2011	14.405.900.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
9	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	243.000.00
				\$243.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180821- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 14:38:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 21 de 2011 - 14:18:08

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 January 2011 (06.01.2011)

PCT

(10) International Publication Number

WO 2011/002684 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 217/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/039976

(22) International Filing Date:

25 June 2010 (25.06.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/222,668	2 July 2009 (02.07.2009)	US
12/819,221	20 June 2010 (20.06.2010)	US

(71) Applicant (for all designated States except US):
TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORP. [US/
US]; 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CONDON, Stephen, M.** [US/US]; 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355 (US). **DENG, Yijun** [US/US]; 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355 (US). **LAPORTE, Matthew, G.** [US/US]; 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355 (US). **RIPPIN, Susan, R.** [US/US]; 343 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355 (US).(74) Agent: **SKERPON, Joseph, M.**; Banner & Witcoff, Ltd.,
1100 13th Street, N.W., Suite 1200, Washington, DC
20005-4051 (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SMAC MIMETIC

(57) Abstract: A SMAC mimetic and pharmaceutical compositions thereof and methods of use.

WO 2011/002684 A1

SMAC MIMETIC

Field of the Invention

This invention is in the field of SMAC mimetics and compositions and uses thereof to treat proliferative disorders including cancers.

Background of the Invention

Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs) are naturally occurring intra-cellular proteins that suppress caspase-dependent apoptosis. SMAC, also known as DIABLO, is another intracellular protein that functions to antagonize, i.e., inhibit the activity of IAPs. In normal healthy cells, SMAC and IAPs function together to maintain healthy cells. However, in certain disease states, e.g., cancers and other proliferative disorders, IAPs are not adequately antagonized and therefore prevent apoptosis and cause or exacerbate abnormal proliferation and survival.

SMAC mimetics, also known as IAP antagonists, are synthetic small molecules that mimic the structure and IAP antagonist activity of the four N-terminal amino acids of SMAC. (SMAC mimetics are sometimes referred to as IAP antagonists.) When administered to animals suffering proliferative disorders, the SMAC mimetics antagonize IAPs, causing an increase in apoptosis among abnormally proliferating cells.

Examples of SMAC peptidomimetics are those disclosed in US 7,517,906; US 7,309,792; US 7,419,975; US 2005/0234042; US 2005/0261203; US 2006/0014700; US 2006/0025347; US 2006/0052311; US 2006/0128632; US 2006/0167066; US 2007/0042428; US 2007/032437; US 2008/0132485; WO 2005/069888; WO 2005/069894; WO 2006/010118; WO 2006/122408; WO 2006/017295; WO 2006/133147; WO 2006/128455; WO 2006/091972; WO 2006/020060; WO 2006/014361; WO 2006/097791; WO 2005/094818; WO 2008/045905; WO 2008/016893; WO 2007/136921; WO 2007/021825; WO 2007/130626; WO 2007/106192; and WO 2007/101347.

Summary of the Invention

This invention, in one aspect, is N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-(4S-hydroxy-1-[2S-(2S-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2R-ylmethyl)}-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-4S-hydroxy-pyrrolidine-1-carbonyl]-propyl}-2S-methylamino-propionamide and

This compound has the following structure:



In a further illustrative embodiment, the invention comprises a method of treating an autoimmune disease, in which the condition is caused or exacerbated by abnormal regulation

of apoptosis, in a mammal in need thereof, including, for example, systemic lupus erythematosus, psoriasis, and idiopathic thrombocytopenic purpura (Morbus Werlhof) that comprises internally administering to the animal an effective amount of Compound 15 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows percent mean body weight loss in rat following 4 days of intravenous bolus dosing with SMAC mimetics substantially as described in Example 4.

Figure 2 shows mean tumor volume (2A) and body weight change (2B) resulting from treatment of human xenografts in nude mice with SMAC mimetics substantially as described in Example 5.

Detailed Description of the Invention

The compound of the invention is a SMAC mimetic that can be used in the treatment of proliferative disorders, e.g.: various benign tumors or malignant tumors (cancer), benign proliferative diseases (e.g., psoriasis, benign prostatic hypertrophy, and restenosis), or autoimmune diseases (e.g., autoimmune proliferative glomerulonephritis, lymphoproliferative autoimmune responses). Cancers which potentially can be treated with IAP antagonists include, but are not limited to, one or more of the following: lung adenocarcinoma, pancreatic cancer, colon cancer, ovarian cancer, breast cancer, mesothelioma, peripheral neuroma, bladder cancer, glioblastoma, melanoma, adrenocortical carcinoma, AIDS-related lymphoma, anal cancer, bladder cancer, meningioma, glioma, astrocytoma, breast cancer, cervical cancer, chronic myeloproliferative disorders (e.g., chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia), colon cancer, endocrine cancers, endometrial cancer, ependymoma, esophageal cancer, Ewing's sarcoma, extracranial germ cell tumors, extragonadal germ cell tumors, extrahepatic bile duct cancer, gallbladder cancer, gastric cancer, gastrointestinal carcinoid tumors, gestational trophoblastic tumors, hairy cell leukemia, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, hypopharyngeal cancer, intraocular melanoma, islet cell carcinoma, Kaposi sarcoma, laryngeal cancer, leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, lip cancer, oral cavity cancer, liver cancer, male breast cancer, malignant mesothelioma, medulloblastoma, melanoma, Merkel cell carcinoma, metastatic squamous neck cancer, multiple myeloma and other plasma cell neoplasms, mycosis fungoides and the Sezary syndrome, myelodysplastic syndromes, nasopharyngeal cancer, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, oropharyngeal cancer, bone cancers, including osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone, ovarian epithelial cancer, ovarian

germ cell tumors, ovarian low malignant potential tumors, pancreatic cancer, paranasal sinus cancer, parathyroid cancer, penile cancer, pheochromocytoma, pituitary tumors, prostate cancer, rectal cancer, renal cell cancer, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, salivary gland cancer, skin cancer, small intestine cancer, soft tissue sarcoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumors, pineoblastoma, testicular cancer, thymoma, thymic carcinoma, thyroid cancer, transitional cell cancer of the renal pelvis and ureter, urethral cancer, uterine sarcoma, vaginal cancer, vulvar cancer, and Wilm's tumor and other childhood kidney tumors.

Some embodiments of the invention include inducing apoptosis of cells, particularly pathologically proliferating cells. The methods can be carried out *in vitro* or *in vivo*.

The methods of the invention can include administration of the compound of the invention alone, administration of a combination of IAP antagonists, or administration of the compound of the invention, with or without one or more additional IAP antagonists, and one or more additional chemotherapeutic agents. Administration of multiple agents can be simultaneous or sequential. Useful chemotherapeutic agents include, but are not limited to, alkylating agents (e.g., cyclophosphamide, mechlorethamine, chlorambucil, melphalan), anthracyclines (e.g., daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantrone, valrubicin), cytoskeletal disruptors (e.g., paclitaxel, docetaxel), epothilones (e.g., epothilone A, epothilone B, epothilone D), inhibitors of topoisomerase II (e.g., etoposide, teniposide, tafuposide), nucleotide analogs precursor analogs (e.g., azacitidine, azathioprine, capecitabine, cytarabine, doxifluridine, fluorouracil, gemcitabine, mercaptopurine, methotrexate, tioguanine), peptide antibiotics (e.g., bleomycin), platinum-based agents (e.g., carboplatin, cisplatin, oxaliplatin), retinoids (e.g., all-trans retinoic acid), and vinca alkaloids and derivatives (e.g., vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine). In some embodiments, chemotherapeutic agents include fludarabine, doxorubicin, paclitaxel, docetaxel, camptothecin, etoposide, topotecan, irinotecan, cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, amsacrine, mitoxantrone, 5-fluoro-uracil, or gemcitabine.

In some embodiments of the invention, pharmaceutical compositions comprising the compound of the invention, alone or in combination with one or more other active pharmaceutical ingredients, are administered to a human or veterinary subject. The pharmaceutical compositions typically comprise at least one pharmaceutically acceptable excipient, e.g., a carrier or diluent, and can be administered in the conventional manner by routes including systemic, topical, or oral routes. Administration is normally by intravenous

injection, either as a bolus or infusion, but other routes of administration are not precluded. An intravenous formulation can be 1 mg/mL of Compound 15 in sterile 0.05M citrate buffered PBS, pH5. Specific modes of administration will depend on the indication and other factors including the particular compound being administered. The amount of compound to be administered is that amount which is therapeutically effective. The dosage to be administered will depend on the characteristics of the subject being treated, e.g., the particular patient treated, age, weight, health, types of concurrent treatment, if any. Frequency of treatments can be easily determined by one of skill in the art (e.g., by the clinician).

Typically, the compound of the invention will be administered by intravenous injection, including, e.g., by infusion over about 1 to about 120 minutes, e.g., about 30 minutes.

The pharmaceutical composition of the invention is a composition in which the active pharmaceutical ingredient, i.e., the compound of the invention, is pure enough, and the composition is otherwise suitable, for internal administration to a human or other mammal. It can be prepared in unit dose form, i.e., a form suitable for single administration to a subject. So, e.g., a pharmaceutical composition in intra-venous unit dose form may comprise a vial or pre-filled syringe, each comprising an effective amount or a convenient fraction of an effective amount such that one the contents of one vial or syringe are administered at a time. Such administration can be repeated up to about 4 times per day over a period of time, if necessary to achieve a cumulative effective dose, e.g., tumor regression. A dosing regimen can be, e.g., daily or twice-weekly intravenous injections, or, e.g., weekly injections in cycles of three weeks on and one week off for as long as the treatment is effective, e.g., until disease progresses or the drug is not tolerated. The effective dose administered in each injection is an amount that is effective and tolerated; it can be, e.g., 0.01 to 30 mg/m², e.g., 0.2 to 10 mg/m², or, e.g., 0.5 to 5 mg/m².

The compound of the invention can also be applied locally, such as in isolated limb perfusion. The compound of the invention can also be applied topically, e.g., as a cream, gel, lotion, or ointment, or in a reservoir or matrix-type patch, or in an active transdermal delivery system.

An effective dose is one that over the course of therapy, which may be, e.g., 1 or more weeks, e.g., multiple courses of 3 weeks on/1 week off, results in treatment of the proliferative disorder, i.e., a decrease in the rate of disease progression, termination of disease progression, or regression or remission.

Pharmaceutical compositions to be used comprise a therapeutically effective amount of a compound as described above, or a pharmaceutically acceptable salt or other form thereof together with one or more pharmaceutically acceptable excipients. The phrase "pharmaceutical composition" refers to a composition suitable for administration in medical use. It should be appreciated that the determinations of proper dosage forms, dosage amounts, and routes of administration for a particular patient are within the level of ordinary skill in the pharmaceutical and medical arts.

Compositions suitable for parenteral administration conveniently comprise a sterile aqueous preparation of the compound of the invention, which is preferably isotonic with the blood of the recipient. This aqueous preparation may be formulated according to known methods using suitable carriers or diluents which may include a buffer.

When practicing the conjoint or combination therapy described in more detail below, the administration of the compound and compositions of the present invention can occur simultaneous with, subsequent to, or prior to chemotherapy or radiation, so long as the chemotherapeutic agent or radiation sensitizes the system to the compound and compositions of the present invention.

The present invention also is directed to the use of the compound and compositions as a chemopotentiating agent with other treatment approaches. The term "chemopotentiating agent" refers to an agent that acts to increase the sensitivity of an organism, tissue, or cell to a chemical compound, or treatment namely "chemotherapeutic agents" or "chemo drugs" or to radiation treatment. Thus, compound and compositions of the present invention can be used for inhibiting tumor growth in vivo by administering them in combination with a biologic or chemotherapeutic agent or by using them in combination with radiation. In these applications, the administration of the compound and compositions of the present invention may occur prior to, and with sufficient time, to cause sensitization of the site to be treated. Alternatively, the compound and compositions of the present invention may be used contemporaneously with radiation and/or additional anti-cancer chemical agents (*infra*). Such systems can avoid repeated administrations of the compound and compositions of the present invention, increasing convenience to the subject and the physician, and may be particularly suitable for certain compositions of the present invention.

Biological and chemotherapeutics/anti-neoplastic agents and radiation induce apoptosis by activating the extrinsic or intrinsic apoptotic pathways, and, since the compound and compositions of the present invention relieve antagonists of apoptotic proteins (IAPs) and,

thus, remove the block in apoptosis, the combination of chemotherapeutics/anti-neoplastic agents and radiation with the compound and compositions of the present invention should work additively or synergistically to facilitate apoptosis.

A combination of the compound of the present invention and a biological or chemotherapeutic/anti neoplastic agent and/or radiation therapy of any type that activates the extrinsic or intrinsic pathway may provide a more effective approach to destroying tumor cells. The compound of the present invention interacts with IAP's, such as XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP, etc., and removes the IAP mediated block of apoptosis. Most chemotherapeutics/anti neoplastic agents and/or radiation therapy kills actively dividing cells by activating the intrinsic apoptotic pathway leading to apoptosis and cell death. Biological antitumor agents such as TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) activate extrinsic apoptotic pathways. As is described in more detail below, embodiments of the invention provide combinations of the compound of the present invention and a biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agent and/or radiation which provide a synergistic action against unwanted cell proliferation. This synergistic action between the compound of the present invention and a biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agent and/or radiation therapy can improve the efficiency of the biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agent and/or radiation therapies. This will allow for an increase in the effectiveness of current biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agents or radiation treatments allowing a higher percentage of tumors to respond to the therapy, an improved tumor response, and, potentially, a reduction in the dose of the biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agent needed to treat a tumor, thereby providing the use of a more tolerable dose of biological or chemotherapeutic/anti-neoplastic agent and/or radiation.

In an embodiment of the present invention, the patient is treated by administering the compound or a pharmaceutical composition of the present invention at a time the patient is subject to concurrent or antecedent radiation or chemotherapy for treatment of a neoproliferative pathology of a tumor such as, but not limited to, bladder cancer, breast cancer, prostate cancer, lung cancer, pancreatic cancer, gastric cancer, colon cancer, ovarian cancer, renal cancer, hepatoma, melanoma, lymphoma, sarcoma, and combinations thereof. In another embodiment of the present invention, the compound or a composition of the present invention can be administered in combination with a biological or chemotherapeutic and/or for use in combination with radiotherapy, immunotherapy, and/or photodynamic

therapy, promoting apoptosis and enhancing the effectiveness of the chemotherapeutic, radiotherapy, immunotherapy, and/or photodynamic therapy.

Embodiments of the invention also include a method of treating a patient afflicted with cancer by the contemporaneous or concurrent administration of a biological or chemotherapeutic agent. Such biological or chemotherapeutic agents include but are not limited to the chemotherapeutic agents described in "Modern Pharmacology with Clinical Applications", Sixth Edition, Craig & Stitzel, Chpt. 56, pg 639-656 (2004), herein incorporated by reference. The chemotherapeutic agent can be, but is not limited to, alkylating agents, antimetabolites, anti-tumor antibiotics, plant-derived products such as taxanes, enzymes, hormonal agents, miscellaneous agents such as cisplatin, monoclonal antibodies, glucocorticoids, mitotic inhibitors, topoisomerase I inhibitors, topoisomerase II inhibitors, immunomodulating agents such as interferons, cellular growth factors, cytokines, and nonsteroidal anti-inflammatory compounds (NSAID), cellular growth factors and kinase inhibitors. Other suitable classifications for chemotherapeutic agents include mitotic inhibitors, and anti-estrogenic agents.

Specific examples of suitable biological and chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, carmustine (BCNU), 5-fluorouracil (5-FU), cytarabine (Ara-C), gemcitabine, methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, dexamethasone, topotecan, etoposide, paclitaxel, vincristine, tamoxifen, TNF-alpha, TRAIL and other members, i.e., other than TRAIL and TNF-alpha, of the TNF superfamily of molecules, interferon (in both its alpha and beta forms), thalidomide, thalidomide derivatives such as lenalidomide, melphalan, and PARP inhibitors. Other specific examples of suitable chemotherapeutic agents include nitrogen mustards such as cyclophosphamide, alkyl sulfonates, nitrosoureas, ethylenimines, triazenes, folate antagonists, purine analogs, pyrimidine analogs, anthracyclines, bleomycins, mitomycins, dactinomycins, plicamycin, vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes, glucocorticoids, L-asparaginase, estrogens, androgens, progestins, luteinizing hormones, octreotide acetate, hydroxyurea, procarbazine, mitotane, hexamethylmelamine, carboplatin, mitoxantrone, monoclonal antibodies, levamisole, interferons, interleukins, filgrastim and sargramostim.

Another embodiment of the present invention relates to the use of the compound or a composition of the present invention in combination with topoisomerase inhibitors to potentiate their apoptotic inducing effect. Topoisomerase inhibitors inhibit DNA replication and repair, thereby promoting apoptosis and are used as chemotherapeutic agents.

Topoisomerase inhibitors promote DNA damage by inhibiting the enzymes that are required in the DNA repair process. Therefore, export of Smac from the mitochondria into the cell cytosol is provoked by the DNA damage caused by topoisomerase inhibitors. Topoisomerase inhibitors of both the Type I class (camptothecin, topotecan, SN-38 (irinotecan active metabolite) and the Type II class (etoposide) are expected to show potent synergy with compounds of the present invention. Further examples of topoisomerase inhibiting agents that may be used include, but are not limited to, irinotecan, topotecan, etoposide, amsacrine, exatecan, gimatecan, etc. Other topoisomerase inhibitors include, for example, Aclacinomycin A, camptothecin, daunorubicin, doxorubicin, ellipticine, epirubicin, and mitaxantrone.

Another embodiment of the present invention relates to the use of the compound or a composition of the present invention in combination with nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs).

In another embodiment of the invention, the chemotherapeutic/anti-neoplastic agent for use in combination with the compound and compositions of the present invention may be a platinum containing compound. In one embodiment of the invention, the platinum containing compound is cisplatin. Cisplatin can synergize with a compound of the present invention and potentiate the inhibition of an IAP, such as but not limited to XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. In another embodiment a platinum containing compound is carboplatin.

Carboplatin can synergize with a compound of the present invention and potentiate the inhibition of an IAP, including, but not limited to, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. In another embodiment a platinum containing compound is oxaliplatin. The oxaliplatin can synergize with a compound of the present invention and potentiate the inhibition of an IAP, including, but not limited to, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc.

Platinum chemotherapy drugs belong to a general group of DNA modifying agents. DNA modifying agents may be any highly reactive chemical compound that bonds with various nucleophilic groups in nucleic acids and proteins and cause mutagenic, carcinogenic, or cytotoxic effects. DNA modifying agents work by different mechanisms, disruption of DNA function and cell death; DNA damage/the formation of cross-bridges or bonds between atoms in the DNA; and induction of mispairing of the nucleotides leading to mutations, to achieve the same end result. Three non-limiting examples of a platinum containing DNA modifying agents are cisplatin, carboplatin and oxaliplatin.

Yet another embodiment of the present invention is the therapeutic combination or the therapeutic use in combination of the compound or compositions of the present invention with TRAIL or TRAIL agonist antibodies, or other chemical or biological agents which bind to and activate the TRAIL receptor(s). Many cancer cell types are sensitive to TRAIL-induced apoptosis, while most normal cells appear to be resistant to this action of TRAIL. TRAIL-resistant cells may arise by a variety of different mechanisms including loss of the receptor, presence of decoy receptors, overexpression of FLIP which competes for zymogen caspase-8 binding during DISC formation **and** inhibition of activated caspase-3 and/or caspase-9 by XIAP. In TRAIL resistance, a compound or composition of the present invention may increase tumor cell sensitivity to TRAIL leading to enhanced cell death, the clinical correlations of which are expected to be increased apoptotic activity in TRAIL resistant tumors, improved clinical response, increased response duration, and ultimately, enhanced patient survival rate.

In another embodiment of the invention, Compound 15 is administered in combination with a cytokine, e.g., TNF α .

The compound and compositions of the present invention also can be used to augment radiation therapy (or radiotherapy), *i.e.*, the medical use of ionizing radiation as part of cancer treatment to control malignant cells. Although radiotherapy is often used as part of curative therapy, it is occasionally used as a palliative treatment, where cure is not possible and the aim is for symptomatic relief. Radiotherapy is commonly used for the treatment of tumors. It may be used as the primary therapy. It is also common to combine radiotherapy with surgery and/or chemotherapy. The most common tumors treated with radiotherapy are breast cancer, prostate cancer, rectal cancer, head & neck cancers, gynecological tumors, bladder cancer and lymphoma. Radiation therapy is commonly applied just to the localized area involved with the tumor. Often the radiation fields also include the draining lymph nodes. It is possible but uncommon to give radiotherapy to the whole body, or entire skin surface. Radiation therapy is usually given daily for up to 35-38 fractions (a daily dose is a fraction). These small frequent doses allow healthy cells time to grow back, repairing damage inflicted by the radiation. Three main divisions of radiotherapy are external beam radiotherapy or teletherapy, brachytherapy or sealed source radiotherapy and unsealed source radiotherapy, which are all suitable examples of treatment protocol in the present invention. The differences relate to the position of the radiation source; external is outside the body, while sealed and unsealed source radiotherapy has radioactive material delivered internally.

Brachytherapy sealed sources are usually extracted later, while unsealed sources are injected into the body.

Compound 15 is capable of forming pharmaceutically acceptable salts, including but not limited to acid addition and/or base addition salts. Such salts are included within all aspects of the invention.

It is intended that the present invention encompass Compound 15 synthesized in vitro using laboratory techniques, such as those well known to synthetic chemists; or synthesized using in vivo techniques, such as through metabolism, fermentation, digestion, and the like. It is also contemplated that the compound of the present invention may be synthesized using a combination of in vitro and in vivo techniques.

The present invention also includes isotopically-enriched compounds, which are identical to Compound 15 but for the fact that one or more atoms are replaced by an atom having an atomic mass or mass number different from the atomic mass or mass number usually found in nature. Examples of isotopes that can be included in the invention include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorous, fluorine and chlorine, such as ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , and ^{36}Cl . Substitution with heavier isotopes such as deuterium, i.e., ^2H , are also included. Isotopically enriched compounds of this invention can generally be prepared by substituting a readily available isotopically labelled reagent for a non-isotopically enriched reagent. For example, incorporation of deuterium can be accomplished by substituting sodium borohydride with *d4*-sodium borohydride, or by replacing iodomethane with *d3*-iodomethane. Representative examples of specific deuterated analogs and their preparation are described in Example 1.

Compound 15 may exist in unsolvated forms as well as solvated forms, including hydrated forms. Furthermore, Compound 15 may exist in various solid states including crystalline, semi-crystalline and amorphous (noncrystalline) forms, and in the form of clathrates, prodrugs, polymorphs, bio-hydrolyzable esters, racemic mixtures, non-racemic mixtures, or as purified stereoisomers including, but not limited to, optically pure enantiomers and diastereomers. In general, all of these and other such forms are intended to be encompassed within the scope of the term, Compound 15.

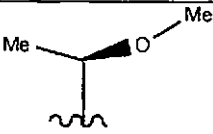
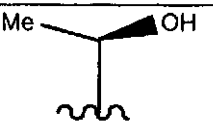
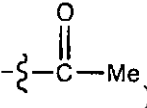
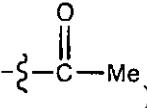
References to Compound 15 and to the compound of the invention, and other similar phrases in this specification and in the claims, are intended to include not only the compound of formula (I), but also pharmaceutically acceptable salts of Compound 15, as well as various forms of said compound or salts thereof such as those that are described above and below.

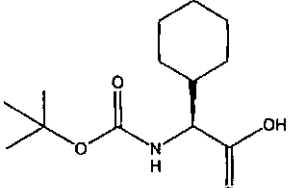
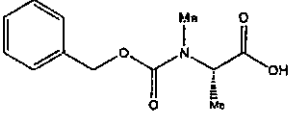
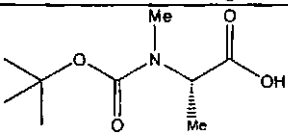
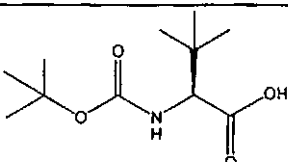
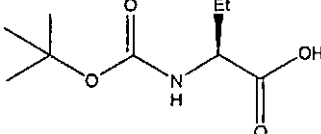
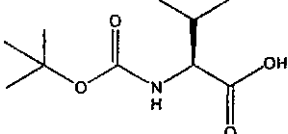
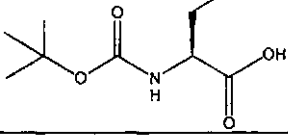
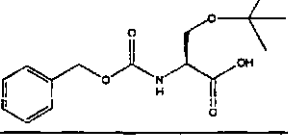
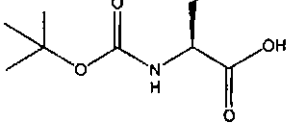
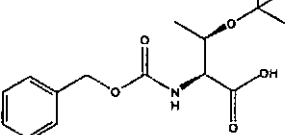
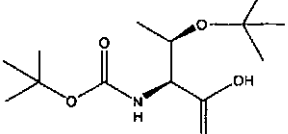
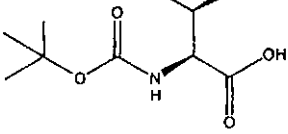
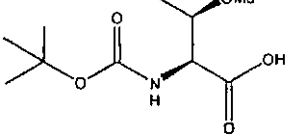
In additional embodiments, the invention comprises compounds useful as intermediates in the synthesis of Compound 15, as well as in processes for preparing such intermediates and Compound 15. For example, in such embodiments, the invention comprises compounds shown in the Examples, below, such as Compounds 9, 10, 11, 12, 13, 14, and the isotopically enriched compounds such as Compounds 18 through 32. One such embodiment is Compound 15 in which the 4-OH substituent on the pyrrolidine moiety is protected with a protecting group. An illustrative protecting group is an acetyl group, which is illustrated in Compounds 11-14, below. Other useful protecting groups will be apparent to persons of skill in the art and include, e.g., benzoyl, benzyl, trimethylsilyl, and triphenylmethyl groups. The protecting group is removed, e.g., by contacting the protected intermediate with an acid or a base, as shown in Schemes XIII and XIV, below. Thus, the invention comprises the compound having the structure of Compound 15 as well as protected versions of Compound 15 such as Compounds 13 and 14 in which the N-termini are protected with carbamate moieties and/or free hydroxyl groups are protected as esters such compounds being herein referred to as Protected Compound 15. The invention further comprises the step of deprotecting a Protected Compound 15 by contacting the Protected Compound 15 with an acid or base whereby the Protecting Group is removed to afford Compound 15. Isotopically enriched compounds of the invention include deuterated forms of Compound 15 such as Compounds 20, 29, and 32. Protected forms of such compounds, e.g., Compounds 19, 28, and 31, are also comprised within the invention.

Examples

The following preparations and schemes are illustrative of synthesis of compounds of the present invention. Abbreviations which are used throughout these schemes and in the application generally, are identified in the following table:

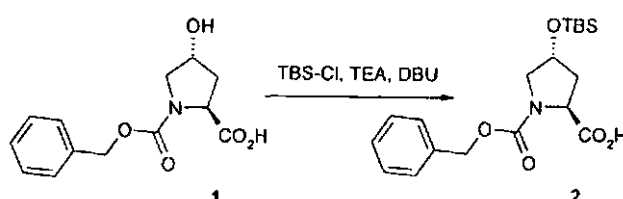
<u>ABBREVIATION</u>	<u>MEANING</u>	<u>ABBREVIATION</u>	<u>MEANING</u>
ACN	Acetonitrile	NMP	N-methylpyrrolidinone
Ac ₂ O	Acetic anhydride	PhCOCl	Benzoyl chloride
Cbz and Z	Benzyloxycarbonyl	DIAD	diisopropyl azo dicarboxylate
Boc and/or boc	tert-butyloxycarbonyl	DIBAL	Diisobutylaluminium hydride
THF	Tetrahydrofuran	DMAP	4-dimethylamino pyridine
DCM	Dichloromethane	DMF	Dimethylformamide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	DMSO	dimethyl sulfoxide

mCPBA	3-chloroperbenzoic acid	TFA	trifluoroacetic acid
Cbz-Cl	Benzyloxycarbonyl chloride	TFAA	trifluoroacetic anhydride
Hex	Hexanes	HOAc or AcOH	acetic acid
HPLC	high performance liquid chromatography	DIPEA	Diisopropylethylamine
TLC	thin layer chromatography	NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
EtOAc	ethyl acetate	NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
Ph	Phenyl	TEA (Et ₃ N)	Triethylamine
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	MsCl	Methane-sulfonylchloride
Me	Methyl*	Et	Ethyl
<i>i</i> Pr	Iso-propyl	<i>t</i> Bu or <i>tert</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
cPr	Cyclopropyl	cHex	Cyclohexyl
(2 <i>R</i> -EtOMe) and/or <i>R</i> -MeCHOMe		(2 <i>R</i> -EtOH) and/or <i>R</i> -MeCHOH	
TBAF	tetrabutyl ammonium fluoride	MsCl	Methanesulfonyl chloride
OMs	Methanesulfonyloxy	OTs	-O-SO ₂ -Ph-Me
TBDMSCl or TBSCl	tert-butyl-dimethyl-silyl chloride	OTBS	tert-butyl-dimethyl-silanyloxy
Ph ₃ P	Triphenylphosphine	Ac	 Acetyl ()
<i>n</i> -Bu	Normal butyl	DMA	Dimethylamine
Swern[O]	Swern Oxidation	HWE	Honer-Wadsworth-Emmons reaction
TBA-Cl	Tetra- <i>n</i> -butyl ammonium chloride	DMS	Dimethylsulfide
NP-HPLC	Normal phase-high performance liquid chromatography	Meldrum's Acid	2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione
EDCI	N-3-(dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide-HCl	Imid.	Imidazole

Et ₂ O	Ethylene oxide ()	HOBT, or HBT	Hydroxybenzotriazole
TES	Triethylsilane	RT	Room temperature
MeNO ₂	Nitromethane	MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol	NaOAc	Sodium acetate
DCE, or EDC	Dichloroethane, Ethylenedichloride	ClCO ₂ Me	Ethyl chloroformate
NaHMDS	Sodium hexamethyldisilazide or sodium bis(trimethylsilyl)amide	TBSCl	tert-butyl-dimethyl-silanyl chloride
Boc-Chg-OH (Boc-L-cyclohexylglycine)		Cbz-N(Me)Ala-OH Z-N(Me)Ala-OH	
Boc-N(Me)Ala-OH		Boc-Tlc-OH	
Boc-Abu-OH		Boc-Val-OH	
Boc-Ser-OH		Cbz-Ser(tBu)-OH	
Boc-Ser(Me)-OH		Cbz-Thr(tBu)-OH	
Boc-Thr(tBu)-OH		Boc-Thr-OH	
Boc-Thr(Me)-OH		PSI	Pounds per Square Inch (Gauge)
h	hour	NaOMe	Sodium methoxide

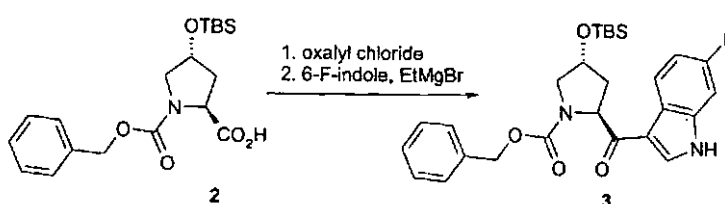
Example 1 – Synthesis

Scheme I



4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-benzyl ester (2): A solution of Z-Hyp-OH (**1**, 300 g, 1.13 mol), TEA (395 mL, 2.83 mol), and DBU (17.2 g, 1.13 mol) in DMF (1.25 L) was stirred in a cold water bath while a suspension of TBS-Cl (188 g, 1.24 mol) in DMF (270 mL) was added slowly at 21-26 °C [Note: moderately exothermic]. The resulting thin suspension was stirred for 22 h at ambient temperature. The reaction mixture was cooled to 2 °C and quenched with water (1.54 L) at ≤ 26 °C [Note: the pH of the aqueous layer was 8.5-9.0]. MTBE (3 L) was added and the mixture was acidified to pH 3-4 with conc. HCl (168 g) at 17-19 °C. The organic layer was separated and washed with water (2 × 1.5 L). The organic layer was concentrated *in vacuo* and dried by additional MTBE distillation. Toluene (2 × 500 mL) was added and distilled to remove moisture to provide 603 g of **2** as a light yellow-colored oil [Note: the water content by KF analysis was 508 ppm]. Based on drying a small sample of **2** to a solid, the contained weight of **2** was 412 g (96% yield, not corrected for purity). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.34 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 5.24-5.11 (m, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.64-3.42 (m, 2H), 2.27-2.09 (m, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.04 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, d₆-DMSO), mixture of rotomers: δ 178.7, 178.4, 159.3, 158.9, 141.9, 141.8, 133.4, 133.3, 132.8, 132.6, 132.3, 131.9, 75.3, 74.6, 71.0, 71.0, 62.8, 62.3, 60.1, 59.7, 44.4, 43.4, 30.6, 30.6, 22.6, 22.6, 0.1, 0.0 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 379.5 [(M)⁺; calcd for C₁₉H₂₉NO₅Si: 379.5].

Scheme II

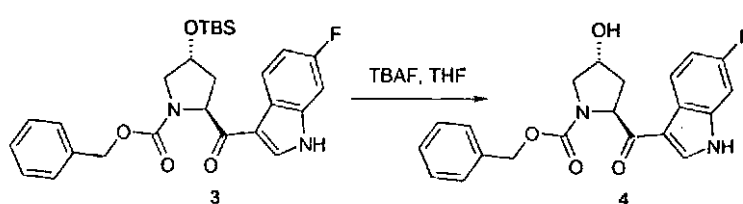


4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-2-(6-fluoro-1H-indole-3-carbonyl)-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (3): Z-Hyp(OTBS)-OH (**2**, 55.5 g, 145 mmol) was dissolved in toluene (265 mL). DMF (0.1 mL) and oxalyl chloride (22.4 g, 174 mmol) were added at ambient temperature. After 2-3 h, the bubbling stopped. After 4 h, the mixture was

concentrated *in vacuo* (65 °C bath, ca. 30 min) to provide 95 g of a light yellow-colored solution which was confirmed to be acid chloride by ^1H NMR analysis.

