INMUNOMODULADORES

Campo de la Invención

La presente descripción proporciona péptidos macrocíclicos novedosos que inhiben las interacciones proteína/proteína PD-1/PD-L1 y CD80/PD-L1, y por ende, son útiles para la mejora de varias enfermedades, que incluyen el cáncer y las enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la Invención

La proteína de Muerte Programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en linfocitos B activados, linfocitos T y células mieloides (Agata et al., *supra*; Okazaki et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 14:779-782 (2002); Bennett et al., *J. Immunol.*, 170:711-718 (2003)).

La proteína PD-1 es una proteína de transmembrana tipo I 55 kDa que es parte de la superfamilia del gen Ig (Agata et al., *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)). La PD-1 contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor de tirosina (ITIM) próximo a la membrana y un motivo de cambio basado en tirosina (ITSM) distal a la membrana (Thomas, M.L., *J. Exp. Med.*, 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., *Immunol. Today*, 18:286-291 (1997)). Si bien su estructura es similar a la de CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPY que es

fundamental para la fijación de CD80 y CD86 (B7-2). Se han identificado dos ligandos de PD-1; PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (b7-DC). Se ha demostrado que la activación de los linfocitos T que expresan PD-1 se regula de manera descendente cuando se produce la interacción con linfocitos que expresan PD-L1 o PD-L2 (Freeman et al., *J. Exp. Med.,* 192:1027-1034 (2000); Latchman et al., *Nat. Immunol.,* 2:261-268 (2001); Carter et al., *Eur. J. Immunol.,* 32:634-643 (2002)). Tanto PD-L1 como PD-L2 son miembros de la familia de la proteína B7 que se fijan a PD-1, pero no se fijan a otros miembros de la familia de CD28. El ligando PD-L1 con frecuencia se presenta en diversos tipos de cáncer en seres humanos (Dong et al., *Nat. Med.,* 8:787-789 (2002)). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución en los linfocitos que infiltran los tumores, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de linfocitos T y una evasión inmunitaria por parte de células cancerosas (Dong et al., *J. Mol. Med.,* 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.,* 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.,* 10:5094-5100 (2004)). La inmunodepresión se puede revertir mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2 (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.,* 170:1257-1266 (2003)).

También se demostró que PD-L1 interactúa con CD80 (Butte MJ et al, *Immunity*; 27:111-122 (2007)). Se demostró que la interacción de células inmunitarias que expresan PD-L1/CD80 es inhibidora. El bloqueo de esta interacción demostró la inactivación de esta interacción inhibidora (Paterson AM, et al., *J Immunol.*, 187:1097-1105 (2011); Yang J, et al. *J Immunol.* Ago 1;187(3):1113-9 (2011)).

Cuando los linfocitos T que expresan PD-1 entran en contacto con células que expresan sus ligandos, se reducen las actividades funcionales en respuesta a los estímulos antigénicos, incluida la proliferación, la secreción de citocina y la citotoxicidad. Las interacciones PD-1/PD-L1 o PD-L2 regulan de manera descendente las respuestas inmunitarias durante la resolución de una infección o tumor, o durante el desarrollo de la tolerancia inmunológica (Keir, M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26:Epub (2008)). La estimulación crónica de antígenos, tal como la que ocurre durante la enfermedad tumoral o las infecciones crónicas, da como resultado linfocitos T que expresan niveles elevados de PD-1 y son disfuncionales con respecto a la actividad hacia el antígeno crónico (reseña en Kim et al., *Curr. Opin. Imm.* (2010)). Esto se denomina "agotamiento de linfocitos T". Los linfocitos B también muestran inhibición y "agotamiento" de PD-1/PD-ligando.

El bloqueo de la ligadura PD-1/PD-L1 por medio del

uso de anticuerpos dirigidos a PD-L1 demostró la restauración y el aumento de la activación de linfocitos T en muchos sistemas. Los pacientes que presentan cáncer avanzado se benefician del tratamiento con un anticuerpo monoclonal dirigido a PD-L1 (Brahmer et al., *New Engl. J. Med.* (2012)). Los modelos preclínicos de animales de tumores e infecciones crónicas dieron cuenta de que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 por parte de anticuerpos monoclonales puede mejorar la respuesta inmunitaria y dar como resultado el rechazo del tumor o el control de la infección. La inmunoterapia antitumoral mediante el bloqueo de PD-1/PD-L1 puede aumentar la respuesta inmunitaria terapéutica a diversos tumores histológicamente diferentes (Dong, H. et al., "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity", *J. Mol. Med.*, 81(5):281-287 (2003); Dong, H. et al., "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanim of immune evasion", *Nat. Med.,* 8(8):793-800 (2002)).

La interferencia con la interacción PD-1/PD-L1 provoca una actividad mejorada de linfocitos T en sistemas con infección crónica. El bloqueo de PD-L1 provocó una mejora de la depuración viral y un restablecimiento de la inmunidad en ratones con infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (Barber, D.L. et al., "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature,* 439(7077):682-687 (2006)). Los ratones

humanizados infectados por VIH-1 mostraron una mejora de la protección contra la viremia y una disminución viral de linfocitos T CD4+ (Palmer et al., *J. Immunol.* (2013)). El bloqueo de PD-1/PD-L1 a través de anticuerpos monoclonales dirigidos a PD-L1 puede restaurar la funcionalidad específica del antígeno *in vitro* a los linfocitos T de pacientes con VIH (Day, Nature (2006); Petrovas, *J. Exp. Med.* (2006); Trautman, *Nature Med.* (2006); D'Souza, *J. Immunol.* (2007); Zhang, Blood (2007); Kaufmann, *Nature Imm.* (2007); Kasu, *J. Immunol.* (2010); Porichis, Blood (2011)), pacientes con HCV (Golden-Mason, *J. Virol.* (2007); Jeung, *J. Leuk. Biol.* (2007); Urbani, *J. Hepatol.* (2008); Nakamoto, *PLoS Path.* (2009); Nakamoto, *Gastroenterology* (2008)) y pacientes con HBV (Boni, *J. Virol.* (2007); Fisicaro, *Gastro.* (2010); Fisicaro et al., *Gastroenterology* (2012); Boni et al., *Gastro.* (2012); Penna et al., *J. Hep.* (2012); Raziorrough, *Hepatology* (2009); Liang, *World J. Gastro.* (2010); Zhang, *Gastro.* (2008)).

El bloqueo de la interacción PD-L1/CD80 también demostró que estimula la inmunidad (Yang J., et al., *J Immunol.* Ago 1;187(3):1113-9 (2011)). Se demostró la mejora de la estimulación inmunitaria que resulta del bloqueo de la interacción PD-L1/CD80 a través de la combinación con el bloqueo de otras interacciones PD-1/PD-L1 o PD-1/PD-L2.

Se supone que las alteraciones en los fenotipos de

células inmunitarias son un factor importante en el choque séptico (Hotchkiss, et al., *Nat Rev Immunol* (2013)). Estos incluyen niveles aumentados de PD-1 y PD-L1 (Guignant, et al, *Crit. Care* (2011)), Las células de pacientes que presentan choque séptico con niveles aumentados de PD-1 y PD-L1 muestran un mayor nivel de apoptosis de linfocitos T. Los anticuerpos dirigidos a PD-L1 pueden reducir el nivel de apoptosis de células inmunitarias (Zhang et al, *Crit Care* (2011)). Además, los ratones que carecen de expresión de PD-1 son más resistentes a los síntomas de choque séptico que los ratones de tipo silvestre. Yang J., et al., *J Immunol.* Ago 1;187(3):1113-9 (2011)). Los estudios revelaron que el bloqueo de las interacciones de PD-L1 por medio de anticuerpos puede deprimir respuestas inmunitarias inadecuadas y mejorar los signos de la enfermedad.

Además de mejorar las respuestas inmunitarias a los antígenos crónicos, el bloqueo de la vía de PD-1/PD-L1 también demostró la mejora de las respuestas a la vacunación, incluida la vacunación terapéutica en el contexto de infección crónica (Ha, S.J. et al., "Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection", *J. Exp. Med.,* 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C. et al., "PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and

prophylactic vaccination", *J. Immunol.*, 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y. et al., "Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1", *J. Immunother.*, 34(3):297-306 (2011)).

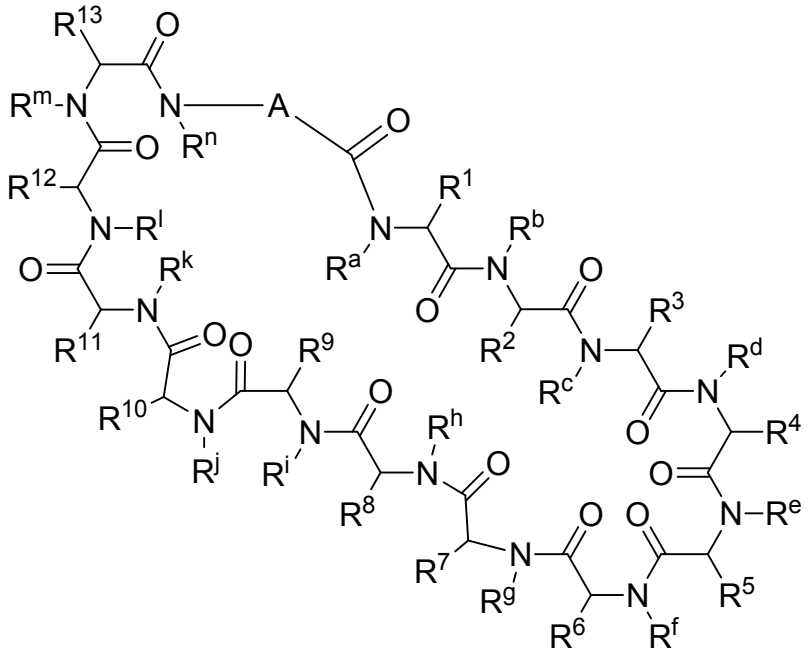
Descripción Detallada de la Invención

Las moléculas descritas en la presente demuestran la capacidad de bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1, en sistemas experimentales bioquímicos y celulares. Estos resultados son coherentes con la posibilidad de que la administración terapéutica mejore la inmunidad en el cáncer o en infecciones crónicas, incluida la vacunación terapéutica.

Los péptidos macrocíclicos descritos en la presente son capaces de inhibir la interacción de PD-L1 con PD-1 y con CD80. Estos compuestos han demostrado una fijación altamente eficaz a PD-L1, el bloqueo de la interacción de PD-L1 con PD-1 o CD80, y son capaces de promover una mejora de la actividad funcional de linfocitos T, lo que los convierte en candidatos para formulaciones parenterales, orales, pulmonares, nasales, bucales o de liberación sostenida.

En un aspecto, la presente descripción proporciona

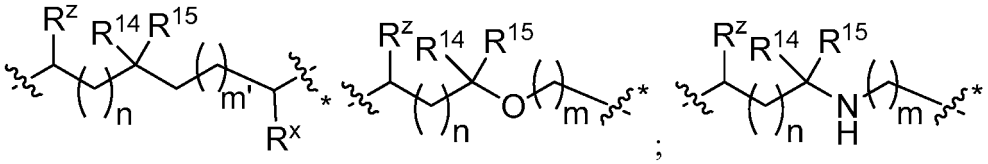
un compuesto de la Fórmula (I)



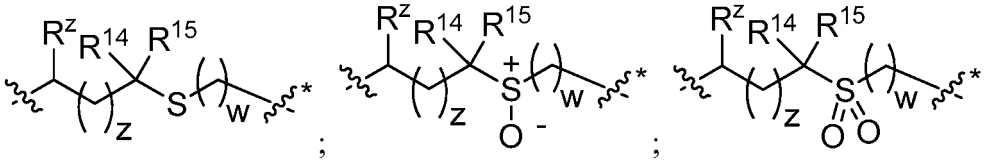
(I),

o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

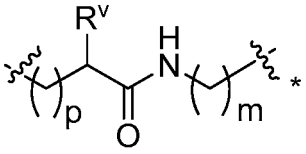
A se selecciona de $-CH_2CH_2-$;



;



;



; y

en donde:

 indica el punto de unión al grupo carbonilo y  indica el punto de unión al átomo de nitrógeno;

n es 0, 1 ó 2;

m es 1 ó 2;

m' es 0 ó 1;

z es 1 ó 2;

cuando z es 1, w es 2;

cuando z es 2, w es 1 ó 2;

p es 0, 1 ó 2;

R^{14} y R^{15} se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^{x} se selecciona de hidrógeno, amino, hidroxi y metilo; y

R^{z} se selecciona de hidrógeno y $-C(O)NHR^{16}$; en donde R^{16} se selecciona de hidrógeno, $-CHR^{17}C(O)NH_2$, $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ y $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$; en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y $-CH_2OH$, y en donde R^{18} se selecciona de hidrógeno y metilo;

R^{v} es hidrógeno, metilo o una cadena lateral de aminoácido natural;

R^{c}, R^{f}, R^{h}, R^{i} y R^{m} son hidrógeno;

R^{n} es hidrógeno o metilo, o R^{v} y R^{n} forman un anillo de pirrolidina;

R^{a}, R^{e}, R^{j} y R^{k} se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural o forman un anillo con el grupo R próximo correspondiente, como se describe más adelante;

R^e y R^k pueden formar, cada uno, un anillo con el grupo R próximo correspondiente y los átomos a los que están unidos, seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^b es metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^d es hidrógeno o metilo, o R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo, hidroxi y fenilo;

R^g es hidrógeno o metilo, o R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, bencilo opcionalmente sustituido con un grupo halo, benciloxi, ciano, ciclohexilo, metilo, halo, hidroxi, isoquinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo metoxi, quinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo halo, y tetrazolilo; y en donde los anillos de pirrolidina y piperidina están opcionalmente fusionados con un grupo ciclohexilo, fenilo o indol; y

R^L es metilo, o R^L y R^{12}, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina y pirolidina, en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi.

En una primera modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se

sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi; y

R^k es metilo.

En una segunda modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este terapéuticamente aceptable, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$.

En una tercera modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este terapéuticamente aceptable, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye

con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_2)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$; y

A es $-CH_2CH_2$.

En una cuarta modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este terapéuticamente aceptable, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

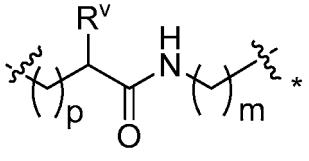
R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$; y

A es 

.

En una quinta modalidad del primer aspecto, la

presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo;

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

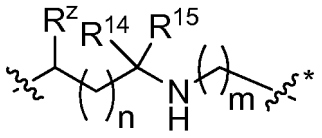
R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH3)2$, $-(CH_2)4NH_2$, $-(CH_2)2CO2H$ y $(CH_2)2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$; y



A es

En una sexta modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

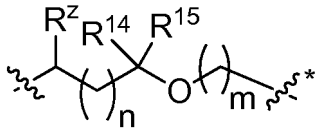
R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$; y



.

A es

En una séptima modalidad del primer aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se

sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi;

R^k es metilo

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

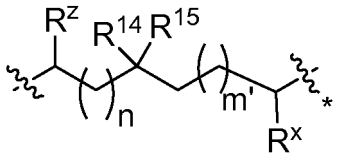
R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

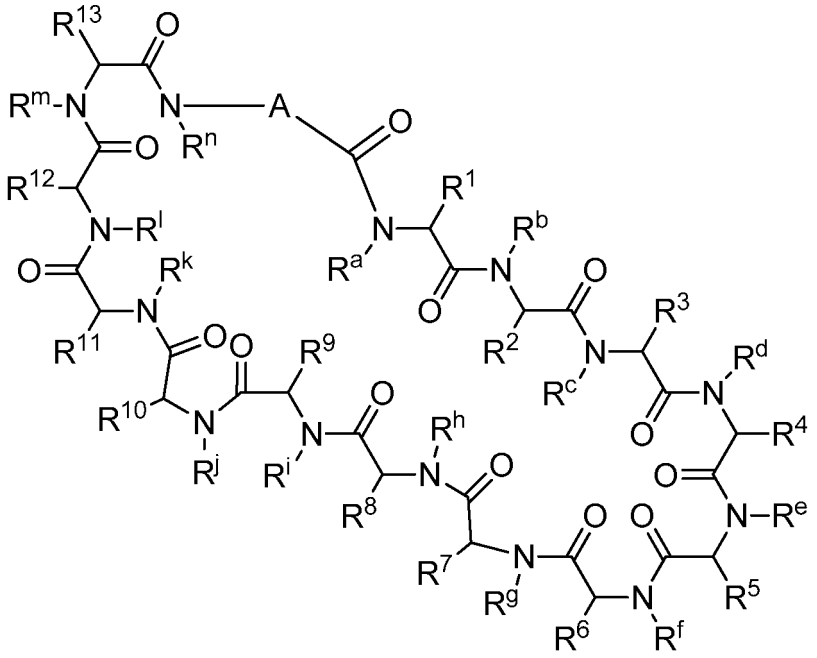
R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$; y



.

A es

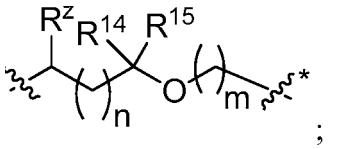
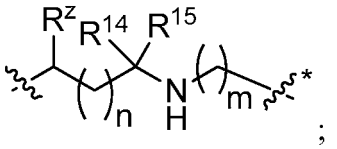
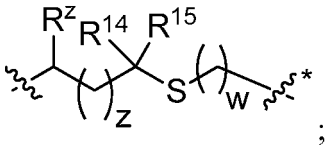
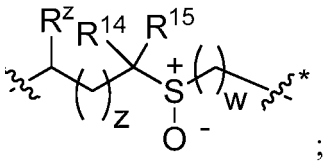
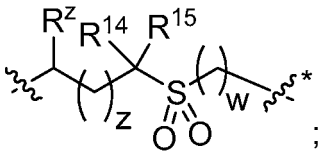
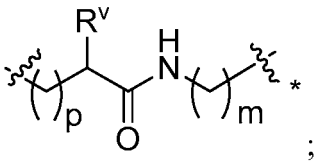
En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (II),



(II),

o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

A se selecciona de $-CH_2CH_2-$;


;

;

;

;

; y

;

en donde:

$\sim\!\!\!*$ indica el punto de unión al grupo carbonilo y

 indica el punto de unión al átomo de nitrógeno;

n es 0 ó 1;

m es 1 ó 2;

z es 1 ó 2;

cuando z es 1, w es 2;

cuando z es 2, w es 1 ó 2;

p es 0, 1 ó 2;

R^{14} y R^{15} se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo; y

R^z se selecciona de hidrógeno y $-C(O)NHR^{16}$; en donde R^{16} se selecciona de hidrógeno, $-CHR^{17}C(O)NH_2$, $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ y $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$; en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y $-CH_2OH$, y en donde R^{18} se selecciona de hidrógeno y metilo;

R^v es hidrógeno o una cadena lateral de aminoácido natural;

R^c, R^f, R^h, R^i y R^m son hidrógeno;

R^n es hidrógeno o metilo, o R^v y R^n forman un anillo de pirrolidina;

R^a, R^e, R^j y R^k se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural o forman un anillo con el grupo R próximo

correspondiente, como se describe más adelante;

R^e y R^k pueden formar, cada uno, un anillo con el grupo R próximo correspondiente y los átomos a los que están unidos, seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^b es metilo, o R^b y R^2, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^d es hidrógeno o metilo, o R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo, hidroxi y fenilo;

R^g es hidrógeno o metilo, o R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se

sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, bencilo opcionalmente sustituido con un grupo halo, benciloxi, ciano, ciclohexilo, metilo, halo, hidroxi, isoquinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo metoxi, quinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo halo, y tetrazolilo; y en donde los anillos de pirrolidina y piperidina están opcionalmente fusionados con un grupo ciclohexilo, fenilo o indol; y

R^L es metilo, o R^L y R^{12}, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina y pirolidina, en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi.

En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona un método para mejorar, estimular y/o aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita; el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal de este terapéuticamente aceptable. En una primera modalidad, el método también comprende administrar un agente adicional antes, durante o después de la administración del compuesto de la Fórmula (I), o una sal de este terapéuticamente aceptable. En una segunda modalidad, el agente adicional es un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un agente citotóxico y/o un modificador de la respuesta inmunitaria.

En una tercera modalidad, el agente adicional es un inhibidor de HDAC. En una cuarta modalidad, el agente adicional es un agonista de TLR7 y/o TLR8.

En un cuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células cancerosas en un sujeto que lo necesita; el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este terapéuticamente aceptable. Se debe comprender que la inhibición puede ser directa o indirecta. En una primera modalidad, el tipo de cáncer se selecciona de melanoma, carcinoma de células renales, cáncer pulmonar de células no pequeñas escamosas (NSCLC), NSCLC de células no escamosas, cáncer colorrectal, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer de ovario, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma pancreático, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas de esófago, tubo gastrointestinal y mama, y cáncer hematológico.

En un quinto aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de este terapéuticamente aceptable. En una primera modalidad, la

enfermedad infecciosa es causada por un virus. En una segunda modalidad, el virus se selecciona de VIH, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, virus del herpes e influenza.

En un sexto aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar el choque séptico en un sujeto que lo necesita; el método comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más péptidos macrocíclicos descritos en la presente.

En un séptimo aspecto, la presente descripción proporciona un método para bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1 y/o CD80 en un sujeto, el método comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido macrocíclico descrito en la presente.

En los compuestos de las Fórmulas (I) y (II), en donde las cadenas laterales de R son parte de un anillo que se sustituye con metilo, el grupo metilo puede encontrarse en cualquier átomo de carbono sustituible en el anillo, incluido el carbono que es parte de la estructura de origen macrocíclica.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^1 preferidas son: fenilalanina, tirosina, 3-tien-2-ilo, 4-metilfenilalanina, 4-clorofenilalanina, 3-metoxifenilalanina, isotriptófano, 3-metilfenilalanina, 1-naftilalanina, 3,4-difluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina, 3,4-dimetoxifenilalanina, 3,4-

diclorofenilalanina, 4-difluorometilfenilalanina, 2-metilfenilalanina, 2-naftilalanina, triptófano, 4-piridinilo, 4-bromofenilalanina, 3-piridinilo, 4-trifluorometilfenilalanina, 4-carboxifenilalanina, 4-metoxifenilalanina, bifenilalanina y 3-clorofenilalanina; y 2,4-diaminobutano.

En los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^2 no es parte de un anillo, las cadenas laterales de R^2 preferidas son: alanina, serina y glicina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^3 preferidas son: asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, serina, ornitina, lisina, histidina, treonina, leucina, alanina, 2,3-diaminopropano y 2,4-diaminobutano.

En los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^4 no es parte de un anillo, las cadenas laterales de R^4 preferidas son: valina, alanina, isoleucina y glicina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^5 preferidas son: histidina, asparagina, 2,3-diaminopropano, serina, glicina, 2,4-diaminobutano, treonina, alanina, lisina, ácido aspártico, alanina y 3-tiazolilalanina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^6 preferidas son: leucina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, serina, lisina, 3-

ciclohexano, treonina, ornitina, 2,4-diaminobutano, alanina, arginina y ornitina ($COCH_3$).

En los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^7 no es parte de un anillo, las cadenas laterales de R^7 preferidas son: glicina, 2,4-diaminobutano, serina, lisina, arginina, ornitina, histidina, asparagina, glutamina, alanina y 2,4-diaminobutano (C(O)ciclobutano).

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^8 preferidas son triptófano y 1,2-bencisotiazolinilalanina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^9 preferidas son: serina, histidina, lisina, ornitina, 2,4-dibutilamina, treonina, lisina, glicina, ácido glutámico, valina, 2,3-diaminopropano, arginina, ácido aspártico y tirosina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^{10} preferidas son: triptófano opcionalmente sustituido, bencisotiazolilalanina, 1-naftilalanina y metionina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^{11} preferidas son: norleucina, leucina, asparagina, fenilalanina, metionina, etoximetano, alanina, triptófano, isoleucina, fenilpropano, ácido glutámico, hexano y heptano.

En los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^{12} no

es parte de un anillo, las cadenas laterales de R^{12} preferidas son: norleucina, alanina, etoximetano, metionina, serina, fenilalanina, metoxietano, leucina, triptófano, isoleucina, ácido glutámico, hexano, heptano y glicina.

En los compuestos de la Fórmula (I), las cadenas laterales de R^{13} preferidas son: arginina, ornitina, alanina, 2,4-diaminobutano, 2,3-diaminopropano, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, lisina, treonina, ciclopropilmetano, glicina, valina, isoleucina, histidina y 2-aminobutano.

De acuerdo con la presente descripción, se descubrieron péptidos que se fijan específicamente a PD-L1 y son capaces de inhibir la interacción de PD-L1 con PD-1 y CD80. Estos péptidos macrocíclicos muestran una eficacia inmunomoduladora *in vitro*, lo que implica que sean candidatos terapéuticos para el tratamiento de varias enfermedades, incluido el cáncer y enfermedades infecciosas.

Las expresiones "fijación específica" o "que se fija específicamente" se refieren a la interacción entre una proteína y una molécula de fijación, tal como un compuesto o ligando. La interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, un sitio de fijación a la enzima, un epítopo o un determinante antigénico) de la proteína reconocida por la molécula de fijación. Por ejemplo, si un compuesto tiene fijación específica al sitio

de fijación a la proteína "A", la presencia del compuesto en una reacción que contiene una proteína que incluye el sitio de fijación A y de un péptido etiquetado que se fija específicamente al sitio de fijación a la proteína A producirán la reducción de la cantidad de péptido etiquetado fijado a la proteína. Por el contrario, la fijación no específica de un compuesto a la proteína no da como resultado un desplazamiento dependiente de la concentración del péptido etiquetado de la proteína.

Se pretende que la presente descripción incluya todos los isótopos de átomos que ocurren en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico, pero diferentes números másicos. A fin de brindar ejemplos generales y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C. Por lo general, los compuestos de la invención etiquetados de manera isotópica se pueden preparar mediante técnicas convencionales conocidas por las personas del oficio de nivel medio o mediante procesos análogos a los que se describen en la presente, usando un reactivo adecuado etiquetado de manera isotópica en lugar de un reactivo no etiquetado. Los compuestos pueden tener una variedad de usos posibles, por ejemplo, como estándares y reactivos para determinar la actividad biológica. En el caso de isótopos estables, es posible que estos compuestos tengan

el potencial de modificar favorablemente propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

Un aspecto adicional del objeto descrito en la presente se refiere al uso de los péptidos descritos como ligandos radioetiquetados para el desarrollo de ensayos de fijación a ligando o para controlar la adsorción, el metabolismo, la distribución, la fijación al receptor o su ocupación *in vivo*, o la disposición del compuesto. Por ejemplo, un péptido macrocíclico descrito en la presente se puede preparar usando el isótopo radiactivo ^{125}I, y el péptido radioetiquetado resultante se puede usar para desarrollar un ensayo de fijación o para estudios de metabolismo. De manera alternativa, y para el mismo fin, un péptido macrocíclico descrito en la presente se puede convertir en una forma radioetiquetada mediante titulación catalítica usando métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

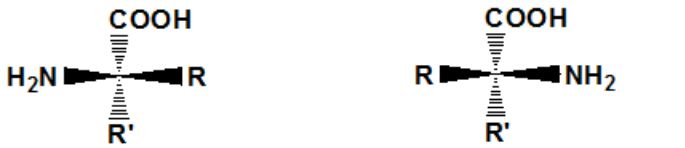
Los péptidos macrocíclicos de la presente descripción también se pueden usar como agentes para las imágenes PET agregando un marcador radiactivo mediante métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

Los péptidos preferidos incluyen al menos uno de los péptidos macrocíclicos provistos en la presente, y estos péptidos se pueden incluir en composiciones y combinaciones farmacéuticas.

Las definiciones provistas en la presente se

aplican, sin limitación, a los términos usados en la presente memoria descriptiva, a menos que se limite de otra manera en casos específicos.

Las personas del oficio de nivel medio de la química de aminoácidos y péptidos están al tanto de que un aminoácido incluye un compuesto representado por la estructura general:



α-aminoácido L o S (si R=H) **α-aminoácido D o R (si R=H)**

en donde R y R′ son como se analizan en la presente.

A menos que se indique lo contrario, el término "aminoácido", como se usa en la presente, solo o como parte de otro grupo, incluye, sin limitación, un grupo amino y un grupo carboxilo ligado al mismo carbono, denominado carbono "α", en donde R y/o R′ pueden ser una cadena lateral natural o no natural, que incluye hidrógeno. La configuración "S" absoluta en el carbono "α" con frecuencia se denomina configuración "L" o "natural". En caso de que ambos sustituyentes "R" y "R′"(principal) sean iguales a hidrógeno, el aminoácido es glicina y no es quiral.

La expresión "cadena lateral de aminoácido natural", como se usa en la presente, se refiere a la cadena

lateral de cualquier aminoácido natural (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina,-histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), por lo general, en la configuración S (es decir, el aminoácido L).

La expresión "cadena lateral de aminoácido no natural", como se usa en la presente, se refiere a una cadena lateral de cualquier aminoácido natural, por lo general, en la configuración R (es decir, el aminoácido D) o a un grupo diferente de una cadena lateral de aminoácidos natural en la configuración R o S (es decir, el aminoácido D o L, respectivamente) seleccionado de:

C_2-C_7alquenilo, C_1-C_3alcoxiC_1-C_3alquilo, C_1-C_6alcoxicarbonilC_1-C_3alquilo, C_1-C_7alquilo, C_1-C_3alquilsulfanilC_1-C_3alquilo, C_1-C_3alquilsulfonilC_1-C_3alquilo, amidoC_1-C_3alquilo, aminoC_1-C_3alquilo, azaindolilC_1-C_3alquilo, benzotiazolilC_1-C_3alquilo, benzotienilC_1-C_3alquilo, benciloxiC_1-C_3alquilo, carboxiC_1-C_3alquilo, cianoC_1-C_3alquilo, C_3-C_6cicloalquilC_1-C_3alquilo, difenilmetilo, furanilC_1-C_3alquilo, haloC_1-C_3alquilo, hidroxiC_1-C_3alquilo, imidazolilC_1-C_3alquilo, naftilC_1-C_3alquilo, piranilC_1-C_3alquilo, piridinilC_1-C_3alquilo, tetrahidrofurilC_1-C_3alquilo, tiazolilC_1-C_3alquilo, tienilC_1-C_3alquilo;

bifenilC_1-C_3alquilo, en donde bifenilo se sustituye

opcionalmente con un grupo seleccionado de C_1-C_3alquilo, amino, ciano, halo, hidroxi y nitro;

indolilC_1-C_3alquilo, en donde la parte de indolilo se sustituye opcionalmente con un grupo seleccionado de C_1-C_3alquilo, carboxiC_1-C_3alquilo, ciano, halo, hidroxi, nitro y fenilo, en donde fenilo también se sustituye opcionalmente con uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente de C_1-C_3alcoxi, C_1-C_3alquilo y halo;

NR^aR^b(C_1-C_7alquilo), en donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de hidrógeno, C_2-C_4alqueniloxicarbonilo, C_1-C_3alcoxicarbonilo, C_1-C_3alquilo, C_1-C_3alquilcarbonilo, C_3-C_6cicloalquilcarbonilo, furanilcarbonilo, fenilC_1-C_3alquilo, fenilcarbonilo, piranilcarbonilo, tetrahidrofurilcarbonilo y tienilcarbonilo. Cuando el ligador alquilo contiene más de un carbono, puede existir un grupo NR^aR^b adicional en la cadena.

NR^cR^dcarbonilC_1-C_3alquilo, en donde R^c y R^d se seleccionan independientemente de hidrógeno, C_3-C_4alquenilo, C_1-C_3alquilo, fenilC_1-C_3alquilo y trifenilmetilo;

fenilC_1-C_3alquilo, en donde la parte de fenilo se sustituye opcionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos seleccionados independientemente de C_1-C_4alcoxi, C_1-C_4alquilo, C_1-C_3alquilsulfonilamino, amido, amino, aminoC_1-C_3alquilo, aminosulfonilo, carboxi, ciano, halo, haloC1-C3alquilo, hidroxi, $-NC(NH_2)_2$, nitro y $-OP(O)(OH)_2$; y

fenoxiC_1-C_3alquilo, en donde fenilo se sustituye opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados independientemente de C_1-C_4alcoxi, C_1-C_4alquilo, C_1-C_3alquilsulfonilamino, amido, amino, aminoC_1-C_3alquilo, aminosulfonilo, carboxi, ciano, halo, haloC_1-C_3alquilo, hidroxi y nitro.

El término "C_2-C_4alquenilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a cuatro átomos de carbono que contiene al menos un enlace doble de carbono-carbono.

El término "C_3-C_4alquenilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de tres o cuatro átomos de carbono que contiene al menos un enlace doble de carbono-carbono.

El término "C_2-C_7alquenilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a siete átomos de carbono que contiene al menos un enlace doble de carbono-carbono.

El término "C_2-C_4alqueniloxi", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_2-C_4alquenilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "C_1-C_3alcoxi", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "C_1-C_4alcoxi", como se usa en la

presente, se refiere a un grupo C_1-C_4alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "C_1-C_6alcoxi", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_6alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "C_1-C_3alcoxiC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alcoxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_1-C_3alcoxicarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C1-C3alcoxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "C_1-C_6alcoxicarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_6alcoxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "C_1-C_6alcoxicarbonilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_6alcoxicarbonilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a tres átomos de carbono.

El término "C_1-C_4alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a

cuatro átomos de carbono.

El término "C_1-C_6alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.

El término "C_1-C_3alquilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "C_1-C_3alquilsulfanilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de azufre.

El término "C_1-C_3alquilsulfanilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilsulfanilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_1-C_3alquilsulfonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo sulfonilo.

El término "C_1-C_3alquilsulfonilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilsulfonilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_1-C_3alquilsulfonilamino", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilsulfonilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo

amino.

El término "amido", como se usa en la presente, se refiere a $-C(O)NH_2$.

El término "amidoC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo amido unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

Como se usa en la presente, el término "amino" se refiere a $-NH_2$.

El término "aminoC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo amino unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "aminosulfonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo amino unido a la porción molecular de origen a través de un grupo sulfonilo.

El término "azaindolilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo azaindolilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo azaindolilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "benzotiazolilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo benzotiazolilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo benzotiazolilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "benzotienilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo benzotienilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo benzotienilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "benciloxi", como se usa en la presente, se refiere a un grupo bencilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "benciloxiC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo benciloxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "bifenilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo bifenilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo bifenilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "carbonilo", como se usa en la presente, se refiere a -C(O)-.

El término "carboxi", como se usa en la presente, se refiere a $-CO_2H$.

El término "carboxiC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo carboxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "ciano", como se usa en la presente, se refiere a -CN.

El término "cianoC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo ciano unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_3-C_6cicloalquilo", como se usa en la presente, se refiere a un sistema de anillos de hidrocarburo monocíclico saturado que tiene de tres a seis átomos de carbono y cero heteroátomos.

El término "C_3-C_6cicloalquilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_3-C_6cicloalquilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "C_3-C_6cicloalquilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_3-C_6 cicloalquilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "furanilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo furanilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo furanilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "furanilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo furanilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

Los términos "halo" y "halógeno", como se usan en la presente, se refieren a F, Cl, Br o I.

El término "haloC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo C_1-C_3alquilo sustituido con uno, dos o tres átomos de halógeno.

El término "halometilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo metilo sustituido con uno, dos o tres átomos de halógeno.

El término "hidroxi", como se usa en la presente, se refiere a -OH.

El término "hidroxiC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo hidroxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "imidazolilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo imidazolilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo imidazolilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "indolilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo indolilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo indolilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "naftilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo naftilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo naftilo se puede unir a la porción alquilo a través de

cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "nitro", como se usa en la presente, se refiere a $-NO_2$.

El término "NR^aR^b", como se usa en la presente, se refiere a dos grupos, R^a y R^b, que están unidos a la porción molecular de origen a través de un átomo de nitrógeno. R^a y R^b se seleccionan independientemente de hidrógeno, C_2-C_4alqueniloxicarbonilo, C_1-C_3alquilcarbonilo, C_3-C_6cicloalquilcarbonilo, furanilcarbonilo y fenilcarbonilo.

El término "$NR^aR^b(C_1$-$C_3)$alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo NR^aR^b unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "NR^cR^d", como se usa en la presente, se refiere a dos grupos, R^c y R^d, que están unidos a la porción molecular de origen a través de un átomo de nitrógeno. R^c y R^d se seleccionan independientemente de hidrógeno, C_1-C_3alquilo y trifenilmetilo.

El término "NR^cR^dcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo NR^cR^d unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "NR^cR^dcarbonilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo NR^cR^dcarbonilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "fenoxi", como se usa en la presente, se

refiere a un grupo fenilo unido a la porción molecular de origen a través de un átomo de oxígeno.

El término "fenoxiC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo fenoxi unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "fenilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo fenilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo.

El término "fenilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo fenilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "piranilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo piranilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo piranilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "piranilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo piranilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "piridinilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo piridinilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo piridinilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "sulfanilo", como se usa en la presente,

se refiere a -S-.

El término "sulfonilo", como se usa en la presente, se refiere a $-SO_2-$.

El término "tetrahidrofurilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo tetrahidrofurilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo tetrahidrofurilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "tetrahidrofurilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo tienilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "tiazolilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo tiazolilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo tiazolilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "tienilC_1-C_3alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo tienilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo C_1-C_3alquilo. El grupo tienilo se puede unir a la porción alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "tienilcarbonilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo tienilo unido a la porción molecular de origen a través de un grupo carbonilo.

El término "tratar" se refiere a: (i) prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección en un paciente que puede tener predisposición a la enfermedad, el trastorno y/o la afección, pero que aún no se le ha diagnosticado; (ii) inhibir la enfermedad, el trastorno o la afección, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, el trastorno o la afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad, del trastorno y/o de la afección, y/o los síntomas asociados a la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

La fijación de los péptidos macrocíclicos a PD-L1 se puede medir, por ejemplo, mediante métodos, tales como fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF), resonancia de plasmones superficiales (SPR), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y similares. Además, la fijación de los péptidos macrocíclicos a PD-L1 expresado en la superficie de las células se puede medir como se describió en la presente, en ensayos de fijación celular.

La administración de un agente terapéutico descrito en la presente incluye, entre otros, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de agente terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente, se refiere, entre otros, a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una afección que se

puede tratar mediante la administración de una composición de los inhibidores de fijación a PD-1/PD-L1 descritos en la presente. Esa cantidad es la cantidad suficiente para demostrar un efecto detectable terapéutico, preventivo o que produce una mejora. El efecto puede incluir, por ejemplo, entre otros, el tratamiento o la prevención de las afecciones enumeradas en la presente. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y de la salud del sujeto, la naturaleza y el alcance de la afección que se trata, las recomendaciones del médico y el tratamiento o la combinación de tratamientos seleccionada para la administración. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado.

En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto usando los péptidos macrocíclicos de la presente descripción. Como se demuestra en la presente, los péptidos macrocíclicos de la presente descripción son capaces de fijarse a PD-L1, alterar la interacción entre PD-L1 y PD-1, competir con la fijación de PD-L1 a anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se sabe bloquean la interacción con PD-1, mejorar la secreción de IFNγ por parte de linfocitos T específicos de CMV, y mejorar la secreción de IFNg por parte de linfocitos T específicos de VIH. En consecuencia, los péptidos macrocíclicos de la presente descripción son útiles

para modificar una respuesta inmunitaria, tratar enfermedades, tales como el cáncer o enfermedades infecciosas, estimular una respuesta autoinmune protectora o estimular respuestas inmunitarias específicas de antígenos (por ejemplo, mediante la coadministración de péptidos bloqueadores de PD-L1 con un antígeno de interés).

A fin de comprender mejor la presente descripción, primero se definen ciertos términos. Las definiciones adicionales se indican a lo largo de la descripción detallada.

Las expresiones "ligando de muerte programada 1", "ligando de muerte celular programada 1", "Proteína PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-L1", "hPD-LI", "CD274" y "B7-H1" se usan indistintamente, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-L1 humano, y análogos que tienen al menos un epítopo común con PD-L1. La secuencia de PD-L1 completa se puede encontrar en GENBANK®, No. de registro NP_054862.

Las expresiones "muerte programada 1", "muerte celular programada 1", "proteína PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-I" se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-1 humano, y análogos que tienen al menos un epítopo común con PD-1. La secuencia de PD-1 completa se puede encontrar en GENBANK®, No. de registro U64863.

Las expresiones “antígeno asociado al linfocito T citotóxico-4”, “CTLA-4”, “CTLA4”, “antígeno CTLA-4” y “CD152” (véase, por ejemplo, Murata, *Am. J. Pathol.,* 155:453-460 (1999)) se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de CTLA-4 humano y análogos que tienen al menos un epítopo común con CTLA-4 (véase, por ejemplo, Balzano, *Int. J. Cancer Suppl.,* 7:28-32 (1992)). La secuencia de ácidos nucleicos CTLA-4 completa se puede encontrar en GENBANK®, No. de registro L15006.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción, por ejemplo, de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluso péptidos macrocíclicos, citocinas y complemento) que da como resultado el daño selectivo, la destrucción o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en el caso de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Un "evento adverso" (AE), como se usa en la presente, se refiere a cualquier signo (incluido un hallazgo anormal en el laboratorio), síntoma o enfermedad desfavorable o, en general, involuntario, incluso no deseable, asociado al uso de un tratamiento médico. Por ejemplo, un evento adverso puede estar asociado a la activación del sistema inmunitario

o a la expansión de las células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T) en respuesta a un tratamiento. Un tratamiento médico puede tener uno o más AE asociados, y cada AE puede tener el mismo nivel de gravedad, o no. La referencia a los métodos capaces de "alterar eventos adversos" implica un régimen de tratamiento que disminuye la incidencia y/o la gravedad de uno o más AE asociados al uso de un régimen de tratamiento diferente.

Como se usa en la presente, "enfermedad hiperproliferativa" se refiere a afecciones en donde el crecimiento celular supera niveles normales. Por ejemplo, las enfermedades o los trastornos hiperproliferativos incluyen el cáncer (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer biliar) y enfermedades que no son malignas (por ejemplo, ateroesclerosis, hiperplasia benigna e hipertrofia prostática benigna).

Como se usan en la presente, "alrededor de" o "que comprende esencialmente" significan, dentro de un margen de error aceptable del valor particular determinado por una persona del oficio de nivel medio, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "alrededor de" o "que comprende esencialmente" puede significar dentro de uno o más de una desviación estándar de acuerdo con la práctica en el estado de la técnica. De manera alternativa, "alrededor de"

o “que comprende esencialmente” puede referirse a un intervalo de hasta 20%. Además, en particular, con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos pueden referirse a hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se brindan valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se supone que el significado de “alrededor de" o "que comprende esencialmente" se encuentra dentro de un margen de error aceptable para tal valor particular.

Como se describe en la presente, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de proporción o intervalo de entero incluye el valor de cualquier entero dentro del intervalo mencionado y, cuando sea adecuado, sus fracciones (tal como un décimo o un centésimo de un entero), a menos que se indique lo contrario.

Ensayos de competencia

La presente descripción también se refiere a péptidos macrocíclicos que son capaces de competir con la fijación de un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia (MDX-1105) en al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90% y al menos alrededor de 100%. Tales péptidos macrocíclicos pueden compartir homología estructural con uno o más péptidos

macrocíclicos descritos en la presente, que incluyen las formas mutantes, de sustitución conservadora, de sustitución funcional y de eliminación, siempre que se fijen específicamente a PD-L1. Por ejemplo, si un péptido macrocíclico se fija considerablemente a la misma región de PD-L1 que un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, el péptido macrocíclico se debe fijar a un epítopo de PD-L1 que al menos se superpone con el epítopo PD-L1 al que se fija el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1. La región de superposición puede variar de un residuo de aminoácido a varios cientos de residuos de aminoácido. El péptido macrocíclico luego debe competir con la fijación del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a PD-L1 y/o bloquearla y, de esa manera, disminuir la fijación del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a PD-L1, preferentemente, en al menos alrededor de 50% en un ensayo de competencia.

Los anticuerpos anti-PD-L1 que se pueden usar como anticuerpos de referencia para los ensayos de competencia se conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos anti-PD-L1 representativos: MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono), L1X3 (Serono), MSB-0010718C (Serono) y PD-L1 Probody (CytomX) y los anticuerpos PD-L1 descritos en WO 2007/005874 de titularidad conjunta.

Los anticuerpos anti-PD-1 que se pueden usar como anticuerpos de referencia para los ensayos de competencia se

conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos anti-PD-1 representativos: nivolumab (BMS); 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, cada uno de los cuales se describe en la patente estadounidense de titularidad conjunta No. 8,008,449 (BMS), MK-3475 (Merck, descrito en la patente estadounidense No. 8,168,757) y los anticuerpos descritos en la patente estadounidense No. 7,488,802.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un péptido macrocíclico o una combinación de péptidos macrocíclicos de la presente descripción, formulados junto con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Tales composiciones pueden incluir un péptido macrocíclico o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la presente descripción, o una combinación de estos (por ejemplo, dos o más diferentes). Por ejemplo, una composición farmacéutica de la descripción puede comprender una combinación de péptidos macrocíclicos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se fijan a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden administrar en un tratamiento conjunto, es

decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, el tratamiento conjunto puede incluir un péptido macrocíclico combinado con al menos un agente antiinflamatorio o inmunodepresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en el tratamiento conjunto se describen con mayor detalle más adelante en la sección de usos de los péptidos macrocíclicos de la descripción.

Como se usa en la presente, un "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes demoradores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). En función de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, un péptido macrocíclico, un inmunoconjugado o una molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la descripción pueden incluir una o más sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Una "sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico" o "sal terapéuticamente aceptable" se

refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no produce ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M. et al., *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977)). Los ejemplos de estas sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, y también de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos, y similares. Las sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, y de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la presente descripción también puede incluir un antioxidante aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de antioxidantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2)

antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, emulgentes y dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización, como se indicó anteriormente, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable

incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que demoran la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en el estado de la técnica. Excepto en el caso de que un medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la descripción. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Con frecuencia, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para obtener una concentración farmacológica alta. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas

de estos. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede obtener incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con uno de los ingredientes mencionados anteriormente o una combinación de estos, según sea necesario, seguido de la microfiltración para su esterilización. En general, las dispersiones se prepararon mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos que se enumeraron anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de aquel.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única variará según el sujeto que se trate y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única será, generalmente, la cantidad de composición que produzca un efecto terapéutico. Por lo general, de un total de 100%, esta cantidad varía de alrededor de 0.01% a alrededor de 99% de ingrediente activo, preferentemente, de alrededor de 0.1% a alrededor de 70%, con máxima preferencia, de alrededor de 1% a alrededor de 30% de ingrediente activo en combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Los regímenes de dosificación se ajustan para brindar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En especial, resulta ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Como se usa en la presente, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente diferenciadas útiles como dosis unitarias para los sujetos

que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosis unitaria de la descripción depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en el estado de la técnica de obtener tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en seres humanos.

Para la administración del péptido macrocíclico, las dosis varían de alrededor de 0.0001 a 100 mg/kg y, con mayor frecuencia, de 0.01 a 5 mg/kg del peso corporal del anfitrión. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por día, dos veces por día, dos veces por semana, tres veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación preferidos de un péptido macrocíclico de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal para la administración

intravenosa, para el macrociclo que se administra, y se usa uno de los siguientes cronograma de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez y luego 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más péptidos macrocíclicos con diferentes especificidades de fijación, en cuyo caso, la dosificación de cada compuesto administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. Por lo general, los compuestos se administran en numerosas ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique mediante la medición de los niveles en sangre del péptido macrocíclico dirigido al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración plasmática de alrededor de 1-1000 .mu.g/ml y, en algunos métodos, alrededor de 25-300 .mu.g/ml.

De manera alternativa, el péptido macrocíclico se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso es necesaria una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En el caso de aplicaciones profilácticas, se

administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un período prolongado. Algunos pacientes reciben el tratamiento de por vida. En el caso de aplicaciones terapéuticas, en ocasiones, es necesaria una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o se concluya la progresión de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de ahí, el paciente puede recibir un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse, a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares que se usan en la presente descripción, o del éster, la sal o la amida de aquel, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se use, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares que se usen, la edad, el sexo,

el peso, la afección, la salud en general y los antecedentes médicos del paciente que está en tratamiento y factores similares conocidos en el campo de la medicina.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un péptido macrocíclico de la invención da como resultado, preferentemente, una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos asintomáticos de la enfermedad, o la prevención de disfunciones o incapacidades causadas por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe, preferentemente, el crecimiento celular o tumoral en al menos alrededor de 20%, con mayor preferencia, al menos alrededor de 40%, aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 60% y, aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 80% con respecto a los sujetos sin tratar. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral y/o el VIH se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos o de la eficacia viral. De manera alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar analizando la capacidad del compuesto de producir inhibición, tal como inhibición *in vitro*, mediante ensayos conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño tumoral, disminuir la carga viral o

mejorar los síntomas en un sujeto. Una persona del oficio de nivel medio podrá determinar tales cantidades en función de factores, tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particulares seleccionadas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit farmacéutico de partes que comprende un péptido macrocíclico y otro inmunomodulador, como se describe en la presente. El kit también puede comprender instrucciones para el uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer, como se describe en la presente) y/o una enfermedad viral.

Una composición de la presente descripción se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más métodos conocidos en el estado de la técnica. La persona del oficio de nivel medio considerará que la vía de administración y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas de los péptidos macrocíclicos de la descripción incluyen las siguientes: intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", como se usa en la presente, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y

tópica, por lo general, mediante inyección, e incluye, entre otras, la infusión y la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

De manera alternativa, un péptido macrocíclico de la descripción se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como la vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos de los métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o, en general, son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Véase, por ejemplo, Robinson, J.R., ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1978).

Las composiciones terapéuticas se pueden

administrar con dispositivos médicos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la descripción se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes estadounidenses Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos conocidos y útiles en la presente descripción incluyen los siguientes: la patente estadounidense No. 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para administrar medicamentos a una velocidad controlada; la patente estadounidense No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente estadounidense No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; la patente estadounidense No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente estadounidense No. 4,439,196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico, que tiene compartimientos multicámara; y la patente estadounidense No. 4,475,196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico. Estas patentes se incorporan en la presente por referencia. Existen numerosos implantes,

sistemas de administración y módulos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

En ciertas modalidades, los péptidos macrocíclicos de la descripción se pueden formular a fin de garantizar la distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye numerosos compuestos altamente hidrófilos. A fin de garantizar que los compuestos terapéuticos de la descripción atraviesen la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para obtener información sobre métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4,522,811, 5,374,548 y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos y, por lo tanto, se mejora la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, Ranade, V.V., *J. Clin. Pharmacol.*, 29:685 (1989)). Los ejemplos de porciones de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,416,016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153:1038 (1988)); péptidos macrocíclicos (Bloeman, P.G. et al., *FEBS Lett.*, 357:140 (1995); Owais, M. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:180 (1995)); receptor de la proteína tensioactiva A (Briscoe et al., *Am. J. Physiol.*, 1233:134 (1995)); p120 (Schreier et al., *J. Biol. Chem.*,

269:9090 (1994)); véanse también Keinanen, K. et al., *FEBS Lett.*, 346:123 (1994); Killion, J.J. et al., *Immunomethods* 4:273 (1994).

Usos y métodos de la descripción

Los péptidos macrocíclicos, las composiciones y los métodos de la presente descripción presentan numerosos usos *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, la detección de PD-L1 o la mejora de la respuesta inmunitaria mediante el bloqueo de PD-L1. Por ejemplo, tales moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en diversas situaciones. En consecuencia, en un aspecto, la descripción provee un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el péptido macrocíclico de la descripción de manera que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, la respuesta se mejora, se estimula o se regula en forma ascendente. En otros casos, el péptido macrocíclico puede presentar actividad terapéutica y de fijación anti-macaco, anti-ratón y/o anti-marmotas.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. La expresión "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, gallinas,

marmotas, anfibios y reptiles, aunque se prefieren los mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan la mejora de una respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que presentan un trastorno que se puede tratar aumentando la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. En una modalidad particular, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de células cancerosas *in vivo*. A fin de lograr la mejora de la inmunidad específica del antígeno, los péptidos macrocíclicos se pueden administrar junto con un antígeno de interés. Cuando los péptidos macrocíclicos a PD-L1 se administran junto con otro agente, ambos pueden administrarse en cualquier orden o de manera simultánea.

La descripción también proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno PD-L1 humano, de marmota, de macaco y/o ratón en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno PD-L1 humano, de marmota, de macaco y/o de ratón, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control con un péptido macrocíclico de referencia, que se fija específicamente a PD-L1 humano, de marmota, de macaco y/o ratón, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el macrociclo y PD-L1 humano, de marmota, de macaco y/o ratón. Luego se detecta la formación de un

complejo, en donde la formación de un complejo diferente entre la muestra en comparación con la muestra de control indica la presencia del antígeno PD-L1 humano, de marmota, de macaco y/o ratón en la muestra.

Dada la fijación específica de los péptidos macrocíclicos de la descripción a PD-L1, en comparación con CD28, ICOS y CTLA-4, los péptidos macrocíclicos de la descripción se pueden usar para detectar específicamente la expresión de PD-L1 en la superficie de células y, además, se pueden usar para purificar PD-L1 mediante la purificación de inmunoafinidad.

Cáncer

El bloqueo de PD-1 por parte de los péptidos macrocíclicos puede mejorar la respuesta inmunitaria a las células cancerosas en el paciente. El ligando de PD-1, PD-L1, no se expresa en células humanas normales, pero es abundante en diversos tipos de cáncer humanos (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución en los linfocitos que infiltran los tumores, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de linfocitos T y una evasión inmune por parte de células cancerosas (Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004)). La inmunodepresión se puede revertir

mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2 (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003)). Si bien estudios anteriores mostraron que la proliferación de linfocitos T se puede recuperar inhibiendo la interacción de PD-1 con PD-L1, no se reportaron efectos directos sobre el crecimiento de tumores cancerosos *in vivo* mediante el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1. En un aspecto, la presente descripción se refiere al tratamiento de un sujeto *in vivo* usando un péptido macrocíclico, de manera que se inhiba el crecimiento de los tumores cancerosos. Se puede usar un péptido macrocíclico solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. De manera alternativa, un péptido macrocíclico se puede usar junto con otros agentes inmunogénicos, tratamientos contra el cáncer estándares u otros péptidos macrocíclicos, como se describe a continuación.

En consecuencia, en una modalidad, la descripción provee un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido macrocíclico.

Los tipos de cáncer preferidos cuyo crecimiento se puede inhibir usando los péptidos macrocíclicos de la

descripción incluyen los tipos de cáncer que generalmente son sensibles a la inmunoterapia. Los ejemplos de tipos de cáncer preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente al tratamiento hormonal y cáncer de próstata resistente a la castración), cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer pulmonar (por ejemplo, cáncer pulmonar de células no pequeñas escamosas y no escamosas). Además, la descripción incluye tumores malignos recidivantes o resistentes al tratamiento, cuyo crecimiento puede inhibirse usando los péptidos macrocíclicos de la descripción.

Los ejemplos de otros tipos de cáncer que se pueden tratar usando los métodos de la descripción incluyen cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago/cáncer gástrico, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula

paratiroides, cáncer de las glándulas suprarrenales, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas, que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uretra, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, tipos de cáncer provocados por el entorno, que incluyen los provocados por el amianto, y combinaciones de estos tipos de cáncer. La presente descripción también es útil para el tratamiento de tipos de cáncer metastásicos, en especial, tipos de cáncer metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144 (2005)).

De manera opcional, los péptidos macrocíclicos a PD-L1 se pueden combinar con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas estimulantes del sistema inmunitario (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Los ejemplos de vacunas antitumorales que se pueden usar incluyen péptidos de

antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (analizada más adelante).

En los seres humanos, algunos tumores demostraron ser inmunogénicos, tales como los melanomas. Se prevé que mediante el aumento del umbral de activación de linfocitos T a través del bloqueo de PD-L1, se activen las respuestas tumorales en el anfitrión.

Es probable que el bloqueo de PD-L1 sea más eficaz en combinación con un protocolo de vacunación. Se trazaron diversas estrategias experimentales para la vacunación contra los tumores (véanse Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000); véase también Restifo, N. et al., Cancer Vaccines, Capítulo 61, pp. 3023-3043, in DeVita, V. et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology,* quinta edición (1997)). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna en la que se usan células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares demostraron ser más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. GM-CSF demostró ser un activador potente de la presentación de

antígenos para la vacunación contra los tumores (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3539-3543 (1993)).

El estudio de los patrones de expresión génica y de expresión génica a gran escala en diversos tumores produjo la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, S.A., *Immunity,* 10:281-287 (1999)). En varios casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos diferenciados que se expresan en los tumores y en la célula donde se produjo el tumor, por ejemplo, antígenos melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Lo que es más importante, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos del tumor en el anfitrión. El bloqueo de PD-L1 se puede usar en combinación con un conjunto de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor, a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. En general, el sistema inmunitario considera estas proteínas como autoantígenos y, por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85% de los tipos de cáncer en seres humanos y solo en una cantidad limitada de tejidos somáticos (Kim, N et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario de varias maneras). El antígeno tumoral también puede ser un

"neoantígeno" expresado en células cancerosas debido a las mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas antitumorales pueden incluir las proteínas de virus implicados en ciertos tipos de cáncer humano, tales como el virus del papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis (HBV y HCV) y el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico de tumores que se puede usar junto con el bloqueo de PD-L1 son las proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas del tejido tumoral en sí mismo. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y estas HSP son altamente eficaces para el suministro a las células que presentan antígenos, a fin de provocar inmunidad tumoral (Suot, R. et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Las células dendríticas (DC) son células que presentan antígenos potentes que se pueden usar para cebar respuestas específicas del antígeno. Las DC se pueden producir *ex vivo* y se pueden cargar con varios antígenos de proteínas y péptidos, así como extractos de células tumorales (Nestle, F. et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). Asimismo,

las DC se pueden transducir por medios genéticos para que también expresen estos antígenos tumorales. Las DC también se fusionaron directamente a las células tumorales, a fin de lograr la inmunización (Kugler, A. et al., *Nat. Med.,* 6:332-336 (2000)). Como método de vacunación, la inmunización de DC se puede combinar de manera eficaz con el bloqueo de PD-L1 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de PD-L1 también se puede combinar con tratamientos oncológicos estándares. El bloqueo de PD-L1 se puede combinar de manera eficaz con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis del reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, M. et al., *Cancer Res.,* 58:5301-5304 (1998)). Un ejemplo de tal combinación es un péptido macrocíclico en combinación con decarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de tal combinación es un péptido macrocíclico en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La razón científica del uso combinado del bloqueo de PD-L1 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería provocar el aumento de los niveles de antígenos tumorales en la vía de presentación de antígenos. Otros tratamientos conjuntos que pueden dar como resultado la sinergia con el bloqueo de PD-L1 mediante la muerte celular son la radiación, la cirugía y la privación

hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el anfitrión. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con el bloqueo de PD-L1. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de células tumorales que podrían alimentar el antígeno tumoral en las vías de presentación del antígeno del anfitrión.

También se pueden usar péptidos macrocíclicos que bloquean PD-L1 en combinación con péptidos macrocíclicos biespecíficos que dirigen células efectoras que expresan el receptor Fc alfa o Fc gamma a células tumorales (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,922,845 y 5,837,243). Se pueden usar péptidos macrocíclicos biespecíficos para dirigirse a dos antígenos separados. Por ejemplo, se usaron péptidos macrocíclicos biespecíficos del receptor anti-Fc/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir los macrófagos a los sitios tumorales. Este direccionamiento puede activar de manera más eficaz las repuestas específicas tumorales. El brazo de los linfocitos T de estas respuestas se podría aumentar mediante el uso del bloqueo de PD-L1. De manera alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC usando péptidos macrocíclicos biespecíficos que se fijan al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de células dendríticas.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del

anfitrión mediante una gran variedad de mecanismos. Varios de estos mecanismos se pueden debilitar mediante la inactivación de proteínas expresadas por los tumores y que son inmunodepresoras. Estos incluyen, entre otros, TGF-beta (Kehrl, J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) y el ligando Fas (Hahne, M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). Los péptidos macrocíclicos de cada una de estas entidades se pueden usar en combinación con anti-PD-L1 para contrarrestar los efectos del agente inmunodepresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales por parte del anfitrión.

Otros péptidos macrocíclicos que se pueden usar para activar la respuesta inmunitaria del anfitrión se pueden usar en combinación con anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas, que activan la función de DC y la presentación de antígenos. Los péptidos macrocíclicos anti-CD40 permiten sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T colaboradores (Ridge, J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)) y se pueden usar junto con anticuerpos PD-1 (Ito, N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Los péptidos macrocíclicos de activación que se dirigen a moléculas coestimulantes de linfocitos T, tales como CTLA-4 (por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,811,097), OX-40 (Weinberg, A. et al., *Immunol.*, 164:2160-

2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., *Nat. Med.*, 3:682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. et al., *Nature,* 397:262-266 (1999)) también pueden proporcionar mayores niveles de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad del injerto contra el hospedero es una consecuencia de este tratamiento, se puede obtener un beneficio terapéutico de las respuestas del injerto contra el tumor. El bloqueo de PD-L1 se puede usar para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados en el donante.

También hay varios protocolos de tratamiento experimental que incluyen la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos del antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores, a fin de estimular los linfocitos T específicos del antígeno contra los tumores (Greenberg, R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a los agentes infecciosos, tales como CMV. Se prevé que la activación *ex vivo* en presencia de péptidos macrocíclicos aumente la frecuencia y actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

Enfermedades infecciosas

Se usan otros métodos de la descripción para tratar

pacientes que estuvieron expuestos a toxinas o patógenos particulares. En consecuencia, otro aspecto de la descripción provee un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un péptido macrocíclico de la presente descripción, de modo que el sujeto reciba tratamiento para la enfermedad infecciosa.

De manera similar a su aplicación a tumores como se analizó anteriormente, el bloqueo de PD-L1 se puede usar solo, o como adyuvante, en combinación con vacunas para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que no hay en la actualidad una vacuna eficaz o patógenos para los cuales las vacunas convencionales no son totalmente eficaces. Estos incluyen, entre otros, VIH, hepatitis (A, B y C), influenza, herpes, giardia, malaria (Butler, N.S. et al., *Nature Immunology* 13, 188-195 (2012); Hafalla, J.C.R., et al. *PLOS Pathogens;* 2 de febrero de 2012)), leishmania, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas Aeruginosa.* El bloqueo de PD-L1 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes, tales como el VIH, que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos nuevos epítopos se reconocen como extraños al momento de la administración de PD-L1 antihumano

y, por lo tanto, provocan una fuerte respuesta de los linfocitos T que no disminuye por las señales negativas a través de PD-L1.

Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos de la descripción incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, virus ECHO, rinovirus, virus de Coxsackie, cornovirus, virus respiratorio sinsicial, virus de la parotiditis, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, viruela vacunoide, virus de HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco contagioso, poliovirus, virus de la rabia, virus de John Cunningham y encefalitis causada por arbovirus.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos de la descripción incluyen clamidia, bacterias rickettsias, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos y conococos, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionela*, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos de la

descripción incluyen *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger*, etc.), género *Mucorales (Mucor, Absidia, Rhizophus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causen infecciones que se pueden tratar mediante los métodos de la descripción incluyen *Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lambia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi* y *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos antes mencionados, el bloqueo de PD-L1 se puede combinar con otras formas de inmunoterapia, tales como el tratamiento de citocinas (por ejemplo, interferones, agentes que dirigen la actividad de VEGF o receptores de VEGF, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia de anticuerpos biespecíficos, que proporciona una presentación mejorada de antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6444-6448 (1993); Poljak, *Structure*, 2:1121-1123 (1994)).

Reacciones autoinmunes

Los péptidos macrocíclicos pueden provocar y

ampliar las respuestas autoinmunes. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales mediante el uso de vacunas de péptidos y células tumorales revela que muchas respuestas antitumorales implican reactividad autoinmune (despigmentación observada en melanoma B 16 modificado por anti-CTLA-4+GM-CSF en van Elsas et al. más atrás; despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk, W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2982-2987 (1999)); prostatitis autoinmune provocada por vacunas de células tumorales TRAMP (Hurwitz, A., *supra* (2000)), vacuna de antígenos peptídicos de melanoma y vitiligo observadas en ensayos clínicos en seres humanos (Rosenberg, S.A. et al., *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19(1):81-84 (1996)).

Por lo tanto, es posible considerar el uso del bloqueo de anti-PD-L1 junto con varias autoproteínas, a fin de elaborar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas autoproteínas para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica una acumulación inadecuada del péptido A.beta. en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide permiten aclarar estos depósitos de amiloides (Schenk et al., *Nature*, 400:173-177 (1999)).

También se pueden usar como dianas otras autoproteínas, tales como IgE, para el tratamiento de la

alergia y el asma, y TNF.alfa para la artritis reumatoide. Finalmente, las respuestas del anticuerpo a distintas hormonas se pueden inducir mediante el uso de los macrociclos descritos en la presente. Las respuestas de los anticuerpos neutralizantes a las hormonas reproductoras se pueden usar para la anticoncepción. Las respuestas de los anticuerpos neutralizantes a las hormonas y otros factores solubles necesarios para el crecimiento de tumores particulares también se pueden considerar como posibles dianas de vacunación.

Los métodos análogos a los descritos anteriormente para el uso de macrociclos anti-PD-L1 se pueden usar para la inducción de respuestas autoinmunes terapéuticas en el tratamiento de pacientes que tienen una acumulación inadecuada de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, incluidos A.beta. en la enfermedad de Alzheimer, citocinas, tales como TNF.alfa., e IgE.

Vacunas

Los péptidos macrocíclicos se pueden usar para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígenos mediante la coadministración de un macrociclo anti-PD-1 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). En consecuencia, en otro aspecto, la descripción provee un método para mejorar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el

antígeno; y (ii) un macrociclo anti-PD-1, de modo que se mejora la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de esos antígenos incluyen los que se analizan en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas contra tumores) analizados anteriormente, o los antígenos de virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Las vías de administración adecuadas de las composiciones (por ejemplo, péptidos macrocíclicos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, e inmunoconjugados) de la descripción *in vivo* e *in vitro* son conocidas en el estado de la técnica, y las pueden seleccionar las personas del oficio de nivel medio. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición.

Como se describió anteriormente, los péptidos macrocíclicos de la descripción se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunodepresor. El péptido se puede fijar al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar de manera separada del agente. En el

último caso (administración por separado), el péptido se puede administrar antes o después del agente, o de manera simultánea con este, o se puede coadministrar con otros tratamientos conocidos, por ejemplo, un tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Los agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, como doxorrubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, decarbazina y ciclofosfamida hidroxiurea que, por sí solos, son eficaces únicamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra de manera intravenosa en dosis de 100 mg una vez cada cuatro semanas, y la adriamicina se administra de manera intravenosa en una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los péptidos macrocíclicos de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes antineoplásicos que funcionan mediante diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico en las células tumorales humanas. La coadministración puede solucionar problemas debidos al desarrollo de resistencia a los fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, lo cual las volvería no reactivas con los péptidos.

Dentro del alcance de la presente descripción también se encuentran kits que comprenden las composiciones de la descripción (por ejemplo, péptidos macrocíclicos,

moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit también puede contener al menos un reactivo adicional, o uno o más péptidos macrocíclicos adicionales de la descripción (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se fija a un epítopo en el antígeno PD-L1 diferente del macrociclo). En general, los kits incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier leyenda o material grabado suministrado sobre el kit o junto con él, o que acompaña de otro modo al kit.