6-Fluoroindole (39.2 g, 290 mmol) was dissolved in anhydrous chlorobenzene (300 mL) and toluene (200 mL) and the solution was cooled to -4 °C using an ice/acetone bath. A solution of 3M EtMgBr in diethyl ether (101 g, 294 mmol) was added over 31 minutes at ≤ 2.5 °C resulting in a pale amber-colored solution. After 30 min, the acid chloride/toluene solution (*vide supra*) was added over 45 minutes at < 2 °C. The reaction mixture was kept cold for 1 h then allowed to slowly warm. After ca. 4 h (10.6 °C), the reaction mixture was quenched with glacial HOAc (9.0 g, exothermic to 17.5 °C) and then water (exothermic). Water (200 mL) and EtOAc (300 mL) were added and the organic layer was separated and washed with water (100 mL, slow separation). The organic layer was concentrated *in vacuo* to afford 227 g of **3** as an amber-colored oil which was used without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), ~2:1 mixture of rotomers: δ 9.38 (m, 0.7H), 8.58 (m, 0.3H), 8.35 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.3H), 8.03 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.7H), 7.74 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.7H), 7.66 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.3H), 7.38-7.32 (m, 5H), 7.07 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 5.26-4.92 (m, 3H), 4.54 (m, 1H), 3.80 (app. dt, $J = 5.2, 11.1$ Hz, 1H), 3.61 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.3H), 3.55 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.7H), 2.25-2.07 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.00 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO), mixture of rotomers: δ 193.4, 193.0, 159.3 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz), 153.9 (d, $J_{\text{CF}} = 16.2$ Hz), 136.7, 136.8 (d, $J_{\text{CF}} = 34.0$ Hz), 134.6, 128.3, 127.8, 127.2, 126.6, 122.4, 113.7 (d, $J_{\text{CF}} = 13.5$ Hz), 110.2 (d, $J_{\text{CF}} = 20.2$ Hz), 98.5 (d, $J_{\text{CF}} = 25.4$ Hz), 70.6, 69.8, 65.8, 65.8, 60.6, 60.3, 55.5, 55.0, 25.7, 25.6, 17.7, 17.7, -4.8, -4.9 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 518.9 $[(\text{M}-\text{H})+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_4\text{SiNa}$: 518.6].

Scheme III

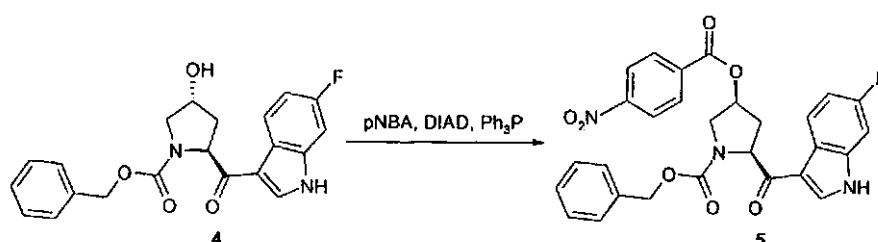


2-(6-Fluoro-1H-indole-3-carbonyl)-4-hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (**4**):

To a solution containing **3** (227 g) in THF (600 mL) was added 1 M TBAF in THF (160 mL) at ambient temperature. After 9 h, another 20 mL of the 1 M TBAF/THF solution was added. After ca. 48 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and then redissolved in EtOAc (600 mL). The organic solution was washed with water (310 mL) and the product

precipitated to form a thick suspension which was filtered (slow). The solids were washed with EtOAc (165 mL in portions) and dried to provide 43 g of **4**. The combined filtrate was concentrated *in vacuo* to precipitate an additional 4.8 g of **4** after drying. ¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO), mixture of rotomers: δ12.08 (br s, 1H), 8.43 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 8.16 (ddd, *J* = 5.4, 8.7, 14.1 Hz, 1H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.27 (app. d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.09-6.93 (m, 4H), 5.24 (dt, *J* = 8.1, 15.6 Hz, 1H), 5.14 (br s, 1H), 5.04 (app. d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.90 (app. dd, *J* = 13.4, 28.4 Hz, 1H), 4.30 (br s, 1H), 3.58-3.43 (m, 2H), 2.27 (m, 1H), 1.93 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, *d*₆-DMSO), mixture of rotomers: δ194.0, 193.6, 159.9 (d, *J*_{CF} = 235.2 Hz), 154.6 (d, *J*_{CF} = 9.6 Hz), 138.1, 137.5 (d, *J*_{CF} = 26.9 Hz), 136.0, 129.0, 128.5, 128.1 (d, *J*_{CF} = 40.0 Hz), 123.4, 123.3, 123.0, 122.9, 114.4 (d, *J*_{CF} = 11.7 Hz), 110.6 (d, *J*_{CF} = 23.7 Hz), 99.3 (d, *J*_{CF} = 25.2 Hz), 69.5, 68.8, 66.4, 66.3, 61.4, 61.1, 56.2, 55.7 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 382.6 [(M)+; calcd for C₂₁H₁₉FN₂O₄: 382.3].

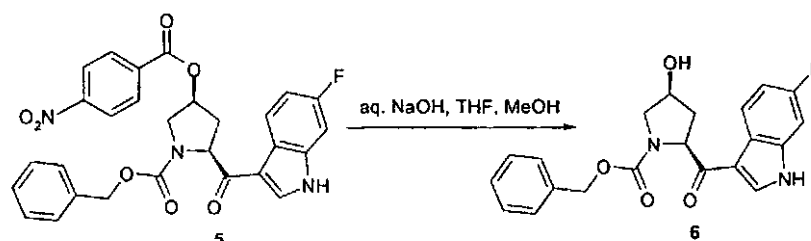
Scheme IV



2-(6-Fluoro-1H-indole-3-carbonyl)-4-(4-nitro-benzyloxy)-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (**5**): A solution containing **4** (51.1 g, 134 mmol), 4-nitrobenzoic acid (27.9 g, 167 mmol) and triphenylphosphine (48.9 g, 187 mmol) in anhydrous THF (700 mL) and DMF (175 mL) was cooled to 2 °C. DIAD (37.4 mL, 194 mmol) was added over 1 h at 2-3 °C. After 1 h, the solution was allowed to warm to ambient temperature. After ca. 16 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and MeOH (250 mL) was added and concentrated to form a thick suspension (322 g). Additional MeOH (250 mL) was added and the solution was concentrated *in vacuo* to afford a thick suspension (420 g) that was chilled in an ice bath. After ca. 1.5 h, the solid was collected on a vacuum filter and washed with chilled MeOH (190 mL). The product was air-dried on the filter to provide 82.9 g (>100%) of **5** as a light yellow-colored solid which was used directly in the next reaction. ¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO), mixture of rotomers: δ12.14 (br s, 1H), 8.47 (app. d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.29-8.21 (m, 3H), 8.03 (dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz, 2H), 7.43-7.33 (m, 2H), 7.28 (app. dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 1H), 7.20-7.08 (m, 4H), 5.55 (br s, 1H), 5.42 (dd, *J* = 8.4, 15.3 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 12.6, 22.2 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.36

(m, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO), mixture of rotomers: δ 192.9, 192.4, 164.2, 160.0 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz), 154.5 (d, $J_{\text{CF}} = 12.0$ Hz), 150.9, 137.5, 137.1 (d, $J_{\text{CF}} = 12.6$ Hz), 135.6, 135.1, 131.3, 128.9 (d, $J_{\text{CF}} = 28.0$ Hz), 128.5, 128.2, 128.1, 127.6, 124.2, 123.0, 113.5 (d, $J_{\text{CF}} = 8.5$ Hz), 110.9 (d, $J_{\text{CF}} = 21.9$ Hz), 99.1 (d, $J_{\text{CF}} = 25.5$ Hz), 75.2, 74.3, 66.7, 66.5, 62.4, 62.1, 53.6, 53.0, 38.6, 37.6 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 531.8 [(M)+; calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_7$: 531.5].

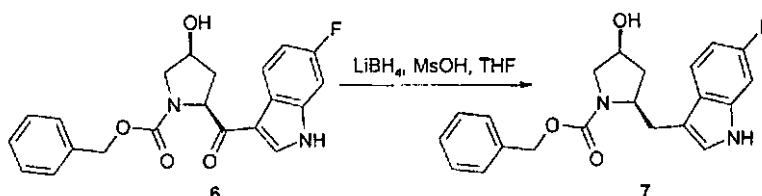
Scheme V



2-(6-Fluoro-1H-indole-3-carbonyl)-4-hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (6):

To a suspension of **5** (82.9 g) in THF (600 mL), MeOH (200 mL), and water (100 mL) was added 50% aq. NaOH (16.0 g, 200 mmol) [Note: exothermic; temp. increase: 23.7 °C to 25.9 °C]. After 2 h, glacial HOAc (5.3 g) was added to adjust the pH to 7-8 [Note: the orange-colored solution changed to pale yellow] and the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Water (500 mL) was added and solvent was removed *in vacuo* until a thick suspension formed. The solid was collected on a vacuum filter and washed with water (400 mL in portions). The solid was dried in a vacuum oven at 55 °C to afford 42.6 g (83%, 2 steps) of **6** as an off-white solid. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 8.38 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 8.14 (ddd, $J = 5.7, 8.7, 14.1$ Hz, 1H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.25 (app. dd, $J = 2.1, 9.9$ Hz, 1H), 7.10-6.95 (m, 4H), 5.16-4.98 (m, 2H), 4.90 (app. q, $J = 13.5, 25.8$ Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.74 (app. ddd, $J = 6.3, 11.1, 18.3$ Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 2.59 (m, 1H), 1.73 (app. ddd, $J = 6.6, 12.9, 25.2$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO): δ 193.8, 193.3, 160.0 (d, $J_{\text{CF}} = 235.2$ Hz), 154.4 (d, $J_{\text{CF}} = 14.5$ Hz), 137.5 (d, $J_{\text{CF}} = 26.0$ Hz), 137.2 (d, $J_{\text{CF}} = 12.3$ Hz), 129.0, 128.5, 128.2 (d, $J_{\text{CF}} = 35.4$ Hz), 128.1, 127.4, 123.2, 123.1, 114.4 (d, $J_{\text{CF}} = 11.4$ Hz), 110.8 (d, $J_{\text{CF}} = 23.7$ Hz), 110.8 (d, $J_{\text{CF}} = 23.7$ Hz), 99.0 (d, $J_{\text{CF}} = 25.8$ Hz), 69.4, 68.6, 66.5, 66.4, 61.5, 61.2, 54.9, 54.6 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 383.8 [(M+H)+; calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}_4$: 383.3].

Scheme VI

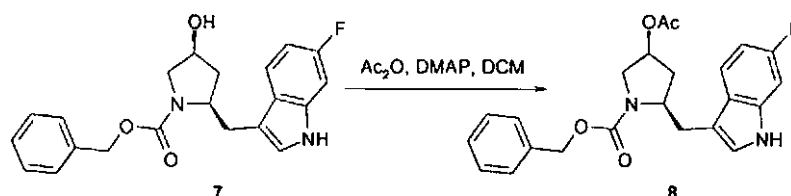


2-(6-Fluoro-1H-indol-3-ylmethyl)-4-hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (7):

To a suspension of **6** (10.1 g, 26 mmol) in anhydrous THF (200 mL) was added 2M LiBH₄ in THF (26.2 mL, 52 mmol) over ca. 7 min [Note: exothermic; temp. increase: 21.5 °C to 28.2 °C]. After 2.5 h, the pale, yellow-colored solution was cooled to ca. 11 °C and methanesulfonic acid (4.66 g, 48 mmol) was added over ca. 4 min [Note: exothermic; temp. increase to 14.2 °C].

After 16 h, the reaction mixture was cooled in an ice-bath and carefully quenched with water (50 mL) [Note: the addition of water was exothermic and released a large quantity of gas]. Following the addition of water, the pH was adjusted to 1 with conc. HCl (1.9 g). The reaction mixture was concentrated to remove THF and the aqueous solution was extracted with EtOAc (110 mL). The organic layer was separated and washed with water (2 × 50 mL) [Note: final pH about 5]. The organic solution was concentrated *in vacuo* and azeotropically dried using anhydrous EtOAc to provide 10.2 g of **7** as a white foam [Note: 87.7 A% by HPLC analysis]. ¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO), ~1:1 mixture of rotomers: δ10.91 (app. d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 6.0, 8.4 Hz, 0.5H), 7.48-7.30 (m, 4.5H), 7.13-7.07 (m, 3H), 6.85 (app. t, *J* = 8.4 Hz, 0.5H), 6.58 (app. t, *J* = 9.9 Hz, 0.5H), 5.19-5.10 (m, 3H), 4.25 (br s, 1H), 4.03-3.96 (m, 1H), 3.55 (dd, *J* = 5.1, 11.4 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.17-2.98 (m, 2H), 1.79 (m, 2H) ppm. ¹³C NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO), mixture of rotomers: δ159.5 (d, *J*_{CF} = 232.1 Hz), 159.4 (d, *J*_{CF} = 232.3 Hz), 154.9, 137.7 (d, *J*_{CF} = 36.6 Hz), 136.7 (d, *J*_{CF} = 12.6 Hz), 136.6 (d, *J*_{CF} = 12.9 Hz), 129.1, 129.1, 128.7, 128.6 (d, *J*_{CF} = 26.3 Hz), 128.2, 125.0 (d, *J*_{CF} = 21.4 Hz), 124.5, 124.3, 120.1 (d, *J*_{CF} = 28.3 Hz), 120.0 (d, *J*_{CF} = 28.6 Hz), 112.4 (d, *J*_{CF} = 14.6 Hz), 107.4 (d, *J*_{CF} = 24.3 Hz), 107.3 (d, *J*_{CF} = 24.3 Hz), 69.9, 69.2, 67.1, 66.3, 58.7, 58.1, 56.1, 55.6, 38.3, 37.6, 31.2, 30.1 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 368.6 [(M)⁺; calcd for C₂₁H₂₁FN₂O₃: 368.4].

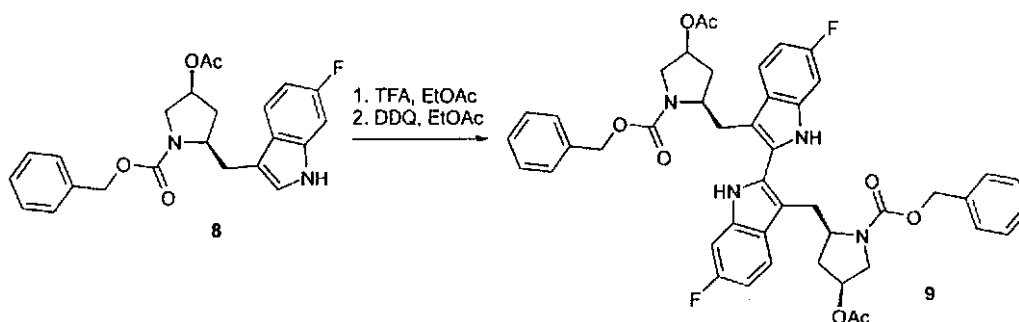
Scheme VII



4-Acetoxy-2-(6-fluoro-1H-indol-3-ylmethyl)-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (8):

To a solution containing **7** (4.7 g, 12.8 mmol) and DMAP (81 mg, 0.66 mmol) in DCM (100 mL) was added acetic anhydride (2.6 g, 25.5 mmol) at ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was quenched with a MeOH (ca. 3 mL) and washed successively with 10% aq. Na_2CO_3 (50 mL), dilute HCl (50 mL), and 10% aq. Na_2CO_3 (50 mL). The organic solution was concentrated *in vacuo* and filtered through a short column of silica gel (ca. 25 g) [eluant: DCM (200 mL) to 0.5% (v/v) MeOH/DCM (80 mL) to 2% MeOH/DCM (100 mL) to 5% MeOH/DCM (100 mL)]. The product-containing fractions were combined and concentrated to provide 3.28 g (63%) of **8** as a white foam [Note: 94.3 A% by HPLC analysis]. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), ~1:1 mixture of rotomers: δ 7.99 (m, 1H), 7.75-6.61 (m, 9H), 5.28 (m, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.82 (dt, $J = 5.4, 13.5$ Hz, 1H), 3.60 (app. t, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.50 (d, $J = 11.7$ Hz, 0.5H), 3.31 (d, $J = 12.9$ Hz, 0.5H), 2.87 (dt, $J = 5.1, 13.5$ Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), ~1:1 mixture of rotomers: δ 170.8, 160.2 ($J_{\text{CF}} = 236.4$ Hz), 155.2, 136.8, 136.6, 136.4, 128.9, 128.8, 128.5 ($J_{\text{CF}} = 24.3$ Hz), 124.5 ($J_{\text{CF}} = 21.4$ Hz), 123.0, 123.0, 120.0 ($J_{\text{CF}} = 27.1$ Hz), 119.9 ($J_{\text{CF}} = 26.0$ Hz), 112.8 ($J_{\text{CF}} = 10.5$ Hz), 108.2 ($J_{\text{CF}} = 24.3$ Hz), 97.7 ($J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz), 74.0, 73.2, 67.9, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.0, 35.4, 34.6, 30.8, 29.7, 21.5 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 410.6 [(M)+; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_4$: 410.4].

Scheme VIII



4-Acetoxy-2-[3'-(4-acetoxy-1-benzylloxycarbonyl-pyrrolidin-2-ylmethyl)-6,6'-difluoro-

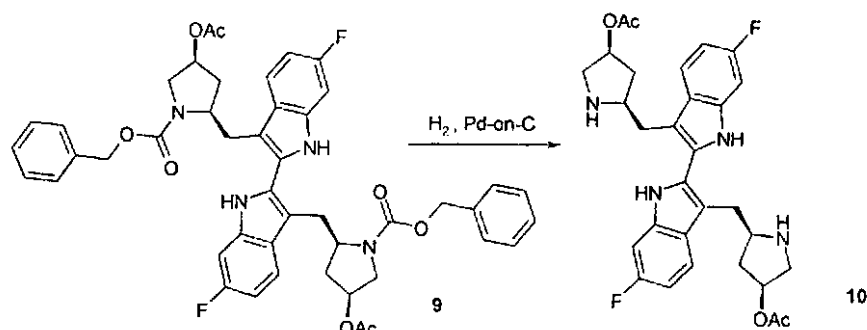
1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (9): A solution

containing **8** (2.9 g, 7.1 mmol) in EtOAc (ca. 5 mL) was cooled in an ice-bath and pre-cooled TFA (20.3 mL) was added in one portion. The resulting yellow-colored solution was stirred at 2-4 °C. After 4.75 h, the cold reaction mixture was transferred (via canula) with stirring into a pre-cooled mixture of EtOAc (30 mL), and 25% aq. K₂CO₃ (80.7 g). The aqueous layer was separated and extracted with EtOAc (3 × 30 mL) and the combined organic extracts were washed with 10% aq. Na₂CO₃ (30 g). The organic solution was concentrated *in vacuo* and azeotropically dried using anhydrous EtOAc to afford 2.95 g of indolyindoline diastereomers as a yellow-colored foam which was used directly in the next reaction. Mass spectrum (ESI), *m/z* 821.3 [(M)+; calcd for C₄₆H₄₆F₂N₄O₈: 820.9].

To a solution containing the indolyindoline diastereomers (2.95 g) in EtOAc (30 mL) was added DDQ (885 mg, 3.9 mmol) in one portion [Note: exothermic; temp. increase: 26 °C to 31.6 °C]. After 3 h, the dark orange/brown-colored reaction mixture was filtered through Celite® which was subsequently rinsed with EtOAc (50 mL). [Note: a second reaction performed at 0.5 mmol-scale was combined for work-up]. The filtrate was washed with 10% aq. Na₂CO₃ (2 washes: 74 g, then 58 g). The organic layer was concentrated *in vacuo* to provide 2.14 g of **9** as a light brown-colored solid.

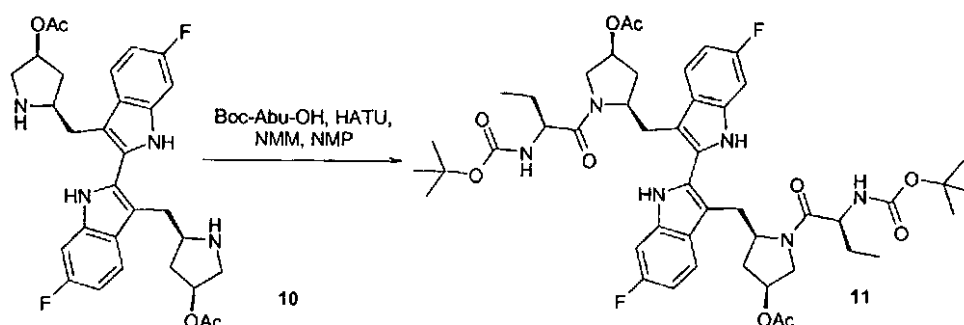
The Celite® pad was further rinsed with THF (100 mL) which was concentrated *in vacuo* to provide another 1.12 g of **9** as a beige-colored solid. The combined solids were dissolved in isopropyl acetate (iPrAc, 50 mL). The iPrAc solution was reduced to ca. 20 mL and resulting suspension was warmed to reflux, cooled to ambient temperature, and then placed in an ice-bath. After 1 h, the solid was collected by vacuum filtration, washed with iPrAc (10 mL) and dried in a vacuum oven to afford 2.13 g (65%, 2 steps) of **9** as a beige-colored solid [Note: ~100 A% by HPLC analysis]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 11.29 (br s, 2H), 7.57-7.36 (m, 14H), 6.90 (app. dt, *J* = 2.1, 9.3 Hz, 2H), 5.39-5.30 (m, 6H), 4.28 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.84-3.73 (m, 4H), 3.66 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 3.40 (dd, *J* = 12.0, 14.4 Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.17 (m, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.7, 161.9, 158.8, 156.3, 137.5, 137.3, 136.5, 128.9, 128.6, 128.5, 125.9, 118.8, 118.6, 108.8, 108.5, 108.3, 98.7, 98.3, 74.4, 68.0, 60.1, 53.5, 34.5, 28.9, 21.7 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 818.2 [(M)+; calcd for C₄₆H₄₄F₂N₄O₈: 818.8].

Scheme IX



Acetic acid 5-[3'-(4-acetoxy-pyrrolidin-2-ylmethyl)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl]-pyrrolidin-3-yl ester (10): A suspension containing **9** (35 g, 42.7 mmol) in 1:1 EtOAc/MeOH (400 mL) was distributed into two 500 mL Parr bottles (ca. 200 mL/each), and charged with 10% Pd-on-C (wet, 5000 mg/each, Aldrich®). The reaction mixture was pressurized to 50 PSI H₂ and shaken for 3 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite® and the solids were washed with EtOAc. The clarified filtrate was concentrated *in vacuo* to afford 24 g of **10** as an off-white solid which was used directly in the next reaction. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 13.10 (br s, 2H) 7.45 (dd, *J* = 5.2, 8.9 Hz, 2H), 7.03 (dd, *J* = 2.3, 9.8 Hz, 2H), 6.85 (m, 2H), 5.35 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.18-3.35 (m, 4H), 2.90-3.14 (m, 4H), 2.56 (m, 2H), 2.00-2.10 (m, 2H), 2.04 (s, 6H), 1.80-1.92 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.3, 161.7, 158.6, 136.1, 135.9, 130.5, 130.4, 125.4, 119.1, 118.9, 109.6, 108.0, 107.6, 97.6, 97.5, 75.1, 57.7, 51.6, 38.7, 32.8, 21.6 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 550.9 [(M)+; calcd for C₃₀H₃₂F₂N₄O₄: 550.6].

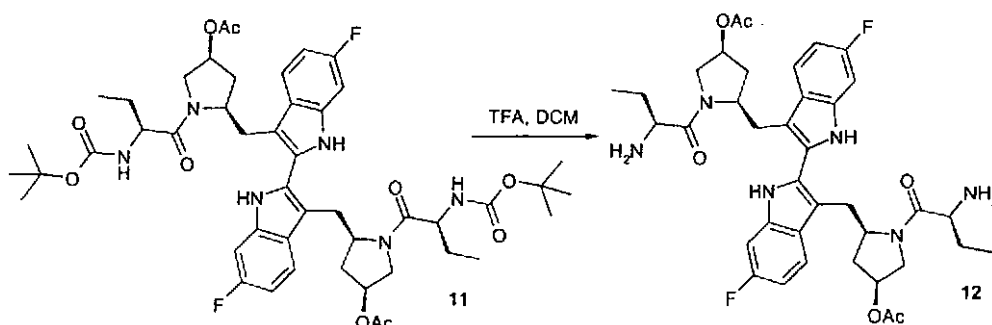
Scheme X



Acetic acid 5-{3'-[4-acetoxy-1-(2-tert-butoxycarbonylamino-butyl)-pyrrolidin-2-ylmethyl]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl}-1-(2-tert-butoxycarbonylamino-butyl)-pyrrolidin-3-yl ester (11): To a solution containing Boc-Abu-OH (20.4 g, 100 mmol) and HATU (42.0 g, 110 mmol) in anhydrous NMP (150 mL) at 0 °C was added NMM (16 mL,

150 mmol) followed by a solution of **10** (24 g, 42 mmol) in NMP (100 mL). The reaction mixture was slowly warmed to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with MTBE (1000 mL) and the heterogeneous mixture was washed with water (500 mL). The layers were separated and the organic phase formed a heterogeneous suspension. MTBE (1000 mL) and EtOAc (500 mL) were added and the now-homogeneous solution was washed successively with 1 N HCl (2 × 100 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 100 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was dissolved in 1:1 DCM/ MeOH (600 mL) and DCM (ca. 200 mL) was removed via distillation at 50 °C [Note: a small quantity of white precipitate was observed]. MeOH (200 mL) was added and additional solvent was removed (ca. 200 mL) at 50 °C. The heterogeneous mixture was cooled at -5 °C. After 16 h, the solid was collected by vacuum filtration and washed with cold MeOH. The solid was dried under high vacuum to afford 32 g of **11** as an off-white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 11.22 (br s, 2H), 7.40 (dd, *J* = 5.1, 8.7 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J* = 8.40, 8.40, 2H) 6.26 (br s, 2H), 5.44 (m, 2H), 4.39 (dd, *J* = 7.5, 16.5 Hz, 2H), 4.24 (m, 2H), 4.15 (dd, *J* = 5.1, 12.9 Hz, 2H), 3.79 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 3.10-3.30 (m, 4H), 2.32 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.56 (s, 18H), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.2, 170.4, 161.4, 158.3, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9, 118.7, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.4, 53.8, 53.5, 34.1, 28.7, 28.6, 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 920.5 [(M)+; calcd for C₄₈H₆₂F₂N₆O₁₀: 921.0].

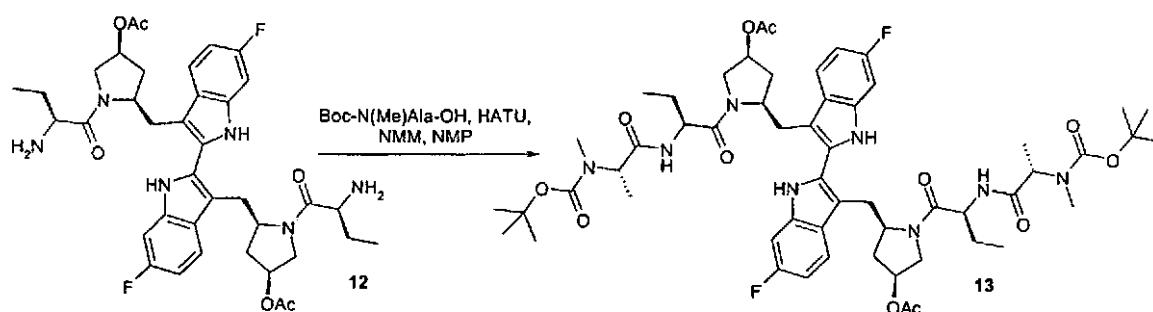
Scheme XI



Acetic acid 5-{3'-[4-acetoxy-1-(2-amino-butyl)-pyrrolidin-2-ylmethyl]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl}-1-(2-amino-butyl)-pyrrolidin-3-yl ester (**12**): A solution containing **11** (27.5 g, 30 mmol) in DCM (200 mL) was cooled to 0 °C. TFA (50 mL) was added and the reaction was monitored by LC/MS analysis until complete conversion of **11** to **12** (ca. 3 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue

was dissolved in EtOAc (ca. 1 L). The EtOAc solution was carefully poured into a saturated aqueous NaHCO_3 /ice/water mixture to neutralize the residual TFA. The organic phase was separated and washed twice with saturated aqueous NaHCO_3 then once with brine. The combined aqueous washes were back-extracted with EtOAc (2×100 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to afford 22 g of crude **12** as an off-white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mixture of rotomers: δ 11.62 (br s, 2H), 7.48-7.62 (m, 4H), 6.89 (ddd, $J = 2.4, 9.3, 9.3$ Hz, 2H), 5.48 (dd, $J = 4.5, 4.8$ Hz, 2H), 4.52 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 2H), 4.06 (dd, $J = 4.8, 12.3$ Hz, 2H), 3.78 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.54-3.70 (m, 4H), 3.30-3.40 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.02-2.16 (m, 2H), 1.70-1.96 (m, 4H), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$): δ 173.5, 170.9, 161.8, 158.6, 137.2, 137.1, 128.2, 128.1, 125.6, 118.7, 118.6, 108.6, 108.3, 108.0, 98.6, 98.1, 74.6, 60.1, 53.5, 33.5, 28.0, 21.4, 9.7 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 721.4 [(M)+; calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_6$: 720.8].

Scheme XII

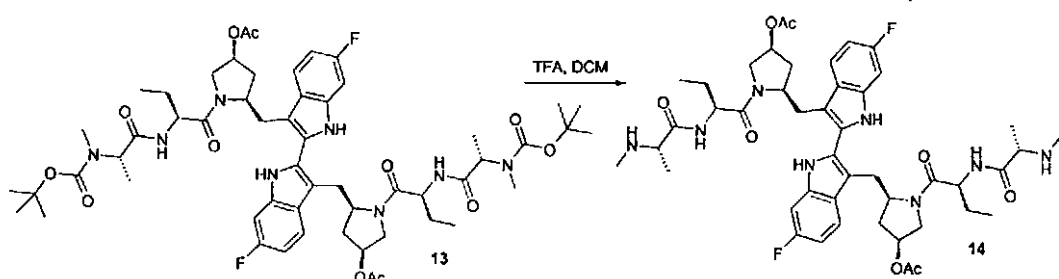


Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2-methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-1-[2-(2-methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (13): To a solution containing Boc-N(Me)Ala-OH (14.6 g, 72 mmol) and HATU (30.4 g, 80 mmol) in anhydrous NMP (150 mL) at 0 °C was added NMM (12 mL, 105 mmol) followed by addition of **12** (30 mmol) in NMP (200 mL). The resulting mixture was allowed to warm to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (1 L) and washed successively with water (1 L), 1N HCl (2×100 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2×100 mL), brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, concentrated to afford 33.5 g of crude **13**.

The crude **13** was dissolved in EtOH (50 mL) and then slowly added to water (1000 mL) with vigorous stirring at 50 °C which resulted in the precipitation of a white solid. The heterogeneous mixture was cooled to -5 °C. After 16 h, the solid was collected by vacuum filtration and washed with water. The wet solid was dried under high vacuum at 50 °C to

afford 29.9 g of **13** as an off-white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.57 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.89 (m, 2H), 5.50 (m, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.67 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.50 (t, $J = 9.6$ Hz, 2H), 4.20 (dd, $J = 3.9, 12.3$ Hz, 2H), 3.85 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.57 (br d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 3.34 (dd, $J = 12.0, 13.8$ Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.34 (s, 6H), 2.10 (m, 2H), 1.95 (dt, $J = 6.0, 13.8$ Hz, 2H), 1.79 (dt, $J = 7.2, 14.1$ Hz, 2H), 1.52 (s, 18H), 1.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 174.0, 172.1, 171.9, 170.5, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.8, 108.4, 108.1, 98.8, 98.5, 81.0, 74.6, 60.1, 54.0, 52.0, 33.7, 30.5, 28.6, 28.1, 25.9, 21.6, 14.0, 9.9 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 1091.7 [(M)+; calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{76}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_{10}$: 1091.2].

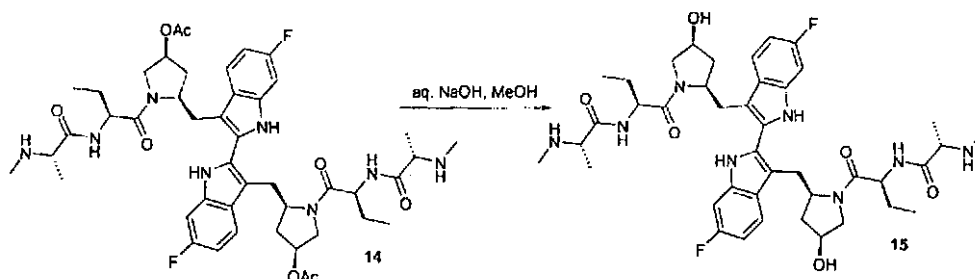
Scheme XIII



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-1-[2-(2-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (**14**): A solution containing **13** (28.5 g, 26 mmol) in DCM (150 mL) was cooled to 0 °C. TFA (50 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was warmed to ambient temperature and monitored until LC/MS analysis revealed complete conversion of **13** to **14** (ca. 4 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue was dissolved in EtOAc (500 mL) and *carefully* poured onto an aqueous NaHCO_3 /ice mixture. The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 $\times$ 250 mL). The combined organic extracts were washed several times with saturated aqueous NaHCO_3 , then brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to afford 24 g of **14** as a light yellow-colored solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.66 (br s, 2H), 8.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.52 (dd, $J = 2.1, 9.6$ Hz, 2H), 7.43 (dd, $J = 5.4, 8.4$ Hz, 2H), 6.83 (ddd, $J = 2.1, 9.0, 9.0$ Hz, 2H), 5.41 (dd, $J = 4.2, 4.5$ Hz, 2H), 4.64 (dd, $J = 7.8, 14.1$ Hz, 2H), 4.36 (br d, $J = 9.3, 9.6$ Hz, 2H), 4.13 (dd, $J = 4.8, 12.6$ Hz, 2H), 3.81 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.44 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.0-3.18 (m, 4H), 2.50 (s, 6H), 2.30 (s, 6H), 2.15 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 1.90-2.08 (m, 2H), 1.76-1.90 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 175.3, 172.6, 170.4, 161.8,

137.5, 137.3, 128.4, 128.3, 125.9, 118.6, 118.5, 108.5, 108.1, 107.8, 98.7, 98.3, 74.5, 60.9, 59.9, 53.9, 51.3, 35.8, 33.6, 27.6, 26.2, 21.5, 20.2, 10.1 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 891.6 [(M)⁺; calcd for C₄₆H₆₀F₂N₈O₈: 891.0].

Scheme XIV



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hydroxy-1-[2S-(2S-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2R-ylmethyl})-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-4S-hydroxy-pyrrolidine-1-carbonyl]-propyl}-2S-methylamino-propionamide (15):

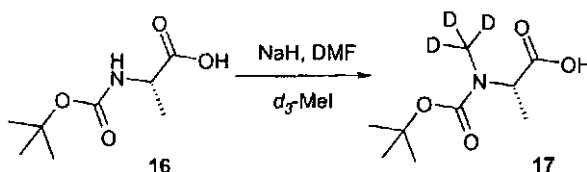
To a solution containing **14** (24 g) in MeOH (200 mL) was added 1 M NaOH (80 mL) at 0 °C. The reaction mixture was degassed and maintained under a nitrogen atmosphere wrapped with aluminum foil. The ice-bath was removed. After 60 min, the MeOH was removed *in vacuo* and the residue was diluted with water (200 mL) and extracted with EtOAc (500 mL). The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 × 150 mL). The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford 22.5 g of crude **15** as a light, brown/yellow-colored solid.

The crude **15** (22.5 g) was dissolved in MeOH (50 mL) and EtOAc (200 mL). The volume was reduced (50%) by distillation at reduced pressure at 60 °C using a rotary evaporator. MTBE (300 mL) was added and the cloudy solution was warmed to 60 °C. After 30 min, the solution was cooled to ambient temperature and then maintained at -5 °C.

After 16 h, the solid was collected by vacuum filtration and washed with cold 25% EtOAc/MTBE and dried under high vacuum at ambient temperature to afford 16.6 g of **15** as an off-white solid. An additional 5.5 g of **15** was recovered from the filtrate via solvent removal and vacuum drying. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 11.74 (s, 2H), 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 7.55 (dd, *J* = 2.4, 9.6 Hz, 2H), 6.88 (ddd, *J* = 2.4, 9.3, 9.3 Hz, 2H), 4.62-4.78 (m, 4H), 4.43 (dd, *J* = 9.3, 9.9 Hz, 2H), 4.03 (dd, *J* = 4.8, 11.4 Hz, 2H), 3.80 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J* = 2.7, 14.4 Hz, 2H), 3.53 (dd, *J* = 11.4, 14.4 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.56 (s, 6H), 2.45 (m, 2H), 2.19 (d, *J* = 14.4 Hz, 2H), 1.76-2.10 (m, 6H), 1.59 (br s, 2H), 1.39 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.22-1.38 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

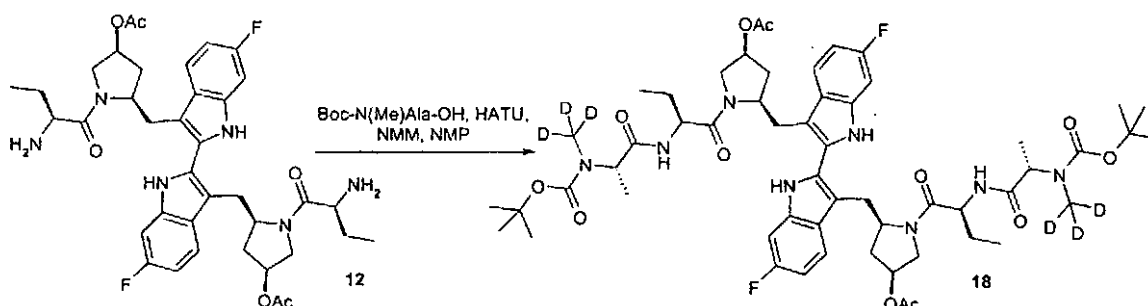
ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO): δ 175.2, 172.8, 161.6, 158.5, 137.3, 137.2, 128.4, 128.3, 126.4, 120.8, 120.6, 109.4, 108.7, 108.4, 98.4, 98.0, 70.8, 60.2, 59.9, 56.6, 51.8, 36.4, 35.3, 28.3, 25.6, 20.0, 10.6 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 807.5 [(M)+; calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 806.9].

Scheme XV



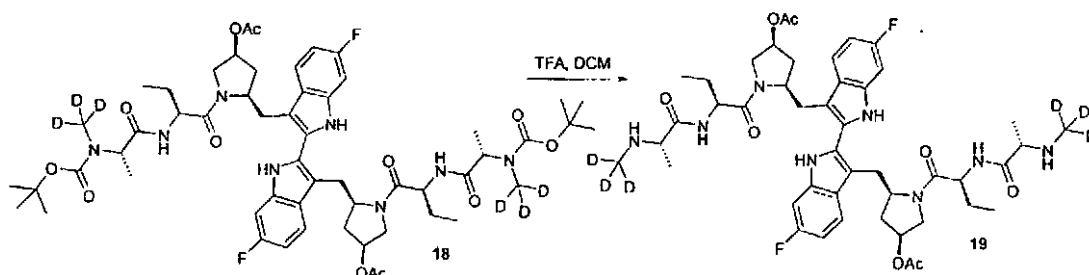
N-tert-butoxycarbonyl-N-(d₃-methyl)alanine (17): To a solution of Boc-Ala-OH (16, 3.5 g, 18.5 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was added NaH (2.1 g, 60% in mineral oil, 51.0 mmol) at 0 °C. After 45 min, the reaction mixture was warmed to ambient temperature and then warmed to 45 °C for an additional 20 min. The reaction mixture was cooled to 0 °C and d₃-iodomethane (10.0 g, 69.0 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was quenched with water, and extracted with EtOAc. The organic phase was discarded and the aqueous solution was acidified to pH 3 with 1N HCl and extracted with EtOAc. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min) to afford 17 (3.6 g, 94%) as a white solid following lyophilization. ^1H NMR (300 MHz, d_4 -MeOH), mixture of rotomers: δ 4.80 (br s, 1H), 4.67 (q, J = 6.9 Hz, 0.5H), 4.38 (q, J = 6.9 Hz, 0.5H), 1.36-1.52 (m, 12H) ppm; Mass spectrum (ESI), m/z 207.0 [(M+H)+; calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{D}_3\text{NO}_4$: 207.2].

Scheme XVI



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2- d_3 -methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-1-[2-(2- d_3 -methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (**18**): To a solution containing Boc-N(d_3 -Me)Ala-OH (**17**, 1.00 g, 4.83 mmol) and HATU (2.00 g, 5.30 mmol) in anhydrous NMP (20 mL) at 0 °C was added NMM (0.8 mL, 7.20 mmol) followed by addition of **12** (crude, 1.73 g, 2.40 mmol) in NMP (20 mL). The resulting mixture was allowed to warm to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (200 mL) and washed successively with water (200 mL), 1N HCl (2 × 100 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 100 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, concentrated. The residue was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, frozen, and lyophilized to afford 1.1 g of **18** (42%) as an off-white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 11.56 (br s, 2H), 7.56 (dd, J = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.10 (br s, 2H), 6.89 (ddd, J = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.75 (br s, 2H), 4.67 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 4.50 (t, J = 9.3 Hz, 2H), 4.18 (dd, J = 4.2, 11.7 Hz, 2H) 3.85 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 3.57 (dd, J = 2.1, 14.4 Hz, 2H), 3.34 (dd, J = 12.0, 14.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.29 (br s, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.51 (s, 18H), 1.39 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.03 (t, J = 7.5 Hz, 6H) ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 1097.7 [(M)+; calcd for C₅₆H₇₀D₆F₂N₈O₁₂: 1097.3].

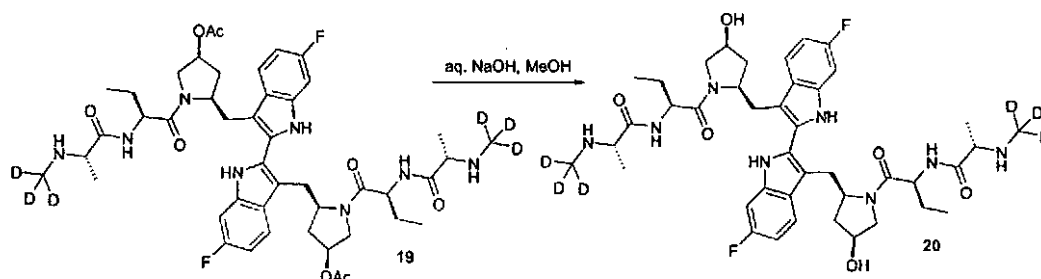
Scheme XVII



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2- d -methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-1-[2-(2- d_3 -methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (**19**): A solution containing **18** (1.10 g, 1.00 mmol) in DCM (15 mL) was cooled to 0 °C. TFA (5 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was warmed to ambient temperature and monitored until LC/MS analysis revealed complete conversion of **18** to **19** (ca. 4 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and *carefully* poured onto an aqueous NaHCO₃/ice mixture. The aqueous phase was separated and back-extracted with

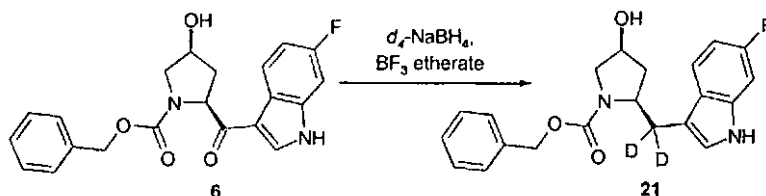
EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic extracts were washed several times with saturated aqueous NaHCO₃, and then brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford crude **19** which was used without further purification. Mass spectrum (ESI), *m/z* 897.5 [(M)⁺; calcd for C₄₆H₅₄D₆F₂N₈O₈: 897.0].

Scheme XVIII



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hydroxy-1-[2S-(2S-*d*₃-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2R-ylmethyl)-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-ylmethyl)-4S-hydroxy-pyrrolidine-1-carbonyl]-propyl}-2S-*d*₃-methylamino-propionamide (**20**): To a solution containing crude **19** (ca. 1.00 mmol) in MeOH (20 mL) was added 1 M NaOH (2 mL) at ambient temperature. After 35 min, the MeOH was removed *in vacuo* and the residue was diluted with water (50 mL) and extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, frozen, and lyophilized to afford 0.6 g of **20** (75%) as a flocculent, white solid. ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), mixture of rotomers: δ 11.86 (s, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 2.4, 9.9 Hz, 2H), 6.83 (m, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.84 (dd, *J* = 4.2, 11.1 Hz, 2H), 3.66 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 3.45 (m, 4H), 2.93 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.60-1.89 (m, 8H), 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN + *d*₄-MeOH), mixture of rotomers: δ 175.2, 173.0, 162.4, 159.3, 137.8, 137.6, 128.8, 128.7, 126.8, 110.8, 120.7, 109.5, 108.7, 108.4, 98.5, 98.1, 71.6, 60.5, 60.1, 56.8, 52.6, 36.6, 28.6, 26.0, 22.7, 19.0, 10.1 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 813.4 [(M)⁺; calcd for C₄₂H₅₀D₆F₂N₈O₆: 813.0].

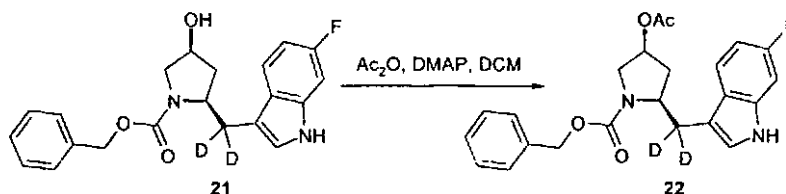
Scheme XIX



2-(6-Fluoro-1H-indol-3-yl)-4-hydroxy-1-methylpyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (21): A suspension of **6** (3.0 g, 7.85 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was cooled to 0 °C. d_4 -NaBH₄ (0.66 g, 15.7 mmol) was added in one portion followed by the addition of BF₃·etherate (1.1 mL, 8.60 mmol). After ca. 10 min, the ice bath was removed and the reaction mixture was warmed to reflux.

After 3 h, the reaction mixture was cooled in an ice-bath and carefully quenched with saturated aqueous NH₄Cl (50 mL). The biphasic mixture was diluted with EtOAc and the organic layer was separated and washed with water (2 × 50 mL) then brine. The EtOAc layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford 3.2 g of crude **21** (>quant.) which was used without further purification. Mass spectrum (ESI), m/z 371.2 [(M+H)⁺; calcd for C₂₁H₂₀D₂FN₂O₃: 371.4].

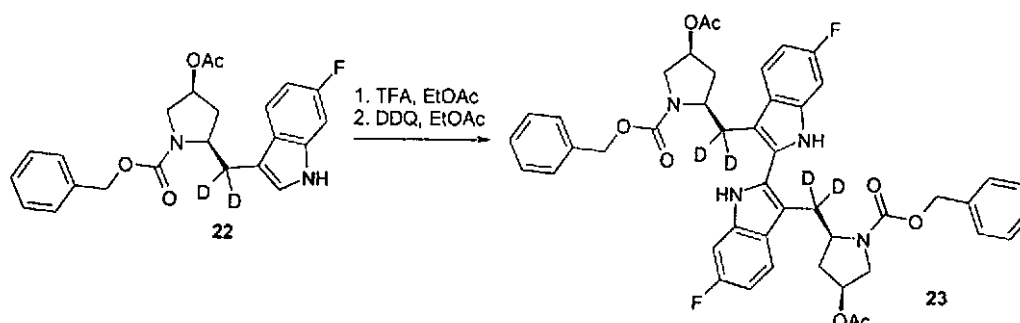
Scheme XX



4-Acetoxy-2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)-1-methylpyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (22): To a solution containing crude **21** (ca. 7.85 mmol), Et₃N (1.2 g, 12.0 mmol), and DMAP (50 mg, cat.) in DCM (30 mL) was added acetic anhydride (0.74 mL, 7.85 mmol) at ambient temperature. After 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (50 mL) then diluted with DCM. The DCM layer was separated and washed successively with dilute HCl (50 mL), water (50 mL), and brine (50 mL). The organic solution was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The crude product was purified by flash silica gel chromatography [30-40% EtOAc in hexane] to afford 2.0 g (62%, 2 steps) of **22** as a white foam. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), ~1:1 mixture of rotomers: δ8.41 (br s, 1H), 7.80-6.50 (m, 9H), 5.25 (m, 1H), 5.21 (m, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.82 (dt, J = 5.1, 13.2 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 11.4, 11.7 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.00 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), ~1:1 mixture of rotomers: δ170.8, 160.2 (J_{CF} = 236.2 Hz),

155.2, 136.9, 136.6, 136.5, 129.0, 128.9, 128.6 ($J_{\text{CF}} = 24.4$ Hz), 124.5 ($J_{\text{CF}} = 22.1$ Hz), 123.1, 120.1 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 119.9 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 112.8, 108.2 ($J_{\text{CF}} = 23.5$ Hz), 97.7 ($J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz), 74.1, 73.3, 68.0, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.1, 35.4, 34.6, 21.5 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 413.1 [(M)+; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{D}_2\text{FN}_2\text{O}_4$: 412.4].

Scheme XXI

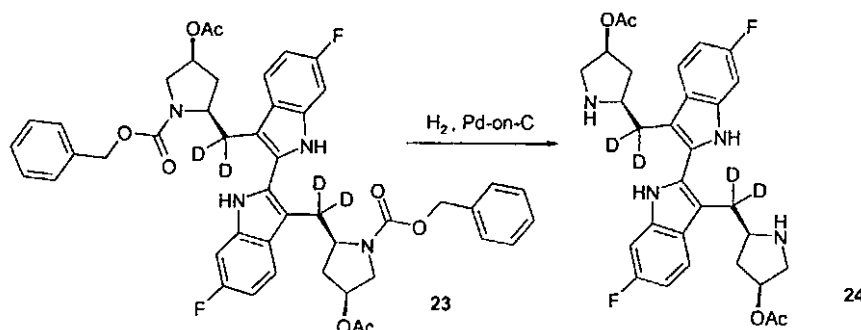


4-Acetoxy-2-[3'-(4-acetoxy-1-benzyloxycarbonyl-pyrrolidin-2-yl)- d_2 -methyl]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid benzyl ester (23):

Indole 22 (2.0 g, 4.80 mmol) was dissolved in pre-cooled (-5 °C) TFA (10 mL). The resulting yellow-colored solution was allowed to slowly warm to ambient temperature over 2 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to remove the TFA and the crude mixture of indolyindoline diastereomers was used directly in the next reaction. Mass spectrum (ESI), m/z 825.4 [(M)+; calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 824.9].

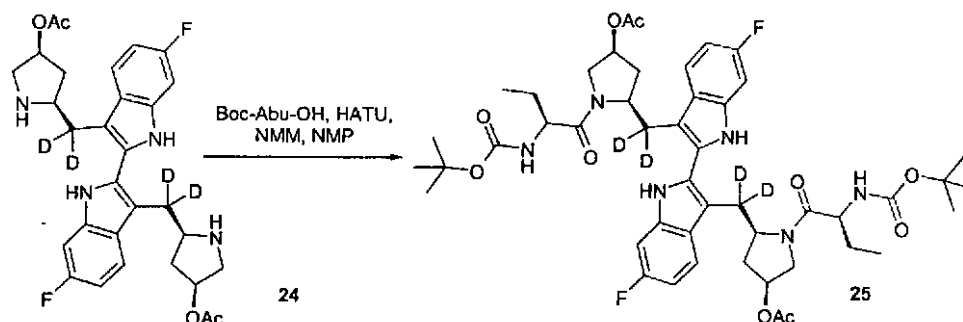
To a solution containing the indolyindoline diastereomers in EtOAc (100 mL) was added DDQ (0.58 g, 2.5 mmol) in one portion. After 15 min, the dark orange/brown-colored reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 . The layers were separated and the organic phase was washed successively with saturated aqueous NaHCO_3 (3×50 mL) and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The crude product was dissolved in DCM (10 mL) and the solution was then diluted with MeOH (50 mL). Slow removal of the DCM *in vacuo* afforded a precipitate which was collected by vacuum filtration, washed with cold MeOH, and dried to provide 1.7 g of 23 (86%, 2 steps). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.30 (br s, 2H), 7.60-7.30 (m, 14H), 6.90 (app. dt, $J = 2.4, 9.3$ Hz, 2H), 5.40 (m, 2H), 5.36 (d, $J = 3.6$ Hz, 4H), 4.28 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 2.31 (s, 6H), 2.06 (m, 4H) ppm; Mass spectrum (ESI), m/z 823.3 [(M)+; calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{40}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 822.9].

Scheme XXII



Acetic acid 5-[3'-(4-acetoxy-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl]-pyrrolidin-3-yl ester (24): A suspension containing **23** (0.40 g, 0.48 mmol) in 1:1 EtOAc/MeOH (40 mL) was placed in a 500 mL Parr bottle and charged with 10% Pd-on-C (wet, ca. 200 mg). The reaction mixture was pressurized to 50 PSI H_2 and shaken for 3 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite® and the solids were washed with EtOAc. The clarified filtrate was concentrated *in vacuo* to afford crude **24** as an off-white solid which was used directly in the next reaction. Mass spectrum (ESI), m/z 555.2 [(M)+; calcd for $C_{30}H_{28}D_4F_2N_4O_4$: 554.6].

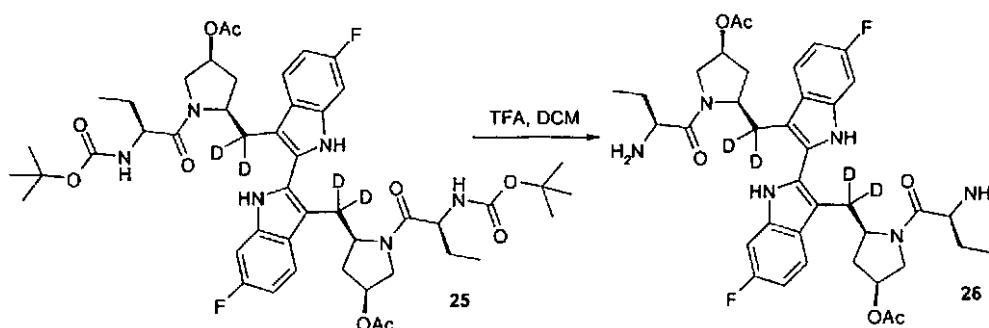
Scheme XXIII



Acetic acid 5-{3'-[4-acetoxy-1-(2-tert-butoxycarbonylamino-butyl)-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl}-1-(2-tert-butoxycarbonylamino-butyl)-pyrrolidin-3-yl ester (25): To a solution containing Boc-Abu-OH (224 mg, 1.1 mmol) and HATU (442 mg, 1.2 mmol) in anhydrous NMP (10 mL) at 0 °C was added NMM (0.2 mL, 1.7 mmol) followed by a solution of **24** (0.48 mmol) in NMP (10 mL). The reaction mixture was slowly warmed to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and the mixture was washed successively with water (5 × 50 mL), 1N HCl (50 mL), saturated aqueous $NaHCO_3$ (50 mL), and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The crude product was purified by reverse-

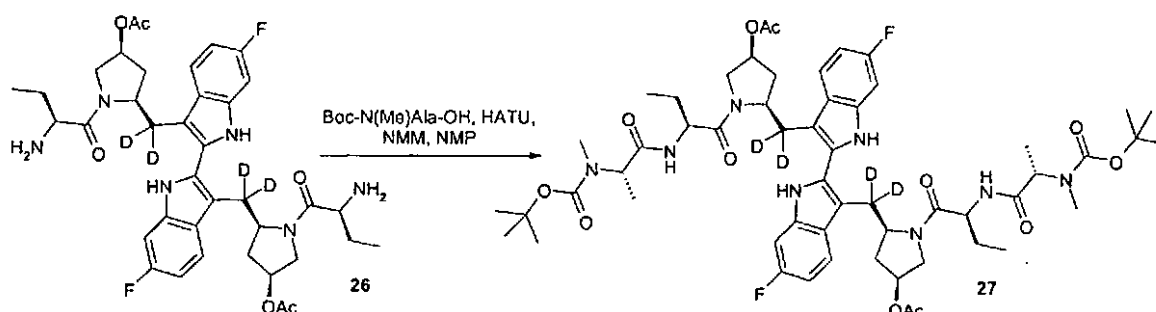
phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, concentrated, and lyophilized to afford 310 mg of **25** (70%, 2 steps) as a flocculent white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), mixture of rotomers: δ 11.17 (br s, 2H), 7.39 (dd, $J = 5.4, 8.4$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.75 (dd, $J = 8.40, 8.40$, 2H), 6.40 (br s, 2H), 5.44 (m, 2H), 4.40 (dd, $J = 7.8, 16.5$ Hz, 2H), 4.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.15 (dd, $J = 5.1, 12.9$ Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.57 (s, 18H), 0.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), mixture of rotomers: δ 172.1, 170.4, 161.4, 158.2, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9, 118.8, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.3, 53.8, 53.6, 34.1, 28.7, 28.6 (br), 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 925.4 [(M)+; calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{10}$: 925.0].

Scheme XXIV



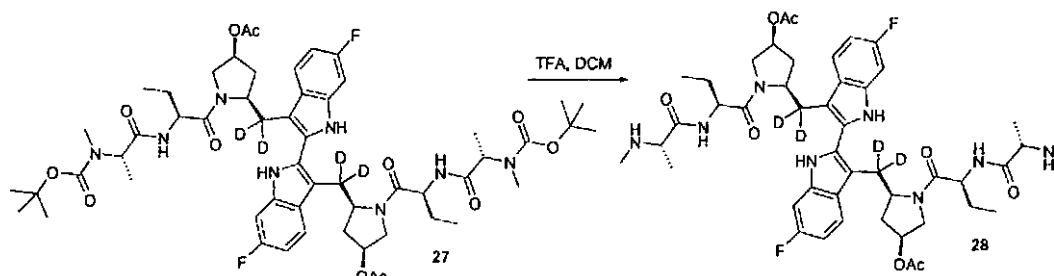
Acetic acid 5-{3'-[4-acetoxy-1-(2-amino-butyl)-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl}-1-(2-amino-butyl)-pyrrolidin-3-yl ester (**26**): A solution containing **25** (310 mg, 0.34 mmol) in DCM (20 mL) was cooled to 0 °C. TFA (5 mL) was added and the reaction was monitored by LC/MS analysis until complete conversion of **25** to **26** (ca. 3 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue was dissolved in EtOAc (50 mL). The EtOAc solution was carefully poured into a saturated aqueous NaHCO_3 /ice/water mixture to neutralize the residual TFA. The organic phase was separated and washed twice with saturated aqueous NaHCO_3 then once with brine. The combined aqueous washes were back-extracted with EtOAc (2 $\times$ 20 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to afford crude **26** (250 mg) as an off-white solid. Mass spectrum (ESI), m/z 725.3 [(M)+; calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_6$: 724.8].

Scheme XXV



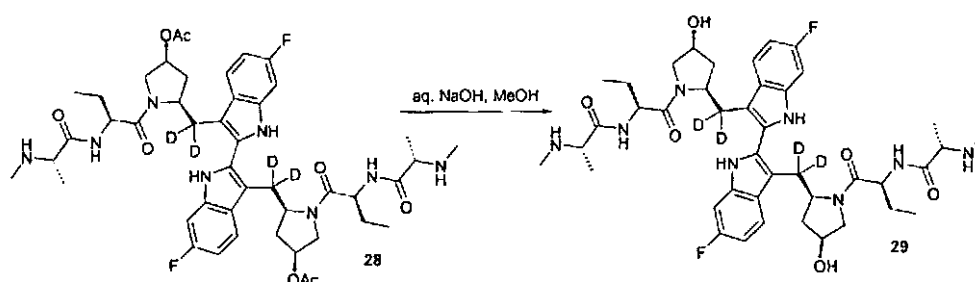
Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2-methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl)-1-[2-(2-methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (27): To a solution containing Boc-N(Me)Ala-OH (83 mg, 0.41 mmol) and HATU (172 mg, 0.45 mmol) in anhydrous NMP (5 mL) at 0 °C was added NMM (0.1 mL, 0.85 mmol) followed by addition of crude **26** (123 mg, 0.17 mmol) in NMP (5 mL). The resulting mixture was allowed to warm to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and washed successively with water (50 mL), 1N HCl (2 × 50 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 50 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, concentrated. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, concentrated, and lyophilized to afford 170 mg of **27** (91%, 2 steps) as a flocculent, off-white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.86 (m, 2H), 5.46 (m, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.17 (dd, *J* = 4.8, 12.3 Hz, 2H), 3.82 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 2.05 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.48 (s, 18H), 1.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 173.3, 170.2, 170.1, 170.5, 168.6, 159.9, 135.5, 135.4, 126.5, 126.4, 123.8, 116.8, 116.7, 106.8, 106.4, 106.1, 96.8, 96.5, 79.1, 72.6, 57.9, 52.1, 50.1, 31.7, 28.5, 26.6, 25.5 (br), 23.9, 19.6, 19.0, 12.1, 8.0 ppm. Mass spectrum (ESI), *m/z* 1095.5 [(M)⁺; calcd for C₅₆H₇₂D₄F₂N₈O₁₂: 1095.3].

Scheme XXVI



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl)-1-[2-(2-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (28): A solution containing **27** (170 mg, 0.15 mmol) in DCM (15 mL) was cooled to 0 °C. TFA (5 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was warmed to ambient temperature and monitored until LC/MS analysis revealed complete conversion of **27** to **28** (ca. 4 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and *carefully* poured onto an aqueous NaHCO₃/ice mixture. The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic extracts were washed several times with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford crude **28** as a light yellow-colored solid. Mass spectrum (ESI), m/z 895.3 [(M)+; calcd for C₄₆H₅₆D₄F₂N₈O₈: 895.0].

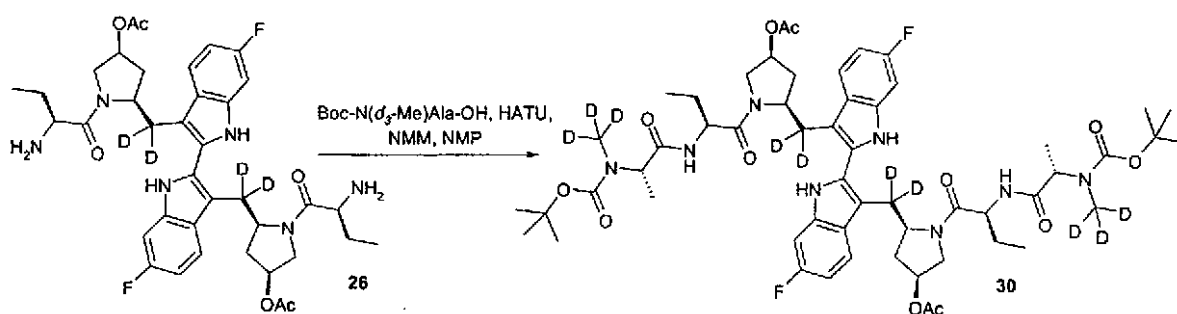
Scheme XXVII



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hydroxy-1-[2S-(2S-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2R-yl- d_2 -methyl}-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl)-4S-hydroxy-pyrrolidine-1-carbonyl]-propyl}-2S-methylamino-propionamide (29): To a solution containing crude **28** (0.15 mmol) in MeOH (20 mL) was added 1 M NaOH (5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was degassed and maintained under a nitrogen atmosphere wrapped with aluminum foil. The ice-bath was removed. After 60 min, the MeOH was removed *in vacuo* and the residue was diluted with water (20 mL) and extracted with EtOAc (50 mL). The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic extracts were

washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, concentrated, and lyophilized to afford 110 mg of **29** (90%, 2 steps) as a flocculent, white-colored solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mixture of rotomers: δ 11.58 (s, 2H), 7.80 (dd, $J = 5.4, 8.7$ Hz, 2H), 7.45 (dd, $J = 2.4, 9.9$ Hz, 2H), 6.87 (ddd, $J = 2.4, 9.2, 9.2$ Hz, 2H), 4.66 (dd, $J = 5.7, 7.8$ Hz, 2H), 4.60 (br s, 2H), 4.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.00 (dd, $J = 4.8, 11.4$ Hz, 2H), 3.76 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 3.43 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.19 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 1.78-2.02 (m, 8H), 1.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mixture of rotomers: δ 173.6, 171.8, 161.7, 158.6, 137.1, 136.9, 128.1, 128.0, 125.9, 119.8, 119.7, 108.3, 108.2, 107.8, 97.8, 97.5, 70.9, 69.4, 59.0, 56.1, 52.0, 36.3, 35.7, 25.5, 18.5, 9.8 ppm. Mass spectrum (ESI), m/z 811.4 [(M)+; calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 810.9].

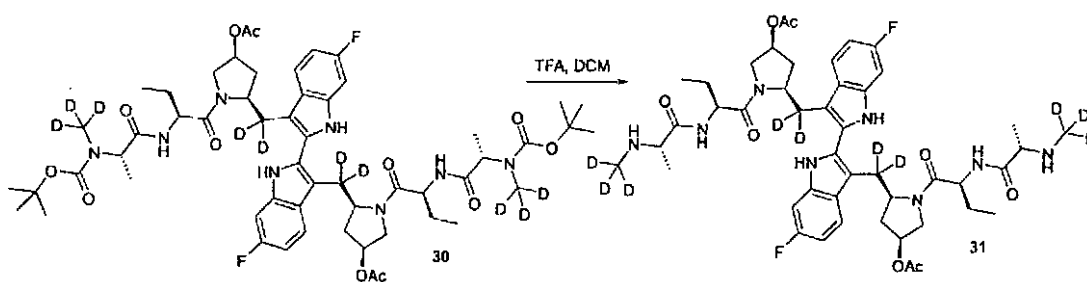
Scheme XXVIII



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2- d_3 -methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-yl- d_2 -methyl}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl)-1-[2-(2- d_3 -methyl-(tert-butoxycarbonyl)-amino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (30): To a solution containing Boc-N(d_3 -Me)Ala-OH (**17**, 83 mg, 0.41 mmol) and HATU (172 mg, 0.45 mmol) in anhydrous NMP (5 mL) at 0 °C was added NMM (0.1 mL, 0.85 mmol) followed by addition of crude **26** (123 mg, 0.17 mmol) in NMP (5 mL). The resulting mixture was allowed to warm to ambient temperature. After 16 h, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and washed successively with water (50 mL), 1N HCl (2 $\times$ 50 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2 $\times$ 50 mL), brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, concentrated. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, concentrated, and lyophilized to afford 160 mg of **30** (85%, 2 steps) as a flocculent, white-colored solid. ^1H NMR (300

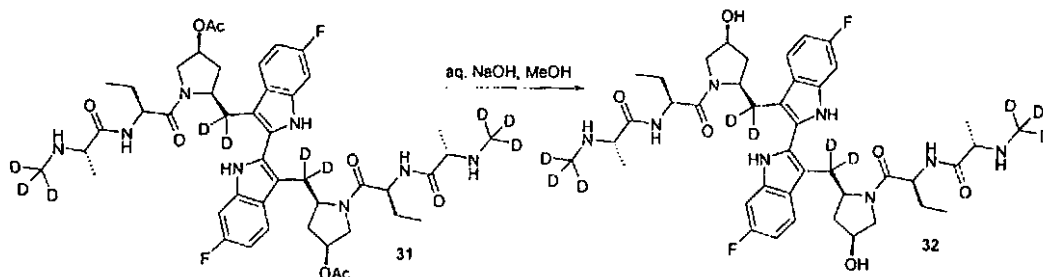
MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.87 (ddd, J = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.46 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.18 (dd, J = 3.9, 11.7 Hz, 2H), 3.83 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.24 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.49 (s, 18H), 1.38 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), mixture of rotomers: δ 175.6, 172.2, 172.1, 170.6, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.5, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.7, 108.4, 108.0, 98.8, 98.4, 81.1, 74.6, 66.1, 59.9, 54.0, 52.1, 33.7, 28.6, 27.5 (br), 25.8, 21.6, 20.9, 14.0, 9.9 ppm; Mass spectrum (ESI), m/z 1101.5 [(M)+; calcd for C₅₆H₆₆D₁₀F₂N₈O₁₂: 1101.3].

Scheme XXIX



Acetic acid 5-(3'-{4-acetoxy-1-[2-(2-*d*₃-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2-yl-*d*₂-methyl}-6,6'-difluoro-1*H*,1'*H*-[2,2']biindolyl-3-yl-*d*₂-methyl)-1-[2-(2-*d*₃-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-3-yl ester (31): A solution containing **30** (160 mg, 0.14 mmol) in DCM (15 mL) was cooled to 0 °C. TFA (5 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was warmed to ambient temperature and monitored until LC/MS analysis revealed complete conversion of **30** to **31** (ca. 4 h). The solvent was removed *in vacuo* and the dark, green-colored residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and *carefully* poured onto an aqueous NaHCO₃/ice mixture. The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic extracts were washed several times with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford crude **31** as a light yellow-colored solid. Mass spectrum (ESI), m/z 901.5 [(M)+; calcd for C₄₆H₅₀D₁₀F₂N₈O₈: 901.1].