Tratamiento conjunto

La combinación de los péptidos macrocíclicos de la presente descripción con otro antagonista de PD-L1 y/u otro inmunomodulador es útil para la mejora de una respuesta inmunitaria contra una enfermedad hiperproliferativa. Por ejemplo, tales moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en diversas situaciones. En consecuencia, en un aspecto, la descripción provee un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un péptido macrocíclico de la descripción de manera que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, la respuesta se mejora, se estimula o se regula en forma

ascendente. En otra modalidad, la presente descripción proporciona un método para alterar eventos adversos asociados al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente terapéutico inmunoestimulador, que comprende administrar un péptido macrocíclico de la presente descripción y una dosis subterapéutica de otro inmunomodulador a un sujeto.

El bloqueo de PD-L1 por parte de los péptidos macrocíclicos puede mejorar la respuesta inmunitaria a las células cancerosas en el paciente. Los tipos de cáncer cuyo crecimiento se puede inhibir usando los péptidos macrocíclicos de la presente descripción incluyen los tipos de cáncer que responden a la inmunoterapia. Los ejemplos representativos de tipos de cáncer para el tratamiento con el tratamiento conjunto de la presente descripción incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón. Los ejemplos de otros tipos de cáncer que se pueden tratar usando los métodos de la presente descripción incluyen cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello

uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de las glándulas suprarrenales, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas, que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uretra, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, tipos de cáncer provocados por el entorno, que incluyen los provocados por el amianto, y combinaciones de estos tipos de cáncer. La presente descripción también es útil para el tratamiento de tipos de cáncer metastásicos.

En ciertas modalidades, la combinación de agentes terapéuticos que contienen al menos un péptido macrocíclico analizado en la presente se puede administrar de manera simultánea como una sola composición en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o de manera simultánea como composiciones separadas, en donde cada agente se puede

administrar de manera secuencial. Por ejemplo, un segundo inmunomodulador y un péptido macrocíclico de la presente descripción se pueden administrar secuencialmente, por ejemplo, en primer lugar, se administra el segundo inmunomodulador y, en segundo lugar, se administra el péptido macrocíclico, o el péptido macrocíclico se administra en primer lugar y el segundo inmunomodulador en segundo lugar. Asimismo, si se administra en forma secuencial más de una dosis del tratamiento conjunto, el orden de la administración secuencial se puede invertir o mantener en el mismo orden en cada punto temporal de administración, las administraciones secuenciales se pueden combinar con administraciones simultáneas, o cualquier combinación de estas. Por ejemplo, la primera administración de un segundo inmunomodulador y el péptido macrocíclico puede ser simultánea; la segunda administración puede ser secuencial, con el segundo inmunomodulador en primer lugar y el péptido macrocíclico en segundo lugar; y la tercera administración puede ser secuencial con el péptido macrocíclico en primer lugar y el segundo inmunomodulador en segundo lugar, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que sea secuencial con el péptido macrocíclico en primer lugar y el segundo inmunomodulador en segundo lugar, y las administraciones posteriores pueden ser simultáneas.

De manera opcional, la combinación del péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador se puede combinar a su vez con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas estimulantes del sistema inmunitario (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Los ejemplos de vacunas antitumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (analizada más adelante).

Un péptido macrocíclico PD-L1 y un segundo inmunomodulador combinados se pueden combinar, a su vez, con un protocolo de vacunación. Se trazaron diversas estrategias experimentales para la vacunación contra los tumores (véanse Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000); véase también Restifo et al., Cancer Vaccines, Capítulo 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición (1997)). En una de estas

estrategias, se prepara una vacuna en la que se usan células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares demostraron ser más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. GM-CSF demostró ser un activador potente de la presentación de antígenos para la vacunación contra los tumores (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:3539-3543 (1993)).

El estudio de los patrones de expresión génica y de expresión génica a gran escala en diversos tumores produjo la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, *Immunity*, 10:281-287 (1999)). En varios casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos de diferenciación que se expresan en los tumores y en la célula donde se produjo el tumor, por ejemplo, antígenos melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Lo que es más importante, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos del tumor en el anfitrión. En ciertas modalidades, un péptido macrocíclico PD-L1 y un segundo inmunomodulador combinados se pueden usar junto con un conjunto de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados en un tumor, a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. En general, el sistema inmunitario considera estas proteínas como autoantígenos y, por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que es

necesaria para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85% de los tipos de cáncer en seres humanos y solo en una cantidad limitada de tejidos somáticos (Kim et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario de varias maneras). El antígeno tumoral también puede ser un "neoantígeno" expresado en células cancerosas debido a las mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas antitumorales pueden incluir las proteínas de virus implicados en ciertos tipos de cáncer humano, tales como el virus del papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis (HBV y HCV) y el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico de tumores que se puede usar junto con el bloqueo del péptido macrocíclico PD-L1 son las proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas del tejido tumoral en sí mismo. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y estas HSP son altamente eficaces para el suministro a las células que presentan antígenos, a fin de provocar inmunidad tumoral (Suot et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Las células dendríticas (DC) son células que presentan antígenos potentes que se pueden usar para cebar respuestas específicas del antígeno. Las DC se pueden producir *ex vivo* y se pueden cargar con varios antígenos de proteínas y péptidos, así como extractos de células tumorales (Nestle et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). Asimismo, las DC se pueden transducir por medios genéticos para que también expresen estos antígenos tumorales. Las DC también se fusionaron directamente a las células tumorales, a fin de lograr la inmunización (Kugler et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). Como método de vacunación, la inmunización de DC se puede combinar eficazmente con el péptido macrocíclico anti-PD-L1 y un segundo inmunomodulador combinados, a fin de activar respuestas antitumorales más potentes.

Un péptido macrocíclico anti-PD-L1 y un inmunomodulador adicional combinados también se pueden combinar con tratamientos oncológicos estándares. Por ejemplo, una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, como se observa en la combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador, es posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la presente descripción (Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Un ejemplo es la combinación de un péptido

macrocíclico y un segundo inmunomodulador a su vez combinados con decarbazine para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo es la combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador a su vez combinados con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. Las razones científicas del uso combinado del péptido macrocíclico PD-L1 y otro inmunomodulador con la quimioterapia consisten en que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería provocar el aumento de los niveles de antígenos tumorales en la vía de presentación de antígenos. Otros tratamientos conjuntos que pueden ocasionar sinergia con un péptido macrocíclico anti-PD-L1 y un inmunomodulador adicional combinados mediante la muerte celular incluyen radiación, cirugía o privación hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el anfitrión. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con PD-L1 y un segundo inmunomodulador combinados. La inhibición de la angiogénesis provoca la muerte de las células tumorales, lo cual también puede ser una fuente de antígenos tumorales que se alimentan en las vías de presentación de antígenos del anfitrión.

También se puede usar una combinación de PD-L1 y otro inmunomodulador en combinación con péptidos macrocíclicos biespecíficos que dirigen las células efectoras

que expresan el receptor de Fc.alfa. o Fc.gamma. a las células tumorales (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,922,845 y 5,837,243). Se pueden usar péptidos macrocíclicos biespecíficos para dirigirse a dos antígenos separados. Por ejemplo, se usaron péptidos macrocíclicos biespecíficos del receptor anti-Fc/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir los macrófagos a los sitios tumorales. Este direccionamiento puede activar de manera más eficaz las repuestas específicas tumorales. El grupo de linfocitos T de estas respuestas se podría aumentar mediante el uso de PD-L1 y un segundo inmunomodulador combinados. De manera alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC usando péptidos macrocíclicos biespecíficos que se fijan al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de células dendríticas.

En otro ejemplo, se puede usar una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador junto con agentes macrocíclicos antineoplásicos, tales como RITUXAN® (rituximab), HERCEPTIN® (trastuzumab), BEXXAR® (tositumomab), ZEVALIN® (ibritumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), Lymphocide (eprtuzumab), AVASTIN® (bevacizumab), TARCEVA® (erlotinib) y similares. A modo de ejemplo y sin pretender limitarse a ninguna teoría, el tratamiento con un anticuerpo antineoplásico o un anticuerpo

antineoplásico conjugado con una toxina puede provocar la muerte de células cancerosas (por ejemplo, células tumorales) que podrían potenciar una respuesta inmunitaria mediada por la diana del segundo inmunomodulador o PD-L1. En una modalidad de ejemplo, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo antineoplásico en combinación con un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador, de manera simultánea o secuencial, o cualquier combinación de estas, lo cual puede potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral por parte del anfitrión.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del anfitrión mediante una gran variedad de mecanismos. Varios de estos mecanismos pueden debilitarse mediante la inactivación de las proteínas expresadas por los tumores y que son inmunodepresoras. Estas incluyen, entre otros, TGF-beta. (Kehrl, J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) y el ligando Fas (Hahne, M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). En otro ejemplo, los anticuerpos dirigidos a cada una de estas entidades también se pueden combinar con un péptido macrocíclico y otro inmunomodulador para contrarrestar los efectos de los agentes inmunodepresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales por parte del anfitrión.

Otros agentes que se pueden usar para activar la respuesta inmunitaria del anfitrión también se pueden usar en combinación con un péptido macrocíclico de la presente descripción. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas, que activan la función de DC y la presentación de antígenos. Los péptidos macrocíclicos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T colaboradores (Ridge, J. et al., *Nature,* 393:474-478 (1998)) y se pueden usar junto con los péptidos macrocíclicos de la presente descripción, solos o combinados con una combinación de anti-CTLA-4 (Ito, N. et al., *Immunobiology,* 201(5):527-540 (2000)). Los péptidos macrocíclicos de activación que se dirigen a las moléculas coestimulantes de linfocitos T, tales como OX-40 (Weinberg, A. et al., *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., *Nat. Med.*, 3:682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. et al., *Nature*, 397:262-266 (1999)) también pueden proporcionar mayores niveles de activación de los linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad del injerto contra el hospedero es una consecuencia de este tratamiento, se puede obtener un beneficio terapéutico de las respuestas del injerto contra el tumor. Se puede usar un péptido macrocíclico de la presente descripción, ya sea solo o en combinación con otro

inmunomodulador, para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumores injertados en el donante.

También hay varios protocolos de tratamiento experimental que incluyen la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos del antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores, a fin de estimular los linfocitos T específicos del antígeno contra los tumores (Greenberg, R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a los agentes infecciosos, tales como CMV. Se puede esperar que la activación *ex vivo* en presencia de un péptido macrocíclico de la presente descripción, ya sea solo o en combinación con otro inmunomodulador, aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar a un sujeto un péptido macrocíclico de la presente descripción en combinación con una dosis subterapéutica de otro inmunomodulador. Por ejemplo, los métodos de la presente descripción proveen un método para reducir la incidencia de diarrea o colitis inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores mediante la administración de un

esteroide no absorbible al paciente. Debido a que cualquier paciente que reciba un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador se encuentra en riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducidas por tal tratamiento, la totalidad de esta población de pacientes es adecuada para la terapia de acuerdo con los métodos de la presente descripción. Si bien se administraron esteroides para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y prevenir exacerbaciones de IBD, no se usaron para prevenir (reducir la incidencia de) IBD en pacientes que no recibieron un diagnóstico de IBD. Los efectos secundarios significativos asociados a los esteroides, incluso los esteroides no absorbibles, desalentaron el uso profiláctico.

En otras modalidades, un péptido macrocíclico de la presente descripción, ya sea solo o en combinación con otro inmunomodulador, también se puede combinar con el uso de cualquier esteroide no absorbible. Como se usa en la presente, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que muestra un metabolismo amplio en la primera pasada, de modo que después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide sea baja, es decir, de menos de alrededor de 20%. En una modalidad de la descripción, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticoesteroide de acción local, que es metabolizado en forma amplia, principalmente por el hígado, después de la

administración oral. ENTOCORT® EC (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida dependiente del pH y del tiempo, desarrollada para optimizar la administración del fármaco al íleo y en el colon. ENTOCORT® EC está aprobado en Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada que afecta el íleo y/o el colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT® EC para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT® EC se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT® EC es ampliamente metabolizado por el sistema de citocromo P450 en el hígado con metabolitos que tienen una actividad de glucocorticoides insignificante. Por lo tanto, la biodisponibilidad es baja (de alrededor de 10%). La baja biodisponibilidad de budesónida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides que tienen metabolismo de primera pasada menos amplio. La budesonida da como resultado menos cantidad de efectos adversos, incluso una menor inhibición hipotalámica-hipofisaria, que los corticoesteroides de acción sistemática. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT® EC puede dar como resultado efectos glucocorticoides sistémicos, tales como hipercorticismo e inhibición suprarrenal. Véase *Physicians' Desk Reference*

Supplement, 58.a edición, 608-610 (2004).

Aun en otras modalidades, una combinación de PD-L1 y otro inmunomodulador junto con un esteroide no absorbible se puede combinar, a su vez, con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA, tales como: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Dosis y formulación

Un péptido adecuado de la Fórmula I, o más específicamente un péptido macrocíclico descrito en la presente, se puede administrar a pacientes para tratar la diabetes y otras enfermedades relacionadas como un compuesto solo o mezclado con un portador aceptable en forma de formulaciones farmacéuticas. Las personas del oficio de nivel medio del tratamiento de la diabetes pueden determinar fácilmente la dosis y la vía de administración del compuesto a mamíferos, incluidos los seres humanos, que necesitan tal tratamiento. La vía de administración puede incluir, por ejemplo, la administración oral, intraoral, rectal, transdérmica, bucal, intranasal, pulmonar, subcutánea, intramuscular, intradérmica, sublingual, intracolónica, intraocular, intravenosa o intestinal. El compuesto se

formula de acuerdo con la vía de administración en función de la práctica farmacéutica aceptable (Fingl et al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, capítulo 1, p. 1 (1975); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Las composiciones peptídicas aceptables desde el punto de vista farmacéutico descritas en la presente se pueden administrar en múltiples formas de dosificación, tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las cuales incluye formulaciones de liberación retardada o sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elíxires, geles in situ, microesferas, complejos cristalinos, liposomas, microemulsiones, tinturas, suspensiones, jarabes, atomizadores en aerosol y emulsiones. Las composiciones descritas en la presente también se pueden administrar en forma oral, intravenosa (bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea, transdérmica o intramuscular, todas las cuales implican formas de dosificación conocidas por las personas del oficio de nivel medio del campo farmacéutico. Las composiciones se pueden administrar solas, pero generalmente se administran con un portador farmacéutico seleccionado en función de la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

El régimen de dosificación de las composiciones descritas en la presente variará, naturalmente, según ciertos factores conocidos, tales como las características

farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; la especie, la edad, el sexo, la salud, la afección médica y el peso del receptor; la naturaleza y el alcance de los síntomas; el tipo de tratamiento simultáneo; la frecuencia del tratamiento; la vía de administración, la función renal y hepática del paciente, y el efecto deseado. Un médico o veterinario puede determinar y recetar la cantidad eficaz del fármaco necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el avance de la enfermedad.

A modo orientativo, la dosis oral diaria del ingrediente activo, cuando se usa para los efectos indicados, variará de alrededor de 0.001 a 1000 mg/kg de peso corporal, preferentemente, de alrededor de 0.01 a 100 mg/kg de peso corporal por día y, con máxima preferencia, de alrededor de 0.6 a 20 mg/kg/día. Si la administración es intravenosa, la dosis diaria del ingrediente activo cuando se usa para los efectos indicados variará de 0.001 ng a 100.0 ng por min/kg de peso corporal durante una infusión a velocidad constante. Tal infusión intravenosa constante se puede administrar preferentemente a una velocidad de 0.01 ng a 50 ng por min/kg de peso corporal y, con máxima preferencia, de 0.01 ng a 10.0 mg por min/kg de peso corporal. Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatros veces por día. Las

composiciones descritas en la presente también se pueden administrar mediante una formulación de absorción retardada que permitirá la liberación sostenida del fármaco durante un período de días/semanas/meses, según se desee.

Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar de manera intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados o mediante vías transdérmicas, usando parches transdérmicos para la piel. Cuando se administra en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de las dosis será, por supuesto, continua en lugar de intermitente durante todo el régimen de dosificación.

En general, las combinaciones se administran en una mezcla con diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos adecuados (que se denominan conjuntamente en la presente "portadores farmacéuticos") seleccionados de manera adecuada con respecto a la forma de administración pretendida, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elíxires, atomizadores de aerosol generados con o sin propulsores y jarabes, y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimido o cápsula, el componente farmacológico activo se puede combinar con un portador inerte oral, no tóxico, aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato

de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, manitol y sorbitol; para la administración oral en forma líquida, los componentes farmacológicos orales se pueden combinar con cualquier portador inerte oral, no tóxico, aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como etanol, glicerol y agua. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes de desintegración y colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, entre otros, almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, endulzantes del maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio. Los desintegrantes incluyen, por ejemplo, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita y goma xantana.

Las composiciones descritas en la presente también se pueden administrar en forma de sistemas de administración de micelas o liposomas mezclados, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar de varios fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Se pueden agregar mejoradores de la

penetración para mejorar la absorción del fármaco.

Debido a que se sabe que los profármacos mejoran múltiples cualidades beneficiosas de los productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.), los compuestos descritos en la presente se pueden suministrar en forma de profármacos. Por ello, el objetivo descrito en la presente pretende incluir profármacos de los compuestos reivindicados en la presente, métodos para suministrarlos y composiciones que los contienen.

Las composiciones descritas en la presente también se pueden acoplar a polímeros solubles como portadores farmacológicos direccionables. Estos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilaspartamidafenol u óxido de polietileno-polilisina sustituida con residuos de palmitoílo. Asimismo, las composiciones descritas en la presente se pueden combinar con una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, caprolactona de poliépsilon, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacilatos y copolímeros en bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las formas de dosificación (composiciones

farmacéuticas) adecuadas para la administración pueden contener de alrededor de 0.01 miligramo a alrededor de 500 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosificación. Generalmente, en estas composiciones farmacéuticas, el ingrediente activo está presente en una cantidad de alrededor de 0.5-95% en peso en función del peso total de la composición.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el ingrediente activo y portadores en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio y ácido esteárico. Se pueden usar diluyentes similares para fabricar comprimidos. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua del medicamento durante un período de horas. Los comprimidos pueden estar recubiertos con azúcar o con una película para disimular el sabor desagradable y protegerlo de la atmósfera, o pueden estar recubiertos de manera entérica para la desintegración selectiva en el tubo gastrointestinal.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes, a fin de aumentar la aceptación por parte del paciente.

En general, el agua, un aceite adecuado, la solución salina, la dextrosa acuosa (glucosa) y las

soluciones de azúcares relacionadas, y los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicoles son portadores adecuados para soluciones parenterales. La solución para la administración parenteral contiene, preferentemente, una sal hidrosoluble del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados y, de ser necesario, sustancias amortiguadoras. Los agentes antioxidantes, tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico, ya sean solos o en combinación, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan el ácido cítrico y sus sales, y EDTA de sodio. Asimismo, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metilparabeno o propilparabeno y clorobutanol.

Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, Mack Publishing Company (1995), un texto de referencia estándar en este campo.

Las formas de dosificación farmacéuticas útiles y representativas para la administración de los compuestos descritos en la presente se pueden ilustrar de la siguiente manera:

Cápsulas

Se puede preparar una gran cantidad de unidades de cápsulas llenando cápsulas de gelatina dura de dos piezas estándares con 100 miligramos de ingrediente activo en polvo,

150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blandas

Una mezcla de ingrediente activo en un aceite que se puede digerir, tal como aceite de soya, aceite de semillas de algodón o aceite de oliva, se puede preparar e inyectar por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina para formar cápsulas de gelatina blandas que contienen 100 miligramos del ingrediente activo. Las cápsulas deben lavarse y secarse.

Comprimidos

Los comprimidos se pueden preparar mediante procedimientos convencionales, de modo que la unidad de dosificación sea, por ejemplo, de 100 miligramos de ingrediente activo, 0.2 miligramos de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98.8 miligramos de lactosa. Los recubrimientos adecuados se pueden aplicar para aumentar la palatabilidad o retrasar la absorción.

Inyectable

Una formulación inyectable de una composición peptídica descrita en la presente puede requerir o no el uso de excipientes, tales como los aprobados por entidades reguladoras. Estos excipientes incluyen, por ejemplo,

solventes y co-solventes, solubilizantes, emulgentes o espesantes, agentes quelantes, antioxidantes y agentes reductores, conservantes antimicrobianos, amortiguadores y agentes de ajuste del pH, agentes volumétricos, protectores y de ajuste de la tonicidad, y aditivos especiales. Una formulación inyectable tiene que ser estéril, libre de pirógeno y, en el caso de soluciones, libre de material particulado.

Una composición parenteral adecuada para la administración mediante inyección se puede preparar agitando, por ejemplo, 1,5% en peso de ingrediente activo en un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico que puede contener o no un co-solvente u otro excipiente. La solución debería transformarse en isotónica con cloruro de sodio y debería esterilizarse.

Suspensión

Se puede preparar una suspensión acuosa para administración oral y/o parenteral, de modo que, por ejemplo, cada 5 ml contenga 100 mg de ingrediente activo finamente dividido, 20 mg de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg de benzoato de sodio, 1.0 g de solución de sorbitol, U.S.P. y 0.025 ml de vanilina u otro saborizante agradable al paladar.

Micropartículas biodegradables

Una composición parenteral de liberación sostenida adecuada para la administración mediante inyección se puede

preparar, por ejemplo, disolviendo un polímero biodegradable adecuado en un solvente, agregando a la solución polimérica el agente activo que se desea incorporar y retirando el solvente de la matriz, para así formar la matriz del polímero con el agente activo distribuido a lo largo de la matriz.

Síntesis de péptidos

La síntesis química de un péptido macrocíclico de la presente descripción se puede llevar a cabo usando una variedad de métodos reconocidos en el estado de la técnica, que incluyen la síntesis gradual en fase sólida, la semisíntesis mediante la religadura de fragmentos peptídicos asistida en forma conformacional, la ligadura enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos, y la ligadura química. Un método preferido para sintetizar los péptidos macrocíclicos y sus análogos descritos en la presente es la síntesis química en la que se emplean varias técnicas en fase sólida, tales como las descritas en Chan, W.C. et al., eds., *Fmoc Solid Phase Synthesis*, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3-284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, Nueva York (1980); y en Stewart, J.M. et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 2ª edición, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). La estrategia preferida se basa en el grupo Fmoc (9-fluorenilmetilmetil-oxicarbonilo) para la protección temporal

del grupo α-amino, en combinación con el grupo terc-butilo para la protección temporal de las cadenas laterales de aminoácidos (véase, por ejemplo, Atherton, E. et al., "The Fluorenylmetoxycarbonyl Amino Protecting Group", en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, Undenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego (1987).

Los péptidos se pueden sintetizar en etapas en un soporte polimérico insoluble (también denominado "resina") desde el C-terminal del péptido. Una síntesis comienza al agregar el aminoácido del C-terminal del péptido a la resina mediante la formación de una ligadura amida o éster. Esto permite la liberación final del péptido resultante como amida del C-terminal o ácido carboxílico, respectivamente.

El aminoácido del C-terminal y todos los otros aminoácidos que se usan en la síntesis deben tener sus grupos α-amino y funcionalidades de cadena lateral (de estar presentes) protegidas de manera diferencial, de manera que el grupo protector α-amino se puede retirar de manera selectiva durante la síntesis. El acoplamiento de un aminoácido se realiza mediante la activación de su grupo carboxilo como un éster activo y una reacción de éste con un grupo α-amino no bloqueado del aminoácido del N-terminal unido a la resina. La secuencia de desprotección y acoplamiento del grupo α-amino se repite hasta que se ensambla la secuencia peptídica

completa. Luego se libera el péptido de la resina con la desprotección concomitante de las funcionalidades de la cadena lateral, usualmente en presencia de secuestrantes adecuados para limitar las cadenas laterales. El péptido resultante se purifica finalmente mediante HPLC de fase inversa.

En la síntesis de las resinas de peptidilo necesarias como precursores de los péptidos finales se emplean resinas poliméricas de poliestireno reticulado disponibles en el comercio (Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA). Los soportes sólidos preferidos son los siguientes: Resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetil-p-metil bencidrilamina (resina MBHA de amida Rink); 9-Fmoc-amino-xanten-3-iloxi-resina Merrifield (resina de amida Sieber); 4-(9-Fmoc)aminometil-3,5-dimetoxifenoxi)valeril-aminometil-resina Merrifield (resina PAL), para carboxamidas del C-terminal. El acoplamiento del primer aminoácido con los aminoácidos posteriores se puede lograr mediante el uso de ésteres activos HOBt, 6-Cl-HOBt o HOAt producidos de DIC/HOBt, HBTU/HOBt, BOP, PyBOP, o de DIC/6-Cl-HOBt, HCTU, DIC/HOAt o HATU, respectivamente. Los soportes sólidos preferidos son los siguientes: resina de cloruro de 2-clorotritilo y 9-Fmoc-amino-xanten-3-iloxi-resina Merrifield (resina de amida Sieber) para los fragmentos peptídicos protegidos. La carga

del primer aminoácido en la resina de cloruro de 2-clorotritilo se logra mejor haciendo reaccionar el aminoácido protegido por Fmoc con la resina en diclorometano y DIEA. Si fuese necesario, se puede agregar una pequeña cantidad de DMF para facilitar la disolución del aminoácido.

Las síntesis de los análogos peptídicos descritos en la presente se pueden realizar usando un sintetizador peptídico de un solo canal o de múltiples canales, tal como un sintetizador de microondas CEM Liberty, o un sintetizador Prelude (6 canales) o Symphony (12 canales) de Protein Technologies, Inc.

Los precursores de la resina de peptidilo para sus péptidos respectivos se pueden escindir y desproteger usando cualquier procedimiento estándar (véase, por ejemplo, King, D.S. et al., *Int. J. Peptide Protein Res.,* 36:255-266 (1990)). Un método deseado es el uso de TFA en presencia de agua y TIS como secuestrantes. En general, la resina de peptidilo se agita en TFA/agua/TIS (94:3:3, v:v:v; 1 ml/100 mg de resina de peptidilo) durante 2-6 h a temperatura ambiente. Luego, la resina gastada se filtra, y la solución de TFA se concentra o se seca a presión reducida. El péptido crudo resultante se precipita y se lava con $_{Et2O}$ o se vuelve a disolver directamente en DMSO o ácido acético acuoso al 50% para la purificación mediante HPLC preparativa.

Se pueden obtener péptidos con la pureza deseada

mediante purificación con HPLC preparativa, por ejemplo, en un cromatógrafo de líquidos Waters modelo 4000 o Shimadzu modelo LC-8A. La solución de péptidos crudos se inyecta en una columna YMC S5 ODS (20 x 100 mm) y se eluyó con un gradiente lineal de MeCN en agua, ambos amortiguados con 0.1% de TFA, con una velocidad de flujo de 14-20 ml/min con monitoreo de efluente por absorbancia de UV a 220 nm. Las estructuras de los péptidos purificados se pueden confirmar mediante análisis MS de electroaspersión.

Datos analíticos:

Espectrometría de masa: "ESI-MS(+)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa realizadas en modo de ión positivo; "ESI-MS(-)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa realizadas en modo de ion negativo; "ESI-HRMS(+)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ion positivo; "ESI-HRMS(-)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ión negativo. Las masas detectadas se informan de acuerdo con la designación de unidad "*m/z*". En general, los compuestos con masas exactas mayores de 1000 se detectaron como iones de doble carga o de triple carga.

Datos analíticos:

Espectrometría de masa: "ESI-MS(+)" significa

ionización por electroaspersión-espectrometría de masa realizadas en modo de ión positivo; "ESI-MS(-)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa realizadas en modo de ion negativo; "ESI-HRMS(+)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ión positivo; "ESI-HRMS(-)" significa ionización por electroaspersión-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ión negativo. Las masas detectadas se informan de acuerdo con la designación de unidad "*m/z*". En general, los compuestos con masas exactas mayores de 1000 se detectaron como iones de doble carga o de triple carga.

Condición de análisis A:

Columna: Waters BEH C18, 2.0 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0% de B, 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.5 minutos a 100% de B; flujo: 1 ml/min; detección: UV a 220 nm.

Condición de análisis B:

Columna: Waters BEH C18, 2.0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0% de

B, 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.5 minutos a 100% de B; flujo: 0.5 ml/min; detección: UV a 220 nm.

Condición de análisis C:

Columna: Waters Aquity BEH C18 2.1 X 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05% de TFA; fase móvil B: acetonitrilo con 0.05% de TFA; temperatura: 40°C; gradiente: 0% de B, 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.5 minutos a 100% de B; flujo: 0.8 ml/min; detección: UV a 220 nm.

Condición de análisis D:

Columna: Waters Aquity BEH C18 2.1 X 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05% de TFA; fase móvil B: metanol con 0.05% de TFA; temperatura: 40°C; gradiente: 0% de B, 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.5 minutos a 100% de B; flujo: 0.8 ml/min; detección: UV a 220 nm.

Procedimientos generales:

Método A de Prelude:

Todas las manipulaciones se realizaron mediante automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). A menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 ml equipado con una frita en la parte inferior; en donde la escala de la reacción excedió los 0.100

mmol, se usó un tubo de polipropileno de 40 ml equipado con una frita en la parte inferior. El tubo se conecta con el sintetizador de péptidos Prelude a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden agregar DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, lo que produce el lavado parejo de los laterales del tubo. Los reactivos restantes se agregan a través de la parte inferior del tubo y se hacen pasar a través de la frita para entrar en contacto con la resina. Todas las soluciones se retiran a través de la parte inferior del tubo. La "agitación periódica" describe un impulso breve de gas de N_2 a través de la frita de la parte inferior; el impulso dura aproximadamente 5 segundos y se produce cada 30 segundos. En general, no se usaron soluciones de aminoácidos de más de tres semanas desde de la preparación. Se usaron soluciones HATU dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HATU = hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido; DIPEA = diisopropiletilamina; TIPS = triisopropilsilano; DTT=DL-ditiotreitol. La resina que se usó es resina de cloruro de 2-clorotritilo (1.42 mmol/g de carga). Los aminoácidos comunes usados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadenas laterales que se indican entre paréntesis: Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-

Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método A de Prelude" describen un experimento realizado a una escala de 0.100 mmol, en donde la escala se determina de acuerdo con la cantidad de aminoácido usado en el "procedimiento de carga de resina" descrito más adelante. En una escala de 0.100 mmol, se usan aproximadamente 100 mg de resina de cloruro de 2-clorotritilo. Todos los procedimientos se pueden realizar a una escala superior a 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala.

Antes del acoplamiento de los aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con una carga del primer aminoácido a la resina, que se describe más adelante como "procedimiento de carga de resina". En el acoplamiento de los aminoácidos al N-terminal de la amina primaria, se usó el "procedimiento de acoplamiento simple" descrito a continuación. En el acoplamiento de los aminoácidos al N-terminal de la amina secundaria, se usó el "procedimiento de acoplamiento doble" descrito a continuación.

Procedimiento de carga de resina:

A un recipiente de reacción de polipropileno en fase sólida de 10 ml, se agregó resina de cloruro de 2-clorotritilo (100 mg, 1.42 mmol/g de carga). El recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Prelude. Al recipiente de reacción, se agregaron manualmente una solución de aminoácido de C-terminal protegido por Fmoc (0.10 mmol) y diisopropiletilamina (0.65 mmol) en DCM (2.5 mL). Mediante automatización, la mezcla se agitó con un burbujeo periódico de nitrógeno durante 60 minutos. Al recipiente de reacción, se agregó metanol (0.20 mL). La mezcla se agitó con un burbujeo periódico de nitrógeno durante 15 minutos, y luego el recipiente de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente dos veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior

del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.8 M en DMF, 0.5 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a

través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Se llevó a cabo una etapa de recubrimiento final de la siguiente manera: al recipiente de reacción, se agregó DMF (0.65 mL), luego DIPEA (0.8 M en DMF, 0.45 mL), luego anhídrido acético (1.0 M en DMF, 1.45 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento doble:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente

manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.8 M en DMF, 0.5 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.8 M en DMF, 0.5 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Se llevó a cabo una etapa de recubrimiento final de la siguiente manera:

al recipiente de reacción, se agregó DMF (0.65 mL), luego DIPEA (0.8 M en DMF, 0.45 mL), luego anhídrido acético (1.0 M en DMF, 1.45 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Método A de Symphony:

Este conjunto de procedimientos es idéntico al del "Método A de Prelude", a menos que se indique lo contrario. En todos los procedimientos, se usó un sintetizador de péptidos Symphony X (Protein Technologies) en lugar de un sintetizador de péptidos Prelude, y todos los reactivos se agregaron a través de la parte superior del recipiente de reacción.

Procedimiento de carga de resina:

Independientemente del sintetizador de péptidos utilizado en las etapas de acoplamiento de péptidos, la etapa de carga de resina siempre se realizó en el sintetizador Prelude de acuerdo con el "Método A de Prelude: procedimiento de carga de resina".

Procedimiento de acoplamiento simple:

Este procedimiento es idéntico al "Método A de Prelude: procedimiento de acoplamiento simple", excepto en que la concentración de solución de DIPEA es de 0.4 M, y se agregó 1.0 mL de esta solución a la reacción. Además, los reactivos usados en la etapa de recubrimiento final son anhídrido acético puro (1.0 mL) que se agregó a la resina suspendida en DIPEA (0.4 M, 1.0 mL).

Procedimiento de acoplamiento doble:

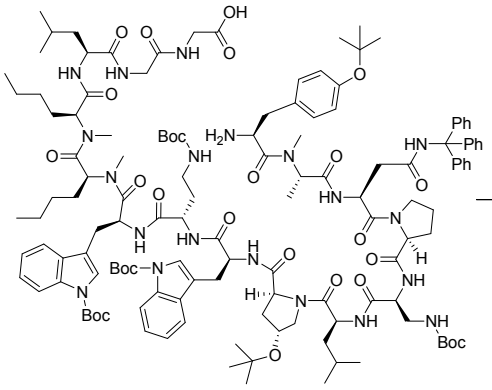
Este procedimiento es idéntico al "Método A de Prelude: procedimiento de acoplamiento doble", excepto en que la concentración de solución de DIPEA es de 0.4 M, y se agregó 1.0 mL de esta solución a la reacción. Además, los reactivos usados en la etapa de recubrimiento final son anhídrido acético puro (1.0 mL) que se agregó a la resina suspendida en DIPEA (0.4 M, 1.0 mL).