Scheme XXX



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hydroxy-1-[2S-(2S-methylamino-propionylamino)-butyryl]-pyrrolidin-2R-yl- d_2 -methyl}]-1H,1'H-[2,2']biindolyl-3-yl- d_2 -methyl)-4S-hydroxy-pyrrolidine-1-carbonyl]-propyl}-2S-methylamino-propionamide (32): To a solution containing crude 31 (0.14 mmol) in MeOH (20 mL) was added 1 M NaOH (5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was degassed and maintained under a nitrogen atmosphere wrapped with aluminum foil. The ice-bath was removed. After 60 min, the MeOH was removed *in vacuo* and the residue was diluted with water (20 mL) and extracted with EtOAc (50 mL). The aqueous phase was separated and back-extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (Dynamax 2" C18 column; 10-100% ACN/water containing 0.1% HOAc over 30 min; 40 mL/min). The product-containing fractions were combined, concentrated, and lyophilized to afford 100 mg of 32 (87%, 2 steps) as a flocculent, white-colored solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ + d_4 -MeOH), mixture of rotomers: δ 11.62 (s, 2H), 7.79 (dd, J = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 7.47 (dd, J = 2.4, 10.2 Hz, 2H), 6.87 (ddd, J = 2.4, 9.2, 9.2 Hz, 2H), 4.68 (dd, J = 5.4, 7.5 Hz, 2H), 4.58 (m, 2H), 4.45 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.99 (dd, J = 4.8, 11.1 Hz, 2H), 3.75 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 3.19 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.15 (br d, J = 12 Hz, 2H), 1.78-2.02 (m, 8H), 1.39 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.07 (t, J = 7.5 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ + d_4 -MeOH), mixture of rotomers: δ 175.4, 172.0, 161.8, 158.7, 137.1, 137.0, 128.2, 128.0, 126.0, 119.9, 119.7, 108.4, 108.3, 107.9, 98.0, 97.6, 71.0, 60.0, 59.6, 56.2, 51.6, 36.4, 25.8, 19.5, 9.8 ppm; Mass spectrum (ESI), m/z 817.4 [(M)+; calcd for C₄₂H₄₆D₁₀F₂N₈O₆: 817.0].

Examples 2, 3, 4, and 5

Compounds tested in Examples 2, 3, 4, and 5 are shown in Table 1.

			(nM)		
15	27 (n=56)	15	174 (n=61)	100	6.4
2	4 (n=3)	0.6	7 (n=3)	0.8	1.8
3	328 (n=3)	83	674 (n=3)	69	2.1
4	464 (n=12)	112	604 (n=12)	192	1.3
5	10 (n=41)	2	37 (n=38)	19	3.7

These data show that Compound 15 has greater relative potency in degrading cIAP-1 relative to cIAP-2 when compared to Compounds 2, 3, 4, and 5.

Example 2B. Caspase-3 Derepression Assay

Exponentially growing MDA-MB-231 tumor cells (ATCC) were harvested by trypsinization and collected by centrifugation in a table top centrifuge at 1000xg for 10 minutes at room temperature. Cell pellet was washed one time by resuspending in 5 mL hypotonic lysis buffer (20 mM HEPES, pH7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM DTT) and recollected by centrifugation. Pellet was next resuspended in 1 volume of hypotonic lysis buffer supplemented with a complete protease inhibitor tablet (Roche) and allowed to swell on ice for 30 minutes. Cells were disrupted by approximately 50 passages through a 27 gauge needle. Lysis was monitored by light microscopy. Lysate was centrifuged at 12000xg for 10 minutes at 4°C to remove membrane fraction, unlysed cells and debris. The soluble fraction was collected for protein concentration determination and subsequent assay analysis. The hypotonic lysate (25 µg protein), 50 µg/mL cytochrome *c* and 10 mM dATP were combined in a microcentrifuge tube to a final volume of 9 µl in hypotonic lysis buffer followed by addition of test compound and incubated for 30 minutes at room temp. Following incubation 50 µl of hypotonic lysis buffer containing 5 µM of pro-fluorescent rhodamine-110₍₂₎ based caspase-3 substrate zDEVD-R110₍₂₎ was added and fluorescence intensity was monitored over time. Activation of the lysate by addition of cytochrome *c* and dATP results in apoptosome formation and subsequent activation of caspases-9 and -3. Endogenous XIAP inhibits much of this activity and addition of test compound to the activated lysate results in more caspase activity than is generated by activated lysate alone as measured by increase in fluorescence intensity upon cleavage of zDEVD-R110₍₂₎ by caspase-3. IC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism by plotting increase in fluorescence intensity vs. different concentrations of compounds tested and the results are shown in Table 3.

Table 3

<u>Compound</u>	<u>XIAP Caspase-3 Derepression IC₅₀ (nm)</u>	<u>SD</u>
15	24.3 (n=3)	2.0
2	13.4 (n=3)	4.3
3	0.2 (n=3)	0
4	0.35 (n=3)	0.2
5	0.36 (n=3)	0.05

These data show that Compound 15 has a lower potency for antagonizing XIAP function in comparison to Compounds 2, 3, 4, and 5.

Example 3 - Cytotoxicity

SKOV-3 ovarian tumor cell cytotoxicity data were generated substantially as follows. The MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay is an example of an assay that has been used for measuring cell growth as previously described (Hansen, M. B., Nielsen, S. E., and Berg, K. (1989) *J. Immunol. Methods* **119**, 203–210) and incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, SK-OV-3 cells were seeded in 96-well plates in McCoy’s medium containing 10% fetal bovine serum albumin (5,000 per well) and incubated overnight at 37°C. The next day, test compounds were added at various concentrations (0.003-10 µM) and the plates were incubated at 37°C for an additional 72 hrs. This incubation time was optimal for measuring inhibitory effects of different analogs. Fifty microliters of 5mg/mL MTT reagent to each well was added and the plates were incubated at 37°C for 3 hours. At the end of the incubation period, 50 microliters of DMSO was added to each well to dissolve cells and the optical density (OD) of the wells was measured using a microplate reader (Victor² 1420, Wallac, Finland) at 535 nm. Cell survival (CS) was calculated by the following equation:

$$CS = (OD \text{ treated well} / \text{mean OD control wells}) \times 100\%$$

The CC₅₀, defined as the drug concentration that results in 50% CS, was derived by calculating the point where the dose-response curve crosses the 50% CS point using GraphPad Prism. These results suggest that Smac mimetics that bind to cIAP-1 can be used in the treatment of cancer either as monotherapy or in combination with chemotherapeutics.

The results of SKOV-3 cytotoxicity assays for the compounds tested in this assay are shown in Table 4.

Table 4

<u>Compound</u>	<u>CC₅₀</u> <u>(nM)</u>	<u>Std Dev</u> <u>(nM)</u>
15	0.14 (n=76)	0.02
2	0.5 (n=6)	0.1
3	13 (n=4)	4
4	2 (n=23)	0.3
5	0.13 (n=76)	0.1

These data indicate that Compound 15 has equivalent potency to Compound 5 and is more potent than Compounds 2, 3, and 4.

Example 4 – Toxicity

Body weight loss (BWL), mortality and additional toxicity data were generated substantially as follows. Sprague-Dawley rats were dosed daily (QDx4, i.v. bolus slow push) with Compounds 15, 4 and 5. Body weights were taken on day 4 and are shown as percent change from day 1. Compounds 4 and 5 were administered at 0.3 mg/Kg, 1 mg/Kg, or 3 mg/Kg; Compound 15 was administered at 1, 5, or 10 mg/Kg.

The results of the BWL assay are shown in Fig 1.

Mortality. Compounds 4 and 5 were not tolerated at 3 mg/Kg, and caused the animals to die at this dose. No mortality was observed with Compound 15 at 5 mg/Kg (mortality was observed at 10 mg/Kg.)

Clinical Results. There were no clinical signs noted at 1 mg/kg/day with Compound 15 after 4 days of administration. Animals treated with Compound 15 at 5 mg/kg/day exhibited clinical signs similar to Compounds 4 and 5 at 1 mg/kg/day such as lethargy, increased/irregular respiration and increased heart rate. Rats treated with 1 mg/kg Compound 5 exhibited additional clinical observations including dehydration, ungroomed appearance, chromorhinorrhea, alopecia (head), and excessive scratching from days 2 to 4.

Body Weight. At 1 mg/Kg, animals receiving Compounds 4 and 5 lost weight whereas animals receiving Compound 15 at 1 mg/kg/day gained weight. At 5 mg/kg/day with Compound 15, a treatment related mean body weight loss of approximately 8% was noted

from day 1 to day 4. A treatment-related mean body weight loss of approximately 4 % and 6 % was noted in animals treated with Compounds 4 and 5, respectively, at 1 mg/kg/day.

Pathology. Assessment of anatomic pathology after treatment with Compounds 4 and 5 at 1 mg/kg/day resulted in the following findings. There was marked to severe bone marrow hypocellularity of the erythroid series, mild to moderate hypercellularity of the myeloid series, and mild to moderate hypertrophy and hyperplasia of megakaryocytes in the tibia and sternum when Compounds 4 and 5 were administered at 1 mg/kg/day. For Compounds 4 and 5 the lungs had dose-related mild to moderate diffuse hypertrophy/hyperplasia of Type 2 pneumocytes which were accompanied by an increase in alveolar macrophages, hypertrophied bronchiolar epithelium, proliferating perivascular mononuclear cells and hypertrophied visceral pleural cells. In contrast, assessment of anatomic pathology following treatment with Compound 15 at the same dose (1 mg/kg/day) identified minimal to mild hypocellularity of erythroid cells, minimal to mild hypercellularity of myeloid cells, and minimal Type 2 pneumocyte hypertrophy in the lungs.

The data described above indicate that Compound 15 is approximately 5-fold better tolerated in the rat as compared to Compounds 4 and 5 on a dose per dose basis.

Example 5 – Tumor Volume Reduction and Body Weight Change

MDA-MB-231 xenograft data were generated substantially as follows. MDA-MB-231 human breast tumor cells were injected into the mammary fat pad of female nude mice and dosing initiated twelve days later at an average tumor volume of approximately 148 mm³. No tumor burden was associated with this model based on lack of weight loss or animal morbidity in control groups. Mice were injected subcutaneously into the mammary fat pad with 1x10⁷ cells suspended in 200µl of a 1:1 HBSS: Matrigel solution ; injected cells were within nine passages of the original lot. Pre-study tumor volumes were recorded beginning approximately one week prior to the estimated start date. When tumors reached approximately 150 mm³ animals are matched by tumor volume into treatment and control groups and dosing initiated (Day 0); mice are tagged and followed individually throughout the experiment. Animals were dosed by weight (0.01 mL per gram; 10 ml/Kg). Beginning on Day 0, animals were observed daily and weighed twice weekly using a digital scale (Ohaus SP601); data including individual and mean gram weights (Mean We ± SD), mean percent weight change versus Day 0 (%vD₀) and mean percent weight change versus prior measurement (%vD_{-x}) were recorded for each group and plotted at study completion.

Beginning on Day 0, tumor dimensions were measured twice weekly by digital caliper (Fowler Ultra-Cal IV) and data including individual and mean estimated tumor volumes (Mean TV $\pm$ SEM) recorded for each group; tumor volume was calculated using the formula: $TV = width^2 \times length \times 0.52$. Individual mice reaching the designated study endpoint (an estimated tumor volume of approximately 1 cm³) were assigned a time to endpoint (TTE) value corresponding to that day; the tumor growth delay (TGD) study was concluded once all mice reach the study endpoint or sixty days following study initiation. At study completion, TGD and %TGD are calculated using the median TTE (MTTE) value for each treatment (T) group versus control (C) by the formulas: $TGD_{(days)} = T - C$ and $\%TGD = T - C / C \times 100$, wherein $T - C$ is the difference between MTTE-Treatment Group and MTTE-Control. Tumored animals not reaching the designated volume endpoint by study completion are considered long-term survivors (LTS) and assigned a TTE value corresponding to the final study day; tumor-free animals are not included in TGD calculations. A Log-rank test is used to determine statistically significant differences in overall survival experience between each treated group compared to control. Individual mice reporting a tumor volume $\leq 50\%$ of the Day 0 measurement for two consecutive measurements over a seven day period were considered partial responders (PR). If the PR persisted until study completion, percent tumor regression (%TR) was determined using the formula: $\%TR = 1 - T_f / T_i \times 100$; a mean value was calculated if multiple PR mice occurred in one group. Individual mice lacking palpable tumors ($< 4 \times 4 \text{ mm}^2$ for two consecutive measurements over a seven day period) were classified as complete responders (CR); a CR that persisted until study completion was considered a tumor-free survivor (TFS); TFS animals are excluded from TGD calculations and statistical analysis. Statistical differences in MTTE values between control and treatment groups are compared using a Log Rank test.

Compound 15 was administered by i.p. injection alone at 20, 40 or 60 mg/Kg on a q3dx5 schedule (every three days for 5 cycles). T-C values of 22 days were calculated for these groups, all of which were found statistically significant compared with control ($p=0.005$, $p<0.0001$, or $p=0.0001$). In the 20 mg/Kg group, 6/10 mice were considered long-term survivors and partial tumor regression was reported in three mice. In the 40 mg/Kg group, 9/10 mice were considered long-term survivors and partial tumor regression was reported in three mice. In the 60 mg/Kg group, 8/10 mice were considered long-term survivors and partial tumor regression was reported in seven mice.

Compound 5 was administered by i.p. injection alone at 15 mg/Kg on a q3dx5 schedule. A T-C value of 21 days was calculated for this group which was found to be statistically significant compared with control ($p=0.002$). In this group 3/10 mice were considered long-term survivors and partial tumor regression was reported in five mice. The efficacy of this dose level produced half the number of long term survivors as 20 mg/Kg of Compound 15. The results of the MDA-MB-231 xenograft assay are shown in Figures 2A and 2B.

Compound 15 at 20 mg/Kg had comparable anti-tumor activity to Compound 5 at 15 mg/Kg. Subsequent studies have shown that the minimal effective dose of Compound 15 in this model is less than 1 mg/Kg. Weight loss was greater in the mice administered Compound 5 at 15 mg/Kg when compared to the mice dosed with Compound 15 at 20 mg/Kg. Thus, Compound 15 has comparable efficacy with less toxicity relative to Compound 5 and therefore has an improved therapeutic index.

The compound of Formula 1 is particularly well tolerated and well suited for use in a pharmaceutical composition, as well as in a method for treating a proliferative disorder or an autoimmune disorder. In particular, the pharmaceutical composition of the invention for the treatment of a proliferative disorder, which comprises an effective amount of Compound 15 in addition to at least one pharmaceutically acceptable excipient, can improve therapeutic index by reducing toxicities. The reduced toxicities include, e.g., one of, or any combination of one or more of:

- reduced body weight loss,
- decreased incidence of mortality,
- reduced bone marrow hypocellularity of the erythroid series,
- reduced hypercellularity of the myeloid series,
- reduced hypertrophy and hyperplasia of megakaryocytes,
- reduced diffuse hypertrophy/hyperplasia of Type 2 pneumocytes
- decreased lethargy,
- more regular respiration,
- lessened increase in heart rate.

The reduced toxicities listed above are those observed in the animals tested. Similar, additional, or different reduced toxicities will be observed in humans. The reductions are relative, e.g., relative to the extent that toxicities would be observed following internal administration of a pharmaceutical composition in which the active pharmaceutical ingredient is an analog of Compound 15, e.g., one or more of the analogs in which R5 is $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-R-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-S-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, and $-R-\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$, e.g., at the same dose or at a dose of comparable potency.

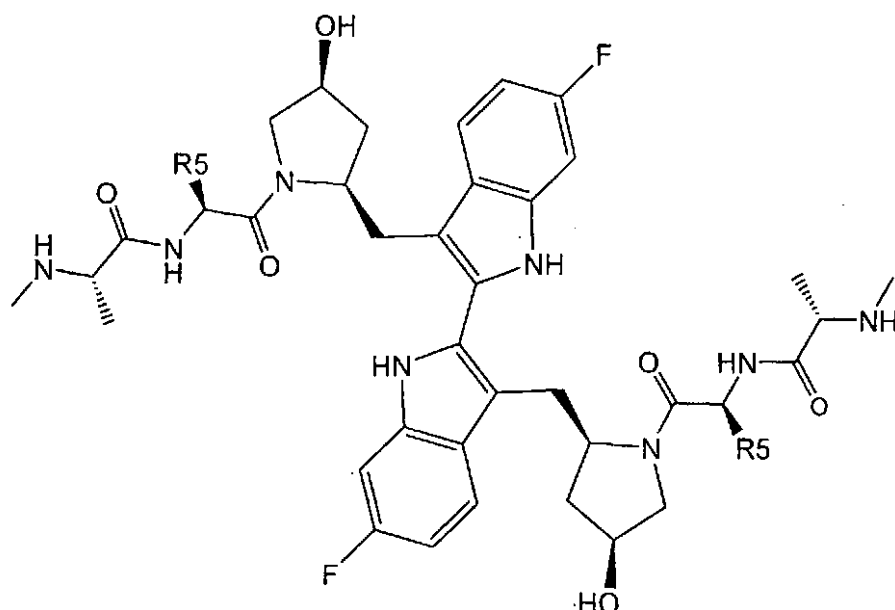
It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and the scope of the appended claims.

WO 2011/002684

PCT/US2010/039976

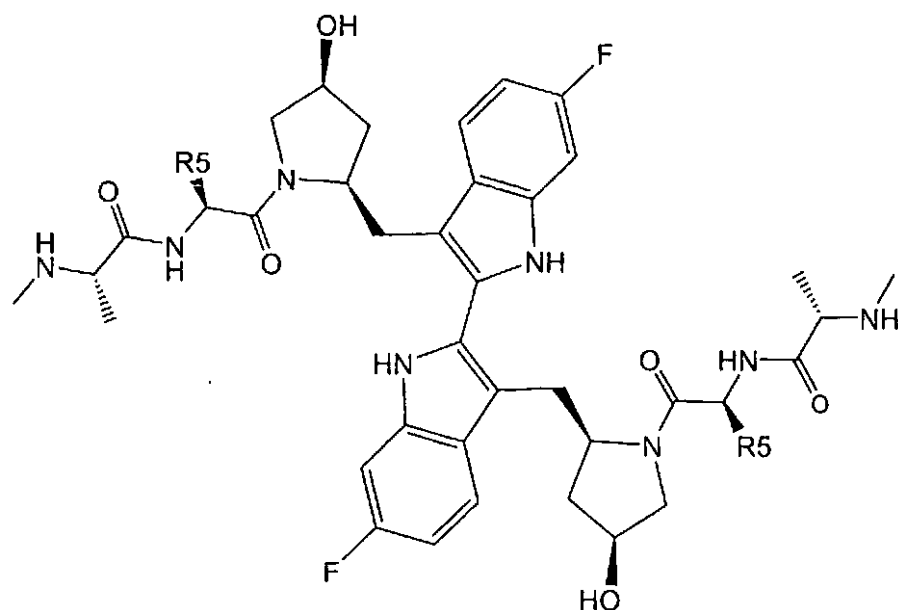
Claims:

1. A compound having the formula:



wherein R5 is $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A pharmaceutical composition comprising the compound having the formula:



wherein R5 is $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable excipient.

3. The pharmaceutical composition of claim 2 for the treatment of a proliferative disorder.

4. The pharmaceutical composition of claim 2 for the treatment of a cancer.
5. The pharmaceutical composition of claim 2, 3, or 4 which is a sterile liquid for injection.
6. The pharmaceutical composition of claim 2, 3, 4, or 5 which is in a unit dose form.
7. A method of treating a proliferative disorder in a mammal in need thereof that comprises internally administering to the animal an effective amount of Compound 15.
8. The method of claim 7 wherein the proliferative disorder is a cancer selected from the group consisting of: lung adenocarcinoma, pancreatic cancer, colon cancer, ovarian cancer, breast cancer, mesothelioma, peripheral neuroma, bladder cancer, glioblastoma, melanoma, adrenocortical carcinoma, AIDS-related lymphoma, anal cancer, bladder cancer, meningioma, glioma, astrocytoma, breast cancer, cervical cancer, chronic myeloproliferative disorders (e.g., chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia), colon cancer, endocrine cancers, endometrial cancer, ependymoma, esophageal cancer, Ewing's sarcoma, extracranial germ cell tumors, extragonadal germ cell tumors, extrahepatic bile duct cancer, gallbladder cancer, gastric cancer, gastrointestinal carcinoid tumors, gestational trophoblastic tumors, hairy cell leukemia, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, hypopharyngeal cancer, intraocular melanoma, islet cell carcinoma, Kaposi sarcoma, laryngeal cancer, leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, lip cancer, oral cavity cancer, liver cancer, male breast cancer, malignant mesothelioma, medulloblastoma, melanoma, Merkel cell carcinoma, metastatic squamous neck cancer, multiple myeloma and other plasma cell neoplasms, mycosis fungoides and the Sezary syndrome, myelodysplastic syndromes, nasopharyngeal cancer, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, oropharyngeal cancer, bone cancers, including osteosarcoma and malignant fibrous histiocyte of bone, ovarian epithelial cancer, ovarian germ cell tumors, ovarian low malignant potential tumors, pancreatic cancer, paranasal sinus cancer, parathyroid cancer, penile cancer, pheochromocytoma, pituitary tumors, prostate cancer, rectal cancer, renal cell cancer, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, salivary gland cancer, skin cancer, small intestine cancer, soft tissue sarcoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumors, pineoblastoma, testicular cancer, thymoma, thymic carcinoma, thyroid cancer, transitional

cell cancer of the renal pelvis and ureter, urethral cancer, uterine sarcoma, vaginal cancer, vulvar cancer, and Wilm's tumor and other childhood kidney tumors.

9. The method of claim 7 wherein the proliferative disorder is a cancer selected from the group consisting of: sarcomas, bladder cancer, ovarian cancer, breast cancer, brain cancer, pancreatic cancer, colon cancer, blood cancer, skin cancer, lung cancer, and bone cancer.

10. The method of claim 7 wherein the cancer is selected from colorectal cancer, renal carcinoma, ovarian carcinoma, pancreatic carcinoma, prostate carcinoma, breast carcinoma, melanoma, glioblastoma, acute myeloid leukemia, small cell lung cell carcinoma, non-small cell lung carcinoma, rhabdomyosarcoma, and basal cell carcinoma.

11. A method for inducing apoptosis in a cell comprising contacting the cell with Compound 15 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

12. The method of claim 11 wherein the cell is a cancer cell.

13. The method of any one or more of claims 7 through 12 that comprises administering Compound 15 in combination with a second cancer therapy selected from radiation, chemotherapy, immunotherapy, photodynamic therapy, and combinations thereof.

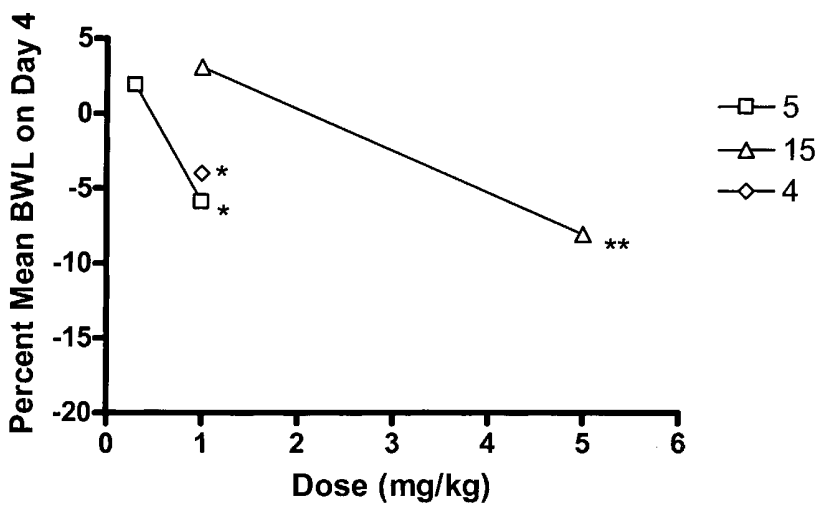
14. A method of treating an autoimmune disease, in a mammal in need thereof, wherein the autoimmune disease is one in which the condition is caused or exacerbated by abnormal regulation of apoptosis and is selected from the group consisting of: systemic lupus erythematosus, psoriasis, and idiopathic thrombocytopenic purpura (Morbus Werlhof) that comprises internally administering to the animal an effective amount of Compound 15 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15. A compound selected from the group consisting of Compound 9, Compound 10, Compound 11, Compound 12, Compound 13, and Protected Compound 15.

16. The compound of claim 15 that is Compound 14.

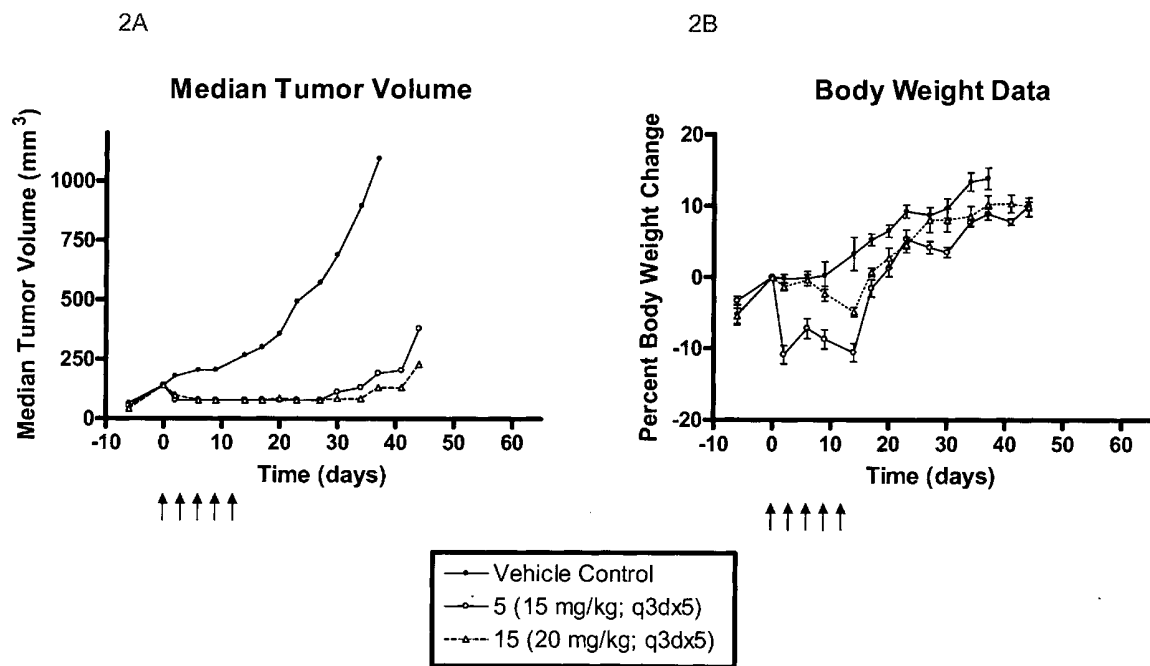
17. A process for preparing Compound 15 that comprises deprotecting a Protected Compound 15.
18. The process of claim 17 wherein the Protected Compound 15 is Compound 14.
19. A compound selected from the group consisting of Compound 19, Compound 20, Compound 28, Compound 29, Compound 31, and Compound 32.

Figure 1



*Mortality at 3 mg/kg
**Mortality at 10 mg/kg

Figure 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/39976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07D 217/00 (2010.01) USPC - 546/144 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 546/144 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 546/148,312,161 (see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar SMAC, Diablo, mimetic, peptidomimetic, apoptosis, promot\$, increas\$, indole, bisindol\$, bis-indol\$, \$bisindole, \$bis-indole, cancer, carcinoma, tumor, treat\$, inhibit\$, prodrug, isotope, deuterium		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2006/0194741 A1 (CONDON et al.) 31 August 2006 (31.08.2006) para [0041], [0049], [0077], [0091], [0099], [0101]-[0110], [0227], [0229], [0232], [0250]	1-5, 7-12, 14 ----- 15-19
Y	US 2008/0119532 A1 (HARRAN et al.) 22 May 2008 (22.05.2008) para [0021], [0062], [0065], [0161]-[0176]	15-19
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 August 2010 (11.08.2010)		Date of mailing of the international search report 31 AUG 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

000059

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/39976

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6, 13
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

MIMÉTICO DE SMAC

Campo de la Invención

Está invención está en el campo de los miméticos de SMAC y composiciones y usos
5 de los mismos para tratar desórdenes proliferativos incluyendo tipos de cáncer.

Antecedentes de la Invención

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) son proteínas de origen natural
intracelular que inhiben la apoptosis dependiente de caspasa. SMAC, también
10 conocido como DIABLO, es otra proteína intracelular que funciona para antagonizar,
es decir, inhibir la actividad de las IAPs. En las células sanas normales, SMAC y IAP
funcionan juntas para mantener saludables las células. Sin embargo, en ciertos
estados de enfermedad, por ejemplo, el cáncer y otros trastornos proliferativos, IAP
no son adecuadamente antagonizadas y por lo tanto, previenen la apoptosis y
15 causan o exacerban la proliferación anormal y la supervivencia

Los miméticos de SMAC, también son conocidos como antagonistas IAP, son
pequeñas moléculas sintéticas que imitan la estructura y la actividad de los
antagonistas IAP de los cuatro aminoácidos N-terminal de SMAC. (Los miméticos de
SMAC se refieren a veces como antagonistas del IAP.) Cuando se administra a los
20 animales que sufren trastornos de proliferación, los miméticos de SMAC antagonizan
a IAPs, causando un aumento en la apoptosis entre células anormalmente
proliferativas.

Ejemplos de peptidomiméticos de SMAC peptidomimetics son los descrito en US 7.517.906; US 7.309.792; US 7.419.975; US 2005/0234042; US 2005/0261203; US 2006/0014700; US 2006/0025347; US 2006/0052311; US 2006/0128632; US 2006/0167066; US 2007/0042428; US 2007/032437; US 2008/0132485; WO 5 2005/069888; WO 2005/069894; WO 2006/010118; WO 2006/122408; WO 2006/017295; WO 2006/133147; WO 2006/128455; WO 2006/091972; WO 2006/020060; WO 2006/014361; WO 2006/097791; WO 2005/094818; WO 2008/045905; WO 2008/016893; WO 2007/136921; WO 2007/021825; WO 2007/130626; WO 2007/106192; y WO 2007/101347.

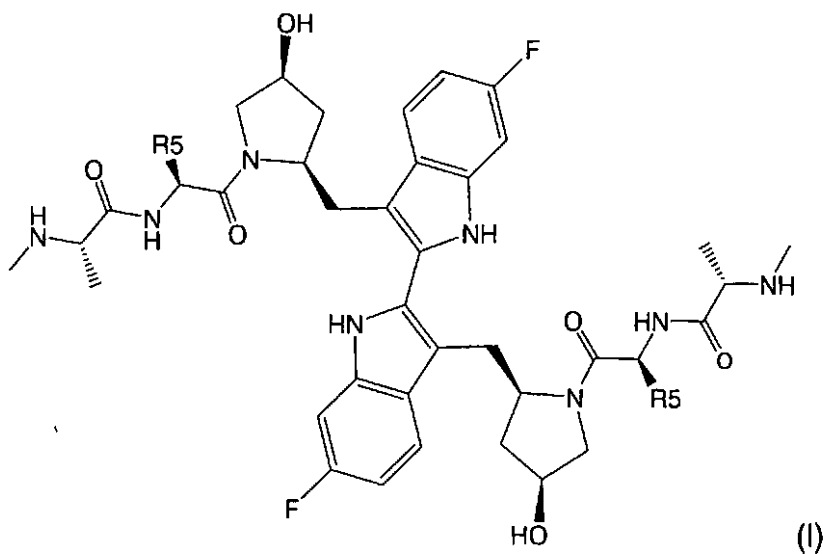
10

Resumen de la Invención

Esta invención, en un aspecto es N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-(4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil)-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidroxi-pirrolidine-1-carbonil]-propil}-2S-metilamino-propionamida y sales 15 farmacéuticamente aceptables del mismo, así como diversas formas de tal compuesto y sales del mismo como se describen a continuación.

Este compuesto tiene la siguiente estructura:

20



5 en que R5 es $-\text{CH}_2\text{CH}_3$. Este compuesto también se conoce aquí como
Compuesto 15.

La invención, en los aspectos relacionados, comprende una composición
farmacéutica que comprende dicho compuesto y un método para tratar un trastorno
10 proliferativo en un mamífero humano o no humano que lo necesite, que comprende
administrar internamente al sujeto una cantidad eficaz de dicho compuesto o de una
sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otros aspectos, la invención comprende un método para tratar un trastorno
15 proliferativo en un mamífero que lo necesite, por ejemplo, un ser humano o un animal
de compañía, un animal para originar alimentos, o un animal para deportes, que
comprende administrar internamente al animal una cantidad efectiva de un
Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable.

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

5

En otros modos de realización ilustrativa, la invención comprende uno o más de los métodos anteriores que comprende además la administración de una segunda terapia relacionada con el cáncer la, tal como, por ejemplo, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica, y sus combinaciones

10

En una realización ilustrativa, la invención comprende un método para tratar una enfermedad autoinmune, en la que la afección es causada o agravada por una regulación anormal de la apoptosis, en un mamífero que lo necesite, incluyendo, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, y púrpura trombocitopénica idiopática (Morbus Werlhof) que comprende administrar internamente al animal una cantidad eficaz del Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

Breve descripción de las Figuras

20 La figura 1 muestra la media por ciento de pérdida de peso corporal en ratas después de 4 días de la administración en bolo intravenoso con miméticos de SMAC sustancialmente como se describe en el Ejemplo 4.

La figura 2 muestra la media del volumen del tumor (2A) y cambio de peso corporal (2B), resultantes del tratamiento de xenoinjertos humanos en ratones atímicos con miméticos de SMAC sustancialmente como se describe en el Ejemplo 5.

5 Descripción Detallada de la Invención

El compuesto de la invención es un mimético de SMAC que puede ser utilizado en el tratamiento de trastornos proliferativos, por ejemplo: varios tumores benignos o tumores malignos (cáncer), enfermedades proliferativas benignas (por ejemplo, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, y reestenosis), o enfermedades autoinmunes (por ejemplo, glomerulonefritis proliferativa autoinmune, respuestas autoinmunes linfoproliferativas). Los cánceres que, potencialmente, pueden ser tratados con antagonistas de la IAP incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: adenocarcinoma de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, mesotelioma, neuroma periférico, cáncer de vejiga, el glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de vejiga, meningioma, glioma, astrocitoma, cáncer de mama, cáncer cervical, trastornos mieloproliferativos crónicos (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica), cáncer de colon, cáncer endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales extracraneales, tumores de células germinales extragonadales, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores trofoblásticos gestacionales, leucemia de células pilosas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de

- Kaposi, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer de labio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer escamoso metastásico del cuello, mieloma múltiple y otras
- 5 neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide y el síndrome de Sézary, síndromes mielodisplásicos, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de orofaringe, cáncer de los huesos, incluyendo el osteosarcoma y el histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer epitelial de ovario, tumores de células germinales de
- 10 ovario, tumores de bajo potencial maligno de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de los senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores de pituitaria, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores
- 15 neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, pineoblastoma, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, cáncer de uretra, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, y tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles.
- 20 Algunas realizaciones de la invención incluyen la inducción de apoptosis de las células, en particular las proliferativas patológicamente. Los métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*.

Los métodos de la invención pueden incluir la administración del compuesto de la

invención solo, la administración de una combinación de antagonistas de IAP, o la administración del compuesto de la invención, con o sin uno o más antagonistas de IAP adicionales, y uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. La administración de múltiples agentes puede ser simultánea o secuencial. Los agentes

5 quimioterapéuticos útiles incluyen, pero no se limitan a, los agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, clorambucil, melfalán), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina), disruptores del citoesqueleto (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel),

10 epotilonas (por ejemplo, epotilona A, epotilona B, epotilona D), los inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido, taflupósido), análogos de precursores de nucleótidos (por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina , mercaptopurina, metotrexato, tioguanina), antibióticos peptídicos (por ejemplo, bleomicina), agentes basados en platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino), retinoides

15 (por ejemplo, el ácido trans-retinoico), y alcaloides de vinca y sus derivados (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina). En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos incluyen fludarabina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, camptotecina, etopósido, topotecán, irinotecán, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, amsacrina, mitoxantrona, 5-fluoro-uracilo, o gemcitabina.

20

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención, solo o en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticos activos, se administran a un sujeto humano o veterinario. Las composiciones farmacéuticas comprenden típicamente al menos un excipiente

- farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un vehículo o diluyente, y se pueden administrar de manera convencional por vías que incluyen vías sistémica, tópica u oral. La administración es normalmente por vía intravenosa, ya sea en forma de bolo o infusión, pero otras vías de administración no están excluidas. Una formulación
- 5 intravenosa puede ser de 1 mg/ml del Compuesto 15 en tampón citrato estéril PBS 0,05 M, a pH 5. Los modos específicos de administración dependerán de la indicación y otros factores, como el compuesto particular que se administra. La cantidad de compuesto a ser administrada es la cantidad que es terapéuticamente eficaz. La dosis a administrar dependerán de las características del sujeto a tratar,
- 10 por ejemplo, características particulares del paciente tratado, edad, peso, salud, tipos de tratamientos simultáneos, si es el su caso. La frecuencia de los tratamientos puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia (por ejemplo, por el médico).
- 15 Por lo general, el compuesto de la invención se administra por inyección intravenosa, incluyendo, por ejemplo, por infusión durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 minutos, por ejemplo, unos 30 minutos.

- La composición farmacéutica de la invención es una composición en la que el
- 20 ingrediente farmacéutico activo, es decir, el compuesto de la invención, es lo suficientemente puro, y de esta forma la composición es adecuada, para la administración interna a un humano u otro mamífero. Se puede preparar en forma de dosis unitarias, es decir, una forma adecuada para la administración única a un sujeto. Así, por ejemplo, una composición farmacéutica en forma intravenosa de

- dosis unitaria puede comprender un vial o una jeringa precargada, cada uno comprende una cantidad efectiva o una fracción conveniente de una cantidad eficaz de tal manera que el contenido de un vial o una jeringa se administran en una vez. Dicha administración se puede repetir hasta alrededor de 4 veces al día, si es necesario, durante un período de tiempo, para alcanzar una dosis acumulativa efectiva, por ejemplo, en la regresión de un tumor. Un régimen de dosificación puede ser, por ejemplo, inyecciones, vía intravenosa diaria o dos veces por semana, o, por ejemplo, inyecciones semanales en ciclos de tres semanas y una semana de descanso durante el tiempo que el tratamiento es eficaz, por ejemplo, hasta que progresa la enfermedad o hasta que el medicamento sea tolerado. La dosis efectiva administrada en cada inyección es una cantidad que es eficaz y tolerable, que puede ser, por ejemplo, 0,01 a 30 mg/m², por ejemplo, 0,2 a 10 mg/m², o, por ejemplo, de 0,5 a 5 mg/m²
- 15 El compuesto de la invención también puede ser aplicado a nivel local, como en la perfusión de un miembro aislado. El compuesto de la invención también puede aplicarse por vía tópica, por ejemplo, en forma de crema, gel, loción o ungüento, o en un parche tipo reservorio o matriz, o en un sistema de liberación transdérmica activa.
- 20 Una dosis efectiva es aquella que en el transcurso de la terapia, que puede ser, por ejemplo, una o más semanas, por ejemplo, un múltiplo de 3 semanas con tratamiento / 1 semana de descanso, entrega resultados en el tratamiento de la enfermedad proliferativa, es decir, una disminución en la tasa de progresión de la enfermedad, el término de la progresión de la enfermedad, o la regresión o remisión.

Las composiciones farmacéuticas que se utilizan comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable u otra forma del mismo, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La frase "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su administración en uso médico. Debe tenerse en cuenta que las determinaciones de las formas de dosificación adecuada, cantidades de dosis y vías de administración en un paciente en particular se encuentran a nivel del experto en la técnica farmacéutica y médica.

10 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del compuesto de la invención, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede ser formulada de acuerdo con los métodos conocidos usando vehículos adecuados o diluyentes que pueden incluir un tampón.

15

Durante la práctica de la terapia combinada o conjunta descrita describe en mayor detalle más adelante, la administración de los compuestos y composiciones de la presente invención, pueden ocurrir simultáneamente, posterior, o previo a la quimioterapia o la radioterapia, siempre y cuando el agente de quimioterapia o radiación sensibilicen el sistema para el compuesto y composiciones de la presente invención.

20

La presente invención también está dirigida al uso de los compuestos y composiciones como agentes potenciadores de quimioterapia con otros enfoques de

tratamiento. El término "agente potenciador de quimioterapia" se refiere a un agente que actúa para aumentar la sensibilidad de un organismo, tejido o célula a un compuesto químico, o tratamiento a saber, "agentes quimioterapéuticos" o "medicamentos de quimioterapia", o para el tratamiento de radiación. Así, el
5 compuesto y composiciones de la presente invención pueden ser utilizado para inhibir el crecimiento tumoral in vivo mediante la administración de ellos en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico o para su uso en combinación con radiación. En estas aplicaciones, la administración del compuesto y composiciones de la presente invención puede ocurrir antes, y con el tiempo
10 suficiente, para causar la sensibilización del sitio ser tratado. Alternativamente, el compuesto y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar simultáneamente con radiación y/o agentes químicos adicionales contra el cáncer (infra). Estos sistemas pueden evitar la administración repetida del compuesto y las composiciones de la presente invención, aumentando la comodidad para el sujeto y
15 el médico, y puede ser especialmente adecuado para ciertas composiciones de la presente invención.

Los agentes biológicos quimioterapéuticos/antineoplásicos y la radioterapia, inducen la apoptosis mediante la activación de las vías de apoptosis extrínseca o intrínseca,
20 y, puesto que el compuesto y las composiciones de la presente invención disminuyen los antagonistas de las proteínas apoptóticas (IAPs) y, por tanto, evitan el bloqueo de la apoptosis, la combinación de agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y la radiación con el compuesto y las composiciones de la presente invención debe trabajar de forma aditiva o sinérgicamente para facilitar la apoptosis

Una combinación del compuesto de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o radioterapia de cualquier tipo que activen la vía extrínseca o intrínseca puede proporcionar un enfoque más eficaz para destruir células tumorales. El compuesto de la presente invención se relaciona con la IAPs, tales como XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP, etc, y elimina el bloqueo de apoptosis mediada por IAP. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y/o terapia de radiación mata las células que se dividen activamente mediante la activación de la vía de apoptosis intrínseca que conduce a la apoptosis y muerte celular. Los agentes antitumorales biológicos, tales como TRAIL (TNF-relacionado con ligando inductor de apoptosis) activa las vías de apoptosis extrínseca. Como se describe en mayor detalle más adelante, las realizaciones de la invención proporcionan las combinaciones de los compuestos de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásico y/o radioterapia, los que proporcionan una acción sinérgica contra la proliferación celular no deseada. Esta acción sinérgica entre el compuesto de la presente invención y un agente biológico o quimioterapéutico/anti-neoplásicos y o la radioterapia puede mejorar la eficiencia de los agentes biológicos o quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y/o terapias con radiación. Esto permitirá un aumento en la eficacia de los actuales agentes biológicos o quimioterapéuticos/anti-neoplásicos o los tratamientos con radiación, lo que permite un mayor porcentaje de tumores que responden a la terapia, una respuesta al tumor mejorada, y, posiblemente, una reducción en la dosis de los agentes biológicos o de los agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos necesarios para tratar un tumor, lo que proporciona el uso de una dosis más tolerable de agentes biológicos o quimioterapéuticos/anti-neoplásicos y/o radioterapia.

En una realización de la presente invención, el paciente es tratado por la administración del compuesto o una composición farmacéutica de la presente invención en un tiempo simultáneo o precedente en que el paciente está sujeto a radiación o quimioterapia para el tratamiento de una patología neoproliferativa de un tumor, tales como, pero no limitado a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer renal, hepatoma, melanoma, linfoma, sarcoma, y sus combinaciones.

10 En otra realización de la presente invención, el compuesto o una composición de la presente invención se pueden administrar en combinación con un agente biológico o quimioterapéutico y/o para su uso en combinación con radioterapia, inmunoterapia y/o la terapia fotodinámica, que promueven la apoptosis y aumentan la eficacia de la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, y/o la terapia fotodinámica.

15

Las realizaciones de la invención también incluyen un método de tratamiento de un paciente afectado con cáncer mediante la administración contemporánea o simultánea de un agente biológico o quimioterapéutico. Estos agentes biológicos o quimioterapéuticos incluyen pero no están limitados a los agentes quimioterapéuticos descritos en "Modern Pharmacology with Clinical Applications", sexta edición, Craig & Stitzel, Cápt. 56, págs 639-656 (2004), que se incorporan aquí como referencia. El agente quimioterapéutico puede ser, pero no se limita a, los agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, productos derivados de plantas como los taxanos, enzimas, agentes hormonales, agentes diversos, tales

como anticuerpos cisplatino, anticuerpos monoclonales, glucocorticoides, inhibidores de la mitosis, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, agentes inmunomoduladores como interferones, factores del crecimiento celular, citoquinas, compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), factores de
5 crecimiento celular e inhibidores de quinasa. Otras clasificaciones adecuadas para los agentes quimioterápicos incluyen inhibidores de la mitosis, y agentes anti-estrogénicos.

Ejemplos específicos de agentes biológicos y quimioterapéuticos y incluyen, pero no
10 se limitan a, cisplatino, carmustina (BCNU), 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), gemcitabina, metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, dexametasona, topotecan, etopósido, paclitaxel, vincristina, tamoxifeno, TNF-alfa, TRAIL y otros miembros, es decir, aparte de TRAIL y TNF-alfa, los de la superfamilia de las moléculas de TNF, interferón (en sus dos formas alfa y beta), talidomida, derivados
15 de talidomida, tales como lenalidomida, melfalán, y los inhibidores de PARP. Otros ejemplos específicos de agentes de quimioterapia incluyen mostazas nitrogenadas, tales como ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, etileniminas, triacenos, antagonistas de folatos, análogos de purina, análogos de pirimidina, antraciclinas, bleomicinas, mitomicina, dactinomicinas, plicamicina, alcaloides de vinca,
20 epipodofilotoxinas, taxanos, glucocorticoides, L-asparaginasa, estrógenos, andrógenos, progestágenos, hormona luteinizante, acetato octreotida, hidroxiurea, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina, carboplatino, mitoxantrona, anticuerpos monoclonales, levamisol, interferones, interleuquinas, filgrastim y sargramostim.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere al uso del compuesto o una composición de la presente invención en combinación con inhibidores de topoisomerasa para potenciar su efecto inductor de apoptosis. Los inhibidores de topoisomerasa inhiben la replicación y reparación del ADN, con lo que promueven la apoptosis y se utilizan como agentes quimioterapéuticos.

Los inhibidores de la topoisomerasa promueven el daño del ADN mediante la inhibición de las enzimas que se requieren en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, la exportación de Smac desde las mitocondrias en el citosol de la célula es provocado por el daño del ADN causado por los inhibidores de la topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa tanto de tipo I, (camptotecina, topotecan, SN-38 (metabolito activo irinotecan) y los de tipo II (etopósido) se espera que muestren una sinergia potente con los compuestos de la presente invención. Otros ejemplos de agentes inhibidores de topoisomerasa que pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan a, irinotecan, topotecan, etopósido amsacrina, exatecan, gimatecan, etc. Otros inhibidores de topoisomerasa incluyen, por ejemplo, Aclacinomycin A, camptotecina, daunorubicina, doxorubicina, elipticina, epirubicina y mitaxantrona.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere al uso del compuesto o una composición de la presente invención en combinación con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

En otra realización de la invención, el agente quimioterapéutico / anti-neoplásico para su uso en combinación con el compuesto y las composiciones de la presente invención, puede ser un compuesto que contiene platino. En una realización de la invención, el compuesto que contiene platino es cisplatino. El cisplatino puede actuar
5 sinérgicamente con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una IAP, tales como, pero no se limitan a XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. En otra realización, el compuesto que contiene platino es carboplatino.

Carboplatino puede actuar sinérgicamente con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una IAP, incluyendo pero no limitado a, XIAP,
10 cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. En otra realización el compuesto que contiene platino es oxaliplatino. El oxaliplatino puede actuar sinérgicamente con un compuesto de la presente invención y potenciar la inhibición de una IAP, incluyendo pero no limitado a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc.

15

Los fármacos de quimioterapia de platino pertenecen a un grupo general de agentes modificadores de ADN. Los agentes modificadores de ADN puede ser cualquier compuesto químico altamente reactivo que se enlaza con diferentes grupos nucleofílicos en ácidos nucleicos y proteínas, y causan efectos mutagénicos,
20 carcinogénicos o citotóxicos. Los agentes modificadores de ADN funcionan a través de diferentes mecanismos, alteración de la función del ADN y muerte celular; daño del ADN / formación de puentes cruzados o enlaces entre átomos en el ADN; y la inducción apareamiento errado de los nucleótidos que lleva a mutaciones, para lograr

el mismo resultado final. Tres ejemplos no limitantes de agentes modificadores de ADN que contienen platino son el cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

Aún, otra forma de realización de la presente invención es la combinación terapéutica o el uso terapéutico de la combinación de los compuestos o composiciones de la presente invención con TRAIL o anticuerpos agonistas TRAIL, u otros agentes químicos o biológicos que se unen y activan el receptor TRAIL. Muchos tipos de células cancerígenas son sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL, mientras que la mayoría de las células normales parecen ser resistentes a la acción de TRAIL. Las células resistentes a TRAIL pueden surgir por una variedad de diferentes mecanismos que incluyen pérdida de los receptores, presencia de receptores señuelo, la sobreexpresión de FLIP, que compite por el mismo caspasa-8 que se une durante la formación del DISC y la inhibición de la caspasa-3 y/o caspasa-9 activada por XIAP. En la resistencia a TRAIL, un compuesto o composición de la presente invención puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales a TRAIL, que conduce a aumentar la muerte celular, la correlación clínica de los cuales se espera una mayor actividad de apoptosis en tumores resistentes a TRAIL, la respuesta clínica mejorada, una mayor duración de la respuesta, y, en definitiva, una mayor tasa de supervivencia del paciente.

20

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

Los compuestos y composiciones de la presente invención también puede ser utilizado para aumentar la terapia de radiación (o radioterapia), es decir, el uso médico de las radiaciones ionizantes, como parte del tratamiento del cáncer para controlar las células malignas. Aunque la radioterapia se utiliza a menudo como parte del tratamiento curativo, a veces es utilizado como un tratamiento paliativo, cuando la curación no es posible y el objetivo es para el alivio sintomático. La radioterapia se utiliza comúnmente para el tratamiento de tumores. Puede ser utilizado como tratamiento primario. También es común combinar la radioterapia con cirugía y/o quimioterapia. Los tumores más comunes que se tratan con radioterapia son el

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de cabeza y cuello, tumores ginecológicos, cáncer de vejiga y el linfoma. La radioterapia suele aplicarse sólo para un área localizada afectada por el tumor. A menudo, los campos de radiación también incluyen los ganglios linfáticos que drenan. Es posible, pero poco común tratar con radioterapia a todo el cuerpo, o superficie completa de la piel.

15

La radioterapia usualmente se administra a diario durante un máximo de 35 a 38 fracciones (una dosis diaria es una fracción). Estas dosis frecuentes pequeñas permiten dar tiempo a las células sanas para volver a crecer, reparar los daños causados por la radiación. Existen tres divisiones principales de radioterapia que son

20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

la radioterapia de haz externo o teleterapia, braquiterapia o radioterapia de fuente sellada y la radioterapia de fuente no sellada, que son todos los ejemplos de protocolo de tratamiento adecuados para la presente invención. Las diferencias se refieren a la posición de la fuente de radiación; externa es fuera del cuerpo, mientras que la radioterapia de fuentes selladas y sin sellar tiene materiales radiactivos

liberados internamente. Las fuentes selladas en braquiterapia son usualmente extraídas más tarde, mientras que las fuentes no selladas se inyectan en el cuerpo.

El Compuesto 15 es capaz de formar sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo pero no limitado a las sales de adición de ácido y / o sales de adición de bases. Estas sales se incluyen en todos los aspectos de la invención.

Se entiende que la presente invención comprende el Compuesto 15 sintetizado in vitro utilizando técnicas laboratorio, como las bien conocidos para los químicos sintéticos, o sintetizado mediante técnicas in vivo, como por ejemplo a través del metabolismo, fermentación, digestión, y similares. También se contempla que el compuesto de la presente invención puede ser sintetizados usando una combinación de técnicas in vitro e in vivo

La presente invención también incluye compuestos enriquecidos isotópicamente, que son idénticos al Compuestos 15, pero el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico de los encontrados generalmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden ser incluidos en la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , y ^{36}Cl . La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ^2H , también están incluidos. Los compuestos enriquecidos isotópicamente de esta invención pueden prepararse generalmente mediante la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente

fácilmente disponible por un reactivo no enriquecido isotópicamente. Por ejemplo, la incorporación de deuterio se puede lograr mediante la sustitución de borohidruro de sodio con *d*4-borohidruro de sodio, o mediante la sustitución de yodometano con *d*3-yodometano. Ejemplos representativos de determinados análogos deuterados y su
5 preparación se describen en el Ejemplo 1.

El compuesto 15 puede existir en formas no solvatadas así como las formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. Además, el Compuesto 15 puede existir en varios estados sólidos, incluyendo formas cristalina, semi-cristalina y
10 amorfa (no cristalina), y en forma de clatratos, profármacos, polimorfos, ésteres biohidrolizables, mezclas racémicas, mezclas no racémicas, o como estereoisómeros purificados, incluyendo pero no limitado a, los enantiómeros ópticamente puros y diastereómeros. En general, todas estas formas y otras pretenden estar comprendidas dentro del alcance de la expresión, Compuesto 15.

15

Las referencias al Compuesto 15 y al compuesto de la invención, y otras frases similares en esta especificación y en las reivindicaciones, se pretende incluir no sólo el compuesto de fórmula (I), sino también las sales farmacéuticamente aceptables del Compuesto 15, así como diversas formas de dicho compuesto o sus sales, como
20 los que se describen arriba y abajo.

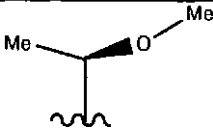
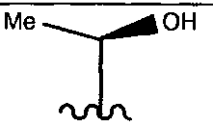
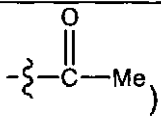
En realizaciones adicionales, la invención comprende compuestos útiles como intermediarios en la síntesis del Compuesto 15, así como los procesos para la preparación de dichos intermediarios y el Compuesto 15. Por ejemplo, en estas

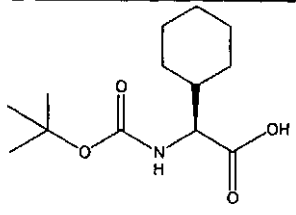
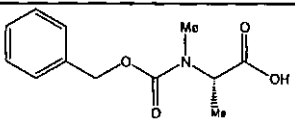
realizaciones, la invención comprende compuestos que se muestran en los ejemplos, a continuación, tales como los Compuestos 9, 10, 11, 12, 13, 14, y los compuestos enriquecido isotópicamente, como los compuestos 18 a 32. Una realización es el Compuesto 15 en el que se protege el sustituyente 4-OH en la fracción pirrolidina con un grupo protector. Un grupo protector ilustrativo es un grupo acetilo, que se ilustra en los compuestos 11-14, a continuación. Otros grupos de protección útiles serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, benzoilo, bencilo, trimetilsililo, y los grupos de trifenilmetilo. El grupo protector se elimina, por ejemplo, poniendo en contacto el intermediario protegido con un ácido o una base, como se muestra en los Esquemas XIII y XIV, a continuación. Por lo tanto, la invención comprende el compuesto que tiene la estructura del Compuesto 15, así como las versiones protegidas del Compuesto 15 tales como los compuestos de 13 y 14 en la que el N-terminal está protegido con los restos de carbamato y/o grupos hidroxilo libres que están protegidos como los ésteres de estos compuestos siendo referidos en adelante como Compuesto Protegido 15. La invención comprende además la etapa de desprotección de un Compuesto Protegido 15, poniendo en contacto con el Compuesto Protegido 15 con un ácido o una base donde se elimina el grupo protector para dar el Compuesto 15. Los compuestos de la invención enriquecidos isotópicamente incluyen las formas deuteradas del Compuesto 15, tales como los compuestos 20, 29 y 32. Las formas protegidas de tales compuestos, por ejemplo, los compuestos 19, 28 y 31, también están comprendidas dentro de la invención.

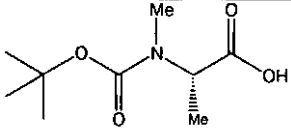
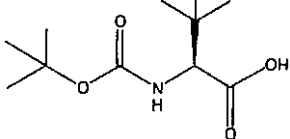
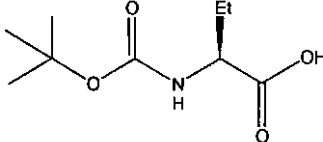
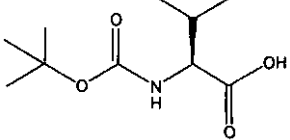
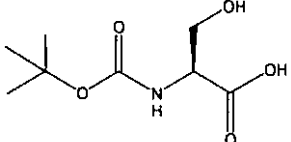
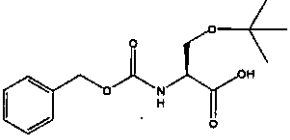
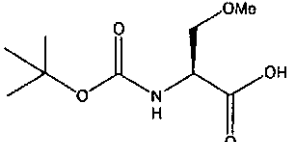
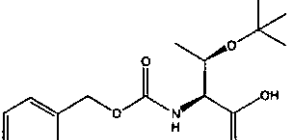
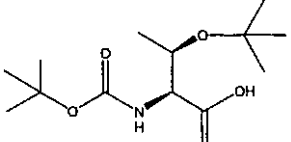
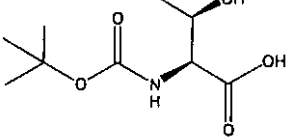
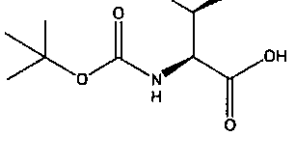
Ejemplos

Las siguientes preparaciones y esquemas son ilustrativos de la síntesis de los compuestos de la presente invención. Las abreviaturas que se utilizan en estos sistemas y en la aplicación en general, se identifican en la siguiente tabla:

<u>ABREVIACIÓN</u>	<u>SIGNIFICADO</u>	<u>ABREVIACIÓN</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ACN	Acetonitrilo	NMP	N-metilpirrolidinona
Ac ₂ O	Anhidrido Acético	PhCOCl	Cloruro de Benzoilo
Cbz and Z	Benziloxycarbonilo	DIAD	diisopropil azo dicarboxilato
Boc and/or boc	tert-butiloxycarbonilo	DIBAL	Hidruro de Diisobutilaluminio
THF	Tetrahidrofurano	DMAP	4-dimetilamino piridina
DCM	Diclorometano	DMF	Dimetilformamida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona	DMSO	dimetil sulfóxido
mCPBA	Acido 3-cloroperbenzoico	TFA	Acido trifluoroacetico
Cbz-Cl	Cloruro de Benziloxycarbonilo	TFAA	Anhidrido trifluoroacético
Hex	Hexanos	HOAc or AcOH	Acido acético

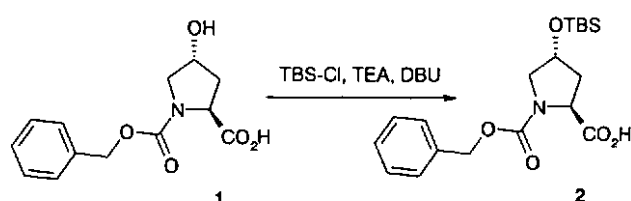
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento	DIPEA	Diisopropiletilamina
TLC	Cromatografía de capa fina	NMM	N-metilmorfolina
EtOAc	Etilacetato	NCS	N-clorosuccinimida
Ph	Fenilo	TEA (Et ₃ N)	Triethylamine
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato	MsCl	Cloruro de metano sulfonilo
Me	Metilo*	Et	Etilo
iPr	Iso-propilo	tBu or tert-Bu	tert-butilo
cPr	Ciclopropilo	cHex	Ciclohexilo
(2R-EtOMe) y/o R-MeCHOMe		(2R-EtOH) y/o R-MeCHOH	
TBAF	Fluoruro de tetrabutil amonio	MsCl	Cloruro de Metanosulfonilo
OMs	Metanosulfoniloxi	OTs	-O-SO ₂ -Ph-Me
TBDMSCl or TBSCl	Cloruro de tert-butil-dimetil-sililo	OTBS	tert-butil-dimetil-silaniloxi
Ph ₃ P	Trifenilfosfina	Ac	Acetilo ()
n-Bu	Normal butil	DMA	Dimetilamina

Swern[O]	Oxidación de Swern	HWE	Reacción de Honer-Wadsworth-Emmons
TBA-Cl	Cloruro de tetra- <i>n</i> -butil amonio	DMS	Dimetilsulfuro
NP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento Fase Normal	Acido de Meldrum	2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona
EDCI	Clorhidrato N-3-(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl	Imid.	Imidazol
Et ₂ O	Oxido de etileno ()	HOBT, or HBT	Hidroxibenzotriazol
TES	Trietolsilano	RT	Temperatura ambiente
MeNO ₂	Nitrometano	MeOH	Metanol
EtOH	Etanol	NaOAc	Acetato de Sodio
DCE, o EDC	Dicloroetano, Etilenedicloruro	CICO ₂ Me	Etil cloroformiato
NaHMDS	Hexametildisilazida de Sodio o bis(trimetilsilil)amida de sodio	TBSCl	Cloruro de tert-butil-dimetil-silanilo
Boc-Chg-OH (Boc-L-ciclohexilglicina)		Cbz-N(Me)Ala-OH Z-N(Me)Ala-OH	

Boc-N(Me)Ala-OH		Boc-Tle-OH	
Boc-Abu-OH		Boc-Val-OH	
Boc-Ser-OH		Cbz-Ser(tBu)-OH	
Boc-Ser(Me)-OH		Cbz-Thr(tBu)-OH	
Boc-Thr(tBu)-OH		Boc-Thr-OH	
Boc-Thr(Me)-OH		PSI	Libras por pulgada cuadrada (Gauge)
h	hora	NaOMe	Metóxido de Sodio

Ejemplo 1 – Síntesis

5 Esquema I



1-bencil éster del ácido 4-(tert-Butil-dimetil-silaniloxi)-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (2):

Se agitó una solución de Z-Hyp-OH (**1**, 300 g, 1,13 mol), TEA (395 mL, 2,83 mol), y

5 DBU (17,2 g, 1,13 mol) en DMF (1,25 L) en un baño de agua fría, mientras que se

agregó lentamente una suspensión de TBS-Cl (188 g, 1,24 mol) en DMF (270 mL) a

21-26°C [Nota: moderadamente exotérmico]. La suspensión diluida resultante se

agitó por 22 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a 2 °C y se

enfrió con agua (1,54 L) a ≤ 26 °C [Nota: el pH de la capa acuosa fue de 8,5-9,0]. Se

10 agregó MTBE (3 L) y la mezcla se acidificó a un pH de 3-4 con HCl conc. (168 g) a

17-19 °C. La capa orgánica fue separada y lavada con agua (2 $\times$ 1,5 L). La capa

orgánica se concentró al vacío y se secó mediante destilación con MTBE adicional.

Se agregó Tolueno (2 $\times$ 500 mL) y se destiló para eliminar humedad para obtener

603 g de **2** como un aceite de color amarillo claro [Nota: el contenido de agua

15 mediante análisis KF fue de 508 ppm]. Sobre la base una muestra pequeña sólida y

seca de **2**, el peso contenido de **2** fue 412 g (96% de rendimiento, no corregido por

pureza). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 5.24-5.11 (m, 2H),

4.52 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.64-3.42 (m, 2H), 2.27-2.09 (m, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.06

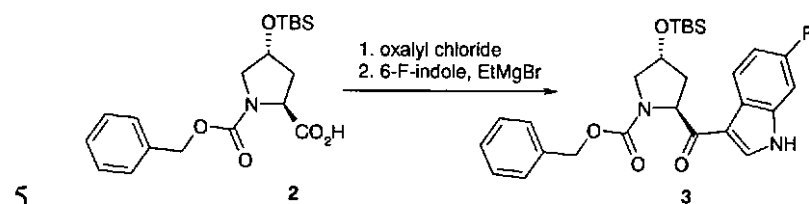
(s, 3H), 0.04 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotámeros:

20 δ 178.7, 178.4, 159.3, 158.9, 141.9, 141.8, 133.4, 133.3, 132.8, 132.6, 132.3, 131.9,

75.3, 74.6, 71.0, 71.0, 62.8, 62.3, 60.1, 59.7, 44.4, 43.4, 30.6, 30.6, 22.6, 22.6, 0.1,

0.0 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 379.5 [(M)+; calculado para $C_{19}H_{29}NO_5Si$: 379.5].

Esquema II



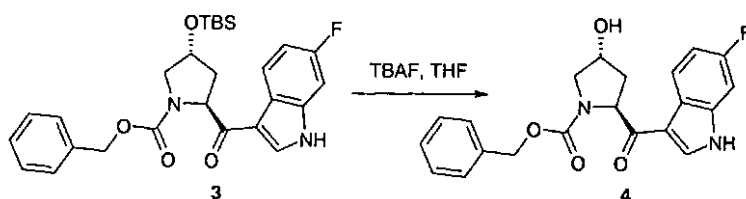
Bencil éster Del ácido 4-(tert-Butil-dimetil-silaniloxy)-2-(6-fluoro-1H-indol-3-carbonil)-pirrolidin-1-carbóxico (3): Se disolvió Z-Hyp(OTBS)-OH (**2**, 55,5 g, 145 mmol) en tolueno (265 mL). Se agregó DMF (0,1 mL) y cloruro de oxalilo (22,4 g, 174 mmol) a temperatura ambiente. Después de 2-3 h, se detuvo el burbujeo. Después de 4h, se concentró la mezcla al vacío (baño a 65 °C, aprx. 30 min) para proporcionar 95 g de una solución de color amarillo claro que se confirmó ser cloruro de ácido por análisis de ^1H NMR.

Se disolvió 6-Fluoroindol (39,2 g, 290 mmol) en clorobenceno anhidro (300 mL) y tolueno (200 mL) y la solución se enfrió a -4 °C usando un baño de hielo/acetona. Se añadió por 31 minutos a $\leq 2,5$ °C, una solución de EtMgBr 3M en dietil éter (101 g, 294 mmol) resultando en una solución de color ámbar pálido. Después de 30 min, se agregó por 45 minutos a < 2 °C, la solución de cloruro de ácido/tolueno (*ver arriba*). La mezcla de reacción se mantuvo fría por 1 h luego se dejó calentar lentamente. Después de aprox. 4 h (10,6 °C), la mezcla de reacción se enfrió con HOAc glacial (9,0 g, exotérmica a 17,5 °C) y luego con agua (exotérmico). Se agregó agua (200 mL) y EtOAc (300 mL) y la capa orgánica se separó y lavó con agua (100 mL,

separación lenta). La capa orgánica se concentró al vacío para proporcionar 227 g de **3** como un aceite de color ámbar el que se utilizó sin purificación adicional. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), ~2:1 mezcla de rotámeros: δ 9.38 (m, 0.7H), 8.58 (m, 0.3H), 8.35 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.3H), 8.03 (app. dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 0.7H), 7.74 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.7H), 7.66 (d, $J = 2.9$ Hz, 0.3H), 7.38-7.32 (m, 5H), 7.07 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 5.26-4.92 (m, 3H), 4.54 (m, 1H), 3.80 (app. dt, $J = 5.2, 11.1$ Hz, 1H), 3.61 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.3H), 3.55 (app. d, $J = 11.1$ Hz, 0.7H), 2.25-2.07 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.00 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotámeros: δ 193.4, 193.0, 159.3 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz), 153.9 (d, $J_{\text{CF}} = 16.2$ Hz), 136.7, 136.8 (d, $J_{\text{CF}} = 34.0$ Hz), 134.6, 128.3, 127.8, 127.2, 126.6, 122.4, 113.7 (d, $J_{\text{CF}} = 13.5$ Hz), 110.2 (d, $J_{\text{CF}} = 20.2$ Hz), 98.5 (d, $J_{\text{CF}} = 25.4$ Hz), 70.6, 69.8, 65.8, 65.8, 60.6, 60.3, 55.5, 55.0, 25.7, 25.6, 17.7, 17.7, -4.8, -4.9 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 518.9 $[(\text{M}-\text{H})+\text{Na}]^+$; calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_4\text{SiNa}$: 518.6].