Secuencia de síntesis general A:

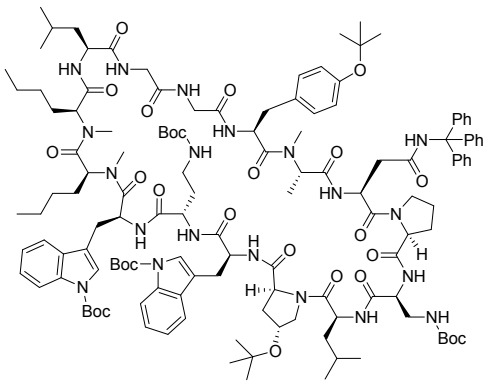
La "secuencia de síntesis general A" describe una secuencia general de procedimientos que se usaron para obtener los péptidos cíclicos descritos en la presente. Para los fines de este procedimiento general, los procedimientos del "Método A de Symphony" son intercambiables por aquellos del "Método A de Prelude". El procedimiento se puede realizar a una escala superior a 0.100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el

múltiplo de la escala. El "Método A de Prelude: procedimiento de carga de resina" se realizó usando 0,100 mmol de aminoácido. Luego se realizaron secuencialmente una serie de acoplamientos de aminoácidos en Prelude de acuerdo con el "Método A de Prelude: procedimiento de acoplamiento simple" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina primaria, o "Método A de Prelude: procedimiento de acoplamiento doble" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina secundaria.

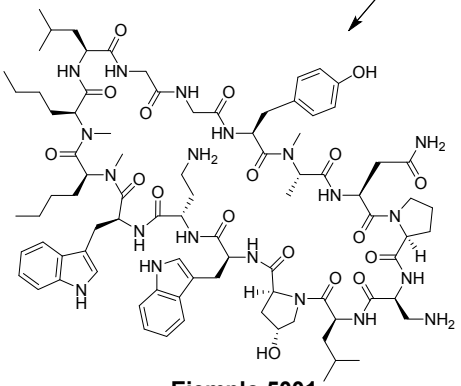
Preparación del Ejemplo 5001



Intermediario 5001A



Intermediario 5001B



Ejemplo 5001

Preparación del Intermediario 5001A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado se

transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 5001A.

Preparación del Intermediario 5001B:

A un vial de 15 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5001A antes preparado, se agregó DMF (0.50 mL), luego HATU (45.6 mg, 0.120 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución amarilla se agitó durante 30 minutos. La solución se sometió directamente a purificación mediante HPLC en las siguientes condiciones: Columna: Luna C18, 30 x 100 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de TFA; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de TFA; gradiente: 60-100% de B durante 10 minutos, luego un mantenimiento de 10 minutos a 100% de B; flujo: 42 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga para obtener un sólido blanco, el Intermediario 5001B.

Preparación del Ejemplo 5001:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). A un vial de 1 dram cargado con la totalidad del Intermediario 5001B antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló

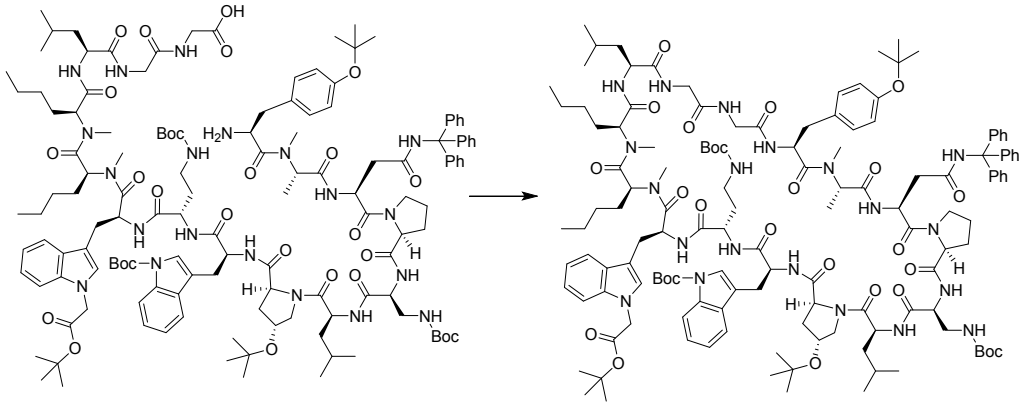
durante 1.5 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con $_{Et2O}$ (20 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en $_{Et2O}$ (10 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en MeOH, y el material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.49 min; ESI-MS(+) m/z 864.2 (M+2H)

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.73 min; ESI-MS(+) m/z 863.8 (M+2H)

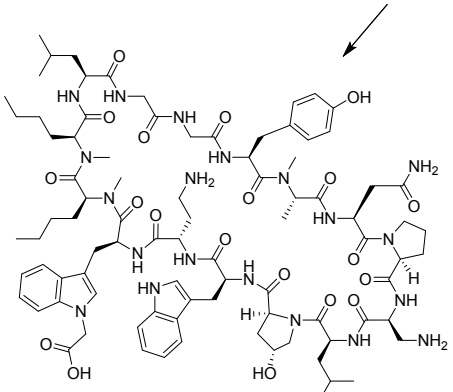
ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 863.4774 Encontrado: 863.4768.

Preparación del Ejemplo 5002



Intermediario 5002A

Intermediario 5002B



Ejemplo 5002

Preparación del Intermediario 5002A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada

lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 5002A.

Preparación del Intermediario 5002B:

A un vial de 15 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5002A antes preparado, se agregó DMF (0.50 mL), luego HATU (45.6 mg, 0.120 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución amarilla se agitó durante 30 minutos. La solución se sometió directamente a purificación mediante HPLC en las siguientes condiciones: Columna: Luna C18, 30 x 100 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de TFA; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de TFA; gradiente: 60-100% de B durante 10 minutos, luego un mantenimiento de 10 minutos a 100% de B; flujo: 42 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga para obtener un sólido blanco, el Intermediario 5002B.

Preparación del Ejemplo 5002:

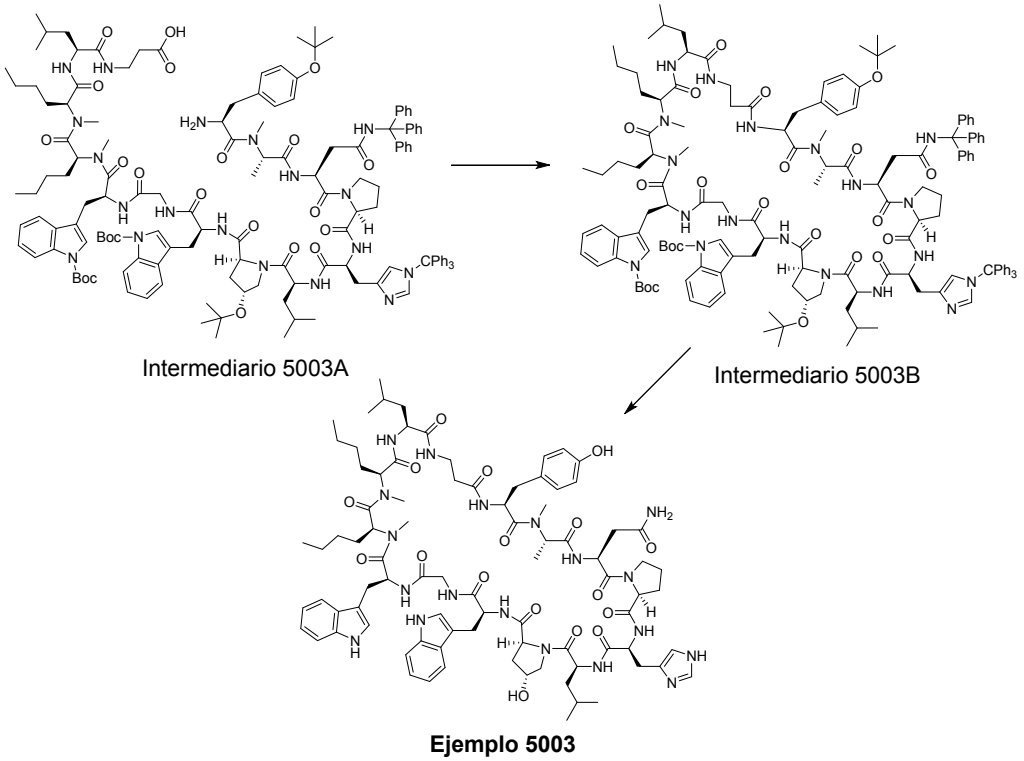
Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). A un vial de 3.69 ml (1 dram) cargado con la totalidad del Intermediario 5002B antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con $_{Et2O}$ (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en $_{Et2O}$ (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en MeOH, y a la solución se agregó DIPEA (0.050 mL). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua

con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 45-85% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.69 min; ESI-MS(-) m/z 891.3 (M-2H)

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 892.4801 Encontrado: 892.4796.

Preparación del Ejemplo 5003



Preparación del Intermediario 5003A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se transfirió a un tubo

de ensayo de 25 mL y se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5003A.

Preparación del Intermediario 5003B:

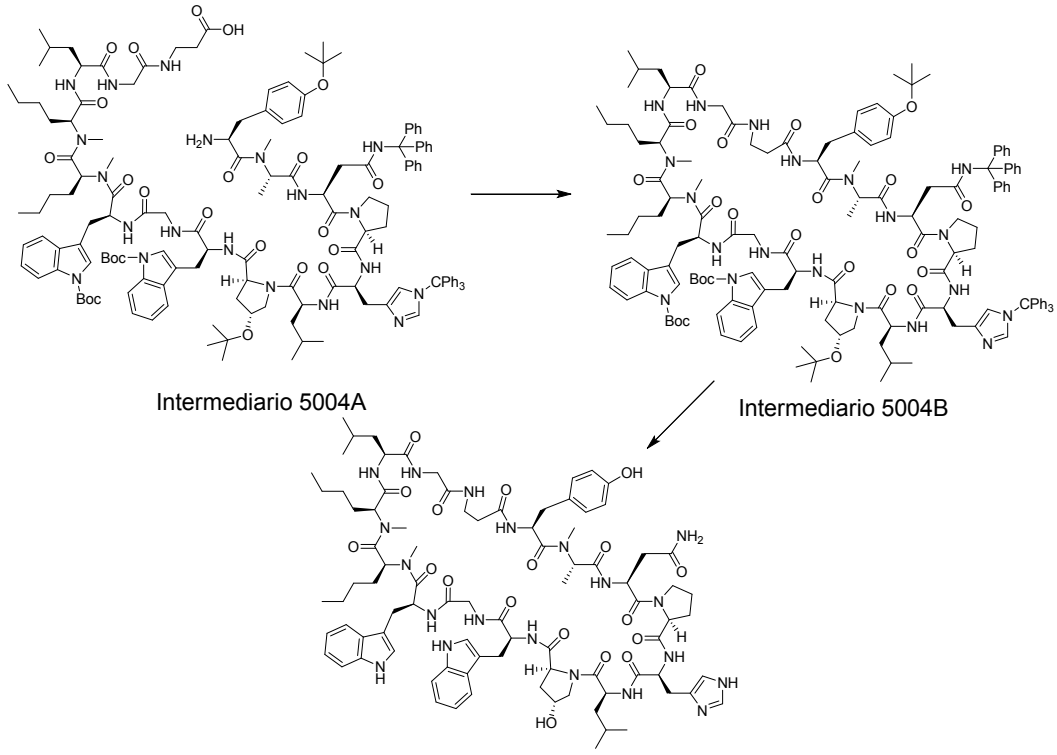
Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5003A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL), luego HATU (84 mg, 0.220 mmol) y luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 30 minutos. La solución luego se diluyó con PhMe a un volumen de 20 mL, y la solución luego se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener un residuo sólido, el Intermediario 5003B crudo.

Preparación del Ejemplo 5003:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5003B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de $_{Et2O}$ (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante

se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 25 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 50-90% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 3 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.93 min; ESI-MS(+) m/z 846.7 (M+2H); ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 845.9588 Encontrado: 845.9576.

Preparación del Ejemplo 5004



Preparación del Intermediario 5004A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente

manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se transfirió a un tubo de ensayo de 25 mL y se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5004A.

Preparación del Intermediario 5004B:

Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5004A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL), luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), luego una solución de HATU (84 mg, 0.220 mmol) en DMF (0.5 mL). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 2 h. La solución luego se diluyó con PhMe a un volumen de 20 mL, y la solución luego se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener un residuo sólido, el Intermediario 5004B crudo.

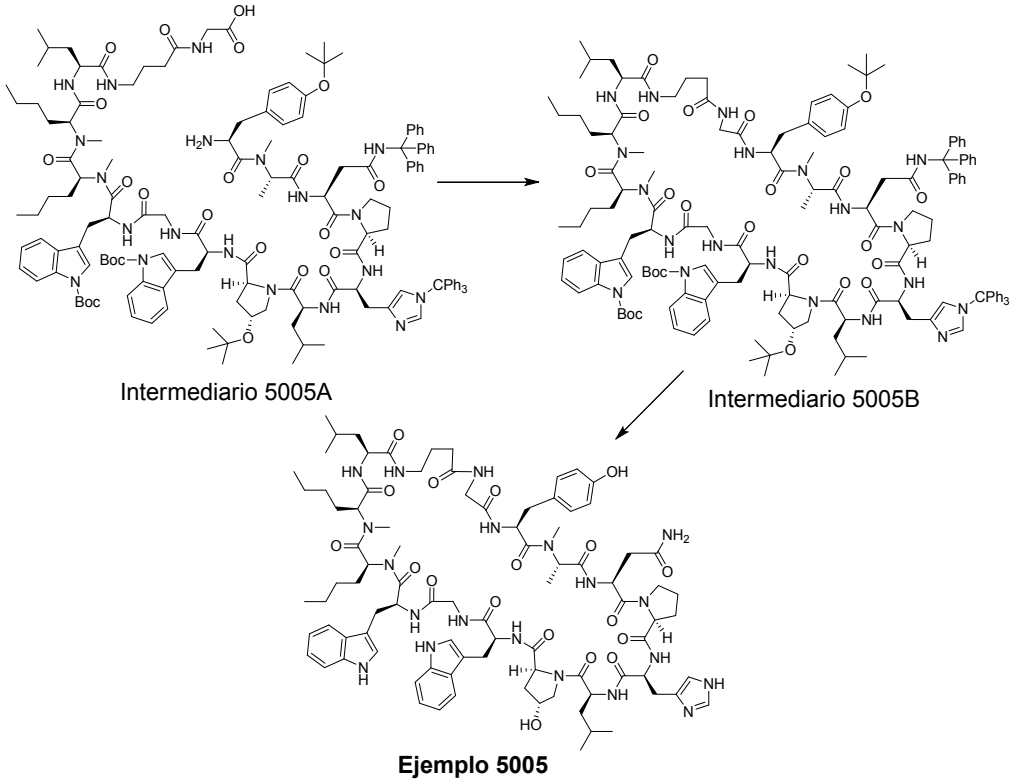
Preparación del Ejemplo 5004:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5004B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 100 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en

las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5,5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.84 min; ESI-MS(+) m/z 874.4 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 874.4696 Encontrado: 874.4679.

Preparación del Ejemplo 5005



Preparación del Intermediario 5005A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se transfirió a un tubo

de ensayo de 25 mL y se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5005A.

Preparación del Intermediario 5005B:

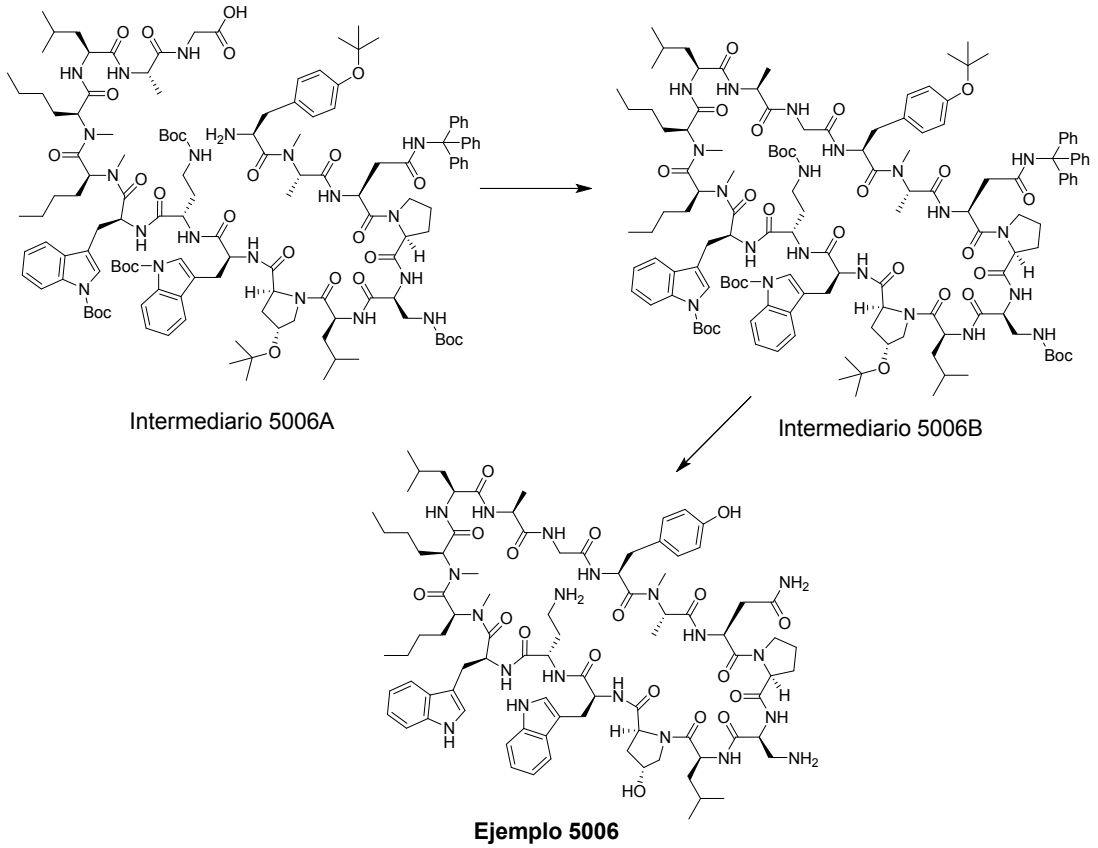
Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5005A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL), luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), luego una solución de HATU (84 mg, 0.220 mmol) en DMF (0.5 mL). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 2 h. La solución luego se diluyó con PhMe a un volumen de 20 mL, y la solución luego se concentró mediante evaporación centrífuga para obtener un residuo sólido, el Intermediario 5005B crudo.

Preparación del Ejemplo 5005:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al tubo de ensayo de 25 mL cargado con la totalidad del Intermediario 5005B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y

a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 100 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 50-90% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4,5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.84 min; ESI-MS(+) m/z 881.5 (M+2H); ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 881.4774 Encontrado: 881.4761.

Preparación del Ejemplo 5006



Preparación del Intermediario 5006A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente

manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se reservó. Al recipiente de reacción que contenía la resina, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. Los filtrados se combinaron y se concentraron mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5006A.

Preparación del Intermediario 5006B:

A un vial de 7 mL con la totalidad del Intermediario 5006A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL),

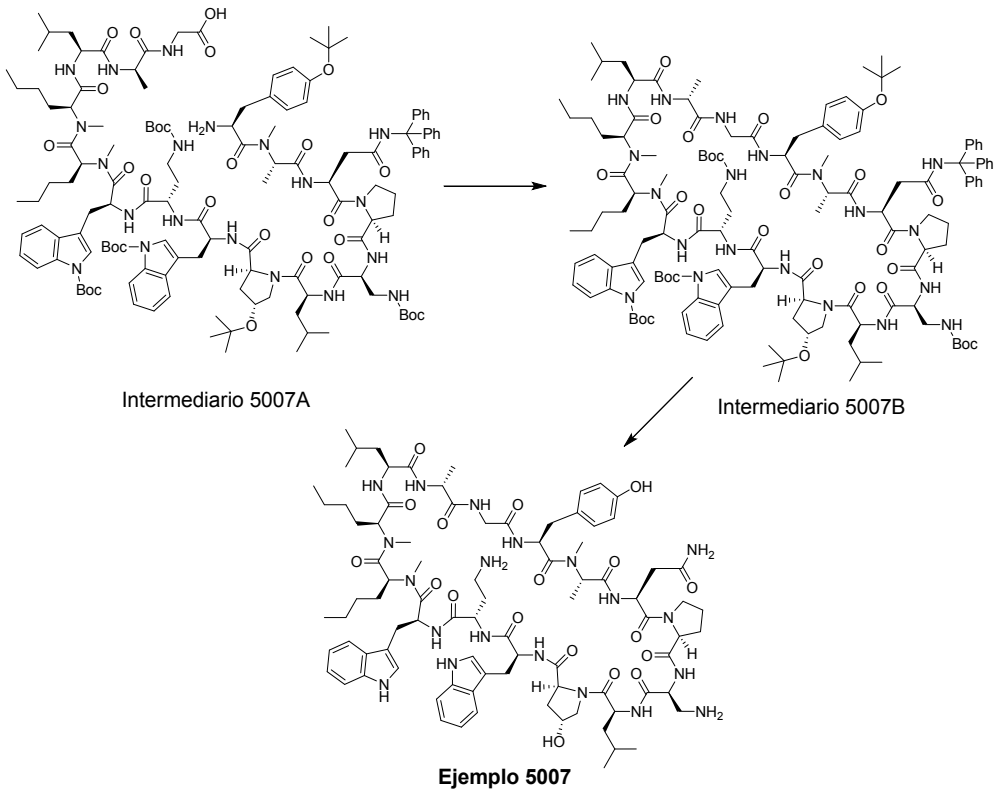
luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), y luego HATU (84 mg, 0.220 mmol). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 1 h. La solución se concentró en un flujo de N_2, luego se concentró adicionalmente al alto vacío para obtener un sólido color ámbar, el Intermediario 5006B crudo.

Preparación del Ejemplo 5006:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al vial cargado con la totalidad del Intermediario 5006B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 25 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x

200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 45-85% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.77 min; ESI-MS(+) m/z 870.1 (M+2H); Condición de análisis C: Tiempo de retención = 1.44 min; ESI-MS(+) m/z 871.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 5007



Preparación del Intermediario 5007A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente

manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se reservó. Al recipiente de reacción que contenía la resina, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. Los filtrados se combinaron y se concentraron mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5007A.

Preparación del Intermediario 5007B:

A un vial de 7 mL con la totalidad del

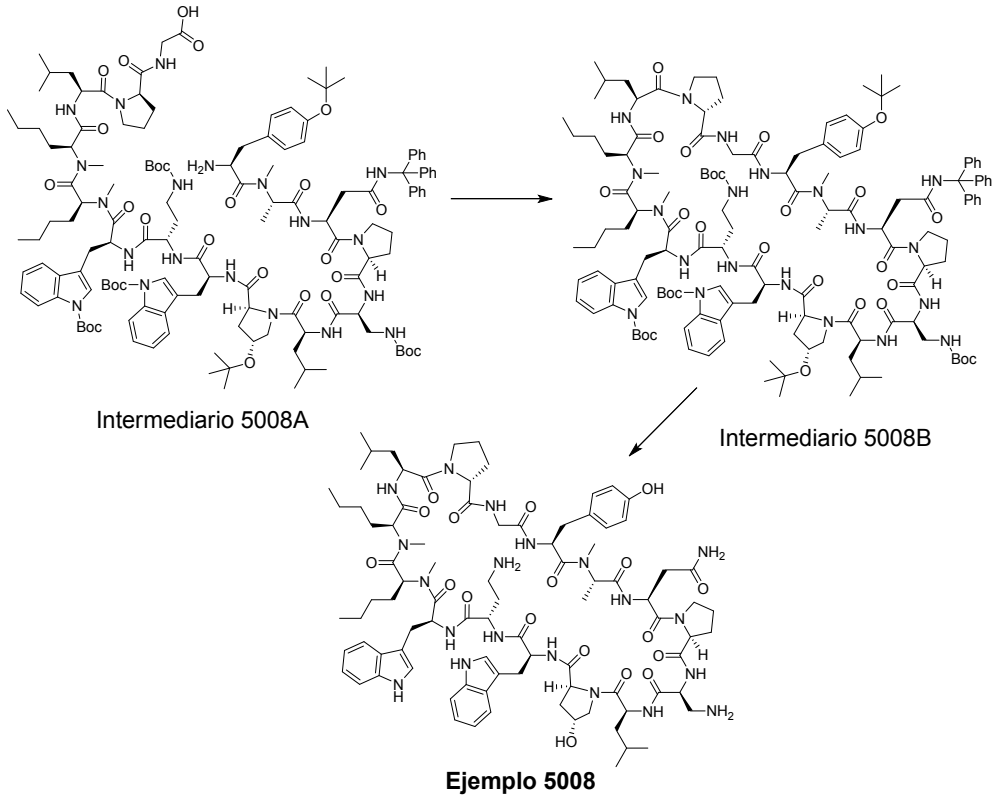
Intermediario 5007A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL), luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), y luego HATU (84 mg, 0.220 mmol). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 1 h. La solución se concentró en un flujo de N_2, luego se concentró adicionalmente al alto vacío para obtener un sólido color ámbar, el Intermediario 5007B crudo.

Preparación del Ejemplo 5007:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al vial cargado con la totalidad del Intermediario 5007B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 25 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las

siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6,5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.70 min; ESI-MS(+) m/z 871.0 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 5008



Preparación del Intermediario 5008A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente

manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se reservó. Al recipiente de reacción que contenía la resina, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. Los filtrados se combinaron y se concentraron mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5008A.

Preparación del Intermediario 5008B:

A un vial de 7 mL con la totalidad del Intermediario 5008A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL),

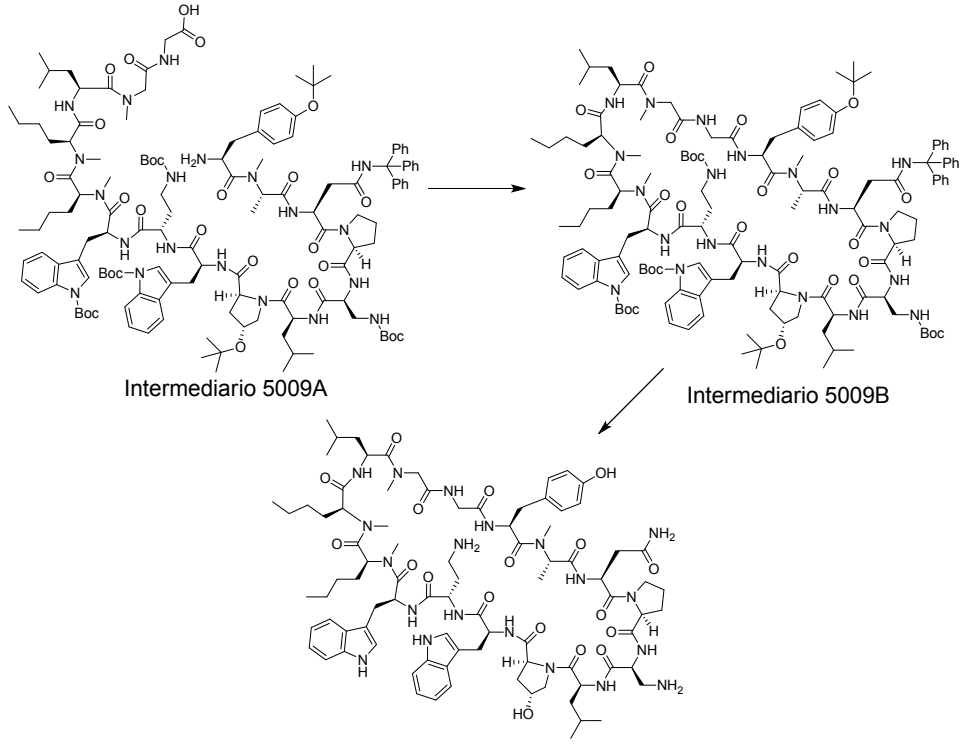
luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), y luego HATU (84 mg, 0.220 mmol). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 1 h. La solución se concentró en un flujo de N_2, luego se concentró adicionalmente al alto vacío para obtener un sólido color ámbar, el Intermediario 5008B crudo.

Preparación del Ejemplo 5008:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al vial cargado con la totalidad del Intermediario 5008B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 25 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 4 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 45-85% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.75 min; ESI-MS(+) m/z 883.7 (M+2H); Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.73 min; ESI-MS(+) m/z 884.3 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 5009



Preparación del Intermediario 5009A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" en una escala de 0.200 mmol usando un recipiente de reacción de 45 mL. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (4.0 mL) a través de

la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (4.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. El filtrado se reservó. Al recipiente de reacción que contenía la resina, se agregó DCM (16 mL), y luego hexafluoroisopropanol (4 mL). La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró a través de la frita de la parte inferior del recipiente de reacción. Los filtrados se combinaron y se concentraron mediante evaporación centrífuga para obtener el Intermediario 5009A.

Preparación del Intermediario 5009B:

A un vial de 7 mL con la totalidad del Intermediario 5009A antes preparado, se agregó DMF (2.0 mL), luego DIPEA (0.350 mL, 2.00 mmol), y luego HATU (84 mg, 0.220

mmol). El tubo de ensayo se colocó en un agitador a 500 rpm durante 1 h. La solución se concentró en un flujo de N_2, luego se concentró adicionalmente al alto vacío para obtener un sólido color ámbar, el Intermediario 5009B crudo.

Preparación del Ejemplo 5009:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (22 mL), fenol (1.325 g), agua (1.25 mL), TIPS (0.5 mL) y DTT (0.25 g). Al vial cargado con la totalidad del Intermediario 5009B crudo antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se diluyó mediante la adición de Et_2O (15 mL). Se formó un precipitado blanco a medida que la mezcla se agitaba exhaustivamente. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en agua:MeOH:MeCN (1 mL:1 mL:1 mL), y a la solución se agregó bicarbonato de amonio (aprox. 25 mg). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 45-85% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5

minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.2 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.72 min; ESI-MS(+) m/z 869.1 (M+2H); Condición de análisis C: Tiempo de retención = 1.47 min; ESI-MS(+) m/z 1852.5 (M+TFA).

Procedimientos generales para los Métodos E/F/G de Symphony X

Procedimientos de acoplamiento generales:

Todas las manipulaciones se realizaron mediante automatización en un sintetizador de péptidos Symphony X (Protein Technologies). A menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 mL equipado con una frita en la parte inferior; en donde la escala de la reacción excedió los 0.100

mmol, se usó un tubo de polipropileno de 40 mL equipado con una frita en la parte inferior. El tubo se conecta con el sintetizador de péptidos Symphony X a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden agregar DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, lo que produce el lavado parejo de los laterales del tubo. Los reactivos restantes se agregan a través de la parte superior del tubo y se hacen pasar a través de la frita para entrar en contacto con la resina. Todas las soluciones se retiran a través de la parte inferior del tubo. La "agitación periódica" describe un impulso breve de gas de N_2 a través de la frita de la parte inferior; el impulso dura aproximadamente 5 segundos y se produce cada 30 segundos. Las soluciones de cloruro de cloroacetilo en DMF se usaron dentro de las 24 h de la preparación. En general, no se usaron soluciones de aminoácidos de más de tres semanas desde de la preparación. Se usaron soluciones HATU dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HATU = hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido; DIPEA = diisopropiletilamina; resina Rink: 4-((2.4-dimetoxifenil)(Fmocamino) metil)fenoximetilpoliestireno.

Procedimiento de expansión de resina:

A un recipiente de reacción de polipropileno en fase sólida de 10 mL, se agregó resina (0.100 mmol). La

resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción, se agregó DMF (2.0 mL), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos antes de que el solvente drenara a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.4 M en DMF, 1.0 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos

antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó anhídrido acético (2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de 1 h de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.4 M

en DMF, 1.0 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 60 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó anhídrido acético (2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento doble:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada

lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.4 M en DMF, 1.0 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó el aminoácido (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.), luego HATU (0.2 M en DMF, 1.0 mL, 2 eq.) y finalmente DIPEA (0.4 M en DMF, 1.0 mL, 4 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 15 minutos, y luego la solución de reacción drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó anhídrido acético (2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita.

La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento a cloruro de cloroacetilo:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó DIPEA (0.8 M en DMF, 3.0 mL, 24 eq.), y luego cloruro de cloroacetilo (0.8 M en DMF, 1.65 mL, 13.2 eq.). La mezcla se agitó periódicamente durante 30 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces de la siguiente manera: para cada

lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó CH_2Cl_2 (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina resultante se colocó en un flujo de N_2 durante 15 minutos.

Método de desprotección:

Todas las manipulaciones se realizaron de manera manual, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "método de desprotección" describe un experimento que se realizó en una escala de 0.100 mmol. El procedimiento se puede realizar a una escala superior a 0.100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (38 mL), DTT (1 g) y triisopropilsilano (1 mL). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un vial de vidrio de 4 mL. Al vial se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La mezcla se mezcló vigorosamente en un agitador (1000 RPM durante 30-90 minutos). La mezcla se filtró a través de un filtro de

jeringa de 0.2 micrómetros, y los sólidos se extrajeron con la "solución de desprotección" (1.0 mL). A un tubo de ensayo de 24 mL cargado con los filtrados combinados, se agregó Et_2O (15 mL). La mezcla se mezcló vigorosamente, después de lo cual una cantidad significativa de un sólido blanco precipitó. La mezcla se centrifugó durante 3 minutos, luego la solución decantó de los sólidos y se descartó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (20 mL); luego la mezcla se centrifugó durante 3 minutos; y la solución decantó de los sólidos y se descartó. Por última vez, los sólidos se suspendieron en Et_2O (20 mL); la mezcla se centrifugó durante 3 minutos; y la solución decantó de los sólidos y se descartó para obtener el péptido crudo como un sólido blanco a blancuzco.

Método E de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron de manera manual, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método E de ciclización" describe un experimento que se realizó en una escala de 0.100 mmol. El procedimiento se puede realizar a una escala superior a 0.100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos de péptidos crudos se disolvieron en 20 mL de DMF, y, a la solución, se agregaron 0.5 mL de DIEA y luego 50 mg de KI. La solución se calentó a 65°C durante la noche. La solución de reacción se concentró, y el residuo se

sometió a purificación mediante HPLC de fase inversa para obtener el péptido cíclico deseado.

Procedimientos generales para el Método E de Symphony X:

Los "procedimientos generales para el Método E de Symphony X" describen una secuencia general de procedimientos que se usaron para obtener los péptidos cíclicos descritos en la presente. A un recipiente de reacción de polipropileno en fase sólida de 10 mL, se agregó resina Rink, y el recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Symphony X. "Procedimientos de acoplamiento generales E": Se siguió el procedimiento de expansión de resina. Luego se realizaron secuencialmente una serie de acoplamientos de aminoácidos en el sintetizador de péptidos Symphony X de acuerdo con el "procedimiento de acoplamiento simple" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina primaria, o el "procedimiento de acoplamiento doble" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina secundaria. El "procedimiento de 1 h de acoplamiento simple" se usó con el aminoácido, el ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(1-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1H-indol-3-il)propanoico se acopló a la resina. Se siguió el procedimiento de acoplamiento a cloruro de cloroacetilo; luego se siguió el método de desprotección; luego se siguió el Método E de ciclización.

Método F de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron de manera manual, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método F de ciclización" describe un experimento que se realizó en una escala de 0.100 mmol. El procedimiento se puede realizar a una escala superior a 0.100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos de péptidos crudos se disolvieron en 20 mL de DMF, y, a la solución, se agregaron 0.2 mL de DIEA. La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos antes de enfriarse a 0°C. Se agregaron por goteo 0.5 mL de solución en DMF de CDI 0.2 M a la mezcla de reacción. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución de reacción se concentró, y el residuo se sometió a purificación mediante HPLC de fase inversa para obtener el péptido cíclico deseado.

Procedimientos generales para el Método F de Symphony X:

Los "procedimientos generales para el Método F de Symphony X" describen una secuencia general de procedimientos que se usaron para obtener los péptidos cíclicos descritos en la presente. A un recipiente de reacción de polipropileno en fase sólida de 10 mL, se agregó resina Rink, y el recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Symphony X. "Procedimientos de acoplamiento generales": Se siguió el

procedimiento de expansión de resina. Luego se realizaron secuencialmente una serie de acoplamientos de aminoácidos en el sintetizador de péptidos Symphony X de acuerdo con el "procedimiento de acoplamiento simple" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina primaria, o el "procedimiento de acoplamiento doble" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina secundaria. El "procedimiento de 1 h de acoplamiento simple" se usó con el aminoácido, el ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(1-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1H-indol-3-il)propanoico se acopló a la resina. Después de que el último aminoácido se acopló en el péptido, al recipiente de reacción se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos en el agitador. La solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente con DMF y luego DCM. Se siguió el método de desprotección; luego se siguió el Método F de ciclización.

Método G de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron de manera manual, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método G de ciclización" describe un experimento que se realizó en una escala de 0.100 mmol. El procedimiento se puede realizar a una escala superior a 0.100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la

escala. Los sólidos de péptidos crudos se disolvieron en 20 mL de THF, y, a la solución, se agregaron 0.2 mL de DIEA. La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos antes de enfriarse a 0°C. Se agregaron por goteo 0.5 mL de solución en THF de dicloruro de oxalilo 0.2 M a la mezcla de reacción. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución de reacción se concentró, y el residuo se sometió a purificación mediante HPLC de fase inversa para obtener el péptido cíclico deseado.

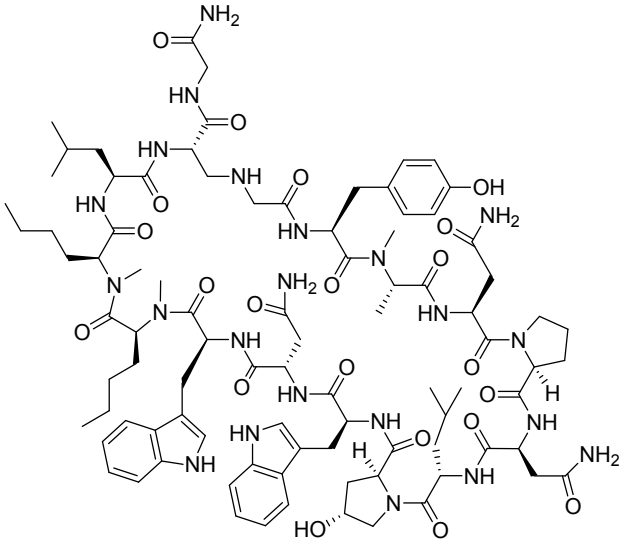
Procedimientos generales para el Método G de Symphony X:

Los "procedimientos generales para el Método G de Symphony X" describen una secuencia general de procedimientos que se usaron para obtener los péptidos cíclicos descritos en la presente. A un recipiente de reacción de polipropileno en fase sólida de 10 mL, se agregó resina Rink, y el recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Symphony X. "Procedimientos de acoplamiento generales": Se siguió el procedimiento de expansión de resina. Luego se realizaron secuencialmente una serie de acoplamientos de aminoácidos en el sintetizador de péptidos Symphony X de acuerdo con el "procedimiento de acoplamiento simple" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina primaria, o el "procedimiento de acoplamiento doble" si el N-terminal del péptido unido a resina era una amina secundaria. El "procedimiento de 1 h de acoplamiento simple" se usó con el aminoácido, el ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(1-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1H-indol-3-il)propanoico se acopló a la resina. Después de que el último

aminoácido se acopló en el péptido, al recipiente de reacción se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos en el agitador. La solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente con DMF y luego DCM. Se siguió el método de desprotección; luego se siguió el Método G de ciclización.

Los Ejemplos 10001-10028 se prepararon siguiendo los "procedimientos generales para el Método E de Symphony X".

Preparación del Ejemplo 10001



Ejemplo 10001

El material crudo del Ejemplo 10001 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El

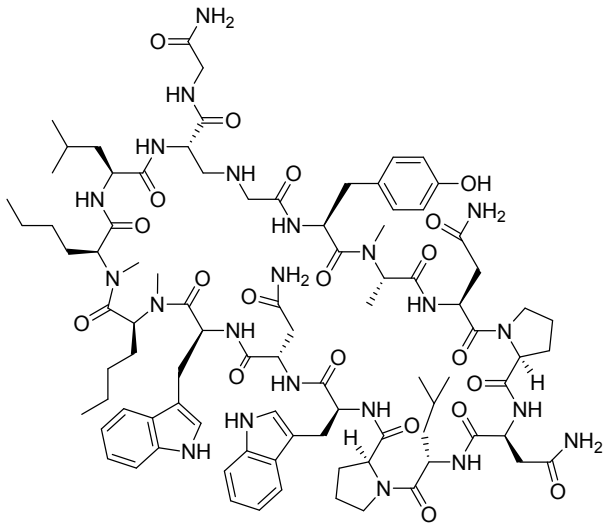
rendimiento del producto fue de 20.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.64 min; ESI-MS(+) m/z 927.55 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.14 min; ESI-MS(+) m/z 927.75 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 927.4885 (M+2H); Encontrado: 927.4877 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10002



Ejemplo 10002

El material crudo del Ejemplo 10002 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

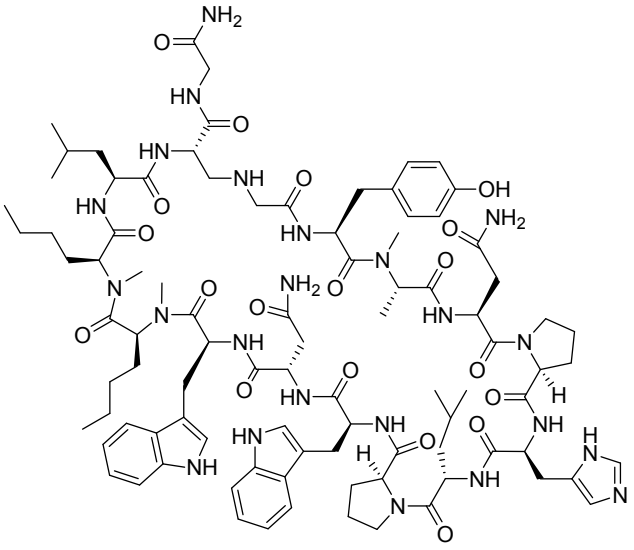
combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 14.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.70 min; ESI-MS(+) m/z 919.75 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.19 min; ESI-MS(+) m/z 919.75 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 919.4910 (M+2H); Encontrado: 919.4897 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10003



Ejemplo 10003

El material crudo del Ejemplo 10003 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B;

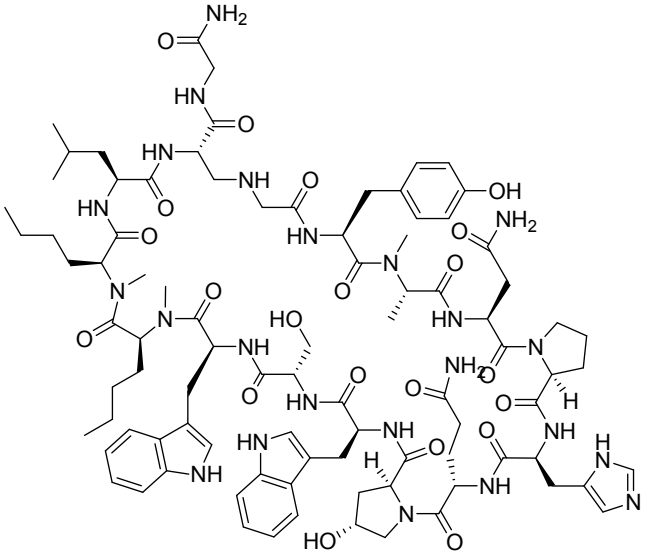
flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 14.2 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.71 min; ESI-MS(+) m/z 931.30 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.21 min; ESI-MS(+) m/z 931.30 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 930.9990 (M+2H); Encontrado: 930.9985 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10004



Ejemplo 10004

El material crudo del Ejemplo 10004 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de

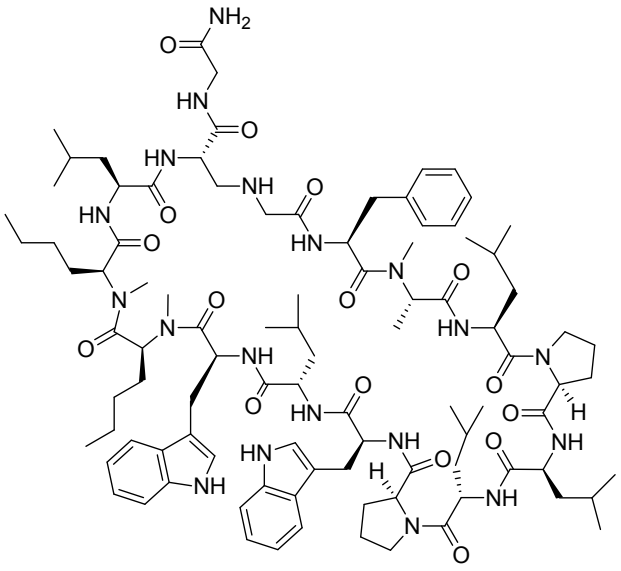
B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.64 min; ESI-MS(+) m/z 933.20 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.14 min; ESI-MS(+) m/z 933.25 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 932.9783 (M+2H); Encontrado: 932.9775 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10005



Ejemplo 10005

El material crudo del Ejemplo 10005 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de

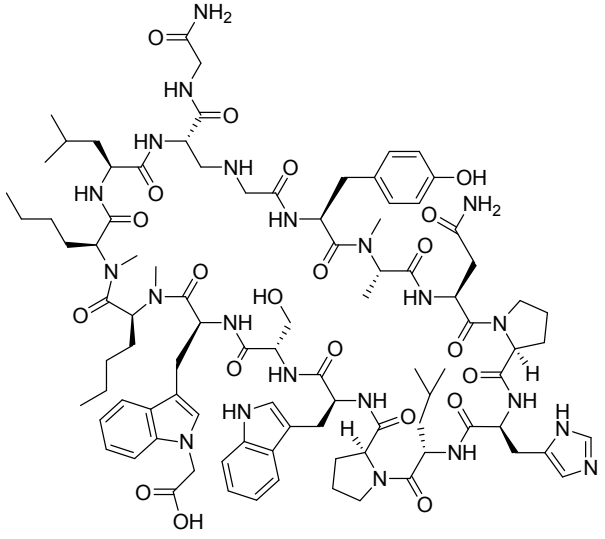
acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 20.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 2.46 min; ESI-MS(+) m/z 910.50 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.29 min; ESI-MS(+) m/z 910.50 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 910.0553 (M+2H); Encontrado: 910.0541 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10006



Ejemplo 10006

El material crudo del Ejemplo 10006 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase

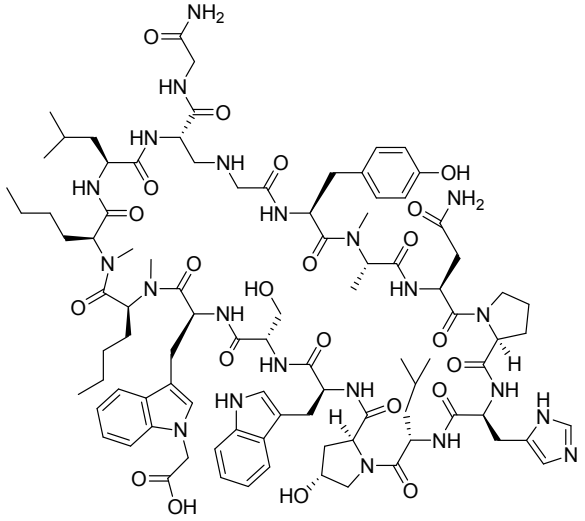
móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.44 min; ESI-MS(+) m/z 947.40 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.56 min; ESI-MS(+) m/z 946.80 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 946.4963 (M+2H); Encontrado: 946.4941 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10007



Ejemplo 10007

El material crudo del Ejemplo 10007 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

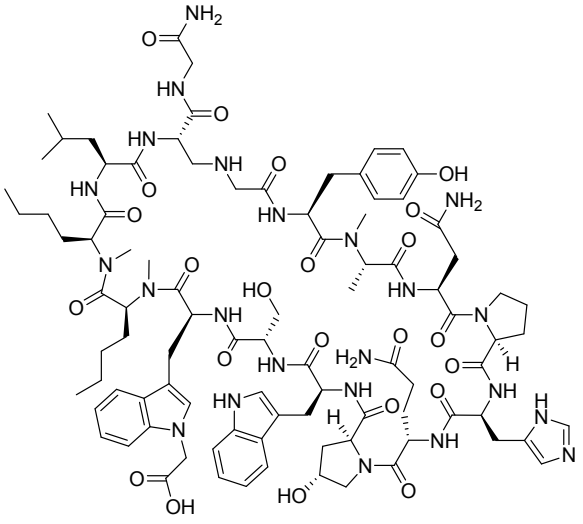
XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.38 min; ESI-MS(+) m/z 954.70 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.52 min; ESI-MS(+) m/z 954.40 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 954.4938 (M+2H); Encontrado: 954.4915 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10008



Ejemplo 10008

El material crudo del Ejemplo 10008 se purificó

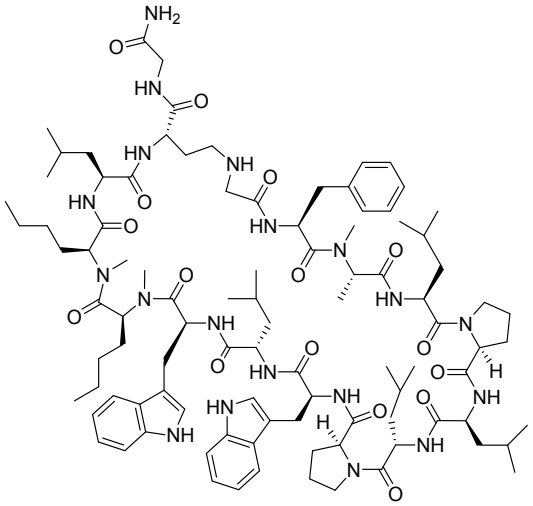
mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.40 min; ESI-MS(+) m/z 962.30 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.92 min; ESI-MS(+) m/z 962.25 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 961.9810 (M+2H); Encontrado: 961.9804 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10009



Ejemplo 10009

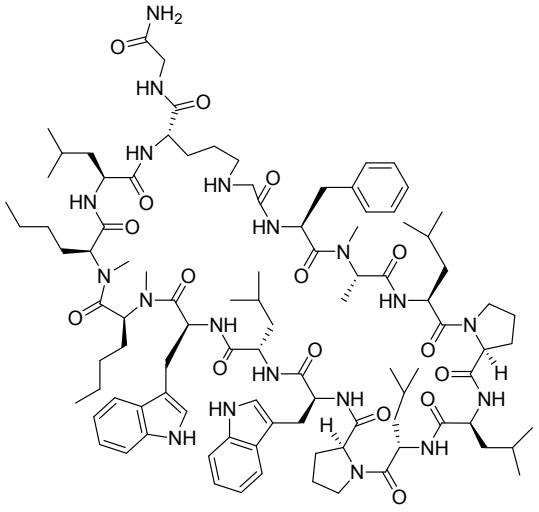
El material crudo del Ejemplo 10009 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 35.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 2.38 min; ESI-MS(+) m/z 917.50 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 917.0631 (M+2H); Encontrado: 917.0618 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10010



Ejemplo 10010

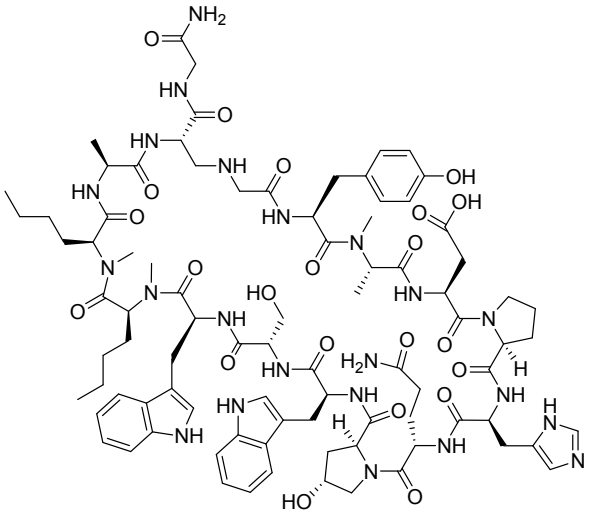
El material crudo del Ejemplo 10010 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 24.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 2.36 min; ESI-MS(+) m/z 924.55 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 924.0709 (M+2H); Encontrado: 924.0700 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10011



Ejemplo 10011

El material crudo del Ejemplo 10011 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

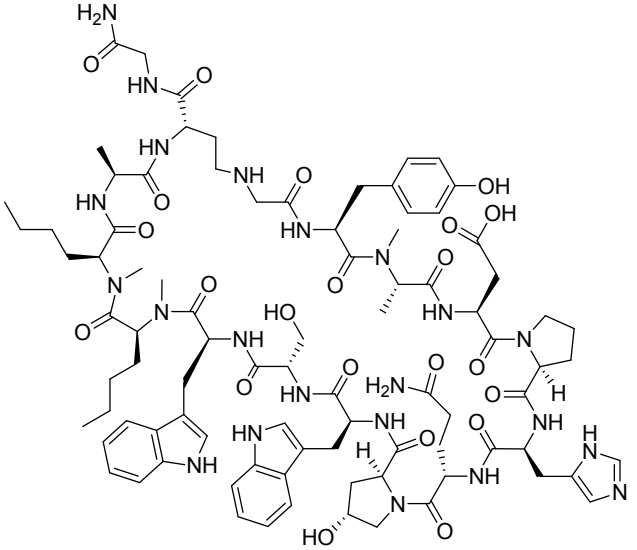
XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.33 min; ESI-MS(+) m/z 912.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.78 min; ESI-MS(+) m/z 912.85 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 912.4468 (M+2H); Encontrado: 912.4468 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10012



Ejemplo 10012

El material crudo del Ejemplo 10012 se purificó

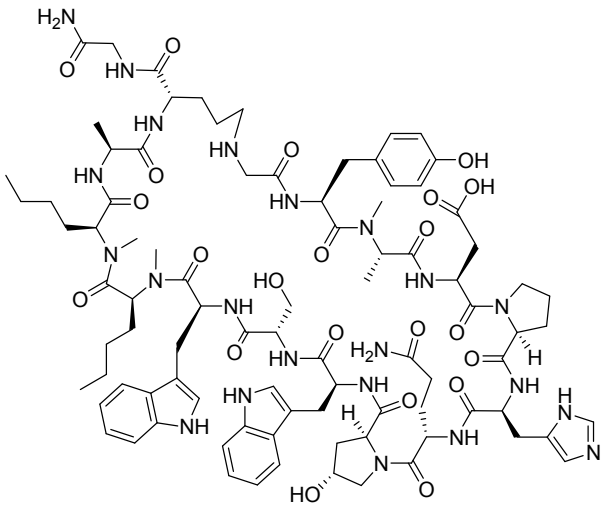
mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 11.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.50 min; ESI-MS(+) m/z 919.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.97 min; ESI-MS(+) m/z 919.90 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 919.4547 (M+2H); Encontrado: 919.4549 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10013



Ejemplo 10013

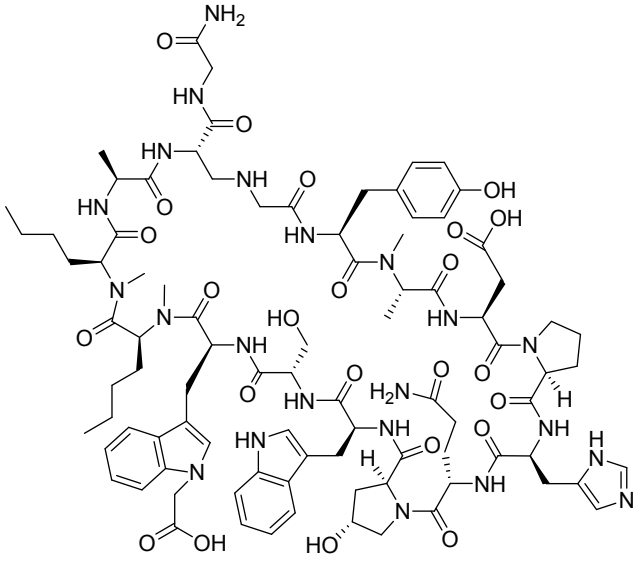
El material crudo del Ejemplo 10013 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.38 min; ESI-MS(+) m/z 927.00 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.73 min; ESI-MS(+) m/z 926.95 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10014



Ejemplo 10014

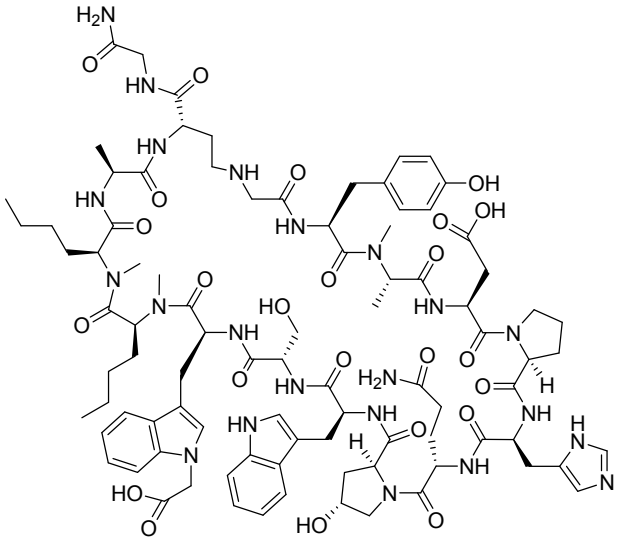
El material crudo del Ejemplo 10014 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.28 min; ESI-MS(+) m/z 941.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.71 min; ESI-MS(+) m/z 941.90 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10015



Ejemplo 10015

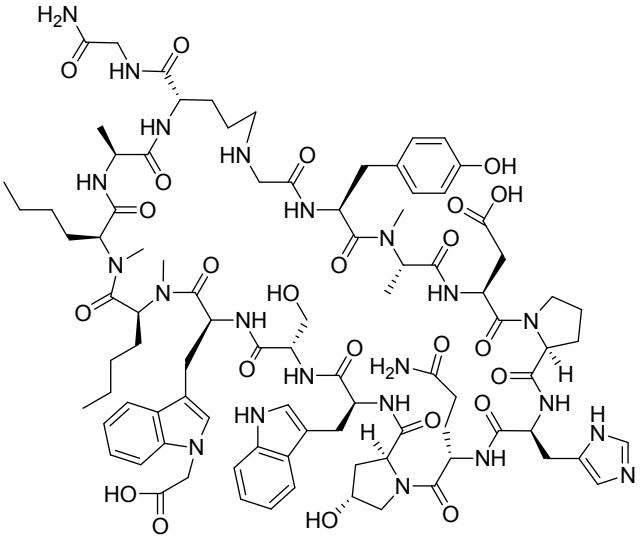
El material crudo del Ejemplo 10015 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.32 min; ESI-MS(+) m/z 948.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.80 min; ESI-MS(+) m/z 948.80 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10016



Ejemplo 10016

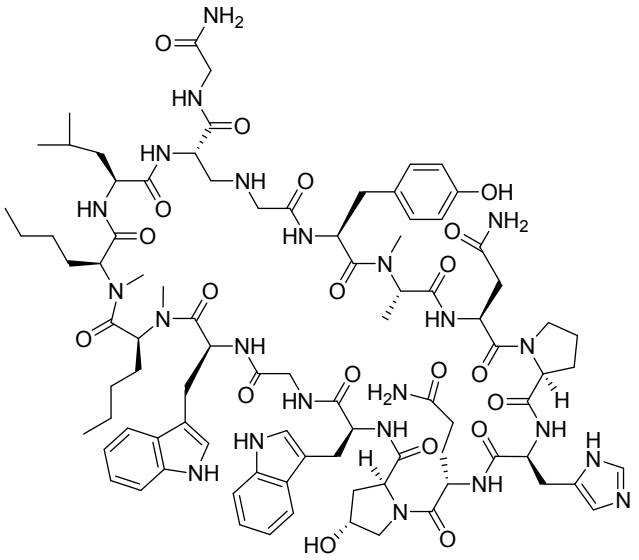
El material crudo del Ejemplo 10016 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.31 min; ESI-MS(+) m/z 955.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.82 min; ESI-MS(+) m/z 955.90 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10017



Ejemplo 10017

El material crudo del Ejemplo 10017 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de

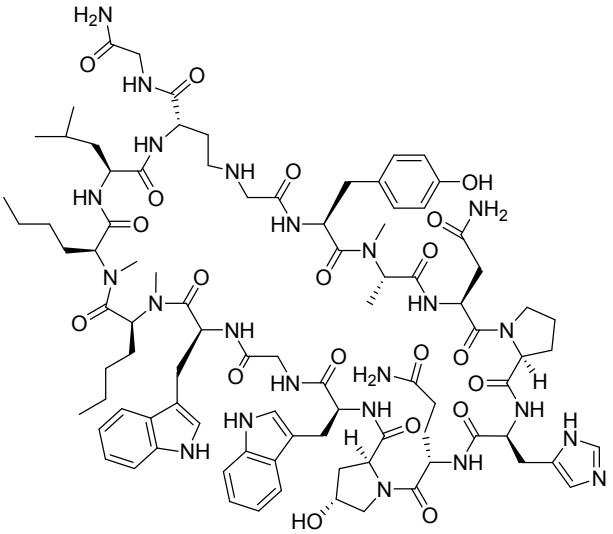
acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 28.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.64 min; ESI-MS(+) m/z 918.40 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.16 min; ESI-MS(+) m/z 918.40 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 917.9730 (M+2H); Encontrado: 917.9720 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10018



Ejemplo 10018

El material crudo del Ejemplo 10018 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

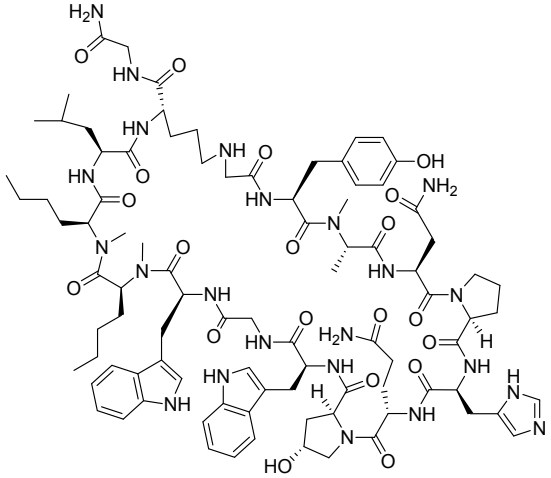
XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 31.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.61 min; ESI-MS(+) m/z 924.45 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.15 min; ESI-MS(+) m/z 925.40 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 924.9808 (M+2H); Encontrado: 924.9808 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10019



Ejemplo 10019

El material crudo del Ejemplo 10019 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

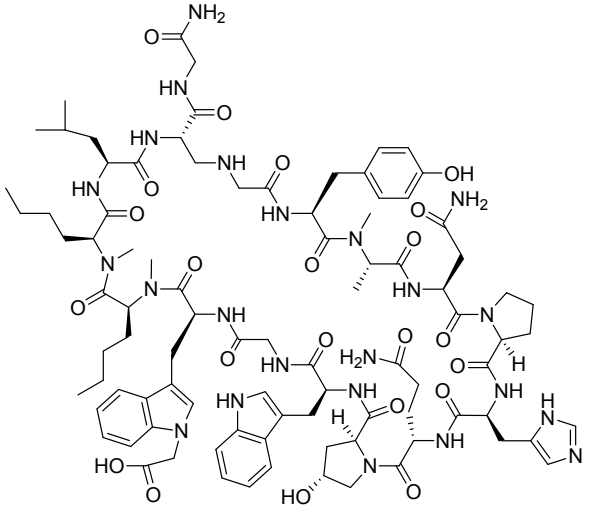
XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 15.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.61 min; ESI-MS(+) m/z 932.45 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.15 min; ESI-MS(+) m/z 932.40 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 931.9887 (M+2H); Encontrado: 931.9878 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10020



Ejemplo 10020

El material crudo del Ejemplo 10020 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna:

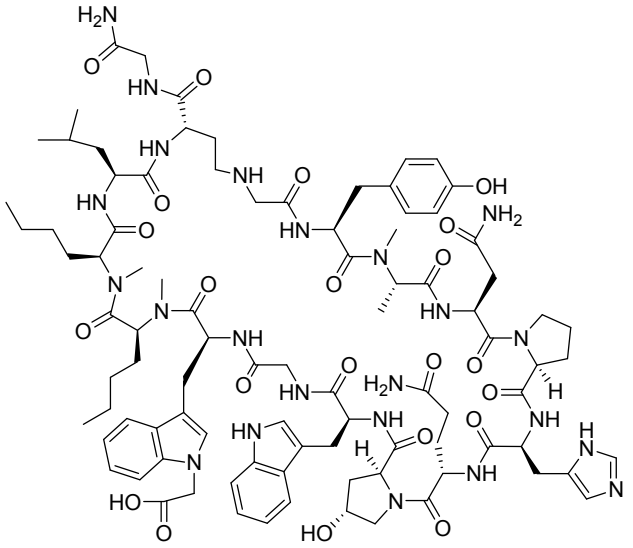
XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 11.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.42 min; ESI-MS(+) m/z 947.40 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.95 min; ESI-MS(+) m/z 947.40 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 946.9758 (M+2H); Encontrado: 946.9756 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10021



Ejemplo 10021

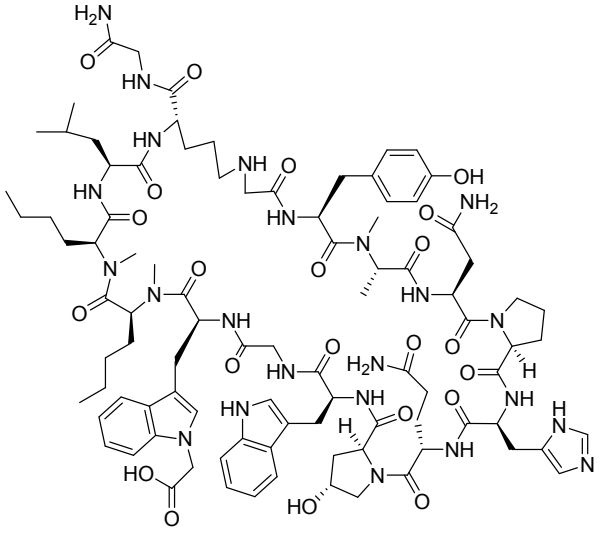
El material crudo del Ejemplo 10021 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 11.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.44 min; ESI-MS(+) m/z 954.40 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.99 min; ESI-MS(+) m/z 954.35 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10022



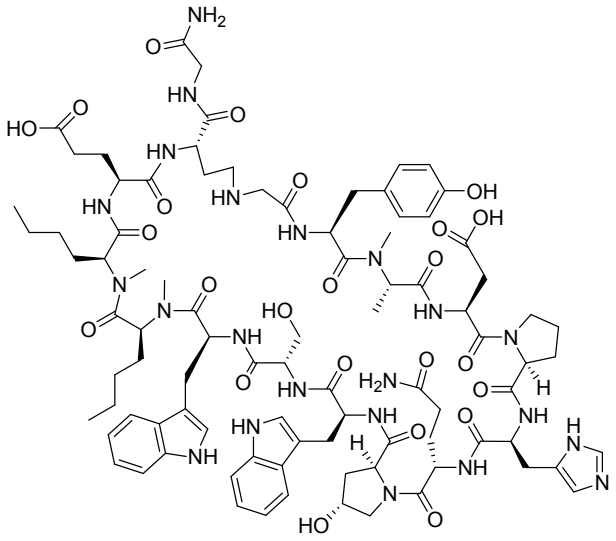
Ejemplo 10022

El material crudo del Ejemplo 10022 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.46 min; ESI-MS(+) m/z 961.45 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10023