15

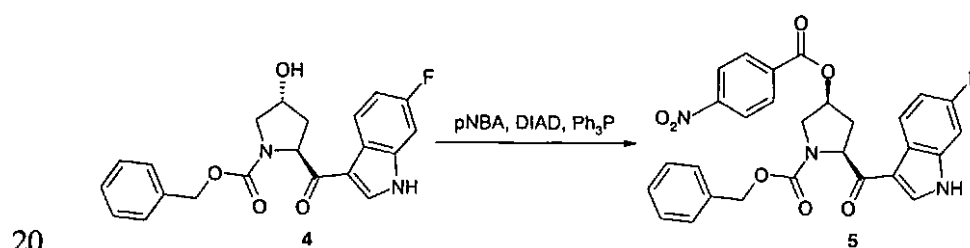
Esquema III



20 Bencil éster del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-hidroxy-pirrolidin-1-carboxílico (**4**): A una solución que contiene **3** (227 g) en THF (600 mL) se agrego TBAF 1 M en THF (160 mL) a temperatura ambiente. Después de 9 h, se agregaron

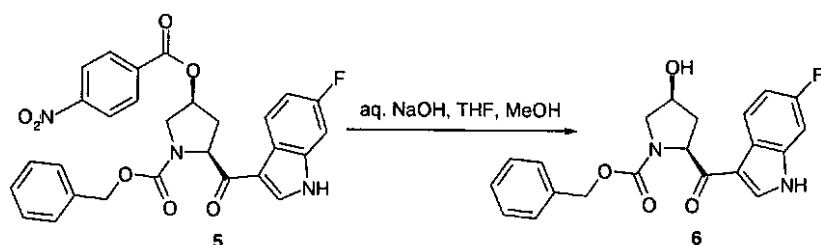
otros 20 mL de la solución de TBAF 1 M /THF. Después de aprox. 48 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío y luego se disolvió en EtOAc (600 mL). La solución orgánica se lavó con agua (310 mL) y se filtró (lento) el producto precipitado para formar una suspensión espesa. Los sólidos fueron lavados con EtOAc (165 mL en 5 porciones) y se secaron para proporcionar 43 g of **4**. El filtrado combinado se concentró al vacío para precipitar un adicional de 4,8 g de **4** después del secado. ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotámeros: δ 12.08 (br s, 1H), 8.43 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 8.16 (ddd, $J = 5.4, 8.7, 14.1$ Hz, 1H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.27 (app. d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 7.09-6.93 (m, 4H), 5.24 (dt, $J = 8.1, 15.6$ Hz, 1H), 5.14 (br s, 1H), 5.04 (app. d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.90 (app. dd, $J = 13.4, 28.4$ Hz, 1H), 4.30 (br s, 1H), 3.58-3.43 (m, 2H), 2.27 (m, 1H), 1.93 (m, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO), mezcla de rotámeros: δ 194.0, 193.6, 159.9 (d, $J_{\text{CF}} = 235.2$ Hz), 154.6 (d, $J_{\text{CF}} = 9.6$ Hz), 138.1, 137.5 (d, $J_{\text{CF}} = 26.9$ Hz), 136.0, 129.0, 128.5, 128.1 (d, $J_{\text{CF}} = 40.0$ Hz), 123.4, 123.3, 123.0, 122.9, 114.4 (d, $J_{\text{CF}} = 11.7$ Hz), 110.6 (d, $J_{\text{CF}} = 23.7$ Hz), 99.3 (d, $J_{\text{CF}} = 25.2$ Hz), 69.5, 68.8, 66.4, 66.3, 61.4, 61.1, 56.2, 55.7 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 382.6 [(M)+; calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_4$: 382.3].

Esquema IV



Bencil ester del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-(4-nitro-benzoiloxi)-pirrolidin-1-carboxílico (5): Una solución que contiene **4** (51,1 g, 134 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (27,9 g, 167 mmol) y trifenilfosfina (48,9 g, 187 mmol) en THF anhidro (700 mL) y DMF (175 mL) se enfrió a 2 °C. Se agregó DIAD (37,4 mL, 194 mmol) por 1 h a 2-3 °C. Después de 1 h, la solución se dejó calendar a temperatura ambiente. Después de aprox. 16 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se agregó MeOH (250 mL) y se concentró para formar una suspensión espesa (322 g). Se agregó adicionalmente MeOH (250 mL) y la solución se concentró al vacío para proporcionar una suspensión espesa (420 g) que fue enfriada en un baño de hielo. Después de aprox. 1,5 h, el sólido se recogió en un filtro al vacío y se lavó con MeOH frío (190 mL). El producto fue secado al aire sobre el filtro para proporcionar 82,9 g (>100%) de **5** como un sólido de color amarillo pálido que fue usado directamente en la próxima reacción. ¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotámeros: δ 12.14 (br s, 1H), 8.47 (app. d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.29-8.21 (m, 3H), 8.03 (dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz, 2H), 7.43-7.33 (m, 2H), 7.28 (app. dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 1H), 7.20-7.08 (m, 4H), 5.55 (br s, 1H), 5.42 (dd, *J* = 8.4, 15.3 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 12.6, 22.2 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.36 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, *d*₆-DMSO), mezcla de rotámeros: δ 192.9, 192.4, 164.2, 160.0 (d, *J*_{CF} = 235.5 Hz), 154.5 (d, *J*_{CF} = 12.0 Hz), 150.9, 137.5, 137.1 (d, *J*_{CF} = 12.6 Hz), 135.6, 135.1, 131.3, 128.9 (d, *J*_{CF} = 28.0 Hz), 128.5, 128.2, 128.1, 127.6, 124.2, 123.0, 113.5 (d, *J*_{CF} = 8.5 Hz), 110.9 (d, *J*_{CF} = 21.9 Hz), 99.1 (d, *J*_{CF} = 25.5 Hz), 75.2, 74.3, 66.7, 66.5, 62.4, 62.1, 53.6, 53.0, 38.6, 37.6 ppm. Espectro de masas (ESI), *m/z* 531.8 [(M)⁺; calculado para C₂₈H₂₂FN₃O₇: 531.5].

Esquema V



Bencil ester del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-

carboxílico (6): A una suspensión de 5 (82,9 g) en THF (600 mL), MeOH (200 mL), y

5 agua (100 mL) se agregó NaOH 50% aq. (16,0 g, 200 mmol) [Nota: exotérmico;

aumento de temperatura: 23,7 °C a 25,9 °C]. Después de 2 h, se agregó HOAc

glacial (5,3 g) para ajustar el pH a 7-8 [Nota: la solución de color anaranjada cambió

a amarillo pálido] y la mezcla de reacción se concentró al vacío. Se agregó agua (500

mL) y se eliminó el solvente al vacío hasta formar una suspensión espesa. El sólido

10 se recogió en un filtro al vacío y se lavó con agua (400 mL en porciones). El sólido se

secó en un horno al vacío a 55 °C para proporcionar 42,6 g (83%, 2 pasos) de 6

como un sólido blancuzco. ¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO): □8.38 (d, *J* = 11.1 Hz,

1H), 8.14 (ddd, *J* = 5.7, 8.7, 14.1 Hz, 1H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.25 (app. dd, *J* = 2.1,

9.9 Hz, 1H), 7.10-6.95 (m, 4H), 5.16-4.98 (m, 2H), 4.90 (app. q, *J* = 13.5, 25.8 Hz,

15 1H), 4.26 (m, 1H), 3.74 (app. ddd, *J* = 6.3, 11.1, 18.3 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 2.59 (m,

1H), 1.73 (app. ddd, *J* = 6.6, 12.9, 25.2 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, *d*₆-DMSO):

□193.8, 193.3, 160.0 (d, *J*_{CF} = 235.2 Hz), 154.4 (d, *J*_{CF} = 14.5 Hz), 137.5 (d, *J*_{CF} =

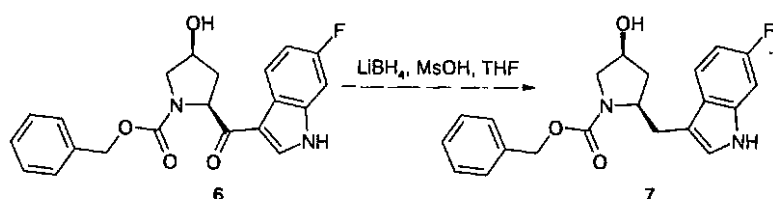
26.0 Hz), 137.2 (d, *J*_{CF} = 12.3 Hz), 129.0, 128.5, 128.2 (d, *J*_{CF} = 35.4 Hz), 128.1,

127.4, 123.2, 123.1, 114.4 (d, *J*_{CF} = 11.4 Hz), 110.8 (d, *J*_{CF} = 23.7 Hz), 110.8 (d, *J*_{CF} =

20 23.7 Hz), 99.0 (d, *J*_{CF} = 25.8 Hz), 69.4, 68.6, 66.5, 66.4, 61.5, 61.2, 54.9, 54.6 ppm.

Espectro de masas (ESI), *m/z* 383.8 [(*M*+*H*)⁺; calculado para C₂₁H₂₀FN₂O₄: 383.3].

Esquema VI

Bencil ester del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-carboxílico

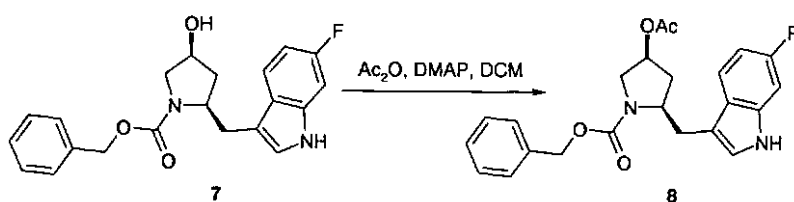
(7): A una suspensión de 6 (10,1 g, 26 mmol) en THF anhidro (200 mL) se agregó

- 5 LiBH₄ 2M en THF (26,2 mL, 52 mmol) por aprox. 7 min [Note: exotérmico; aumento de temperatura: 21,5 °C a 28,2 °C]. Luego de 2,5 h, la solución de color Amarillo pálido se enfrió a aprox. 11 °C y se agregó ácido metanosulfónico (4,66 g, 48 mmol) por aprox. 4 min [Nota: exotérmico; aumento de temperature a 14,2 °C].

- Después de 16 h, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y con
- 10 mucho cuidado se enfrió con agua (50 mL) [Nota: la adición de agua fue exotérmica y liberó una gran cantidad de gas]. Después de la adición de agua, se ajustó el pH a 1 con HCl conc. (1,9 g). La mezcla de reacción se concentró para eliminar THF y la solución acuosa fue extraída con EtOAc (110 mL). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (2 × 50 mL) [Nota: pH final aproximadamente 5]. La solución orgánica
- 15 se concentró al vacío y se secó isotrópicamente usando EtOAc anhidro para proporcionar 10,2 g de 7 como una espuma blanca [Nota: 87,7 A% por análisis de HPLC]. ¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO), ~1:1 mezcla de rotámeros: δ 10.91 (app. d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 6.0, 8.4 Hz, 0.5H), 7.48-7.30 (m, 4.5H), 7.13-7.07 (m, 3H), 6.85 (app. t, J = 8.4 Hz, 0.5H), 6.58 (app. t, J = 9.9 Hz, 0.5H), 5.19-5.10 (m, 3H),
- 20 4.25 (br s, 1H), 4.03-3.96 (m, 1H), 3.55 (dd, J = 5.1, 11.4 Hz, 1H), 3.29 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 3.17-2.98 (m, 2H), 1.79 (m, 2H) ppm. ¹³C NMR (300 MHz, d₆-DMSO), mezcla de rotámeros: δ 159.5 (d, J_{CF} = 232.1 Hz), 159.4 (d, J_{CF} = 232.3 Hz), 154.9,

137.7 (d, $J_{CF} = 36.6$ Hz), 136.7 (d, $J_{CF} = 12.6$ Hz), 136.6 (d, $J_{CF} = 12.9$ Hz), 129.1, 129.1, 128.7, 128.6 (d, $J_{CF} = 26.3$ Hz), 128.2, 125.0 (d, $J_{CF} = 21.4$ Hz), 124.5, 124.3, 120.1 (d, $J_{CF} = 28.3$ Hz), 120.0 (d, $J_{CF} = 28.6$ Hz), 112.4 (d, $J_{CF} = 14.6$ Hz), 107.4 (d, $J_{CF} = 24.3$ Hz), 107.3 (d, $J_{CF} = 24.3$ Hz), 69.9, 69.2, 67.1, 66.3, 58.7, 58.1, 56.1, 55.6, 38.3, 37.6, 31.2, 30.1 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 368.6 [(M)⁺; calculado para C₂₁H₂₁FN₂O₃: 368.4].

Esquema VII



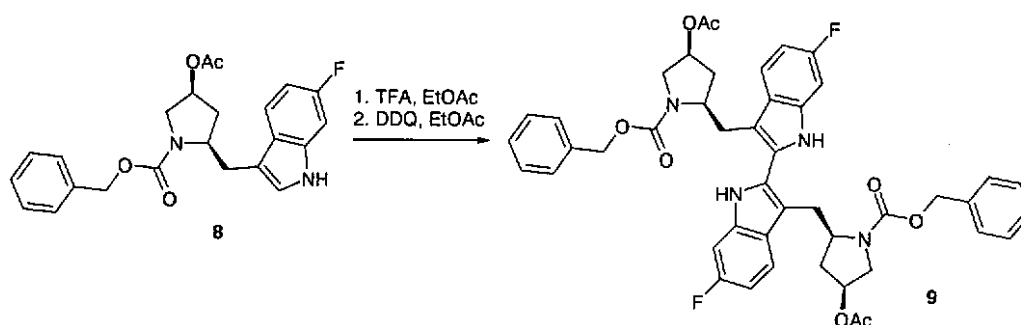
10 Bencil ester del ácido 4-Acetoxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-pirrolidin-1-carboxílico (8): A una solución que contiene **7** (4,7 g, 12,8 mmol) y DMAP (81 mg, 0,66 mmol) en DCM (100 mL) se agregó anhídrido acético (2,6 g, 25,5 mmol) a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se enfrió con MeOH (aprox. 3 mL) y se lavó sucesivamente con Na₂CO₃ 10% aq. (50 mL), diluir con HCl (50 mL), y

15 Na₂CO₃ 10% aq. (50 mL). La solución orgánica se concentró al vacío y se filtró a través de una columna corta de sílica gel (aprox. 25 g) [eluyente: DCM (200 mL) a MeOH/DCM 0,5% (v/v) (80 mL) MeOH/DCM 2% (100 mL) a MeOH/DCM 5% (100 mL)]. Las fracciones contenidas en el producto se combinaron y concentraron para proporcionar 3,28 g (63%) de **8** como una espuma blanca [Nota: 94,3 A% por análisis

20 de HPLC]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), ~1:1 mezcla de ratámeros: δ 7.99 (m, 1H), 7.75-6.61 (m, 9H), 5.28 (m, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.82 (dt, $J = 5.4, 13.5$ Hz, 1H), 3.60 (app. t, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.50 (d, $J = 11.7$ Hz, 0.5H), 3.31 (d, $J = 12.9$ Hz,

0.5H), 2.87 (dt, $J = 5.1, 13.5$ Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), ~1:1 mezcla de rotámeros: δ 170.8, 160.2 ($J_{\text{CF}} = 236.4$ Hz), 155.2, 136.8, 136.6, 136.4, 128.9, 128.8, 128.5 ($J_{\text{CF}} = 24.3$ Hz), 124.5 ($J_{\text{CF}} = 21.4$ Hz), 123.0, 123.0, 120.0 ($J_{\text{CF}} = 27.1$ Hz), 119.9 ($J_{\text{CF}} = 26.0$ Hz), 112.8 ($J_{\text{CF}} = 10.5$ Hz), 108.2 ($J_{\text{CF}} = 24.3$ Hz), 97.7 ($J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz), 74.0, 73.2, 67.9, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.0, 35.4, 34.6, 30.8, 29.7, 21.5 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 410.6 $[(M)^+]$; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_4$: 410.4].

Esquema VIII



Bencil ester del ácido 4-Acetoxi-2-[3'-(4-acetoxi-1-benziloxycarbonil-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil]-pirrolidin-1-carboxílico (9): Una solución que contiene **8** (2,9 g, 7,1 mmol) en EtOAc (aprox. 5 mL) se enfrió en un baño de hielo y se agregó TFA (20,3 mL) pre-enfriado en una porción. La solución resultante de color amarilla se agitó a 2-4 °C. Luego de 4,75 h, la mezcla de reacción fría se transfirió (a través de cánula) con agitación a una mezcla pre-enfriada de EtOAc (30 mL), y K_2CO_3 25% aq. (80,7 g). La capa acuosa se separó y se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con Na_2CO_3 (30 g) 10% aq. La solución orgánica se concentró al vacío y se secó

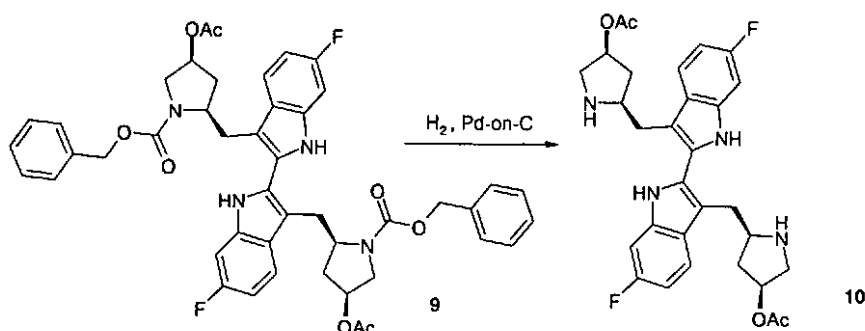
azeotrópicamente usando EtOAc anhidro para proporcionar 2,95 g de diastereomeros de indolilindolina como una espuma de color amarilla la que se usó directamente en la próxima reacción. Espectro de masas (ESI), m/z 821.3 [(M)+; calculado para $C_{46}H_{46}F_2N_4O_8$: 820.9].

5 A una solución que contiene los diastereomeros de indolilindolina (2,95 g) en EtOAc (30 mL) se agregó DDQ (885 mg, 3,9 mmol) en una porción [Note: exotérmico; aumento de temperatura: 26 °C a 31,6 °C]. Luego de 3 h, la mezcla de reacción de color anaranjada/café oscura se filtró a través de Celite® la que fue posteriormente enjuagada con EtOAc (50 mL). [Nota: una segunda reacción
10 realizada a escala de 0,5 mmol se combinó para el trabajo en marcha]. El filtrado se lavó con Na_2CO_3 10% aq. (2 lavados: 74 g, luego 58 g). La capa orgánica se concentró al vacío para proporcionar 2,14 g of **9** como un sólido de color café claro.

El soporte de Celite® además se enjuagó con THF (100 mL) el que fue concentrado al vacío para proporcionar otros 1,12 g de **9** como un sólido de color
15 beige. Los sólidos combinados se disolvieron en acetato de isopropilo (iPrAc, 50 mL). La solución de iPrAc se redujo a aprox. 20 mL y la suspensión resultante se calentó a reflujo, se enfrió a temperatura ambiente, y luego se colocó en un baño de hielo. Luego de 1 h, el sólido se recogió mediante filtración al vacío, se lavó con iPrAc (10 mL) y se secó en un horno al vacío para proporcionar 2,13 g (65%, 2 pasos) de **9**
20 como un sólido de color beige [Note: ~100 A% mediante análisis de HPLC]. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 11.29 (br s, 2H), 7.57-7.36 (m, 14H), 6.90 (app. dt, J = 2.1, 9.3 Hz, 2H), 5.39-5.30 (m, 6H), 4.28 (t, J = 9.0 Hz, 2H), 3.84-3.73 (m, 4H), 3.66 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 3.40 (dd, J = 12.0, 14.4 Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.17 (m, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 170.7, 161.9, 158.8, 156.3, 137.5, 137.3,

136.5, 128.9, 128.6, 128.5, 125.9, 118.8, 118.6, 108.8, 108.5, 108.3, 98.7, 98.3, 74.4, 68.0, 60.1, 53.5, 34.5, 28.9, 21.7 ppm. Espectros de masas (ESI), m/z 818.2 [(M)+; calculado para $C_{46}H_{44}F_2N_4O_8$: 818.8].

5 Esquema IX



Ácido acético de 5-[3'-(4-acetoxi-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-

3-ilmetil]-pirrolidin-3-il ester (10): Se distribuyó una suspensión que contiene **9** (35 g, 42,7 mmol) en 1:1 EtOAc/MeOH (400 mL) en dos botella Parr de 500 mL Parr (aprx.

200 mL/cada una), y se cargaron con Pd sobre C 10% (humectado, 5.000 mg/cada uno, Aldrich®). La mezcla de reacción fue presurizada a 50 PSI H_2 y se agitó por 3 h.

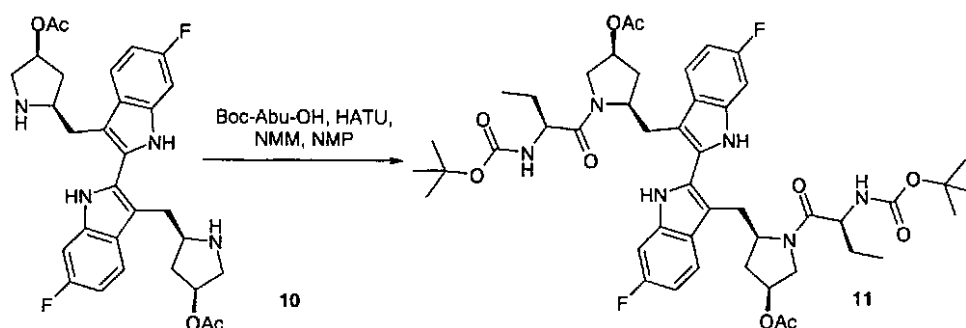
La mezcla de reacción se filtro a través de um soporte de Celite® y El sólido se lavo con EtOAc. El filtrado clarificado se concentró al vacío para proporcionar 24 g de **10** como un sólido blancuzco el que se uso directamente en la próxima reacción. ^1H

NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 13.10 (br s, 2H) 7.45 (dd, J = 5.2, 8.9 Hz, 2H), 7.03 (dd, J = 2.3, 9.8 Hz, 2H), 6.85 (m, 2H), 5.35 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.18-3.35 (m, 4H), 2.90-3.14 (m, 4H), 2.56 (m, 2H), 2.00-2.10 (m, 2H), 2.04 (s, 6H), 1.80-1.92 (m, 2H) ppm;

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 171.3, 161.7, 158.6, 136.1, 135.9, 130.5, 130.4, 125.4, 119.1, 118.9, 109.6, 108.0, 107.6, 97.6, 97.5, 75.1, 57.7, 51.6, 38.7, 32.8, 21.6 ppm.

Espectro de masas (ESI), m/z 550.9 [(M)+; calculado para $C_{30}H_{32}F_2N_4O_4$: 550.6].

Esquema X

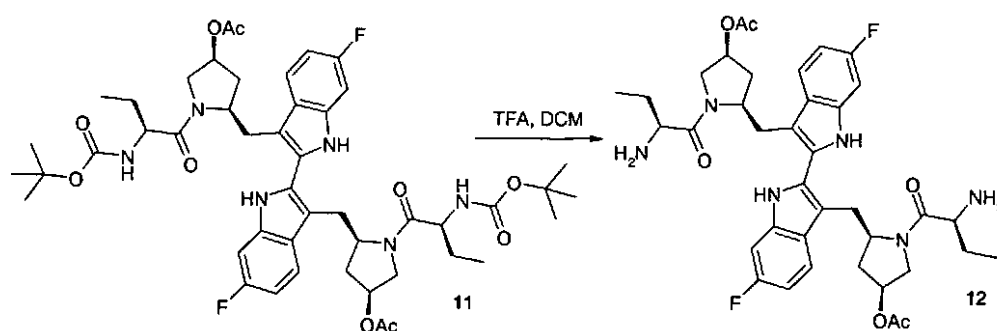


- Ácido acético de 5-{3'-[4-acetoxi-1-(2-tert-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil}-1-(2-tert-butoxycarbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-il ester (**11**): A una solución que contiene Boc-Abu-OH (20,4 g, 100 mmol) y HATU (42,0 g, 110 mmol) en NMP anhidro (150 mL) a 0 °C se agregó NMM (16 mL, 150 mmol) seguido por una solución de **10** (24 g, 42 mmol) en NMP (100 mL). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente.
- Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con MTBE (1000 mL) y la mezcla heterogénea se lavó con agua (500 mL). Las capas fueron separadas y la fase orgánica formó una suspensión heterogénea. Se agregó MTBE (1.000 mL) y EtOAc (500 mL) y la ahora solución homogénea se lavó sucesivamente con HCl 1N (2 × 100 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 × 100 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se disolvió en DCM/ MeOH 1:1 (600 mL) y DCM (aprox. 200 mL) se eliminó mediante destilación a 50 °C [Note: se observe una pequeña cantidad de un precipitado blanco]. Se agregó MeOH (200 mL) y se eliminó el disolvente adicional (aprox. 200 mL) a 50 °C. La mezcla heterogénea se enfrió a -5 °C. Luego de 16 h, el sólido se recogió mediante filtración al vacío y se lavó con MeOH frío. El sólido se secó bajo alto vacío para proporcionar 32 g de **11** como un

sólido blancuzco. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), mezcla de rotámeros: δ 11.22 (br s, 2H), 7.40 (dd, $J = 5.1, 8.7$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.76 (dd, $J = 8.40, 8.40$, 2H) 6.26 (br s, 2H), 5.44 (m, 2H), 4.39 (dd, $J = 7.5, 16.5$ Hz, 2H), 4.24 (m, 2H), 4.15 (dd, $J = 5.1, 12.9$ Hz, 2H), 3.79 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H), 3.10-3.30 (m, 4H), 2.32 (d, $J = 14.7$ Hz, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.56 (s, 18H), 0.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.2, 170.4, 161.4, 158.3, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9, 118.7, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.4, 53.8, 53.5, 34.1, 28.7, 28.6, 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 920.5 [(M)+; calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{62}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{10}$: 921.0].

10

Esquema XI

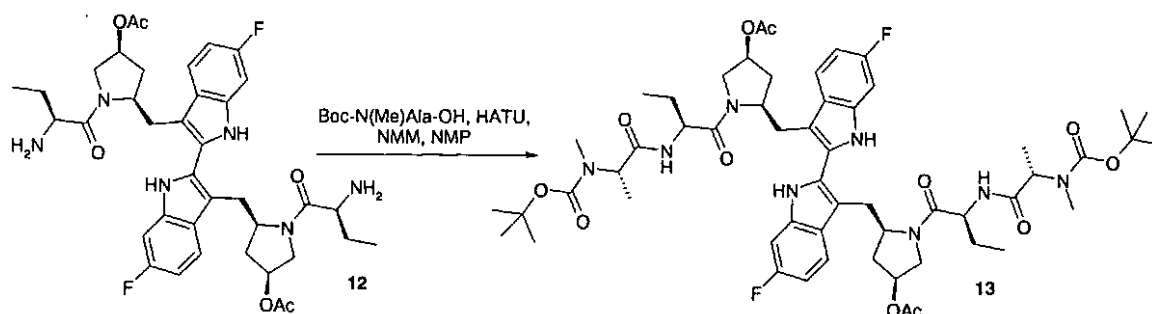


Ácido acético de 5-[3'-[4-acetoxi-1-(2-amino-butilil)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil]-1-(2-amino-butilil)-pirrolidin-3-il ester (12):

Una solución que contiene **11** (27,5 g, 30 mmol) en DCM (200 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó TFA (50 mL) y la reacción fu monitoreada mediante análisis con LC/MS hasta completar la conversión de **11** a **12** (aprox. 3 h). El disolvente se eliminó al vacío y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (aprox. 1 L). La solución de EtOAc fue vertida cuidadosamente en una solución saturada de una mezcla de NaHCO_3 /hielo/agua para neutralizar el TFA residual. La fase orgánica se

separó y se lavó dos veces con NaHCO_3 acuoso saturado, luego una con salmuera. La combinación acuosa lavada se volvió a extraer con EtOAc (2×100 mL) los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar 22 g **12** crudo como un sólido blancuzco. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mezcla de rotámeros: δ 11.62 (br s, 2H), 7.48-7.62 (m, 4H), 6.89 (ddd, $J = 2.4, 9.3, 9.3$ Hz, 2H), 5.48 (dd, $J = 4.5, 4.8$ Hz, 2H), 4.52 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 2H), 4.06 (dd, $J = 4.8, 12.3$ Hz, 2H), 3.78 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.54-3.70 (m, 4H), 3.30-3.40 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.02-2.16 (m, 2H), 1.70-1.96 (m, 4H), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$): δ 173.5, 170.9, 161.8, 158.6, 137.2, 137.1, 128.2, 128.1, 125.6, 118.7, 118.6, 108.6, 108.3, 108.0, 98.6, 98.1, 74.6, 60.1, 53.5, 33.5, 28.0, 21.4, 9.7 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 721.4 [(M)+; calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_6$: 720.8].

Esquema XII



Ácido acético de 5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2-metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il ester

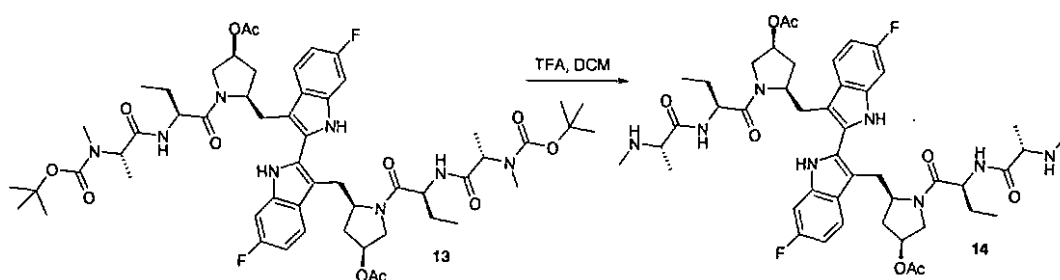
(13): A uma solução que contiene Boc-N(Me)Ala-OH (14,6 g, 72 mmol) y HATU (30,4 g, 80 mmol) en NMP anhidro (150 mL) a 0 °C se agrego NMM (12 mL, 105 mmol) seguido por La adición de **12** (30 mmol) en NMP (200 mL). La mezcla

resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (1 L) y se lavó sucesivamente con agua (1 L), HCl 1N (2 × 100 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 × 100 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró para proporcionar 33,5 g de **13** crudo.

5 El **13** crudo se disolvió en EtOH (50 mL) y luego se añadió lentamente al agua (1.000 mL) con fuerte agitación a 50 °C lo que resultó en la precipitación de un sólido blanco. La mezcla heterogénea se enfrió a -5 °C. Luego de 16 h, el sólido se recogió por filtración al vacío y se lavó con agua. El sólido húmedo se secó bajo alto vacío a 50 °C para proporcionar 29,9 g de **13** como un sólido blanquizco. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): □11.57 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.89 (m, 2H), 5.50 (m, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.67 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.50 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.20 (dd, *J* = 3.9, 12.3 Hz, 2H) 3.85 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.57 (br d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 3.34 (dd, *J* = 12.0, 13.8 Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.34 (s, 6H), 2.10 (m, 2H), 1.95 (dt, *J* = 6.0, 13.8 Hz, 2H), 1.79 (dt, *J* = 7.2, 14.1 Hz, 2H), 1.52 (s, 18H), 1.39 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): □174.0, 172.1, 171.9, 170.5, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.8, 108.4, 108.1, 98.8, 98.5, 81.0, 74.6, 60.1, 54.0, 52.0, 33.7, 30.5, 28.6, 28.1, 25.9, 21.6, 14.0, 9.9 ppm. Espectro de masas (ESI), *m/z* 1091.7 [(M)⁺; calculado para C₅₆H₇₆F₂N₈O₁₀: 1091.2].

10

15



Ácido acético de 5-(3'-(4-acetoxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-metilamino-

propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster (14): Una solución que contiene **13** (28,5 g,

5 26 mmol) en DCM (150 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó TFA (50 mL). Luego de 30

min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitoreó hasta

que el análisis LC/MS reveló una completa conversión de **13** a **14** (aprox. 4 h). El

disolvente se eliminó al vacío el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc

(500 mL) y se vertió cuidadosamente en una mezcla acuosa de NaHCO₃/hielo. La

10 fase acuosa se separó y se extrae de nuevo con (2 × 250 mL). Los extractos

orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ acuoso saturado, luego

salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar

24 g de **14** como un sólido de color amarillo claro. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

□ 11.66 (br s, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 2H), 7.43 (dd, *J*

15 = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 6.83 (ddd, *J* = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.41 (dd, *J* = 4.2, 4.5 Hz, 2H),

4.64 (dd, *J* = 7.8, 14.1 Hz, 2H), 4.36 (br d, *J* = 9.3, 9.6 Hz, 2H), 4.13 (dd, *J* = 4.8, 12.6

Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.44 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 3.0-3.18 (m, 4H), 2.50

(s, 6H), 2.30 (s, 6H), 2.15 (d, *J* = 14.4 Hz, 2H), 1.90-2.08 (m, 2H), 1.76-1.90 (m, 2H),

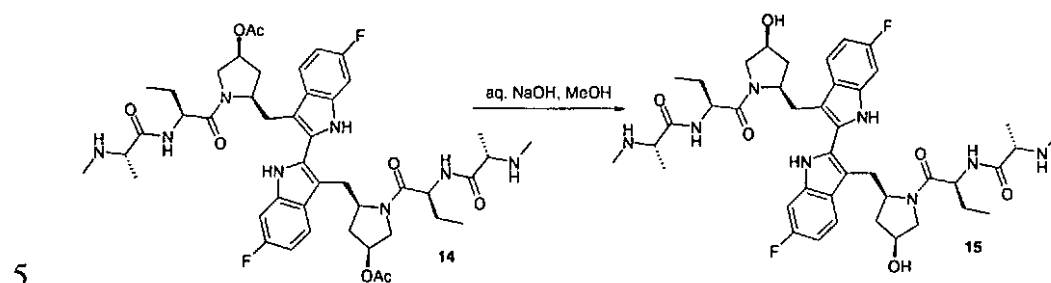
1.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):

20 □ 175.3, 172.6, 170.4, 161.8, 137.5, 137.3, 128.4, 128.3, 125.9, 118.6, 118.5, 108.5,

108.1, 107.8, 98.7, 98.3, 74.5, 60.9, 59.9, 53.9, 51.3, 35.8, 33.6, 27.6, 26.2, 21.5,

20.2, 10.1 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 891.6 [(M)+; calculado para $C_{46}H_{60}F_2N_8O_8$: 891.0].

Esquema XIV

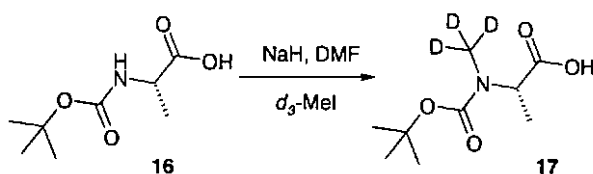


N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-[4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil]-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidroxi-pirrolidin-1-carbonil]-propil}-2S-metilamino-propionamida (15): A uma solução que contiene **14** (24 g) in MeOH (200 mL) se agrego NaOH 1M (80 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se
 10 desgasificó y se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno envuelta con papel aluminio. El baño de hielo fue retirado. Luego de 60 min, se eliminó el MeOH al vacío y el residuo se diluyó con agua (200 mL) y se extrajo con EtOAc (500 mL). La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 x 150 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro,
 15 se filtró, y se concentró para proporcionar 22,5 g de **15** crudo como un sólido de color café amarillo claro..

El **15** crudo (22,5 g) se disolvió en MeOH (50 mL) y EtOAc (200 mL). El volumen se redujo (50%) mediante destilación a presión reducida a 60 °C usando evaporador rotatorio. Se agregó MTBE (300 mL) y la solución turbia se calentó a 60
 20 °C. Luego de 30 min, la solución se enfrió a temperatura ambiente y luego se mantuvo a -5 °C.