Ejemplo 10023

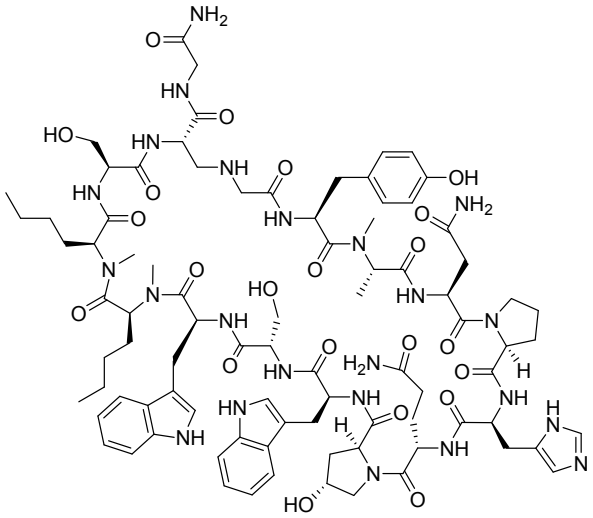
El material crudo del Ejemplo 10023 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase

móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.52 min; ESI-MS(+) m/z 949.00 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.80 min; ESI-MS(+) m/z 948.85 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10024



Ejemplo 10024

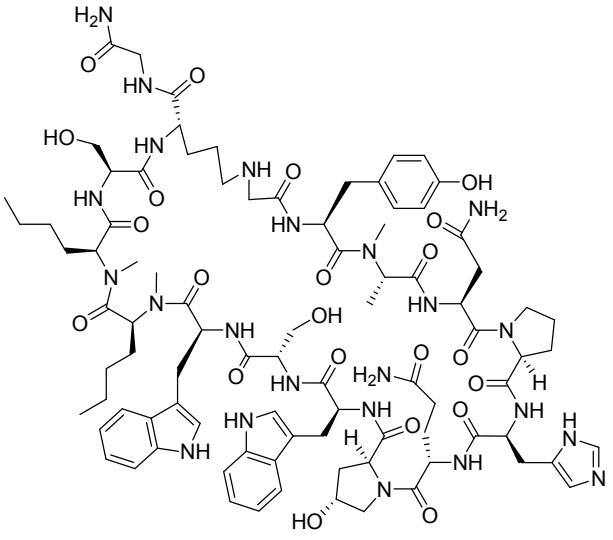
El material crudo del Ejemplo 10024 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase

móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.56 min; ESI-MS(+) m/z 920.30 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.05 min; ESI-MS(+) m/z 920.30 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10025



Ejemplo 10025

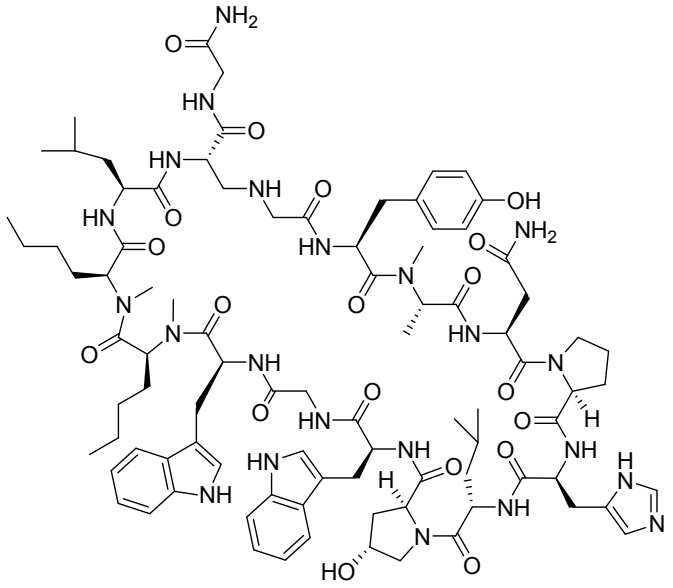
El material crudo del Ejemplo 10025 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase

móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.43 min; ESI-MS(+) m/z 934.60 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.97 min; ESI-MS(+) m/z 934.35 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10026



Ejemplo 10026

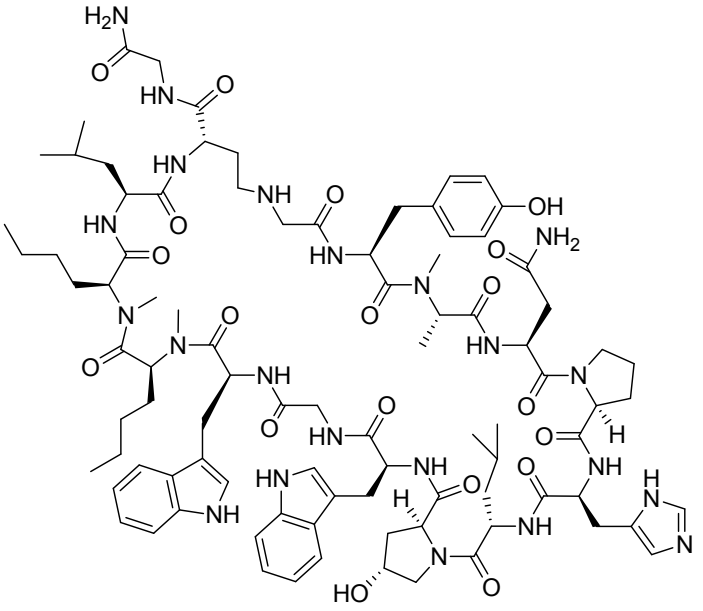
El material crudo del Ejemplo 10026 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones:

Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 19.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.69 min; ESI-MS(+) m/z 910.85 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.18 min; ESI-MS(+) m/z 910.85 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10027



Ejemplo 10027

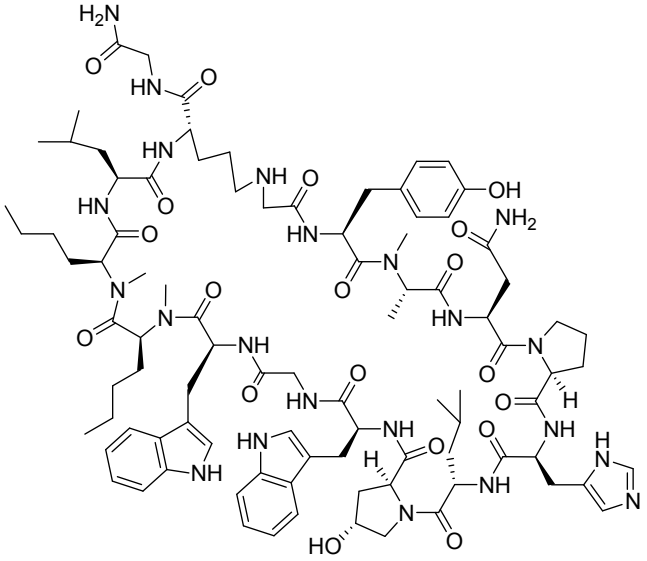
El material crudo del Ejemplo 10027 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 21.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.66 min; ESI-MS(+) m/z 917.85 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.18 min; ESI-MS(+) m/z 917.90 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10028



Ejemplo 10028

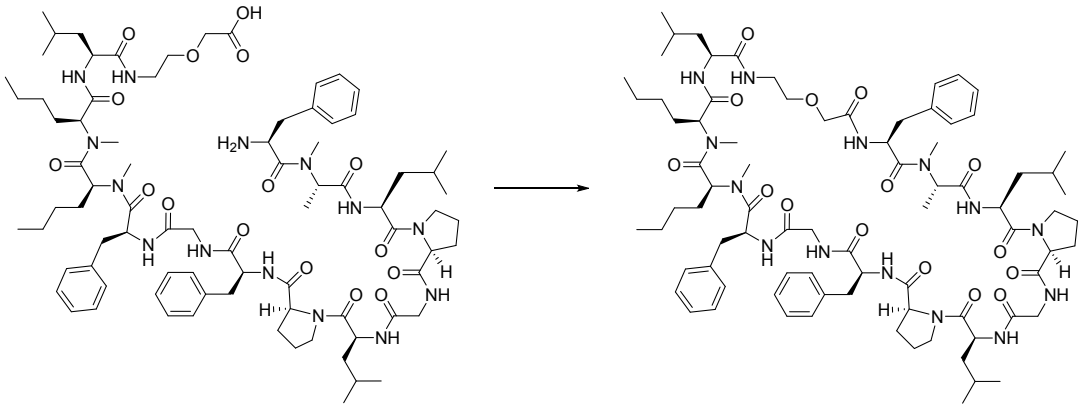
El material crudo del Ejemplo 10028 se purificó

mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 20.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.65 min; ESI-MS(+) m/z 924.90 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 3.17 min; ESI-MS(+) m/z 924.90 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10500



Intermediario 10500 **Ejemplo 10500**

Preparación del Intermediario 10500:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Se

usó ácido 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etoxi)acético en el "procedimiento de carga de resina". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado

se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10500.

Preparación del Ejemplo 10500:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 1 dram cargado con la totalidad del Intermediario 10500 antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló durante 1.5 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (20 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (10 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm;

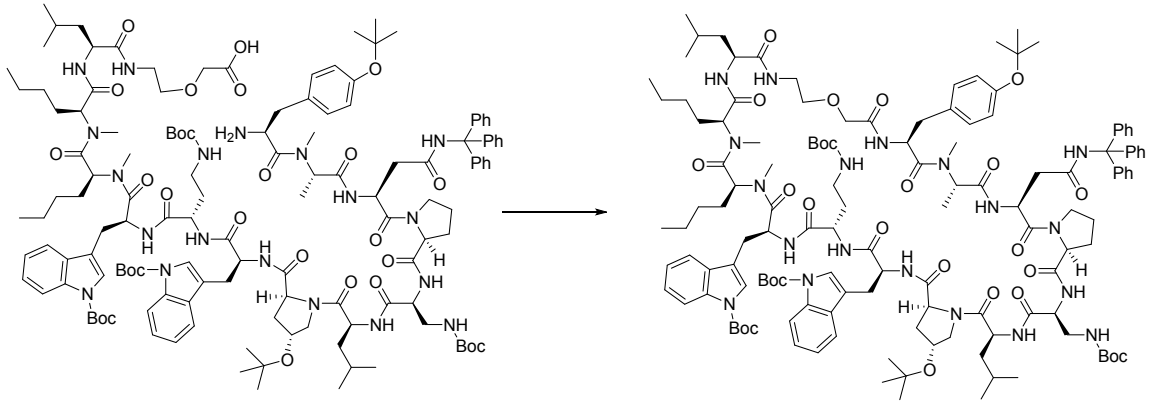
Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 40-80% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 2.57 min; ESI-MS(+) m/z 764.9 (M+2H)

Condición de análisis E: Tiempo de retención = 2.57 min; ESI-MS(+) m/z 765.4 (M+2H)

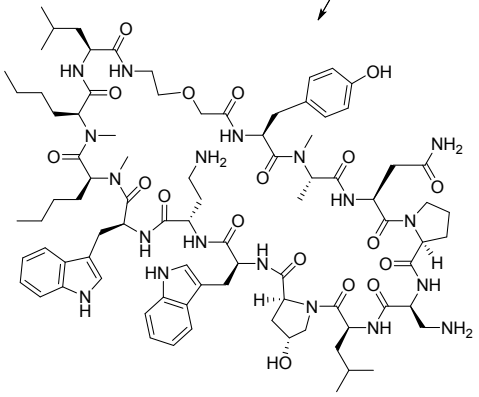
ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 765.4602 Encontrado: 765.4581.

Preparación del Ejemplo 10501



Intermediario 10501A

Intermediario 10501B



Ejemplo 10501

Preparación del Intermediario 10501A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Se

usó ácido 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etoxi)acético en el "procedimiento de carga de resina". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado

se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10501A.

Preparación del Intermediario 10501B:

A un vial de 15 mL cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó DCM (2 mL), luego HATU (38 mg, 0.10 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución se agitó durante 2 h. La solución se secó al vacío para obtener el Intermediario 10501B.

Preparación del Ejemplo 10501:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 1 dram cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en MeOH, y a la solución se agregó DIPEA (0.050 mL). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm,

partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga.

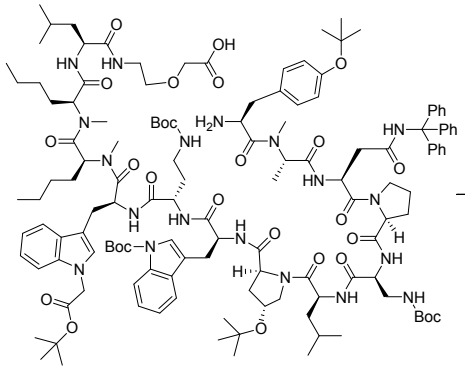
El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 40-80% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 4 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.65 min; ESI-MS(-) m/z 856.8 (M+2H).

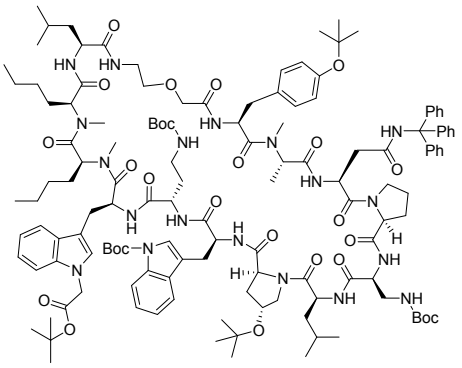
Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.72 min; ESI-MS(-) m/z 857.2 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: Calculado: 856.9798 Encontrado: 856.9790.

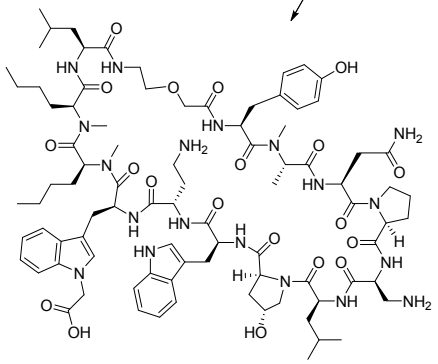
Preparación del Ejemplo 10502



Intermediario 10502A



Intermediario 10502B



Ejemplo 10502

Preparación del Intermediario 10502A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Se usó ácido 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etoxi)acético en el "procedimiento de carga de resina". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la

frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10502A.

Preparación del Intermediario 10502B:

A un vial de 15 mL cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó DCM (2 mL), luego HATU (38 mg, 0.10 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución se agitó durante 2 h. La solución se secó al vacío, se volvió a disolver en MeOH, y luego se sometió a purificación mediante HPLC en las siguientes condiciones: Columna: Waters XBridge C18, 30 x 100 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 55-100% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 15 minutos a 100% de B; flujo: 30 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga para obtener un sólido blanco, el Intermediario 10502B.

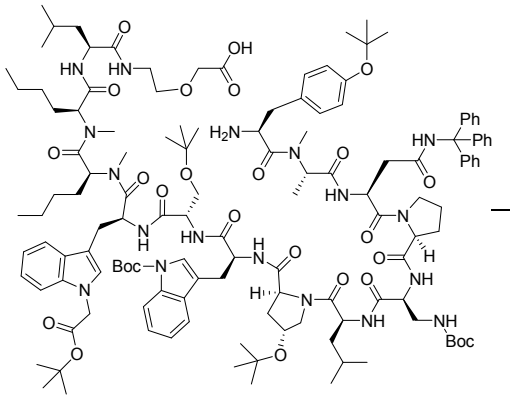
Preparación del Ejemplo 10502:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 1 dram cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó la "solución de

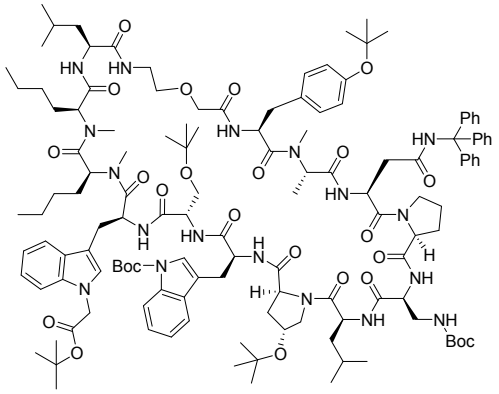
desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en MeOH, y a la solución se agregó DIPEA (0.050 mL). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 50-100% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 83%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.79 min; ESI-MS(-) m/z 886.1 (M+2H).

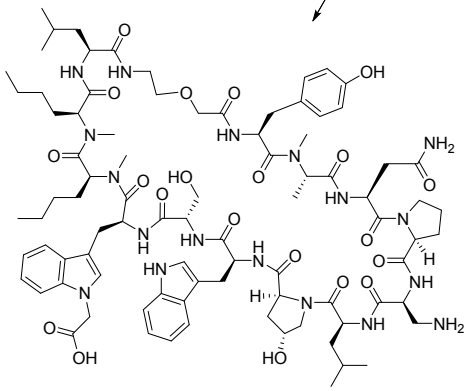
Preparación del Ejemplo 10503



Intermediario 10503A



Intermediario 10503B



Ejemplo 10503

Preparación del Intermediario 10503A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Se usó ácido 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etoxi)acético en el "procedimiento de carga de resina". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a

través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10503A.

Preparación del Intermediario 10503B:

A un vial de 15 mL cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó DCM (2 mL),

luego HATU (38 mg, 0.10 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución se agitó durante 2 h. La solución se secó al vacío para obtener el Intermediario 10503B.

Preparación del Ejemplo 10503:

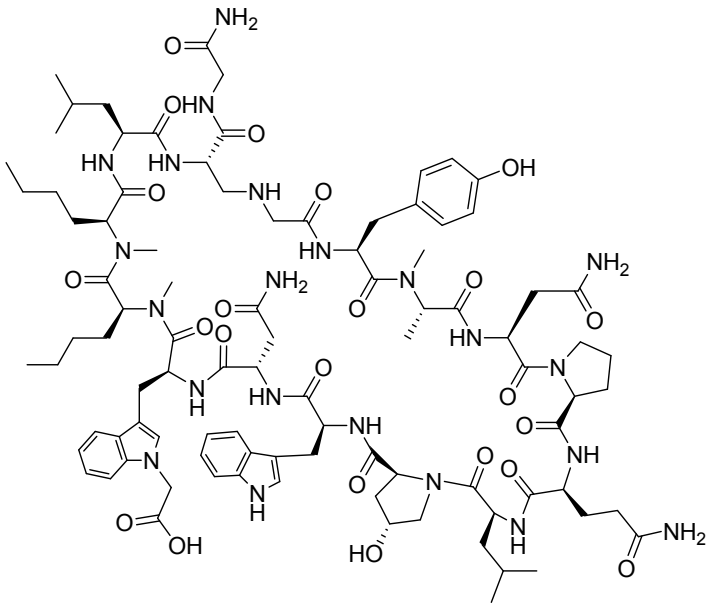
Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 1 dram cargado con la totalidad del Intermediario 10501A antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (1.0 mL). La solución se mezcló durante 1.0 h en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El residuo resultante se disolvió en MeOH, y a la solución se agregó DIPEA (0.050 mL). El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 40-90% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a

purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH c-18. 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.81 min; ESI-MS(-) m/z 879.3 (M+2H).

Condición de análisis E: Tiempo de retención = 1.81 min; ESI-MS(-) m/z 1758.1 (M-H).

Preparación del Ejemplo 9005

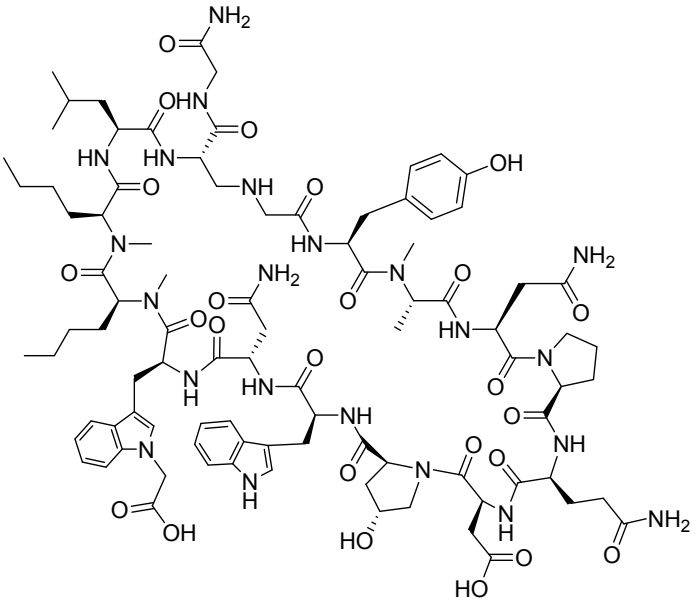


Ejemplo 9005

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 40-80% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 3 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 964.1 (M+2H).

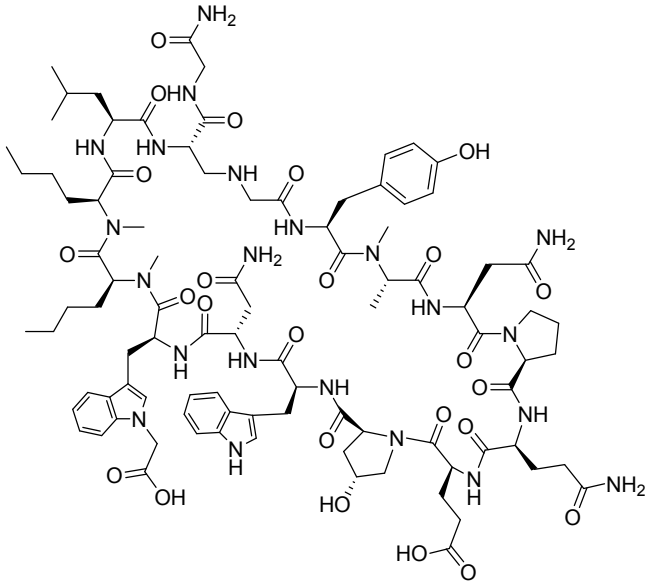
Preparación del Ejemplo 9006



Ejemplo 9006

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-40% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 964.5 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9007

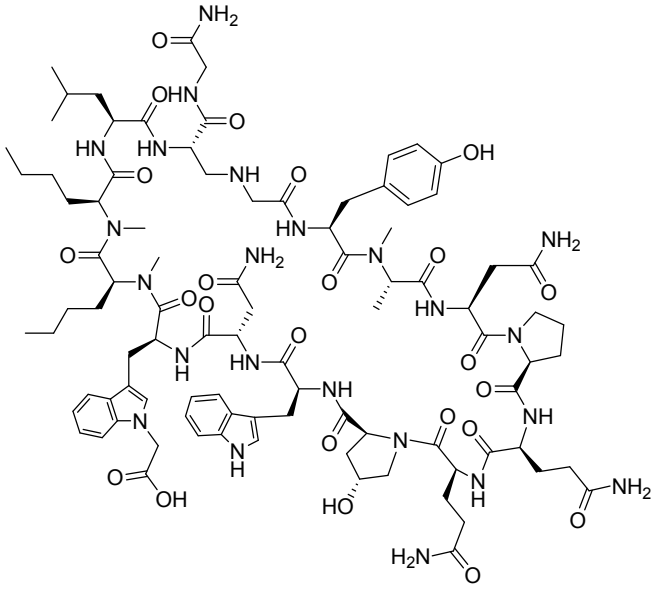


Ejemplo 9007

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 30-70% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 5-40% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 971.5 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9008

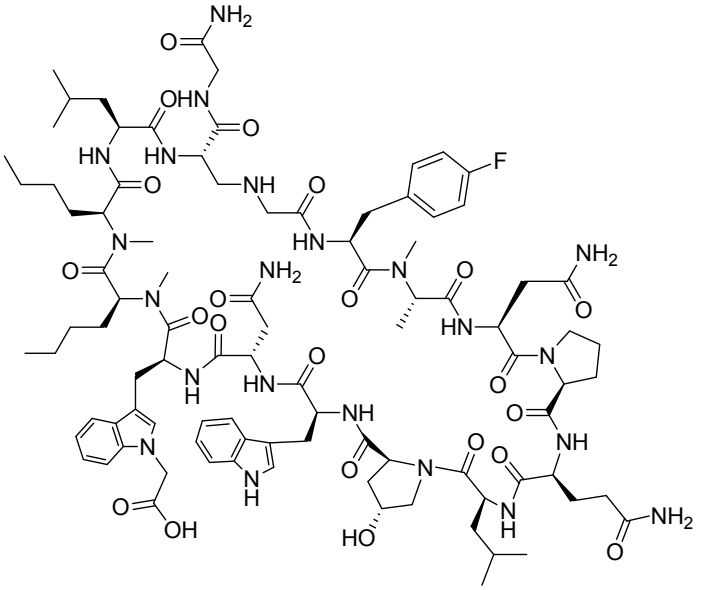


Ejemplo 9008

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 40-80% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 3 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 971.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9009

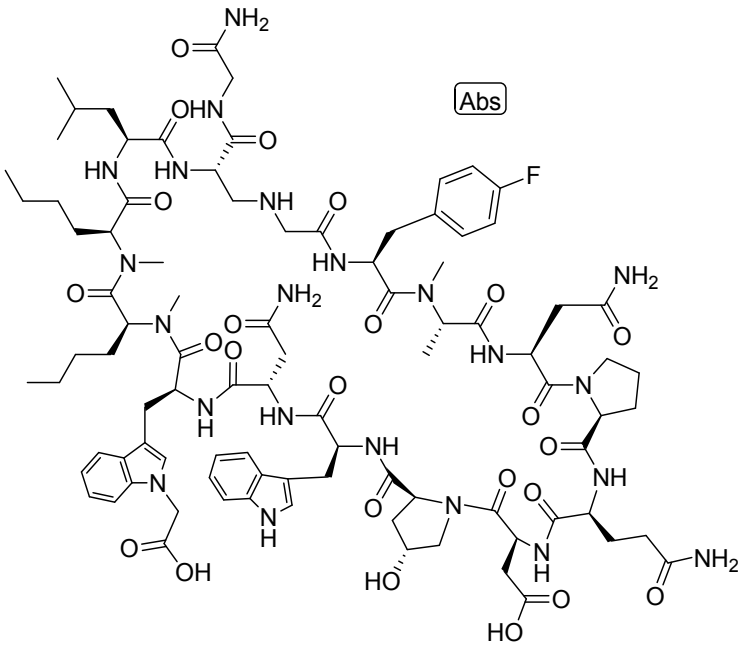


Ejemplo 9009

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 9.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 964.9 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9010

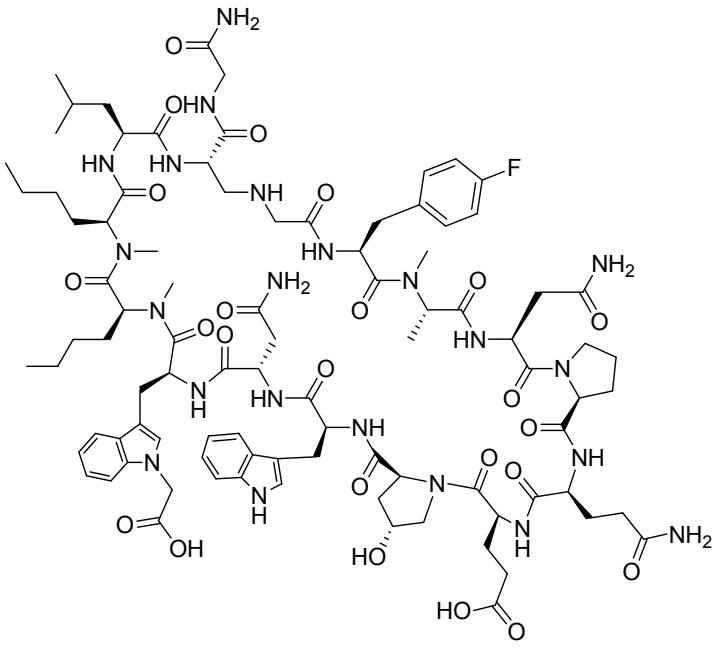


Ejemplo 9010

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 10.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 966.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9011

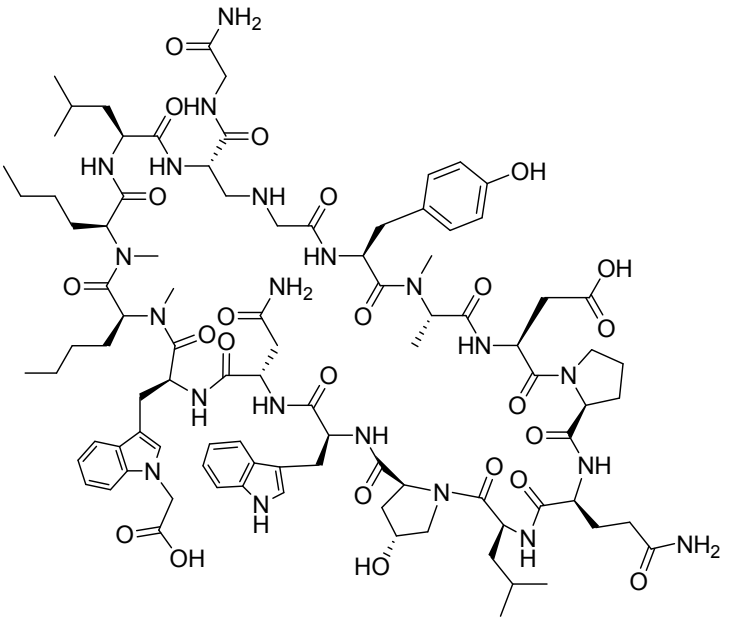


Ejemplo 9011

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 20-60% de B durante 30 minutos,

luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 15.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 82%. ESI-MS(+) *m/z* 973.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9012

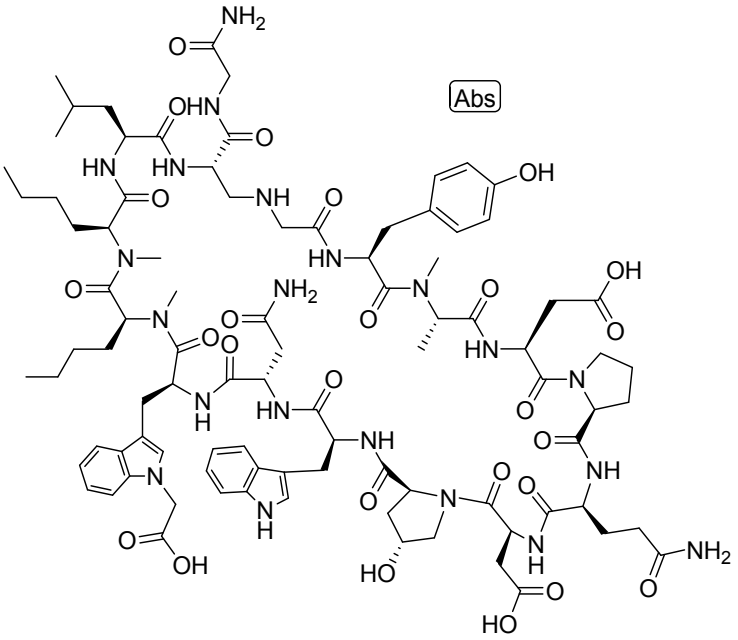


Ejemplo 9012

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%. ESI-MS(+) *m/z* 964.0 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9013

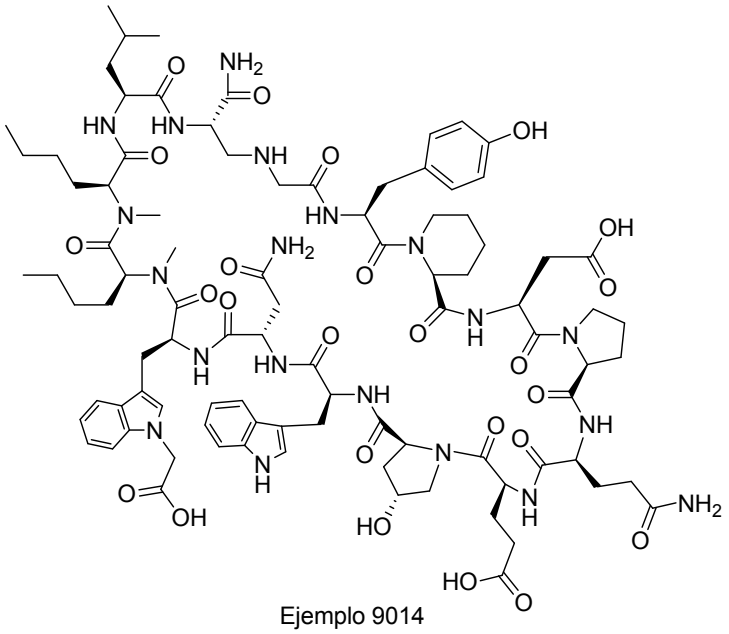


Ejemplo 9013

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 30-70% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 10.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 965.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9014

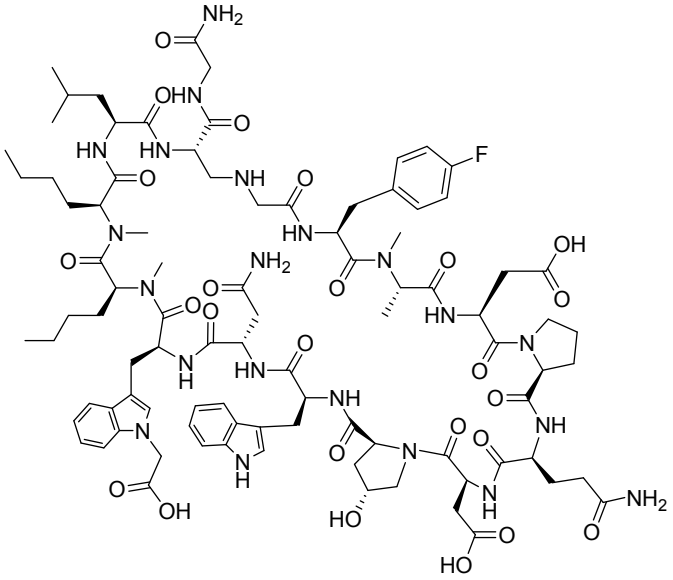


Ejemplo 9014

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 972.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9015

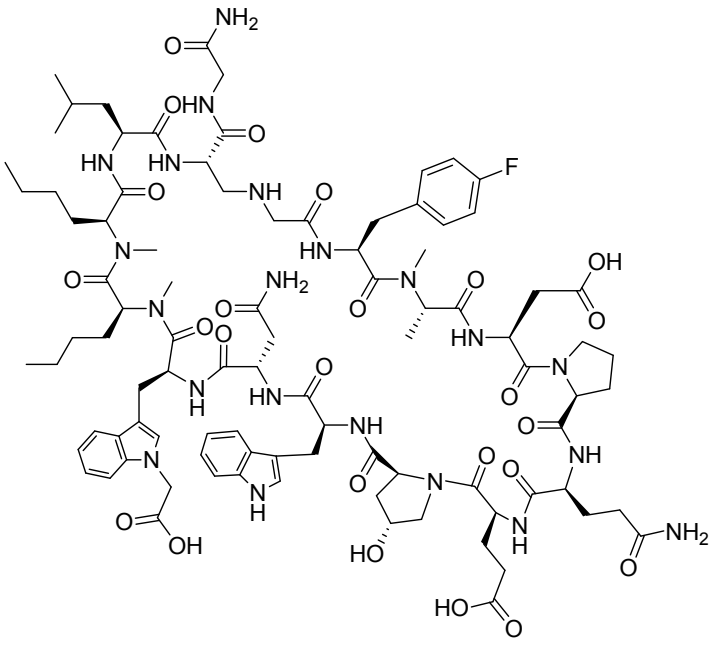


Ejemplo 9015

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%. ESI-MS(+) *m/z* 966.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9016

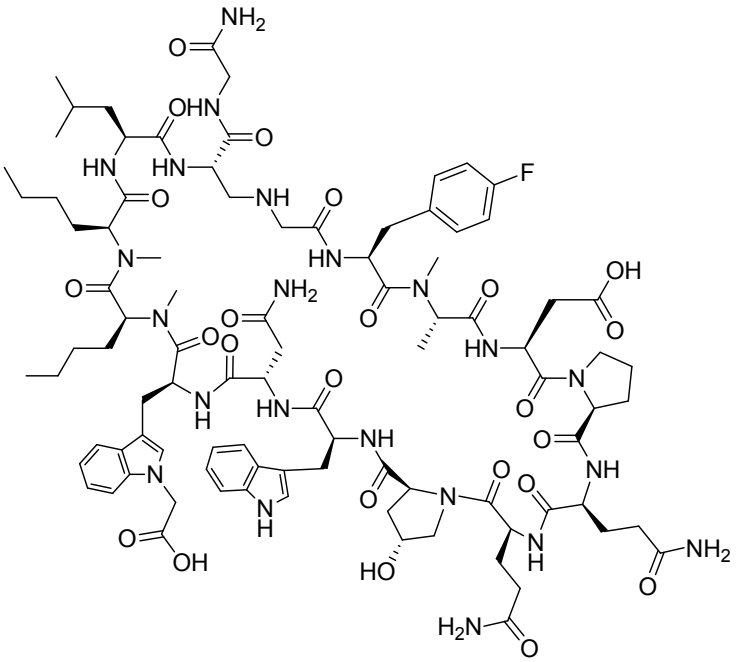


Ejemplo 9016

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de

acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%. ESI-MS(+) *m/z* 973.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9017

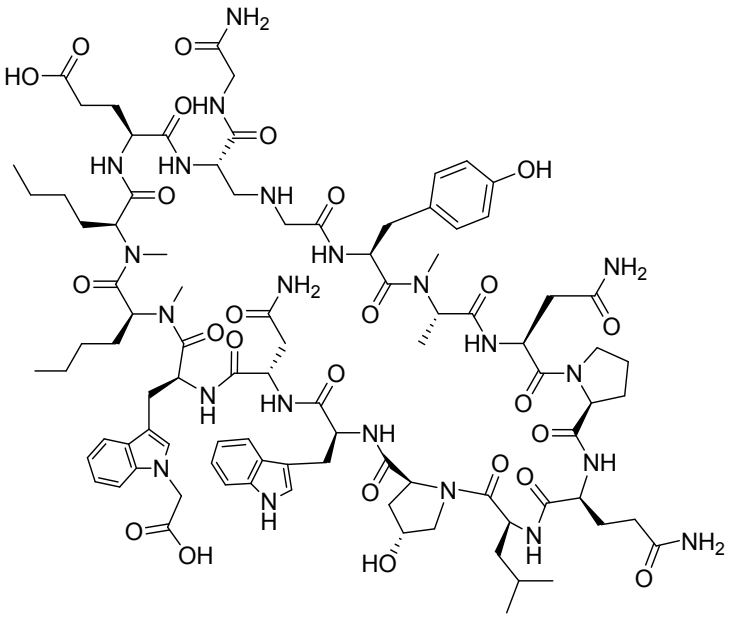


Ejemplo 9017

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase

móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.2 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 92%. ESI-MS(+) *m/z* 973.1 (M+2H).

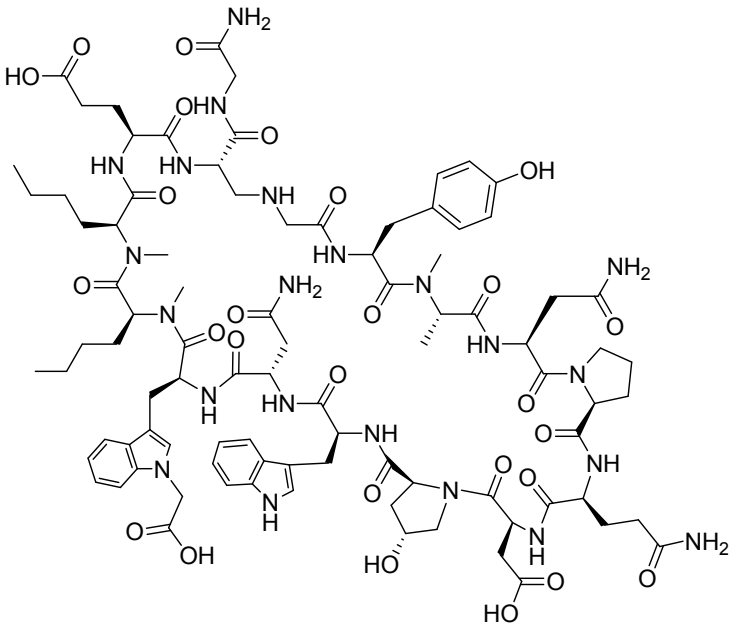
Preparación del Ejemplo 9018



Ejemplo 9018

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 972.1 (M+2H).

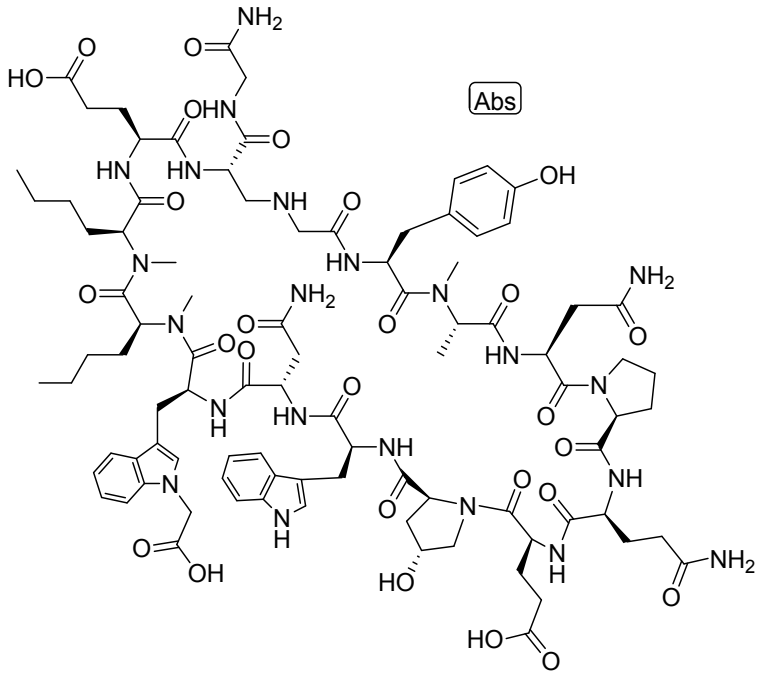
Preparación del Ejemplo 9019



Ejemplo 9019

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%. ESI-MS(+) *m/z* 972.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9020

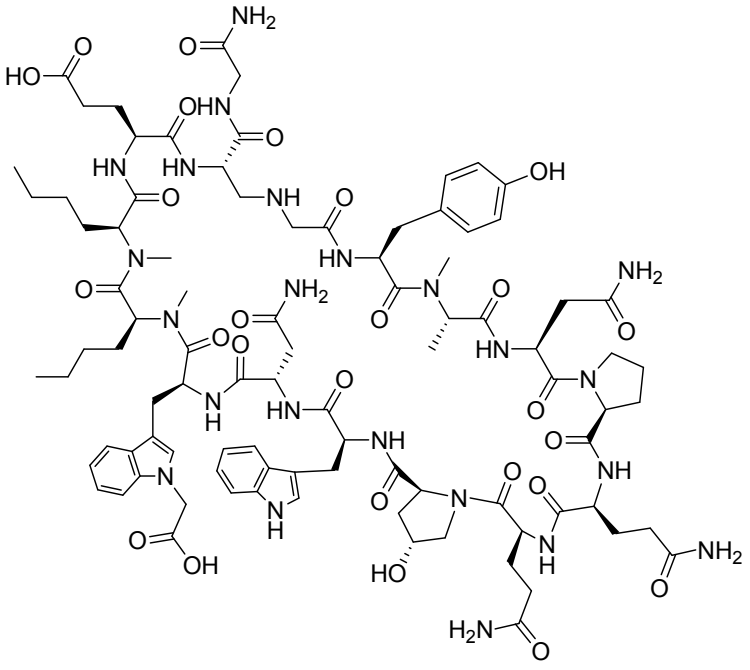


Ejemplo 9020

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil

B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 94%. ESI-MS(+) *m/z* 980.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9021

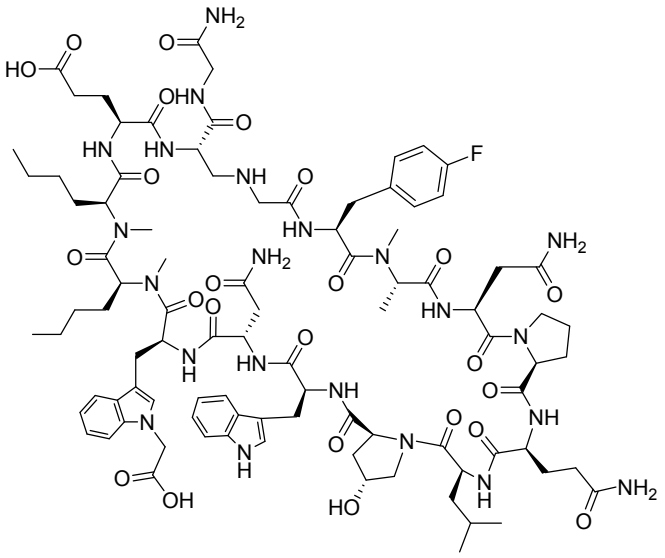


Ejemplo 9021

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido

trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 0-45% de B durante 50 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 979.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9022

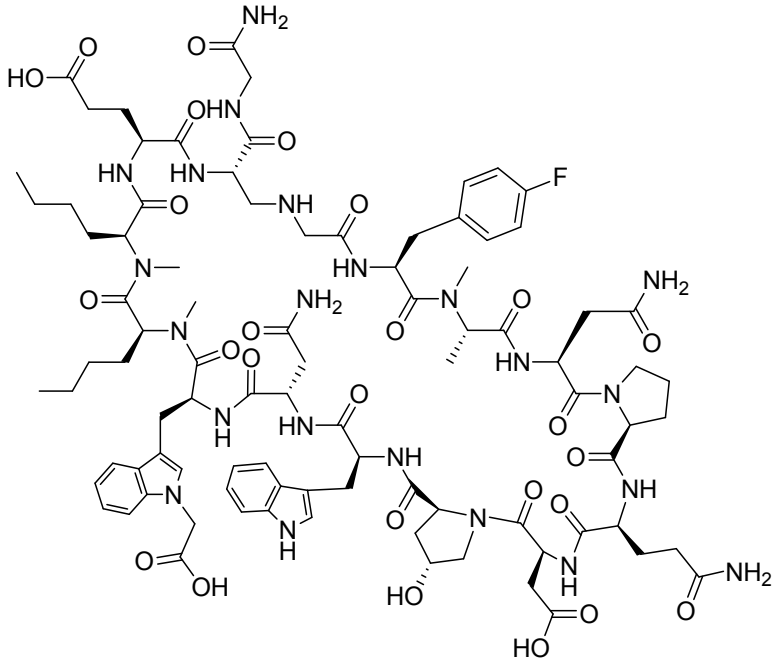


Ejemplo 9022

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge

C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 33 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) m/z 972.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9023

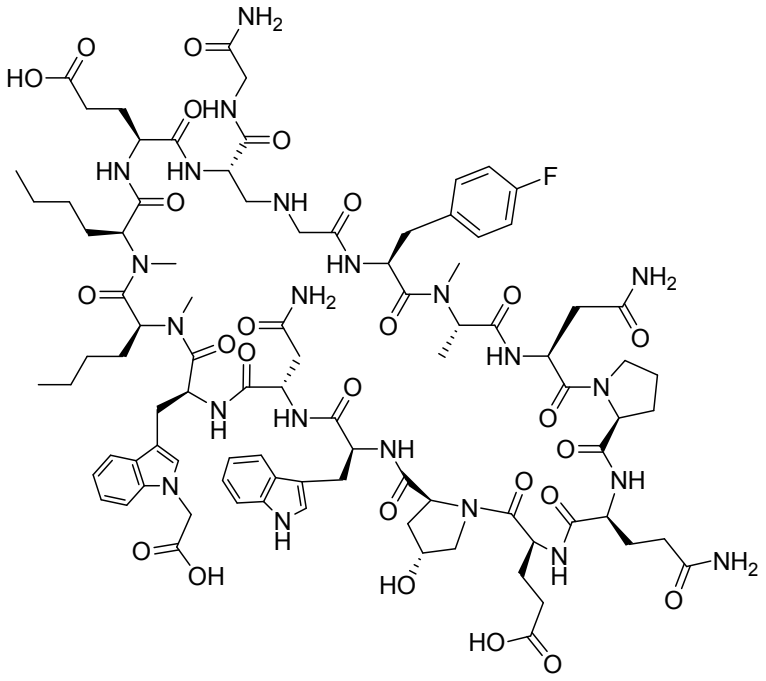


Ejemplo 9023

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-85% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 9.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%. ESI-MS(+) *m/z* 974.0 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9024

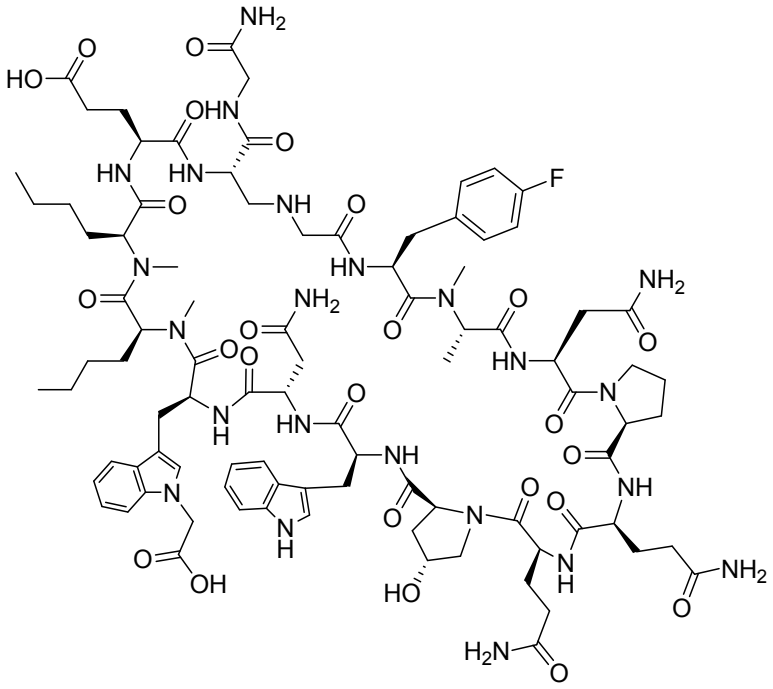


Ejemplo 9024

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego

un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%. ESI-MS(+) *m/z* 980.6 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9025



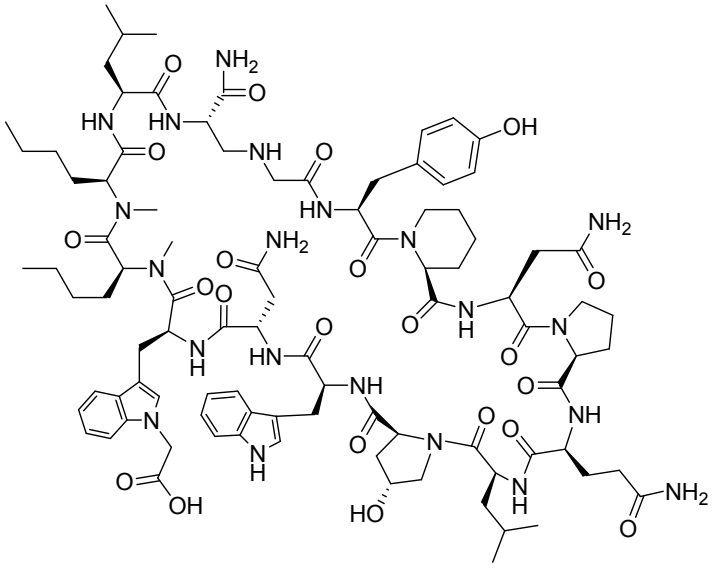
Ejemplo 9025

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 0 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%. ESI-MS(+) *m/z* 980.0 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9026

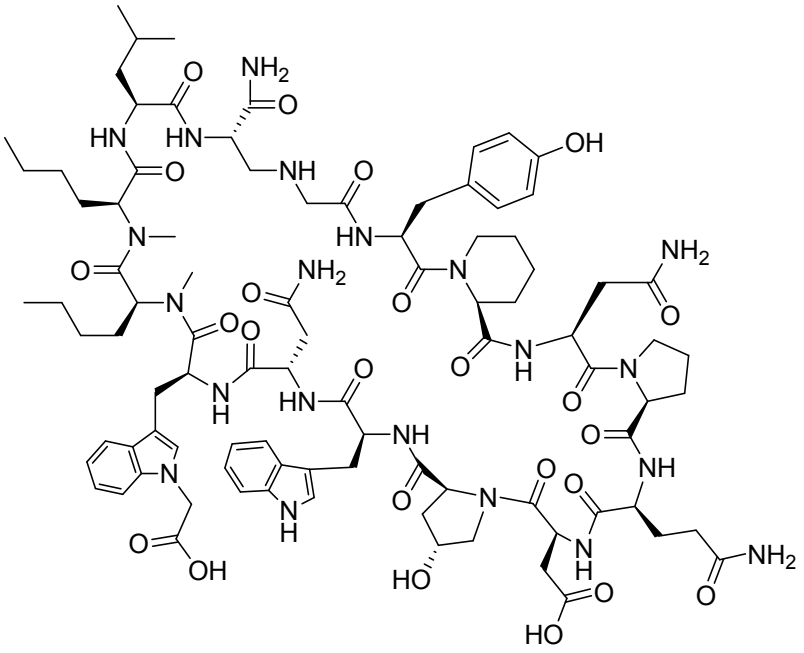


Ejemplo 9026

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters Xbridge c-18. 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 948.2

(M+2H).

Preparación del Ejemplo 9027

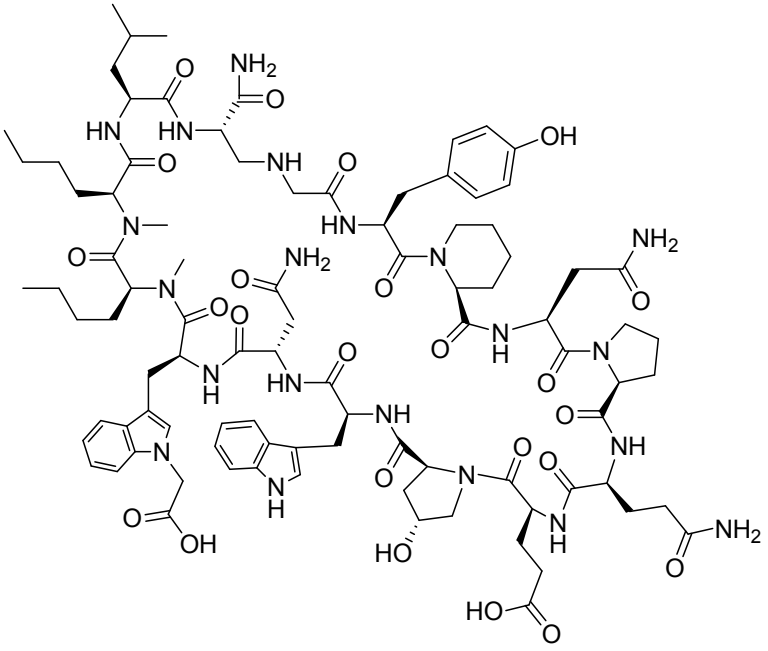


Ejemplo 9027

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: waters CSH c-18. 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil

B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 949.3 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9028

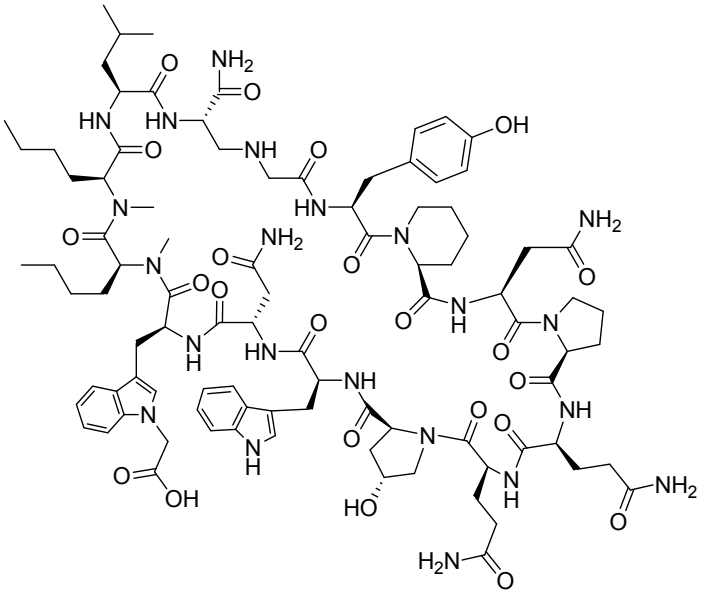


Ejemplo 9028

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters Xbridge c-18. 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato

de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 90%. ESI-MS(+) *m/z* 956.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9029

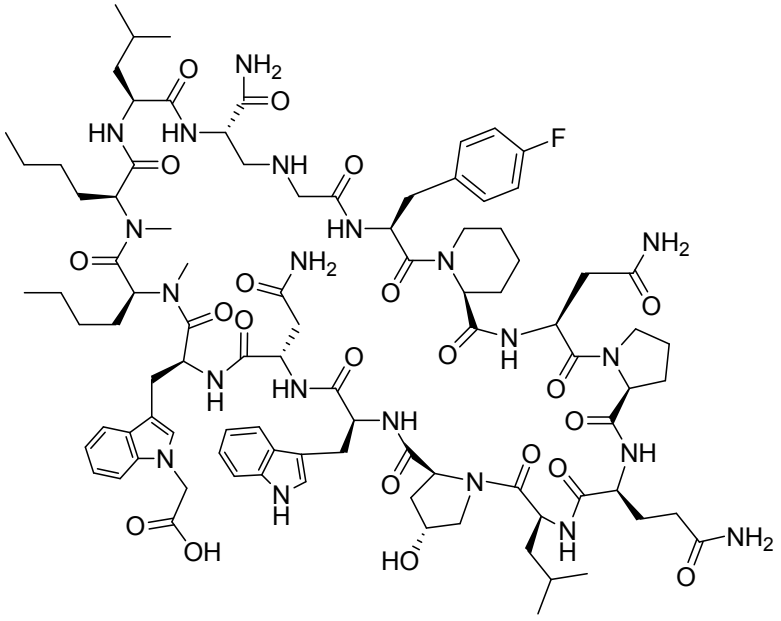


Ejemplo 9029

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters Xbridge C-18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%. ESI-MS(+) *m/z* 956.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9030

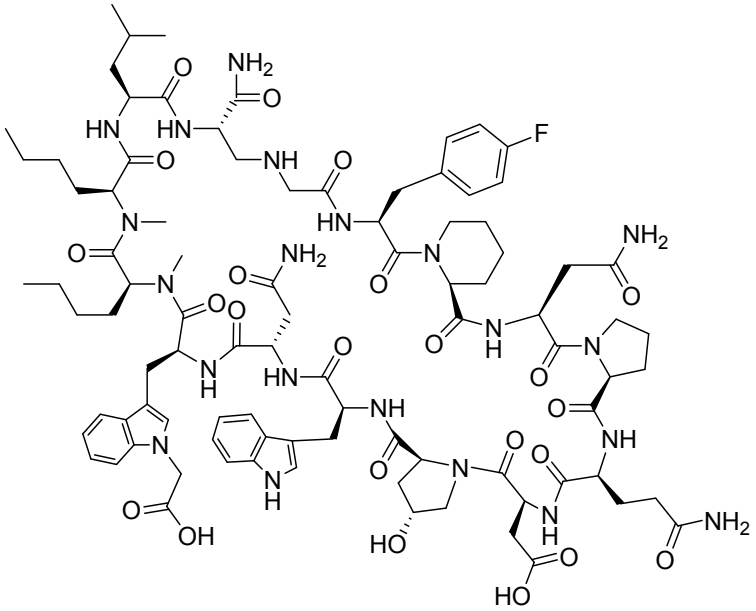


Ejemplo 9030

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El

rendimiento del producto fue de 5.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 949.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9031

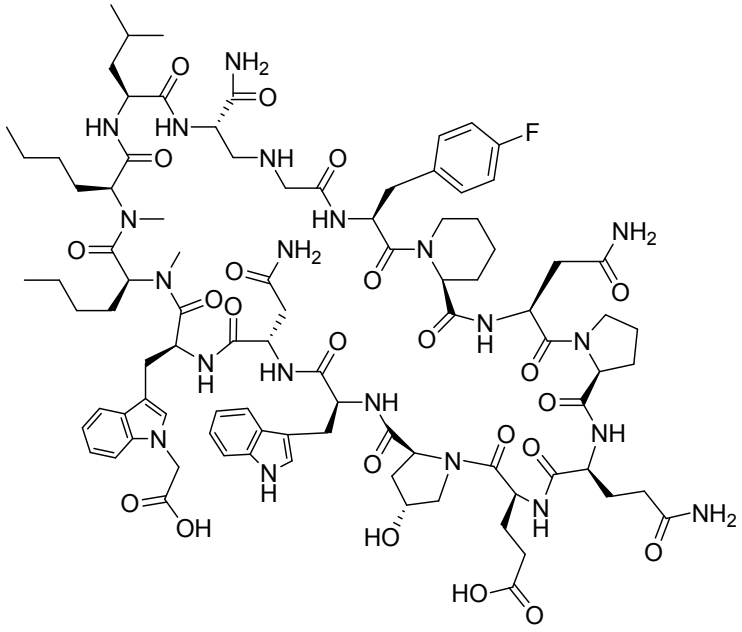


Ejemplo 9031

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm,

partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-30% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 950.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9032

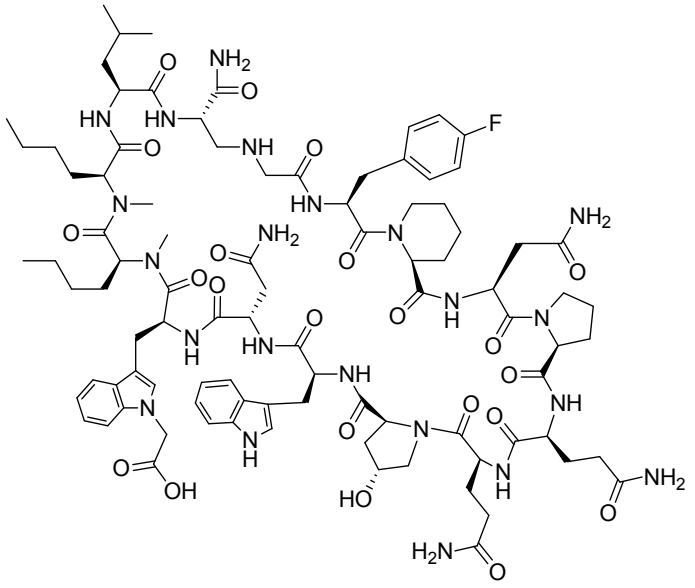


Ejemplo 9032

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido

trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 82%. ESI-MS(+) *m/z* 957.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9033

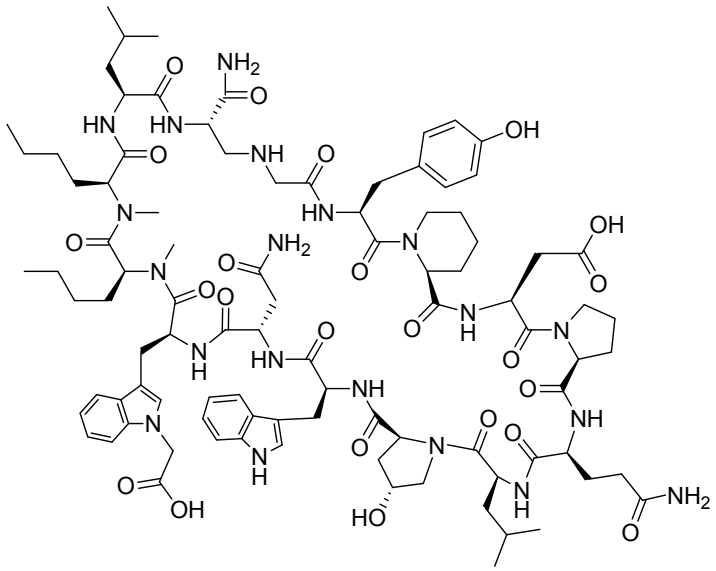


Ejemplo 9033

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%. ESI-MS(+) *m/z* 956.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9034

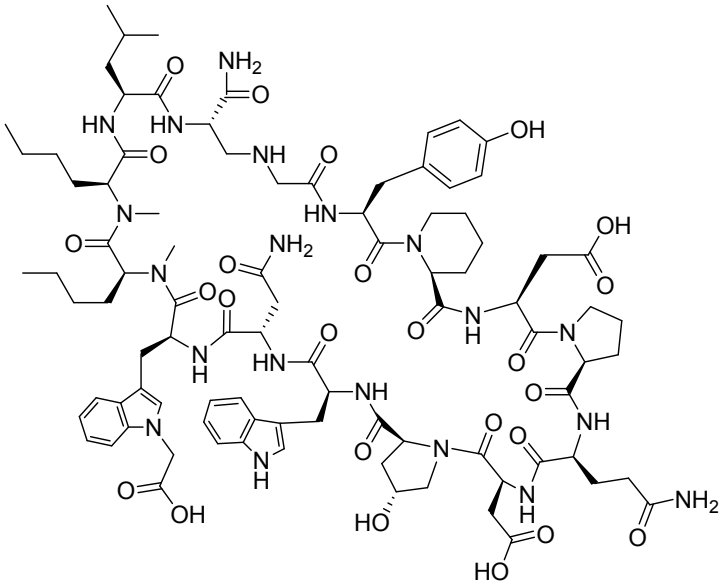


Ejemplo 9034

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 948.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9035

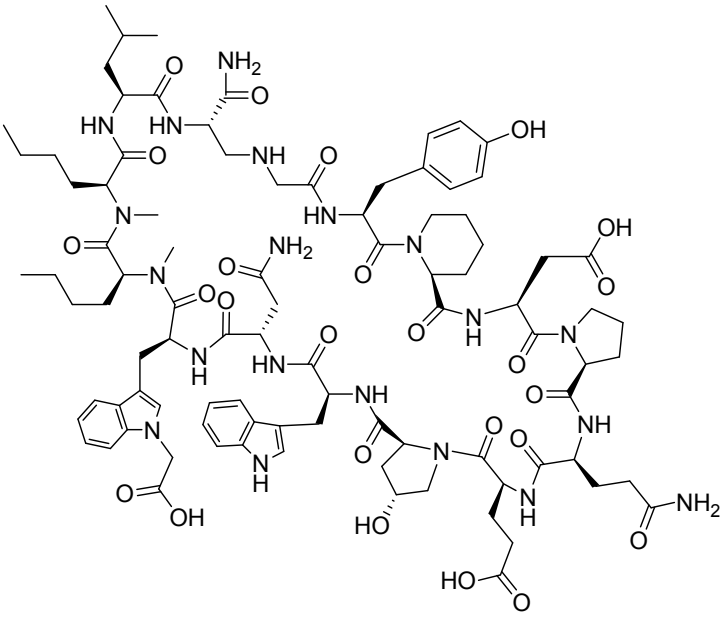


Ejemplo 9035

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20

mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 950.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9036