Después de 16 h, el sólido se recogió mediante filtración al vacío y se lavó con EtOAc/MTBE 25% y se secó bajo alto vacío a temperatura ambiente para proporcionar 16,6 g de **15** como un sólido blancuzco. A partir del filtrado a través de la eliminación del disolvente y secado al vacío se recuperó un adicional de 5,5 g de **15**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.74 (s, 2H), 8.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 5.4, 8.4$ Hz, 2H), 7.55 (dd, $J = 2.4, 9.6$ Hz, 2H), 6.88 (ddd, $J = 2.4, 9.3, 9.3$ Hz, 2H), 4.62-4.78 (m, 4H), 4.43 (dd, $J = 9.3, 9.9$ Hz, 2H), 4.03 (dd, $J = 4.8, 11.4$ Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 3.66 (dd, $J = 2.7, 14.4$ Hz, 2H), 3.53 (dd, $J = 11.4, 14.4$ Hz, 2H), 3.11 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.56 (s, 6H), 2.45 (m, 2H), 2.19 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 1.76-2.10 (m, 6H), 1.59 (br s, 2H), 1.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.22-1.38 (m, 2H), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, d_6 -DMSO): δ 175.2, 172.8, 161.6, 158.5, 137.3, 137.2, 128.4, 128.3, 126.4, 120.8, 120.6, 109.4, 108.7, 108.4, 98.4, 98.0, 70.8, 60.2, 59.9, 56.6, 51.8, 36.4, 35.3, 28.3, 25.6, 20.0, 10.6 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 807.5 [(M)+; calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 806.9].

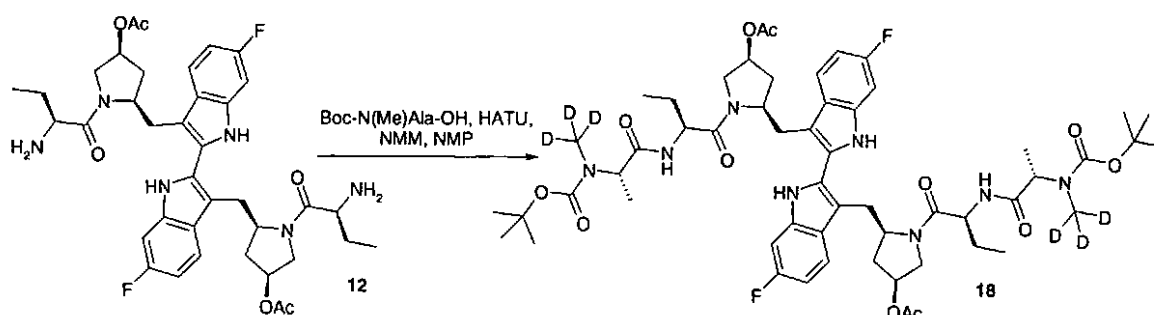
Esquema XV



N-tert-butoxycarbonyl-N-(d₃-metil)alanina (17): A una solución de Boc-Ala-OH (**16**, 3,5 g, 18,5 mmol) en THF anhidro (50 mL) se agregó NaH (2,1 g, 60% en aceite mineral,

51,0 mmol) a 0 °C. Luego de 45 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y luego se calentó a 45 °C por un período adicional de 20 min. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se agregó d_3 -iodometano (10,0 g, 69,0 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se enfrió con agua, y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica fue desechada y la solución acuosa se acidificó a pH 3 con HCl 1N y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC e fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min) para proporcionar **17** (3,6 g, 94%) como un sólido blanco después de la liofilización. ^1H NMR (300 MHz, d_4 -MeOH), mezcla de rotámeros: δ 4.80 (br s, 1H), 4.67 (q, J = 6.9 Hz, 0.5H), 4.38 (q, J = 6.9 Hz, 0.5H), 1.36-1.52 (m, 12H) ppm; Espectro de masas (ESI), m/z 207.0 [(M+H) $^+$; calculado para $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{D}_3\text{NO}_4$: 207.2].

Esquema XVI



Ácido acético de 5-(3'-[4-acetoxi-1-[2-(2- d_3 -metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2- d_3 -metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster (**18**): A una solución que contiene Boc-N(d_3 -Me)Ala-OH (**17**, 1,00 g, 4,83 mmol) and

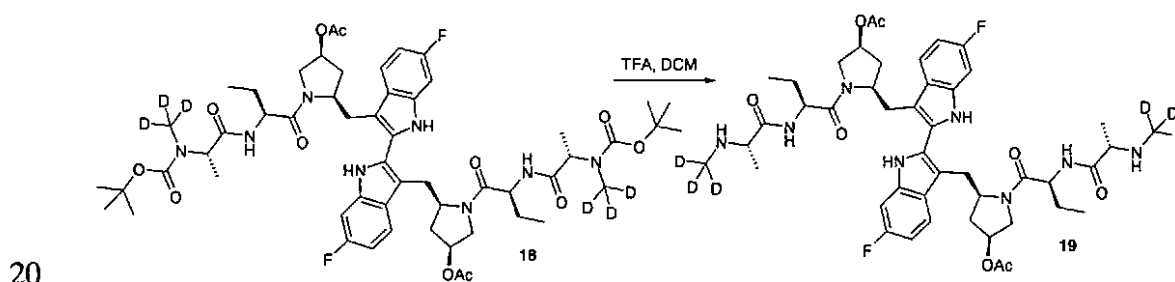
HATU (2,00 g, 5,30 mmol) en NMP anhidro (20 mL) a 0 °C se agregó NMM (0,8 mL, 7,20 mmol) seguido de la adición de **12** (crudo, 1,73 g, 2,40 mmol) en NMP (20 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (200 mL) y se lavó sucesivamente con

5 agua (200 mL), HCl 1N (2 × 100 mL), NaHCO₃ acuoso saturados (2 × 100 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró. El residuo se purificó por HPLC en fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en el producto fueron combinadas, congeladas, y liofilizadas para proporcionar 1,1 g de **18**

10 (42%) como un sólido blancuzco. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotámeros: δ 11.56 (br s, 2H), 7.56 (dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.10 (br s, 2H), 6.89 (ddd, *J* = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.75 (br s, 2H), 4.67 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.50 (t, *J* = 9.3 Hz, 2H), 4.18 (dd, *J* = 4.2, 11.7 Hz, 2H) 3.85 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.57 (dd, *J* = 2.1, 14.4 Hz, 2H), 3.34 (dd, *J* = 12.0, 14.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H),

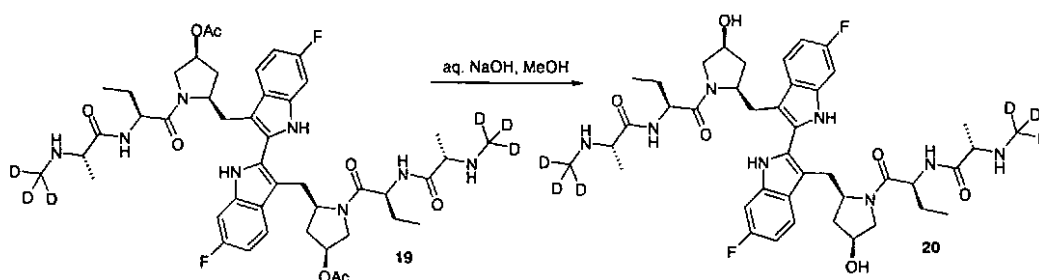
15 2.29 (br s, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.51 (s, 18H), 1.39 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H) ppm. Espectro de masas (ESI), *m/z* 1097.7 [(M)⁺; calculado para C₅₆H₇₀D₆F₂N₈O₁₂: 1097.3].

Esquema XVII



Ácido acético de 5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2-*d*-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1*H*,1'*H*-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-*d*₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster (**19**): Una solución que contiene **18** (1,10 g, 1,00 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó TFA (5 mL). Luego de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitoreó por análisis LC/MS hasta que reveló una completa conversión de **18** a **19** (aprox. 4 h). El disolvente se removió a vacío y un residuo de color verde oscuro, se disolvió en EtOAc (100 mL) y se virtió cuidadosamente en una mezcla acuosa de NaHCO₃/hielo. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 × 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ acuoso saturado, y luego salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar **19** crudo el que se utilizó sin purificación adicional. Espectro de masas (ESI), *m/z* 897.5 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₅₄D₆F₂N₈O₈: 897.0].

Esquema XVIII

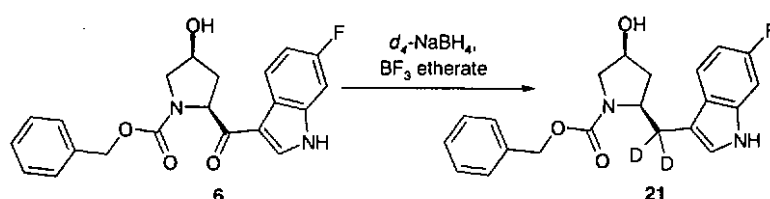


N-{1*S*-[2*R*-(6,6'-Difluoro-3'-{4*S*-hidroxi-1-[2*S*-(2*S*-*d*₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2*R*-ilmetil}-1*H*,1'*H*-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4*S*-hidroxi-pirrolidin-1-carbonil]-propil}-2*S*-*d*₃-metilamino-propionamida (**20**): A una solución que contiene

19 crudo (aprox. 1,00 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó NaOH 1M (2 mL) a temperatura ambiente. Luego de 35 min, el MeOH fue eliminado al vacío y el residuo

se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc (2 × 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por HPLC en fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en el producto fueron combinadas, congeladas y liofilizadas para proporcionar 0,6 g de **20** (75%) como un sólido blanco floculante. ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), mezcla de rotámeros: δ 11.86 (s, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 2.4, 9.9 Hz, 2H), 6.83 (m, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.84 (dd, *J* = 4.2, 11.1 Hz, 2H), 3.66 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 3.45 (m, 4H), 2.93 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.60-1.89 (m, 8H), 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN + *d*₄-MeOH), mezcla de rotámeros: δ 175.2, 173.0, 162.4, 159.3, 137.8, 137.6, 128.8, 128.7, 126.8, 110.8, 120.7, 109.5, 108.7, 108.4, 98.5, 98.1, 71.6, 60.5, 60.1, 56.8, 52.6, 36.6, 28.6, 26.0, 22.7, 19.0, 10.1 ppm. Espectro de masas (ESI), *m/z* 813.4 [(M)⁺; calculado para C₄₂H₅₀D₆F₂N₈O₆: 813.0].

Esquema XIX



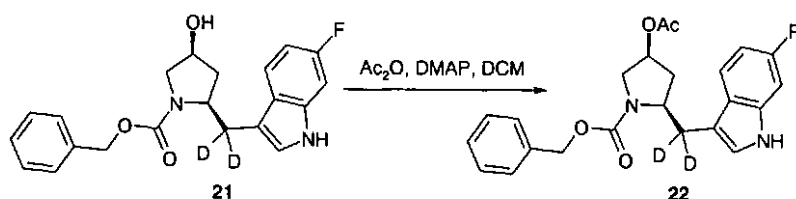
Bencil ester del ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-il-*d*₂-metil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-carboxílico (21**):** Una suspensión de **6** (3,0 g, 7,85 mmol) en THF anhidro (50 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó *d*₄-NaBH₄ (0,66 g, 15,7 mmol) en una porción seguido

de la adición de $\text{BF}_3 \cdot \text{etherato}$ (1,1 mL, 8,60 mmol). Luego de aprox. 10 min, el baño de hielo fue retirado y la mezcla de reacción se calentó a reflujo.

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

10

Esquema XX

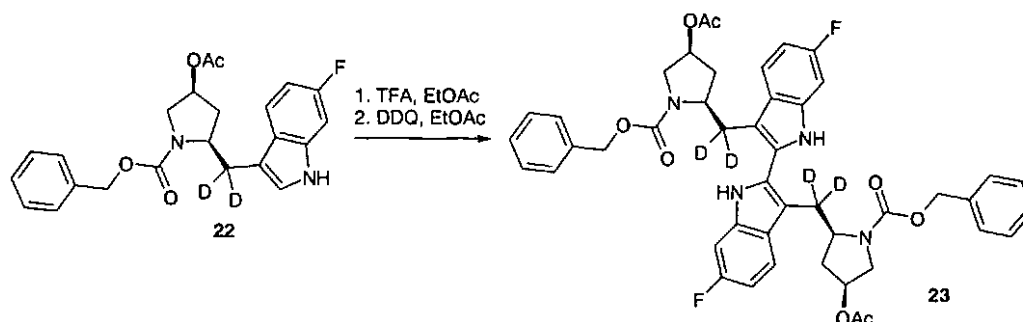


Bencil ester del ácido 4-Acetoxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-il-*d*₂-metil)-pirrolidin-1-carboxílico (**22**): A una solución que contiene **21** crudo (aprox. 7,85 mmol), Et₃N (1,2 g, 12,0 mmol), y DMAP (50 mg, cat.) en DCM (30 mL) se agregó anhídrido acético (0,74 mL, 7,85 mmol) a temperatura ambiente. Luego de 3 h, la mezcla de reacción se enfrió con NaHCO_3 acuoso saturado (50 mL) luego se diluyó con DCM. La capa DCM se separó y se lavó sucesivamente con HCl diluido (50 mL), agua (50 mL), y salmuera (50 mL). La solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en silica gel [30-40% EtOAc en hexano] para proporcionar 2,0 g (62%, 2 etapas) de **22** como una espuma blanca. ¹H NMR (300 MHz, CDCl_3), ~1:1 mezcla de rotámeros: δ 8.41 (br s,

20

1H), 7.80-6.50 (m, 9H), 5.25 (m, 1H), 5.21 (m, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.82 (dt, $J = 5.1$, 13.2 Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 11.4$, 11.7 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.00 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), ~1:1 mezcla de rotámeros: δ 170.8, 160.2 ($J_{\text{CF}} = 236.2$ Hz), 155.2, 136.9, 136.6, 136.5, 129.0, 128.9, 128.6 ($J_{\text{CF}} = 24.4$ Hz), 124.5 ($J_{\text{CF}} = 22.1$ Hz), 123.1, 120.1 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 119.9 ($J_{\text{CF}} = 27.2$ Hz), 112.8, 108.2 ($J_{\text{CF}} = 23.5$ Hz), 97.7 ($J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz), 74.1, 73.3, 68.0, 67.2, 58.5, 57.6, 53.4, 53.1, 35.4, 34.6, 21.5 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 413.1 [(M)+; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{D}_2\text{FN}_2\text{O}_4$: 412.4].

10 Esquema XXI



Bencil ester del ácido 4-Acetoxi-2-[3'-(4-acetoxi-1-benziloxycarbonil-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-pirrolidin-1-carboxílico (23): El

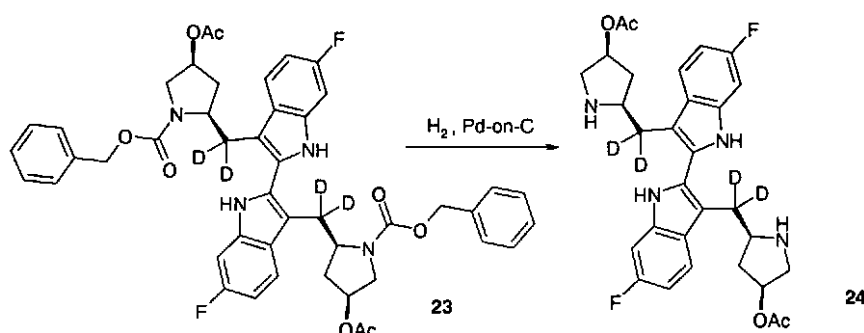
Indol 22 (2,0 g, 4,80 mmol) se disolvió en TFA (10 mL) pre-enfriado (-5 °C). La solución resultante de color Amarillo se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente por 2 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío para eliminar el TFA y la mezcla cruda de diastereomeros de indolilindolina se usó directamente en la próxima reacción. Espectro de masas (ESI), m/z 825.4 [(M)+; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 824.9].

A una solución que contiene los diastereomeros de indolilindolina en EtOAc (100 mL) se agregó DDQ (0,58 g, 2,5 mmol) en una porción. Luego de 15 min, la mezcla de reacción de color anaranjado/café oscuro se enfrió con NaHCO_3 acuoso saturado. Las capas fueron separadas y la fase orgánica se lavó sucesivamente con

5 NaHCO_3 acuoso saturado (3 x 50 mL) y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto crudo se disolvió en DCM (10 mL) y la solución luego se diluyó con MeOH (50 mL). Se eliminó lentamente el DCM al vacío proporcionando un precipitado que fue recogido por filtración al vacío, lavado con MeOH frío, y secado para proporcionar 1,7 g de **23** (86%, 2 etapas). ^1H NMR (300

10 MHz, CDCl_3): δ 11.30 (br s, 2H), 7.60-7.30 (m, 14H), 6.90 (app. dt, $J = 2.4, 9.3$ Hz, 2H), 5.40 (m, 2H), 5.36 (d, $J = 3.6$ Hz, 4H), 4.28 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 2.31 (s, 6H), 2.06 (m, 4H) ppm; Espectro de masas (ESI), m/z 823.3 [(M)+; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{40}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 822.9].

15 Esquema XXII

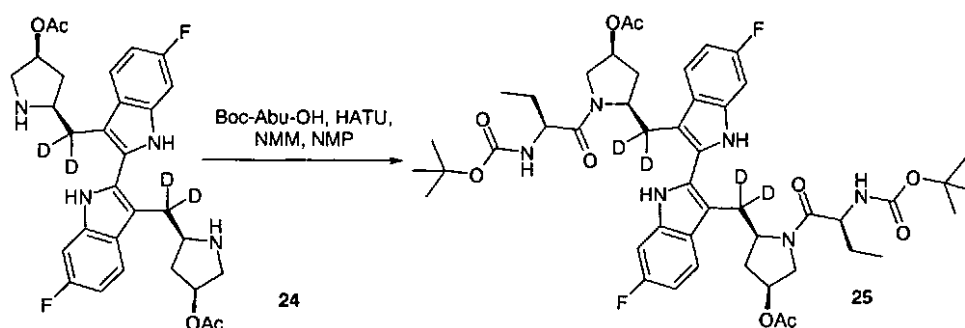


Ácido acético de 5-[3'-(4-acetoxi-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-pirrolidin-3-il ester (**24**): Uma suspensão que contiene **23** (0,40 g, 0,48 mmol) en EtOAc/MeOH 1:1 (40 mL) se colocó en una botella Parr de

20 500 mL y se cargó con Pd sobre C 10% (húmedo, aprox. 200 mg). La mezcla de

reacción fue presurizada a 50 PSI H_2 y agitada por 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un soporte de Celite® y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado clarificado se concentró al vacío para proporcionar **24** crudo como un sólido blancuzco el que fue usado directamente en la próxima reacción. Espectro de masas (ESI), m/z 555.2 [(M)+; calculado para $C_{30}H_{28}D_4F_2N_4O_4$: 554.6].

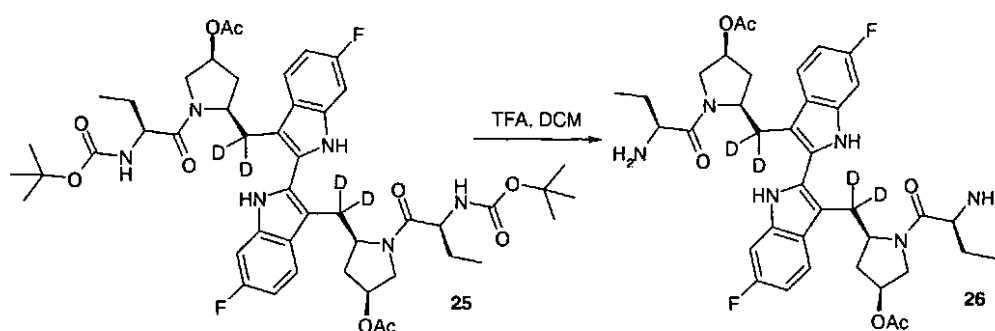
Esquema XXIII



- 10 Ácido acético de 5-{3'-[4-acetoxi-1-(2-tert-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-2-il- d_2 -metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-1-(2-tert-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-il ester (**25**): A uma solución que contiene Boc-Abu-OH (224 mg, 1,1 mmol) y HATU (442 mg, 1,2 mmol) en NMP anhidro (10 mL) a 0 °C se agregó NMM (0,2 mL, 1,7 mmol) seguido por una solución de **24** (0,48 mmol) en NMP (10 mL). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (100 mL) y la mezcla se lavó sucesivamente con agua (5 × 50 mL), HCl 1N (50 mL), $NaHCO_3$ acuso saturado (50 mL), y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por HPLC en fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones

contenidas en el producto fueron combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar 310 mg of **25** (70%, 2 etapas) como un sólido blanco floculado. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), mezcla de rotámetros: δ 11.17 (br s, 2H), 7.39 (dd, $J = 5.4$, 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.75 (dd, $J = 8.40$, 8.40, 2H), 6.40 (br s, 2H),
 5.44 (m, 2H), 4.40 (dd, $J = 7.8$, 16.5 Hz, 2H), 4.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.15 (dd, $J =$
 5.1, 12.9 Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H),
 1.57 (s, 18H), 0.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), mezcla de
 rotámetros: δ 172.1, 170.4, 161.4, 158.2, 155.8, 137.0, 136.9, 128.6, 125.5, 118.9,
 118.8, 108.6, 108.4, 108.1, 98.3, 98.0, 80.8, 74.7, 60.3, 53.8, 53.6, 34.1, 28.7, 28.6
 (br), 26.2, 21.5, 10.5 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 925.4 [(M)+; calculado para
 $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{10}$: 925.0].

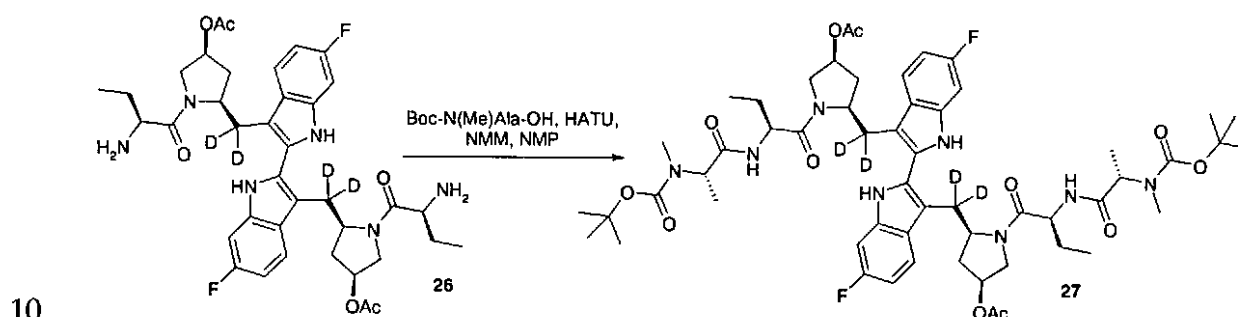
Esquema XXIV



15 Ácido acético de 5-{3'-[4-acetoxi-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-2-il- d_2 -metil]-6,6'-
difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-3-il éster (**26**):
 Una solución que contiene **25** (310 mg, 0,34 mmol) en DCM (20 mL) se enfrió a 0
 °C. Se agregó TFA (5 mL) y la reacción fue monitoreada mediante análisis de LC/MS
 hasta completar la conversión de **25** a **26** (aprox. 3 h). El disolvente se eliminó al
 20 vacío y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (50 mL). La solución

de EtOAc fue cuidadosamente vertida en una mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado/hielo/agua para neutralizar el TFA residual. La fase orgánica se separó y se lavó dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado luego una vez con salmuera. El combinado acuoso se lavó y se volvió a extraer con EtOAc (2 × 20 mL) y los
 5 extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró para proporcionar **26** crudo (250 mg) como un sólido blancuzco. Espectro de masas (ESI), m/z 725.3 [(M)+; calculado para C₃₈H₄₂D₄F₂N₆O₆: 724.8].

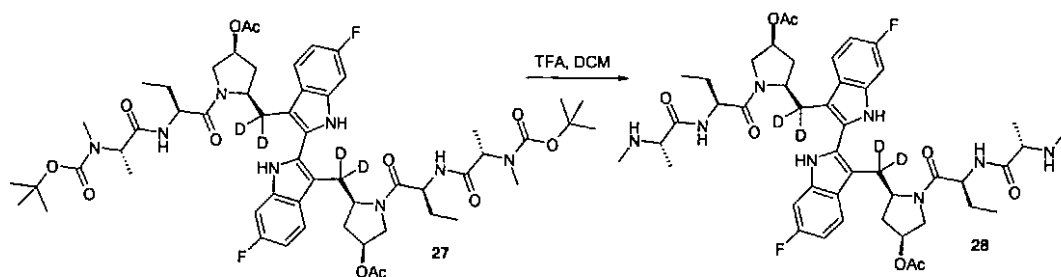
Esquema XXV



Ácido acético de 5-(3'-[4-acetoxi-1-[2-(2-metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il-*d*₂-metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-*d*₂-methil)-1-[2-(2-metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il
éster (27): A una solución que contiene Boc-N(Me)Ala-OH (83 mg, 0,41 mmol) y
 15 HATU (172 mg, 0,45 mmol) en NMP anhidro (5 mL) a 0 °C se agregó NMM (0,1 mL, 0,85 mmol) seguido por la adición de **26** crudo (123 mg, 0,17 mmol) en NMP (5 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (100 mL) y se lavó sucesivamente con agua (50 mL), HCl 1N (2 × 50 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 × 50 mL), salmuera,
 20 se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó

mediante HPLC en fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en producto fueron combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar 170 mg de **27** (91%, 2 etapas) como un sólido blancuzco floculado. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotámeros: δ 11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.86 (m, 2H), 5.46 (m, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.17 (dd, *J* = 4.8, 12.3 Hz, 2H) 3.82 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 2.05 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.48 (s, 18H), 1.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), mezcla de rotámeros: δ 173.3, 170.2, 170.1, 170.5, 168.6, 159.9, 135.5, 135.4, 126.5, 126.4, 123.8, 116.8, 116.7, 106.8, 106.4, 106.1, 96.8, 96.5, 79.1, 72.6, 57.9, 52.1, 50.1, 31.7, 28.5, 26.6, 25.5 (br), 23.9, 19.6, 19.0, 12.1, 8.0 ppm. Espectro de masas (ESI), *m/z* 1095.5 [(M)+; calculado para C₅₆H₇₂D₄F₂N₈O₁₂: 1095.3].

Esquema XXVI

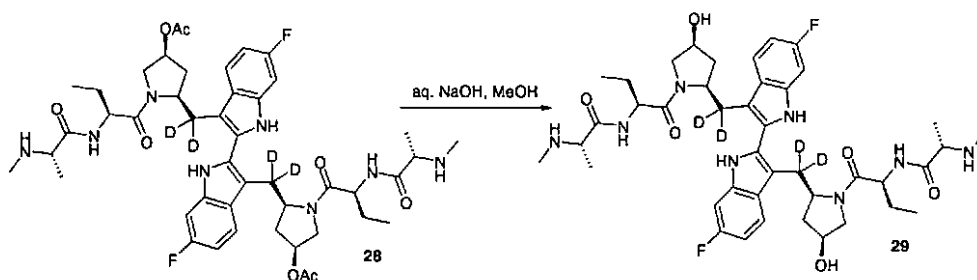


Ácido acético de 5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il-*d*₂-metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-*d*₂-metil)-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster (**28**): Una solución que contiene **27** (170 mg, 0,15 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó TFA (5 mL). Luego de 30 min, la mezcla de reacción se dejó calendar temperatura ambiente y se monitoreó

mediante análisis de LC/MS hasta que se observó una completa conversión de **27** a **28** (aprox. 4 h). Se eliminó el disolvente al vacío y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (100 mL) y se vertió cuidadosamente en una mezcla de NaHCO₃ acuoso/hielo. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 × 20 mL).

5 Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO₃ acuoso saturado, luego salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar **28** crudo como un sólido de color amarillo claro. Espectro de masas (ESI), *m/z* 895.3 [(M)+; calculado para C₄₆H₅₆D₄F₂N₈O₈: 895.0].

10 Esquema XXVII



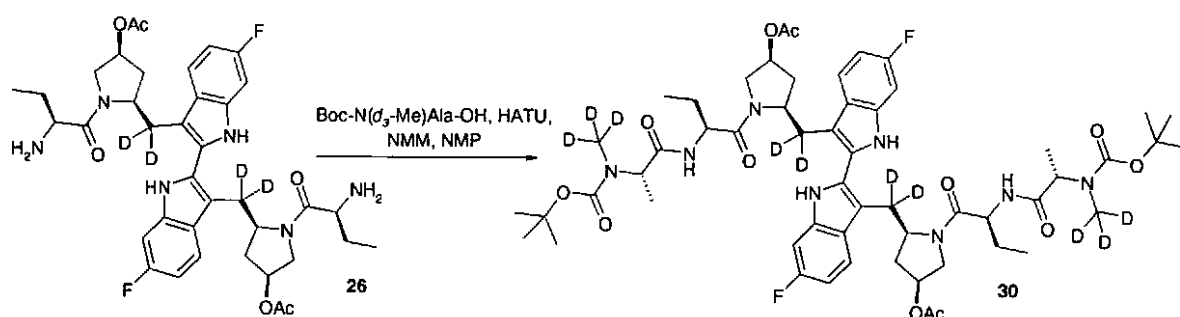
N-[1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-[4S-hidroxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-il-d₂-metil)]-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-4S-hidroxi-pirrolidin-1-carbonil]-propil]-2S-metilamino-propionamida (**29**): A uma solução que contiene **28**

15 crudo (0,15 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó NaOH 1M (5 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción fue desgasificada y mantenida bajo una atmósfera de nitrógeno envuelta en papel aluminio. Se eliminó el baño de hielo. Luego de 60 min, el MeOH se eliminó al vacío y el residuo se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (50 mL). Se separó la fase acuosa y se volvió a extraer con EtOAc (2 × 50 mL). Los extractos

20 orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase

reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en el producto fueron combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar 110 mg de **29** (90%, 2 etapas) como un sólido de color blanco floculado. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mezcla de rotámeros: δ 11.58 (s, 2H), 7.80 (dd, $J = 5.4, 8.7$ Hz, 2H), 7.45 (dd, $J = 2.4, 9.9$ Hz, 2H), 6.87 (ddd, $J = 2.4, 9.2, 9.2$ Hz, 2H), 4.66 (dd, $J = 5.7, 7.8$ Hz, 2H), 4.60 (br s, 2H), 4.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.00 (dd, $J = 4.8, 11.4$ Hz, 2H), 3.76 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 3.43 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.19 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 1.78-2.02 (m, 8H), 1.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + d_4\text{-MeOH}$), mezcla de rotámeros: δ 173.6, 171.8, 161.7, 158.6, 137.1, 136.9, 128.1, 128.0, 125.9, 119.8, 119.7, 108.3, 108.2, 107.8, 97.8, 97.5, 70.9, 69.4, 59.0, 56.1, 52.0, 36.3, 35.7, 25.5, 18.5, 9.8 ppm. Espectro de masas (ESI), m/z 811.4 [(M)+; calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 810.9].

Esquema XXVIII

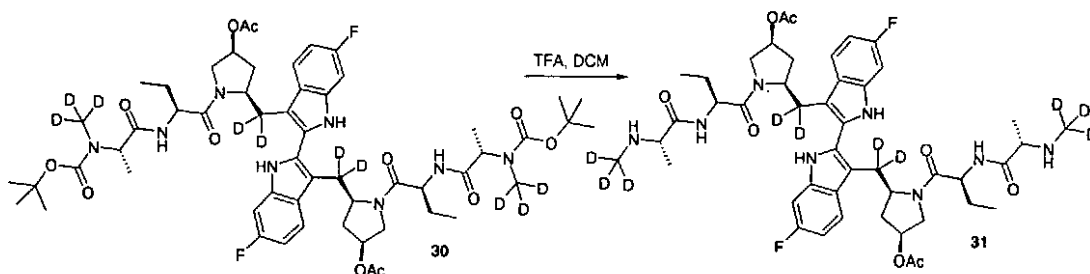


Ácido acético de 5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2- d_3 -metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-1-[2-(2- d_3 -metil-(tert-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il

éster (30): A una solución que contiene Boc-N(d_3 -Me)Ala-OH (**17**, 83 mg, 0,41 mmol) y HATU (172 mg, 0,45 mmol) en NMP anhidro (5 mL) a 0 °C se agregó NMM (0,1

mL, 0,85 mmol) seguido por la adición de **26** crudo (123 mg, 0,17 mmol) en NMP (5 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Luego de 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (100 mL) y se lavó sucesivamente con agua (50 mL), HCl 1N (2 × 50 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 × 50 mL), salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en el producto se combinaron, concentraron, y liofilizaron para proporcionar 160 mg de **30** (85%, 2 etapas) como sólido de color blanco floculado. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mezcla de rotámetros: δ 11.51 (br s, 2H), 7.40-7.60 (m, 4H), 6.87 (ddd, *J* = 2.1, 9.0, 9.0 Hz, 2H), 5.47 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.74 (br s, 2H), 4.65 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.18 (dd, *J* = 3.9, 11.7 Hz, 2H) 3.83 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.24 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.49 (s, 18H), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), mezcla de rotámetros: δ 175.6, 172.2, 172.1, 170.6, 161.8, 158.7, 137.5, 137.3, 128.5, 128.4, 125.8, 118.7, 118.6, 108.7, 108.4, 108.0, 98.8, 98.4, 81.1, 74.6, 66.1, 59.9, 54.0, 52.1, 33.7, 28.6, 27.5 (br), 25.8, 21.6, 20.9, 14.0, 9.9 ppm; Espectro de masas (ESI), *m/z* 1101.5 [(M)⁺; calculado para C₅₆H₆₆D₁₀F₂N₈O₁₂: 1101.3].

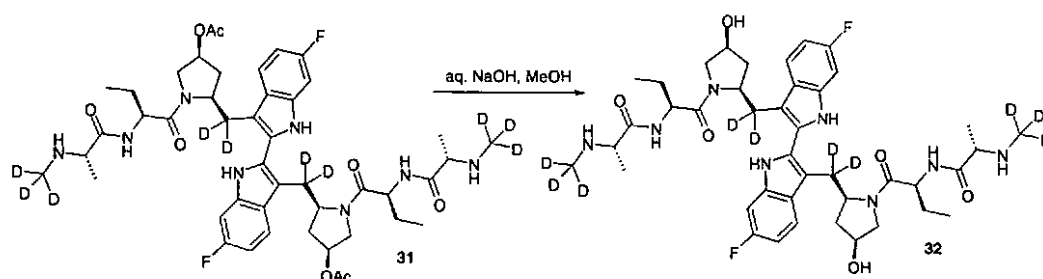
20 Esquema XXIX



Ácido acético de 5-(3'-{4-acetoxi-1-[2-(2- d_3 -metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il- d_2 -metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil)-1-[2-(2- d_3 -metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-il éster (**31**): Una solución que contiene **30** (160 mg, 0,14 mmol) en DCM (15 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó TFA (5 mL).
 5 Luego de 30 min, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se monitoreó mediante análisis de LC/MS hasta que se observó una completa conversión de **30** a **31** (aprox. 4 h). Se eliminó el disolvente al vacío y el residuo de color verde oscuro se disolvió en EtOAc (100 mL) y se vertió cuidadosamente en una mezcla de NaHCO_3 acuoso/hielo. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con
 10 EtOAc (2 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron varias veces con NaHCO_3 acuoso saturado, luego salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar **31** crudo como un sólido de color amarillo claro. Espectro de masas (ESI), m/z 901.5 [(M)⁺; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{D}_{10}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_8$: 901.1].

15

Esquema XXX



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

20 carbonil]-propil}-2S-metilamino-propionamida (**32**): A uma solución que contiene **31** crudo (0,14 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó NaOH 1M (5 mL) a 0 °C. La mezcla

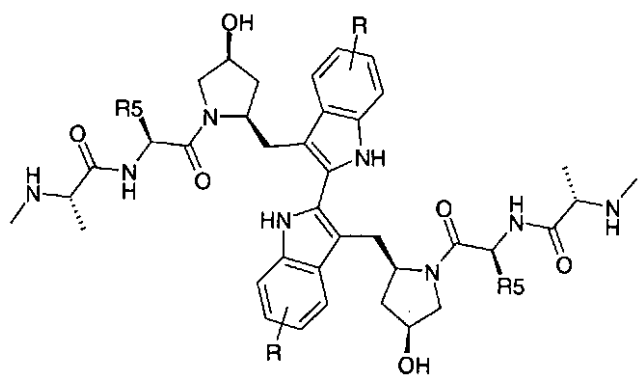
de reacción fue desgasificada y mantenida bajo una atmósfera de nitrógeno envuelta con papel aluminio. Se retiró el baño de hielo. Después de 60 min, se eliminó el MeOH al vacío y el residuo se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (50 mL). La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (2 x 50 mL). Los
5 extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC de fase reversa (columna Dynamax 2" C18; ACN/agua 10-100% que contiene 0,1% HOAc por 30 min; 40 mL/min). Las fracciones contenidas en el producto fueron combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar 100 mg de **32** (87%, 2
10 etapas) como un sólido de color blanco floculado. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mezcla de rotámeros: □ 11.62 (s, 2H), 7.79 (dd, *J* = 5.4, 8.4 Hz, 2H), 7.47 (dd, *J* = 2.4, 10.2 Hz, 2H), 6.87 (ddd, *J* = 2.4, 9.2, 9.2 Hz, 2H), 4.68 (dd, *J* = 5.4, 7.5 Hz, 2H), 4.58 (m, 2H), 4.45 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.99 (dd, *J* = 4.8, 11.1 Hz, 2H), 3.75 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 3.19 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.15 (br d, *J* = 12 Hz, 2H), 1.78-2.02
15 (m, 8H), 1.39 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mezcla de rotámeros: □175.4, 172.0, 161.8, 158.7, 137.1, 137.0, 128.2, 128.0, 126.0, 119.9, 119.7, 108.4, 108.3, 107.9, 98.0, 97.6, 71.0, 60.0, 59.6, 56.2, 51.6, 36.4, 25.8, 19.5, 9.8 ppm; Espectro de masas (ESI), *m/z* 817.4 [(M)+; calculado para C₄₂H₄₆D₁₀F₂N₈O₆: 817.0].

20

Ejemplos 2, 3, 4, y 5

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

Tabla 1



Compuesto	R5	R
15	-CH2CH3	6-F
2	-CH(CH3)CH3	6-F
3	-R-CH(OH)CH3	6-F
4	-S-CH(OH)CH3	6-F
5	-R-CH(OCH3)CH3	6-F

5 Ejemplo 2A. Ensayo de Degradación de cIAP

La degradación en la concentración de cIAP-1 y cIAP-2 en un 50% para diversos compuestos, se determinó mediante el control de la desaparición de la Proteína Verde Fluorescente señal-(GFP) en células A375. En pocas palabras, las líneas celulares A375 que expresan cIAP-1 y cIAP-2 GFP-marcadas son generadas mediante transfección del vector HA2xEGFP-pcDNA3 que contiene la región codificante cIAP-1 (A375Gc1) o cIAP-2 (A375Gc2). Se cultivaron 2x10⁴ células de A375Gc1 o A375Gc2 en places de 96 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos de prueba por 2 h. Después de la incubación, las células se recogieron por tripsinización y se suspendieron en 150 µl de DMEM-10%

FBS. Un total de 10⁴ células fue analizado usando un FACScan (Becton Dickinson). La fluorescencia de GFP se monitoreó usando un filtro de excitación a 488 nm y se midió la emisión con un filtro de 530nm. Se define IC₅₀ como la concentración de fármaco que inhibe el 50% de la señal GFP.

5

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

Table 2

<u>Compuesto</u>	<u>IC₅₀</u> <u>GFP-cIAP-</u> <u>1</u> <u>(nM)</u>	<u>SD</u>	<u>IC₅₀</u> <u>GFP-cIAP-</u> <u>2</u> <u>(nM)</u>	<u>SD</u>	<u>Razón IC50</u> <u>cIAP-2/cIAP-1</u>
15	27 (n=56)	15	174 (n=61)	100	6,4
2	4 (n=3)	0,6	7 (n=3)	0,8	1,8
3	328 (n=3)	83	674 (n=3)	69	2,1
4	464 (n=12)	112	604 (n=12)	192	1,3
5	10 (n=41)	2	37 (n=38)	19	3,7

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

Ejemplo 2B. Ensayo de Desrepresión de Caspasa-3

Se cosecharon células tumorales MDA-MB-231(ATCC) en fase de crecimiento exponencial mediante tripsinización y se recogieron por centrifugación en una

10

15

centrífuga de sobremesa a 1000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet de células se lavó una vez mediante resuspensión en 5 mL buffer de lisis hipotónico (20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM EDTA, 1,0 mM DTT) y se recolectó mediante centrifugación. El pellet se resuspendió en un volumen de 5 buffer lisis hipotónico suplementado con una tableta completa de inhibidor de proteasa (Roche) y se dejó reposar en hielo por 30 minutos. Las células fueron destruidas por aproximadamente 50 pasadas a través de una aguja de calibre. La lisis fue monitoreada por microscopía de luz. El lisado se centrifugó a 12.000xg por 10 minutos a 4°C para eliminar la fracción de membrana, células no lisadas y 10 residuos. La fracción soluble se recogió para la determinación de concentración de proteínas y subsecuentemente el análisis del ensayo.

El lisado hipotónico (25 µg de proteína), 50 µg/mL citocromo *c* y dATP 10 mM fueron combinados en un tubo de microcentrífuga a un volumen final de 9 µl en un buffer de 15 lisis hipotónico mediante la adición del compuesto de prueba y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se agregaron 50 µl de buffer de lisis hipotónico que contiene rhodamine-110₍₂₎ pro-fluorescente 5 µM basado en sustrato de caspasa-3 zDEVD-R110₍₂₎ y monitoreándose la intensidad de la fluorescencia en el tiempo. La activación del lisado por adición de citocromo *c* y 20 dATP da como resultado la formación de apoptosomas y subsecuentemente la activación de las caspasas-9 y -3. El XIAP endógeno inhibe gran parte de esta actividad y la adición de los compuestos de prueba al lisado se traduce en mayor actividad de caspasa que el generado por el lisado activado solo, como medida del incremento en la intensidad de la fluorescencia en el cleavage de zDEVD-R110₍₂₎ por

caspara-3. Los valores de IC₅₀ se calcularon usando GraphPad Prism mediante el gráfico del incremento en la intensidad de la fluorescencia vs. Diferentes concentraciones de los compuestos probados y el resultado se muestra en la Tabla 3.

5

Tabla 3

<u>Compuesto</u>	<u>Desrepresión</u>		<u>SD</u>
	<u>IC₅₀</u>	<u>XIAP</u>	
	<u>Caspasa-3</u>		
	(nm)		
15	24,3 (n=3)		2,0
2	13,4 (n=3)		4,3
3	0,2 (n=3)		0
4	0,35 (n=3)		0,2
5	0,36 (n=3)		0,05

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

10

Ejemplo 3 - Citotoxicidad

Los datos de citotoxicidad de células tumorales de ovario SKOV-3 fueron generados de acuerdo a lo siguiente. El ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimethiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) es un ejemplo de un ensayo que ha sido usado para medir el crecimiento celular como se describió previamente (Hansen, M. B.,

15

Nielsen, S. E., y Berg, K. (1989) *J. Immunol. Methods* **119**, 203–210) y se incorpora aquí a modo de referencia en su totalidad. En resumen, las células SK-OV-3 se sembraron en places de 96 pocillos que contenían medio McCoy con 10% albumina de suero fetal bovino (5.000 por pocillo) incubándose a 37°C durante toda la noche.

5 Al día siguiente, se agregaron los compuestos de prueba en diferentes concentraciones (0,003-10 μ M) y se incubaron las placas a 37°C por un período adicional de 72 hrs. Este tiempo de incubación fue óptimo para medir los efectos inhibitorios de análogos diferentes. Cincuenta microlitros de reactivo MTT 5mg/mL se agregaron a cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C por 3 horas. Al final del
10 periodo de incubación, se agregaron a cada pocillo 50 microlitros de DMSO para disolver las células y se midió la densidad óptica (OD) de los pocillos usando un lector de microplacas (Victor² 1420, Wallac, Finland) a 535 nm. La sobrevida celular (CS) fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$CS = (OD \text{ pocillos tratados} / \text{promedio OD pocillos control}) \times 100\%$$

15

El CC₅₀, se define como la concentración de fármaco a la cual se logra el 50% de la CS (sobrevida celular), derivado mediante el cálculo del punto donde la curva dosis-respuesta cruza el 50% del punto de CS para lo cual se utilizó el GraphPad Prism. Los resultados sugieren que los miméticos de Smac que se unen a cIAP-1 pueden
20 ser usados en el tratamiento del cáncer como monoterapia o en combinación con quimioterapia. Los resultados del ensayo de citotoxicidad SKOV-3 para los compuestos probados en este ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

<u>Compuesto</u>	<u>CC₅₀</u> <u>(nM)</u>	<u>Desviación</u> <u>Standard</u> <u>(nM)</u>
15	0,14 (n=76)	0,02
2	0,5 (n=6)	0,1
3	13 (n=4)	4
4	2 (n=23)	0,3
5	0,13 (n=76)	0,1

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

5 Ejemplo 4 – Toxicidad

Los datos de pérdida de peso corporal, (BWL), mortalidad y toxicidad adicional fueron generados de acuerdo a lo siguiente. Ratas Sprague-Dawley se les administró diariamente (QDx4, bolo i.v. de administración lenta) con los Compuestos 15, 4 y 5.

10 Los pesos corporales se tomaron el día 4, y se muestran como el cambio en porcentaje desde el día 1. Los Compuestos 4 y 5 se administraron a 0,3 mg/Kg, 1 mg/Kg, o 3 mg/Kg; el Compuesto 15 fue administrado a 1, 5, o 10 mg/Kg.

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

Mortalidad. Los Compuestos 4 y 5 no fueron tolerados a 3 mg/Kg, y causaron la muerte de los animales a esta dosis. No se observe mortalidad con el Compuesto 15 a 5 mg/Kg (se observe mortalidad a 10 mg/Kg.)

- 5 Resultados Clínicos. No se observaron signos clínicos a 1 mg/kg/día con el Compuesto 15 después de 4 días de la administración. Los animales tratados con el Compuesto 15 a 5 mg/kg/día mostraron signos clínicos similares a los Compuestos 4 y 5 a 1 mg/kg/día tal como letargo, respiración aumentada/irregular e incremento en el ritmo cardíaco. Las ratas tratadas con el Compuesto 5 con 1 mg/kg exhibieron
- 10 observaciones clínicas adicionales que incluyen deshidratación, apariencia descuidada, cromorrinorrea, alopecia (cabeza), y rascarse en exceso los días 2 a 4.

- Peso Corporal. Los animales que recibieron los Compuestos 4 y 5 (1 mg/Kg), perdieron peso, mientras que los animales que recibieron el Compuesto 15
- 15 (mg/kg/día) ganaron peso. Para el Compuesto 15 a 5 mg/kg/día, se observó una pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento de aproximadamente 8%, desde el día 1 hasta el día 4. Se observó una pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento de aproximadamente 4% y 6% en los animales tratados con los Compuestos 4 y 5, respectivamente, para 1 mg/kg/día.

20

Patología. La evaluación de la patología anatómica después del tratamiento con los Compuestos 4 y 5 para 1 mg/kg/día produjo los siguientes resultados. Se observe marcada a severa hipocelularidad de la médula ósea de las series eritroides, leve a moderada hipocelularidad de la serie mieloide, y leve a moderada hipertrofia e

hiperplasia de megacariocitos en la tibia y esternón cuando se administraron los Compuestos 4 y 5 para 1 mg/kg/día. Para los Compuestos 4 y 5 los pulmones tenía una relación de dosis de leve a moderada de hipertrofia difusa/hiperplasia de neumocitos Tipo 2 que fue acompañada por un incremento en los macrófagos alveolares, hipertrofia del epitelio bronquial, proliferación de células mononucleares perivasculares, e hipertrofia de las células de la pleura visceral. Por el contrario, la evaluación de anatomía patológica seguida del tratamiento con el Compuesto 15 con la misma dosis (1 mg/kg/día) identificó de una mínima a leve hipocelularidad de células eritroides, mínima a leve hiper celularidad de células mieloides, y mínima hipertrofia pneumocítica Tipo 2 en los pulmones.

Los datos descritos anteriormente indican que el Compuesto 15 es aproximadamente 5 veces mejor tolerado en las ratas, en comparación con los Compuestos 4 y 5 en una dosis por base de dosis.

15

Ejemplo 5 – Reducción del Volumen del Tumor y Cambio de Peso Corporal.

Los datos de xenoinjerto de MDA-MB-231 fueron generados de acuerdo a lo siguiente. Células tumorales humanas de mama MDA-MB-231, se inyectaron en un soporte de grasa mamaria de rata hembra y la dosificación se inició 12 días más tarde en un tumor de volumen promedio de aproximadamente 148 mm³. No se asoció carga tumoral con este modelo basado en la falta de pérdida de peso o morbilidad animal en los grupos control. Los ratones fueron inyectados en forma subcutánea en el soporte de grasa mamaria con 1x10⁷ células suspendidas en 200µl de una solución HBSS: Matrigel 1:1; las células inyectadas están dentro de los

20

nueve pasajes del peso original. El volumen del tumor en pre-estudio fue registrado a partir de aproximadamente 1 semana previo al comienzo del estudio. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente los 150mm³ los animales son agrupados por el volumen del tumor en grupo de tratamiento y grupo control e iniciando la dosificación (Día 0); los ratones son marcados y con seguimiento individual a través del experimento.

Los animales fueron dosificados por el peso (0,01 mL por gramo; 10 ml/Kg).

A partir del Día 0, los animales fueron observados diariamente y se pesaron dos veces por semana usando una balanza digital (Ohaus SP601); los datos incluyen el peso individual y el promedio en gramos (Promedio $W_e \pm SD$), el porcentaje de variación de peso promedio versus Día 0 ($\%vD_0$) y porcentaje de variación de peso promedio versus medida inicial ($\%vD_{-x}$) se registraron para cada grupo y graficados al completar el estudio.

A partir del Día 0, se midieron las dimensiones del tumor dos veces por semana mediante un pie de metro digital (Fowler Ultra-Cal IV) y los datos incluyen volúmenes del tumor estimado individual y promedio (Promedio $TV \pm SEM$) registrándose por cada grupo; el volumen del tumor se calculó usando la fórmula: $TV = ancho^2 \times longitud \times 0,52$. Los ratones individuales que alcanzan el punto final del estudio diseñado (un volumen de tumor estimado en aproximadamente 1 cm³) se les asigna un tiempo de punto final (TTE) igual al valor correspondiente a ese día; el estudio del retraso del crecimiento del tumor (TGD) concluyó una vez que todos los ratones llegaron al punto final del estudio o sesenta días siguientes al inicio del estudio. Al final del estudio, se calcularon TGD y %TGD usando el TTE (MTTE) promedio el valor de cada grupo tratado (T) versus grupo control (C) mediante las fórmulas:

$TGD_{(días)} = T-C$ y $\%TGD = T-C/C \times 100$, en que $T-C$ es la diferencia entre MTTE-Grupo Tratado y MTTE- Grupo Control. Los animales con tumores que no alcanzaron el punto final de volumen designado para terminar el estudio son considerados sobrevivientes a largo plazo (LTS) y se les asignó el valor de TTE correspondiente al

5 día final del estudio; los animales libres de tumor no fueron incluidos en los cálculos de TGD. Un test de Log-rank se usó para determinar las diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del estudio entre cada grupo tratado comparado con el grupo control. Los ratones que reportaron un volumen de tumor individual $\leq 50\%$ del Día 0 medido por dos medidas consecutivas por un

10 período de siete días fueron considerados como respuesta parcial (PR). Si la PR persiste hasta terminar el estudio, la regresión porcentual del tumor ($\%TR$) se determinó usando la fórmula: $\%TR = 1 - T_f / T_i \times 100$; un valor promedio se calculó si múltiples ratones con PR están en un mismo grupo. Los ratones individuales que carecen de tumores palpables ($< 4 \times 4 \text{ mm}^2$ por dos medidas consecutivas por un

15 período de siete días) fueron clasificados como con respuesta completa (CR); una CR que persiste hasta terminar el estudio es considerada como un sobreviviente libre de tumores (TFS); los animales TFS son excluidos del cálculo de TGD y del análisis estadístico. Las diferencias estadísticas en los valores MTTE entre los grupos control y tratados son comparados usando el test de Log Rank.

20 El Compuesto 15 se administró por inyección única i.p. de 20, 40 ó 60 mg/Kg en un programa q3dx5 (cada tres días durante cinco ciclos). Los valores T-C de 22 días se calcularon para estos grupos, todos los cuales se encontraron estadísticamente significativos comparados con el control ($p=0,005$, $p<0,0001$, o $p=0,0001$). En el grupo de 20 mg/Kg grupo, 6/10 ratones fueron considerados sobrevivientes de largo

plazo y se reportó regresión parcial del tumor en tres ratones. En el grupo de 40 mg/Kg, 9/10 ratones son considerados sobrevivientes de largo plazo y se reportaron tres ratones con regresión parcial del tumor. En el grupo de 60 mg/Kg, 8/10 ratones considerados sobrevivientes de largo plazo y se reportó regresión parcial del tumor en siete ratones.

El Compuesto 5 se administró por inyección única i.p. de 15 mg/Kg en un programa q3dx5. Un valor de T-C de 21 días se calculó para este grupo el que se encontró ser estadísticamente significativo comparado con el control ($p=0,002$). En este grupo 3/10 ratones fueron considerado sobrevivientes de largo plazo y se reportó regresión parcial del tumor en cinco ratones. La eficacia de este nivel de dosis produjo la mitad del número de sobrevivientes de largo plazo que el producido por el Compuesto 15 con 20 mg/Kg.

Los resultados del ensayo de xenoinjerto de MDA-MB-231 se muestran en las Figuras 2A y 2B. El Compuesto 15 a 20 mg/Kg tiene una actividad anti-tumoral comparable con el Compuesto 5 a 15 mg/Kg. Estudios posteriores han mostrado que la dosis mínima efectiva del Compuesto 15 en este modelo es menor que 1 mg/Kg. La pérdida de peso fue mayor en los ratones que se les administró el Compuesto 5 a 15 mg/Kg cuando se comparó con los ratones que se les administró el Compuesto 15 a 20 mg/Kg. Así, el Compuesto 15 tiene una eficacia comparable con una toxicidad relativa menor que el Compuesto 5 y por lo tanto tiene un índice terapéutico mejorado.

El compuesto de Fórmula 1 es particularmente bien tolerado y adecuado para su uso en una composición farmacéutica, así como un método para tratar un trastorno proliferativo o un desorden autoinmune. En particular, la composición farmacéutica del invento, para el tratamiento de trastornos proliferativos, que comprende una
5 cantidad efectiva de un Compuesto 15 en adición con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, puede mejorar el índice terapéutico mediante la reducción de la toxicidad. La toxicidad reducida, incluye por ejemplo una o cualquier combinación de uno o más de los siguientes:

- Reducción de la pérdida de peso corporal,
- 10 • Disminución de incidencia de la mortalidad,
- Reducción de hipocelularidad de la médula ósea de series eritroide,
- Reducción de hipercelularidad de la serie mieloide,
- Reducción de hipertrofia e hiperplasia de megacariocitos,
- Reducción hipertrofia difusa/hiperplasia de pneumocitos Tipo 2,
- 15 • Disminución del letargo,
- Respiración más regular,
- Reducido aumento de la frecuencia cardiaca.

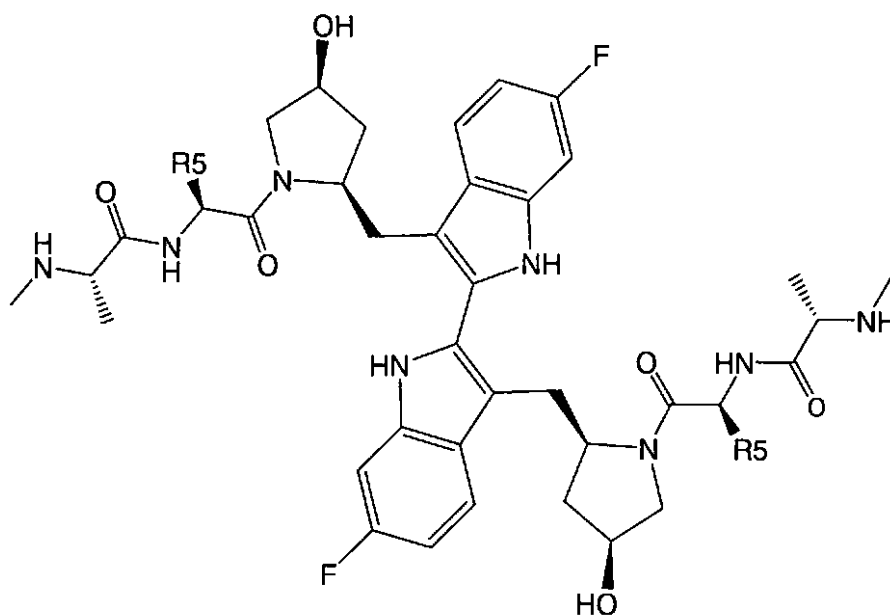
El listado de reducción de toxicidad de arriba se observaron en los animales
20 testeados. Reducciones de toxicidad similares, adicionales o diferentes se podrán observar en humanos. Las reducciones son relativas, por ejemplo, relativo al alcance que podría ser observada la toxicidad seguido de la administración interna de una composición farmacéutica en la cual el ingrediente farmacéuticamente activo es un análogo del Compuesto 15, por ejemplo, uno o más de los análogos en los que R5

es $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-R-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-S-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, y $-R-\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$, por ejemplo en la misma dosis o en una dosis de potencia comparable.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas aquí son solo para
5 propósitos ilustrativos y que diferentes modificaciones o cambios a la luz de los
mismos pueden ser sugeridas por una persona experto en el arte y son incluidos en
el espíritu y alcance de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

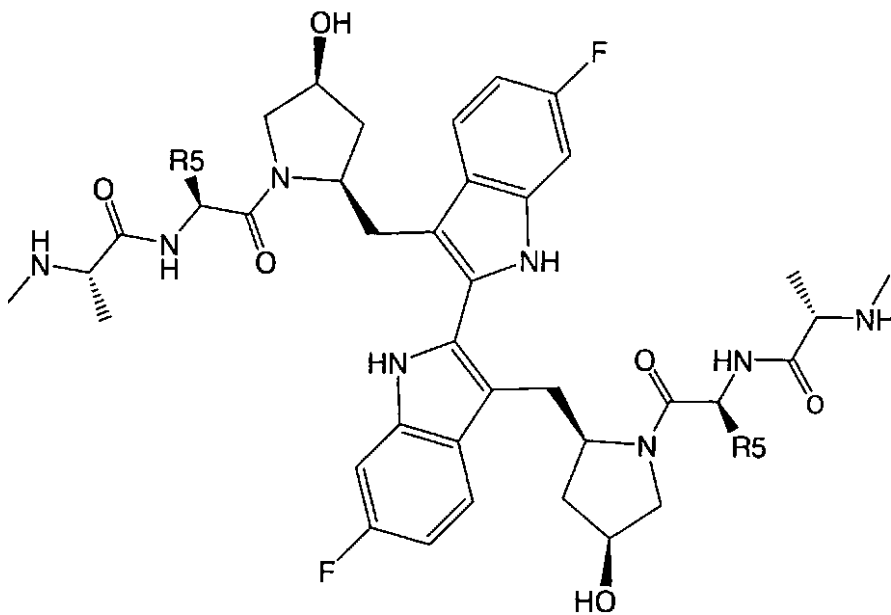
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la formula:



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

10 2. Una composición que comprende el compuesto que tiene la fórmula:



En que R5 es $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 para el tratamiento de un trastorno proliferativo.

4. La composición de la reivindicación 2, para el tratamiento del cáncer.

10

5. La composición de la reivindicación 2, 3, ó 4 la cual es un líquido estéril para inyección.

6. La composición de la reivindicación 2, 3, 4, ó 5 que está en forma de una dosis

15 unitaria.

7. Un método para tratar un trastorno proliferativo en un mamífero que necesita del mismo, que comprende administrar internamente al animal una cantidad eficaz del Compuesto 15.

- 5 8. El método de la reivindicación 7 en donde el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: adenocarcinoma de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, mesotelioma, neuroma periférico, cáncer de vejiga, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfomas relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de vejiga,
- 10 meningioma, glioma, astrocitoma, el cáncer de mama, cáncer cervical, trastornos mieloproliferativos crónicos (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica), cáncer de colon, cáncer endocrino, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago , sarcoma de Ewing, tumores de células germinales extracraneales, tumores de células germinales extragonadales, cáncer
- 15 de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores trofoblásticos del embarazo, leucemia de células pilosas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular , carcinoma de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer
- 20 de labio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer escamoso metastásico del cuello, mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide y síndrome de Sézary, síndromes mielodisplásicos, cáncer de la nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de pulmón de

células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de la orofaringe, cáncer de los huesos, incluyendo el osteosarcoma y el histiocitoma fibroso maligno del hueso , cáncer epitelial de ovario, tumores de células germinales de ovario, tumores de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer de los senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores de la pituitaria, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, pineoblastoma, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, cáncer de uretra, el sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, y el tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles.

9. El método de la reivindicación 7 en que el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo consistente de: sarcomas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer de pulmón y cáncer de huesos.

10. El método de la reivindicación 7 en que el cáncer es seleccionado de cáncer colorrectal, carcinoma renal, carcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, melanoma, glioblastoma, leucemia mieloide aguda, el carcinoma de células pequeñas de pulmón , carcinoma de células no pequeñas de pulmón, rabdomiosarcoma y carcinoma de células basales.

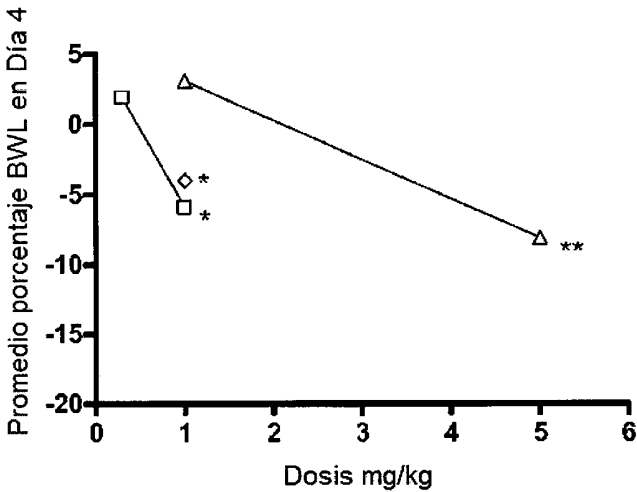
11. Un método para inducir apoptosis en una célula que comprende contactar la célula con un Compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
12. El método de la reivindicación 11 en que la célula es una célula cancerígena.
- 5 13. El método de de una o más de las reivindicaciones 7 a 12, que comprende administrar el Compuesto 15 en combinación con una segunda terapia para cáncer seleccionada de radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica y combinaciones de las mismas.
- 10 14. Un método para tratar una enfermedad autoinmune, en un animal que lo necesita, en que la enfermedad autoinmune es en el que la condición es causada o agravada por una regulación anormal de la apoptosis y se selecciona del grupo que consiste de: lupus eritematoso sistémico, psoriasis, y púrpura trombocitopénica
- 15 idiopática (Morbus Werlhof) que comprende administrar internamente al animal una cantidad eficaz de Compuesto de 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 15. Un compuesto seleccionado del grupo consistente del Compuesto 9, Compuesto 10, Compuesto 11, Compuesto 12, Compuesto 13, y Compuesto Protegido 15.
16. El compuesto de la reivindicación 15 que es el Compuesto 14.

17. Un proceso para preparar el Compuesto 15 que comprende desproteger el Compuesto Protegido 15.
18. El proceso de la reivindicación 17 donde el Compuesto Protegido es el
5 Compuesto 14.
19. Un compuesto seleccionado del grupo consistente del Compuesto 19, Compuesto 20, Compuesto 28, Compuesto 29, Compuesto 31, y Compuesto 32.

MIMÉTICOS DE SMAC**RESUMEN**

- 5 Un mimético de SMAC y composiciones farmacéuticas del mismo y métodos de uso.

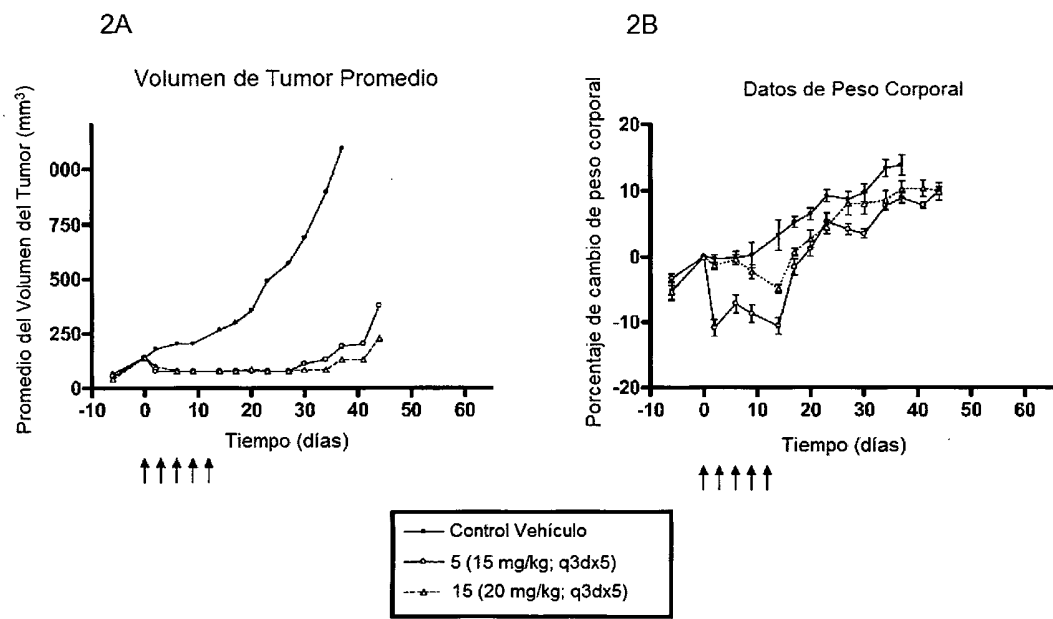
Figura 1



*Mortalidad para 3mg/kg

**Mortalidad para 10 mg/kg

Figura 2

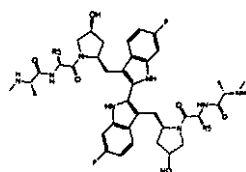


 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS			
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____					
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:			
(4) Clasificación Internacional :					
(71) Solicitante(s) TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORP.					
(72) Inventor(es) STEPHEN M. CONDON, YIJUN DENG, MATTHEW G. LAPORTE, SUSAN R. RIPPIN					
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO					
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33) País
		61/222.668		02/07/2009	US
		12/819.221		20/06/2010	US
(85) Fecha inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 06/01/2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 25/06/2010				N° publicación: WO 2011/002684 A1	
No. de solicitud PCT/US2010/039976					
(54) Título: MIMETICO DE SMAC					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) Pais 61/222.668 02/07/2009 US 12/819.221 20/06/2010 US		(51) Int. Cl.: (71) Solicitante(s) TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORP. (72) Inventor(es) STEPHEN M. CONDON YIJUN DENG MATTHEW G. LAPORTE SUSAN R. RIPPIN (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25/06/2010 N° de solicitud PCT/US2010/039976		(87) Publicación internacional Fecha: 06/01/2011 N° publicación: WO 2011/002684 A1	
(54) Titulo: MIMETICO DE SMAC			

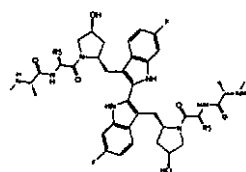
Reivindicación(es):

1. Un compuesto que tiene la formula:



En que R5 es -CH₂CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición que comprende el compuesto que tiene la fórmula:



En que R5 es -CH₂CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
4. La composición de la reivindicación 2, para el tratamiento del cáncer.
5. La composición de la reivindicación 2, 3, ó 4 la cual es un líquido estéril para inyección.
6. La composición de la reivindicación 2, 3, 4, ó 5 que está en forma de una dosis unitaria.
7. Un método para tratar un trastorno proliferativo en un mamífero que necesita del mismo, que comprende administrar internamente al animal una cantidad eficaz del Compuesto 15.
8. El método de la reivindicación 7 en donde el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: adenocarcinoma de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, mesotelioma, neuroma periférico, cáncer de vejiga, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfomas relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de vejiga, meningioma, glioma, astrocitoma, el cáncer de mama, cáncer cervical, trastornos mieloproliferativos crónicos (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica), cáncer de colon, cáncer endocrino, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de

esófago, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales extracraneales, tumores de células germinales extragonadales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores trofoblásticos del embarazo, leucemia de células pilosas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, carcinoma de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer de labio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer escamoso metastásico del cuello, mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide y síndrome de Sézary, síndromes mielodisplásicos, cáncer de la nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de la orofaringe, cáncer de los huesos, incluyendo el osteosarcoma y el histiocitoma fibroso maligno del hueso, cáncer epitelial de ovario, tumores de células germinales de ovario, tumores de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer de los senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores de la pituitaria, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, pineoblastoma, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, cáncer de uretra, el sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, y el tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles.

9. El método de la reivindicación 7 en que el trastorno proliferativo es un cáncer seleccionado del grupo consistente de: sarcomas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer de pulmón y cáncer de huesos.

...



No. 11-180821- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 14:38:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142



LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art. 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Descripción de la invención
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art. 33 Decisión 486/00
Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
☒ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒ Dibujos de ser estos pertinentes
☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita diseño industrial
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