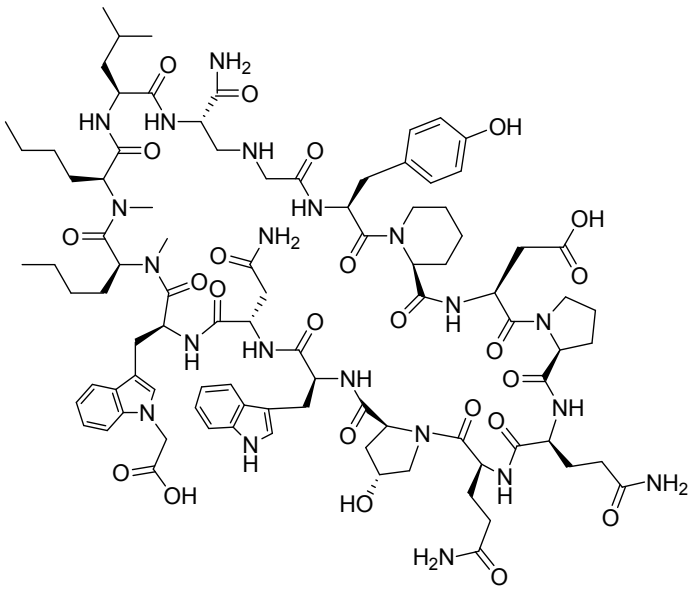


Ejemplo 9036

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%. ESI-MS(+) *m/z* 956.3 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9037

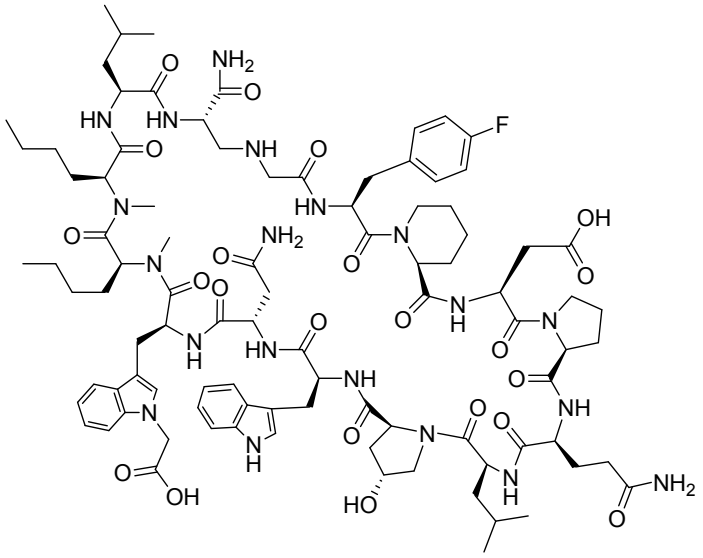


Ejemplo 9037

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 15-55% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 956.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9038

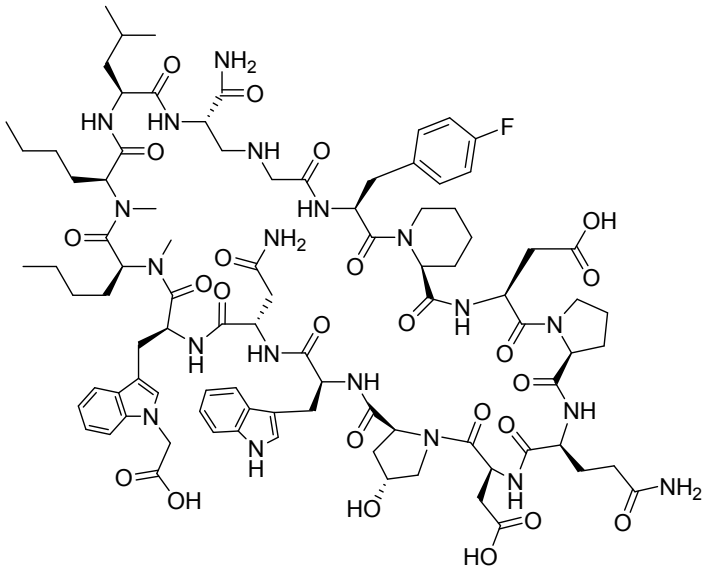


Ejemplo 9038

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 20-60% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 5-45% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 949.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9039

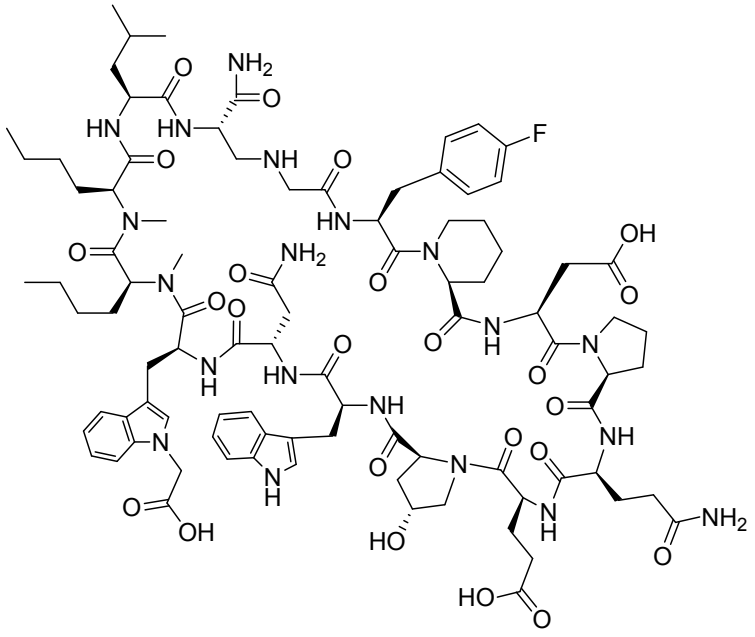


Ejemplo 9039

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 951.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9040

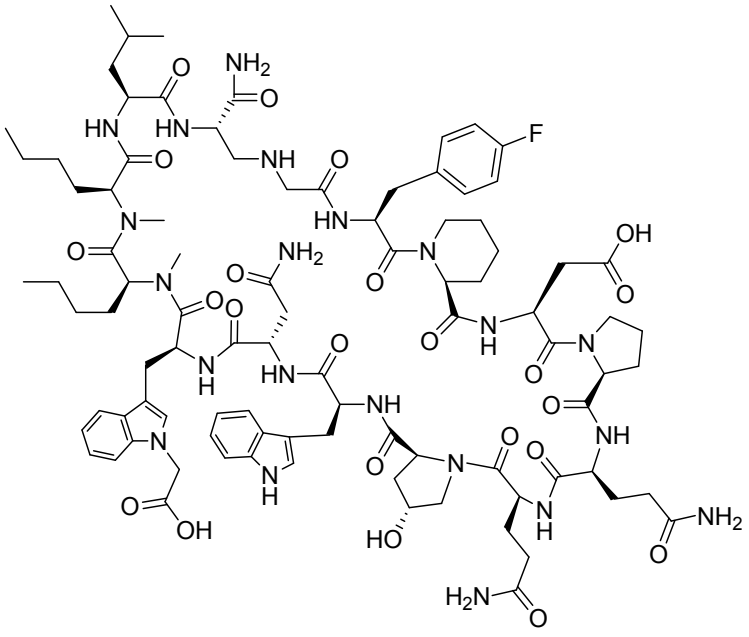


Ejemplo 9040

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente:

10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 957.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9041

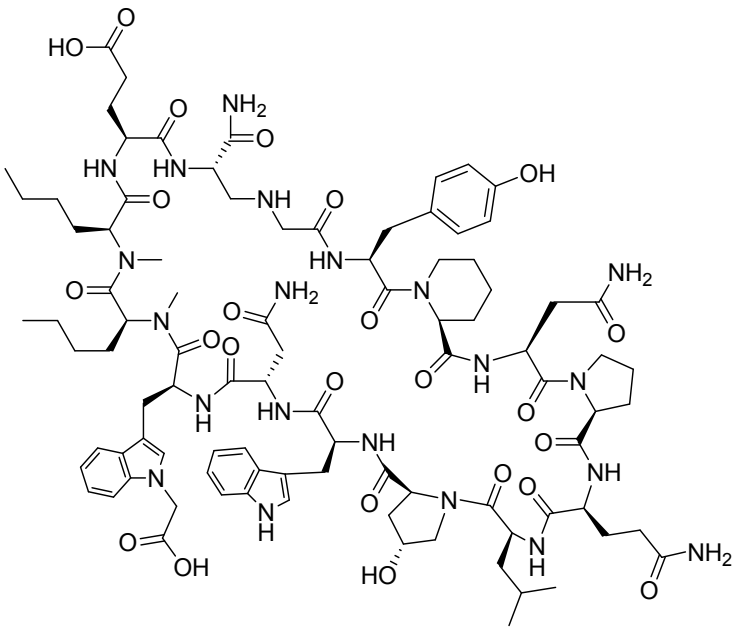


Ejemplo 9041

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 25-65% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.7 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 957.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9042

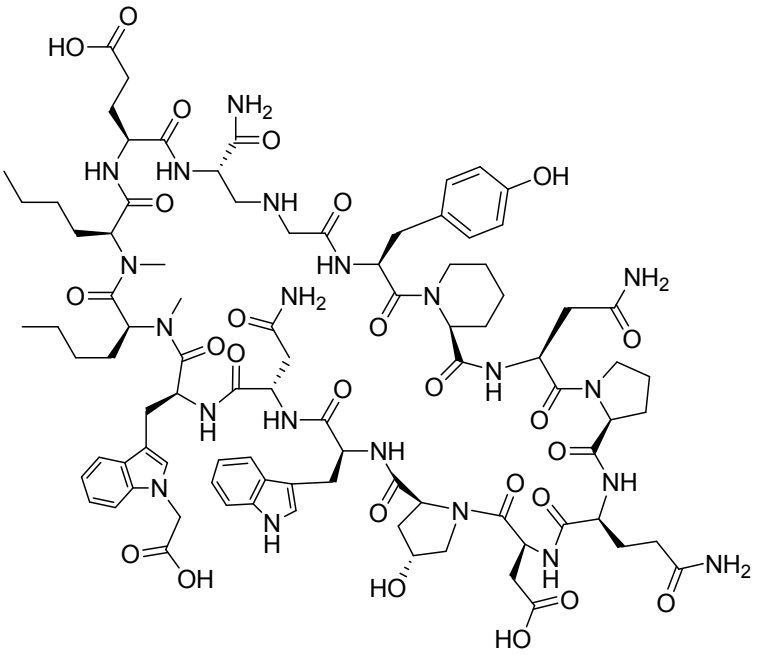


Ejemplo 9042

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente:

10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 956.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9043

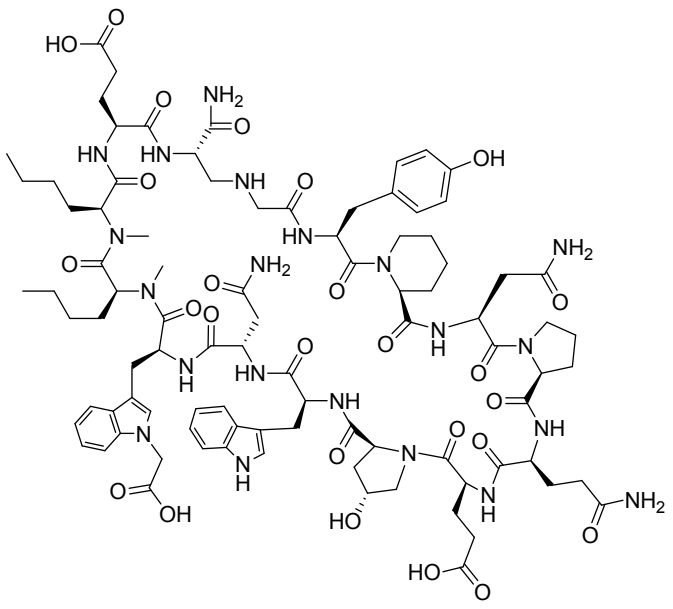


Ejemplo 9043

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 35-75% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 957.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9044

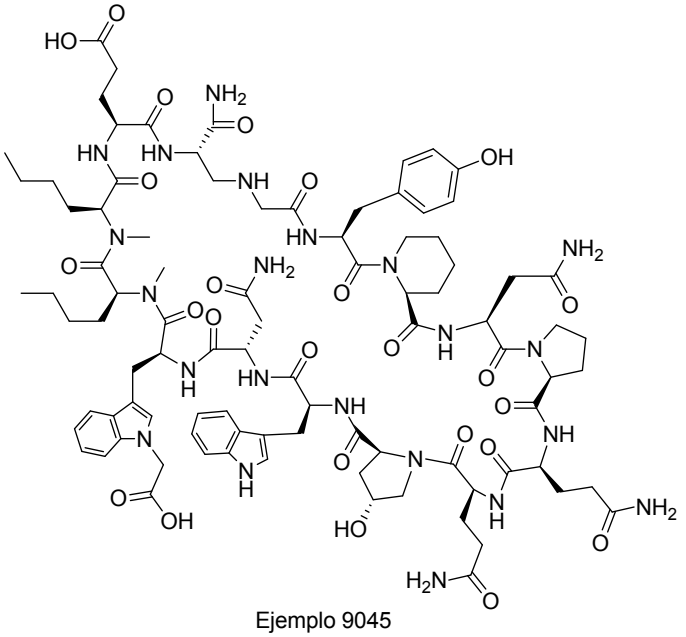


Ejemplo 9044

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%. ESI-MS(+) *m/z* 964.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9045

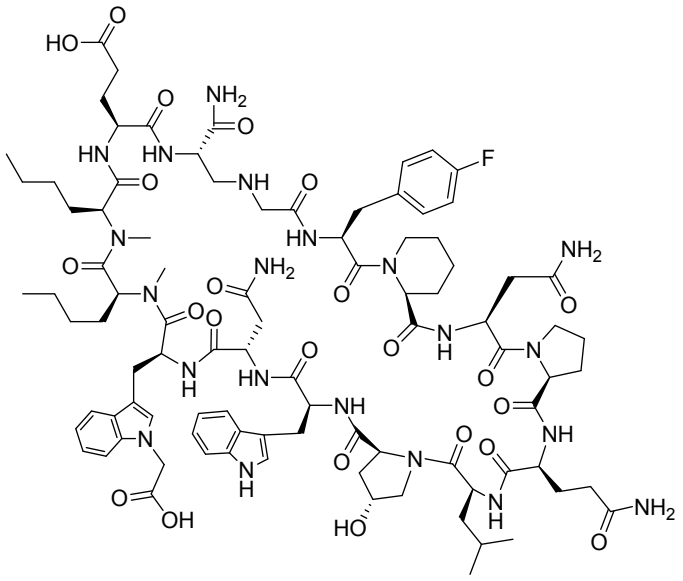


Ejemplo 9045

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 35-75% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente:

10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 99%. ESI-MS(+) *m/z* 963.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9046

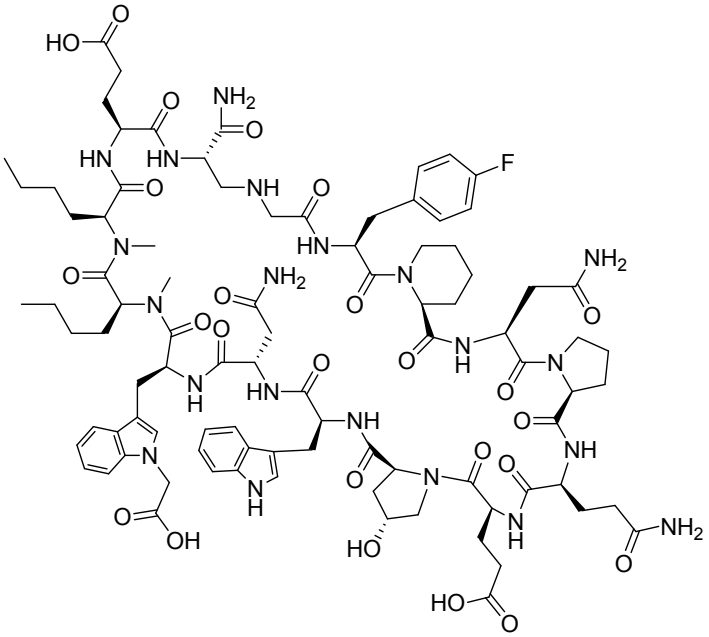


Ejemplo 9046

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 35-75% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.2 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 957.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9047

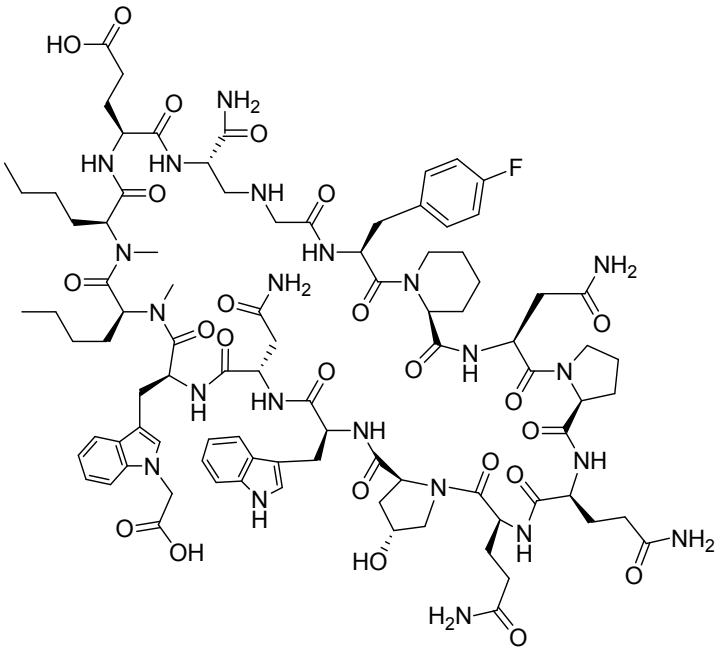


Ejemplo 9047

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge

C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 35-75% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%. ESI-MS(+) *m/z* 965.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9048

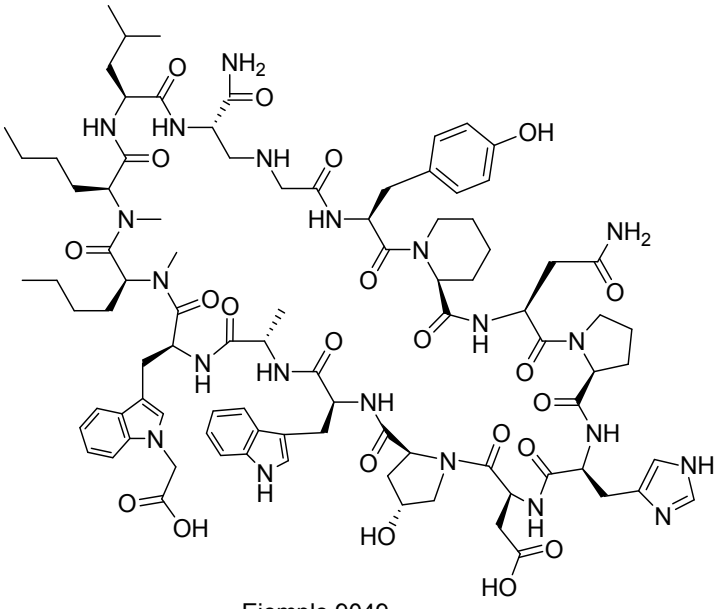


Ejemplo 9048

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 35-75% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente:

10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 6.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%. ESI-MS(+) *m/z* 965.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9049

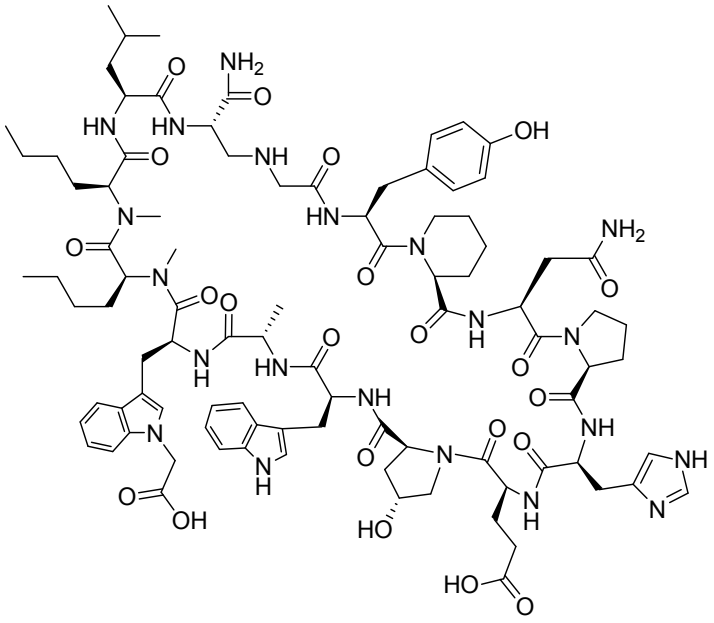


Ejemplo 9049

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 18-58% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 90%. ESI-MS(+) *m/z* 932.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9050

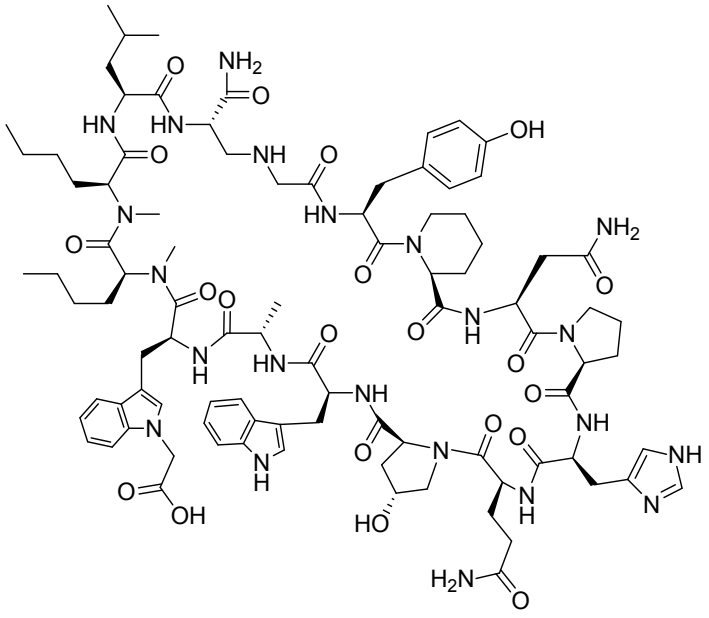


Ejemplo 9050

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 18-58% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 94%. ESI-MS(+) *m/z* 938.7 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9051

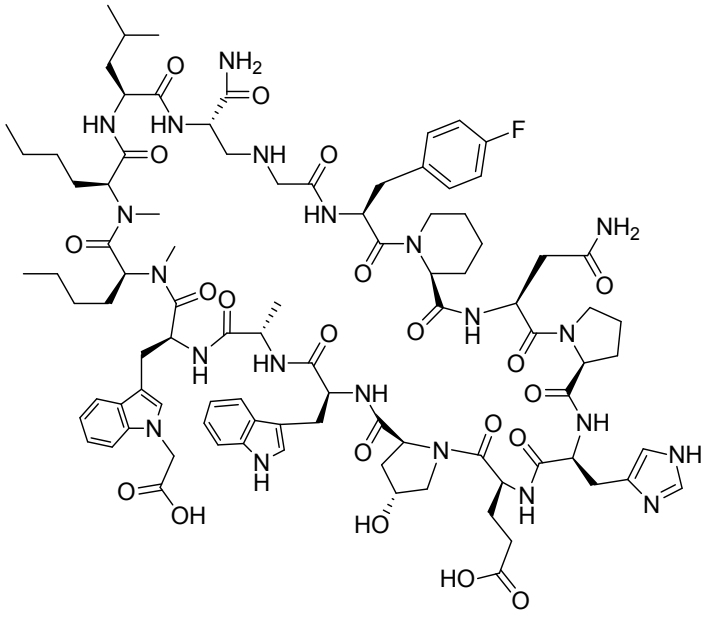


Ejemplo 9051

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético;

gradiente: 18-58% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%. ESI-MS(+) *m/z* 938.5 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9052

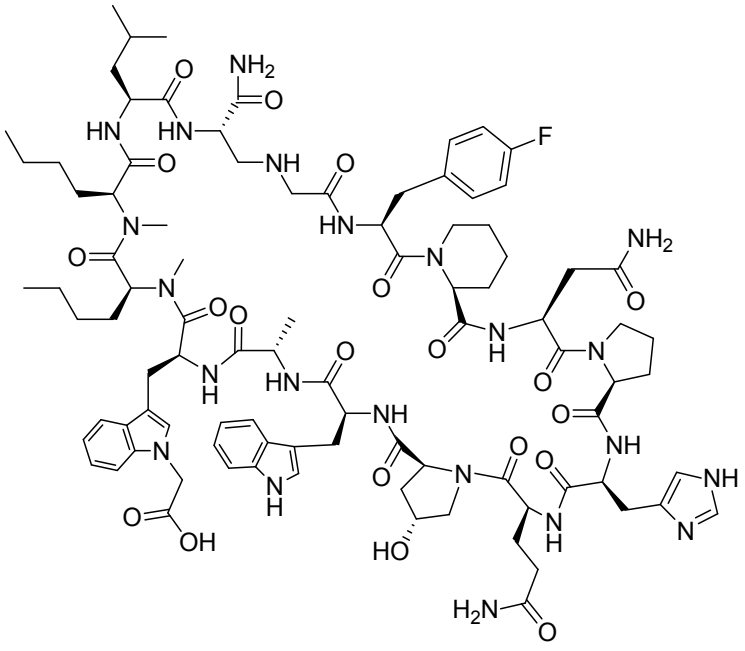


Ejemplo 9052

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 20-60% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 5.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 86%. ESI-MS(+) *m/z* 940.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9053

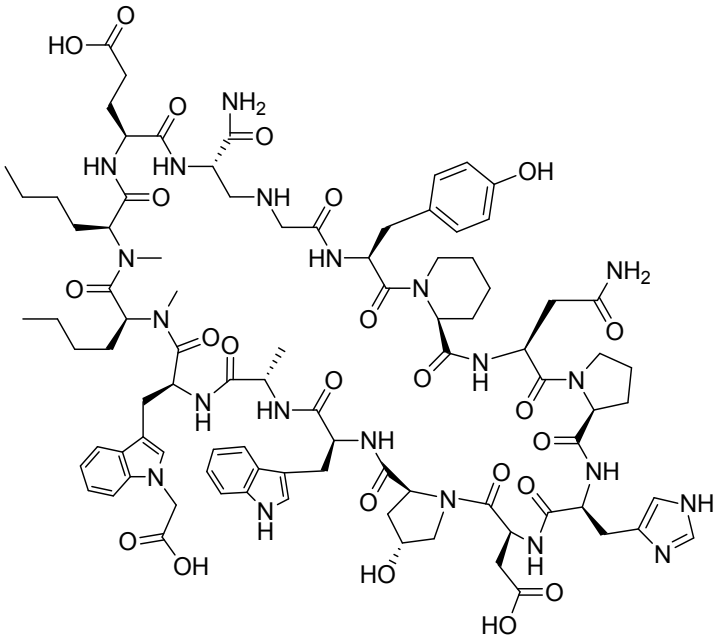


Ejemplo 9053

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 20-60% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 96%. ESI-MS(+) *m/z* 940.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9054

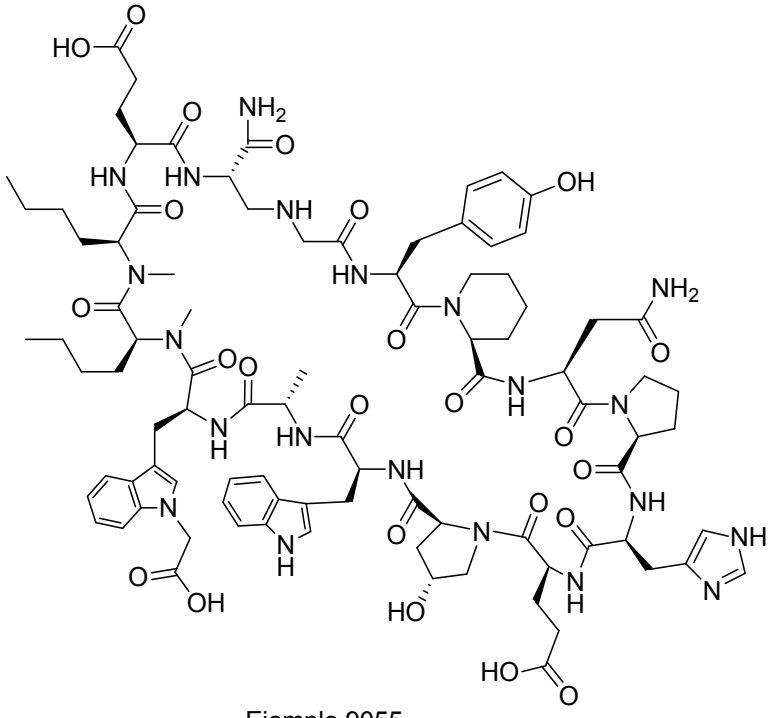


Ejemplo 9054

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 940.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9055

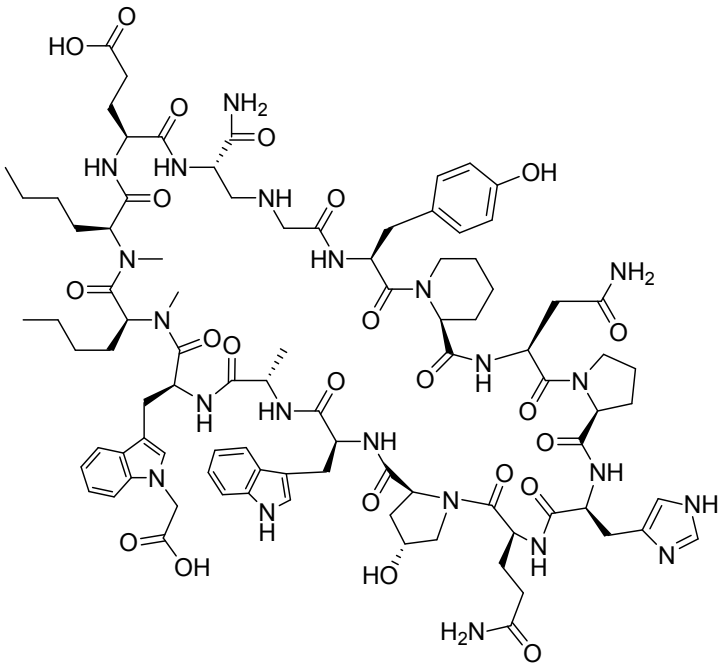


Ejemplo 9055

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

gradiente: 10-100% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 84%. ESI-MS(+) *m/z* 947.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9056

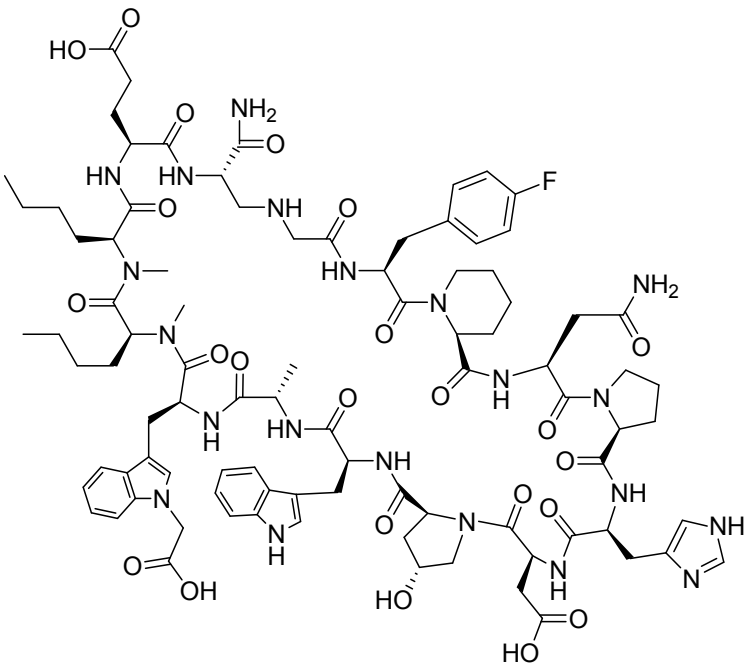


Ejemplo 9056

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-100% de B durante 15 minutos, luego un

mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 90%. ESI-MS(+) *m/z* 946.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9057

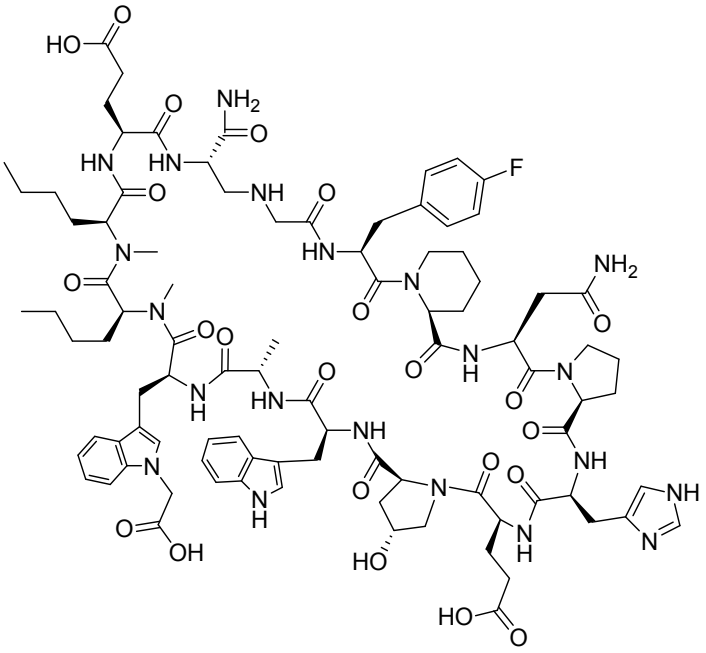


Ejemplo 9057

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 30-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.1 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 92%. ESI-MS(+) *m/z* 941.4 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9058

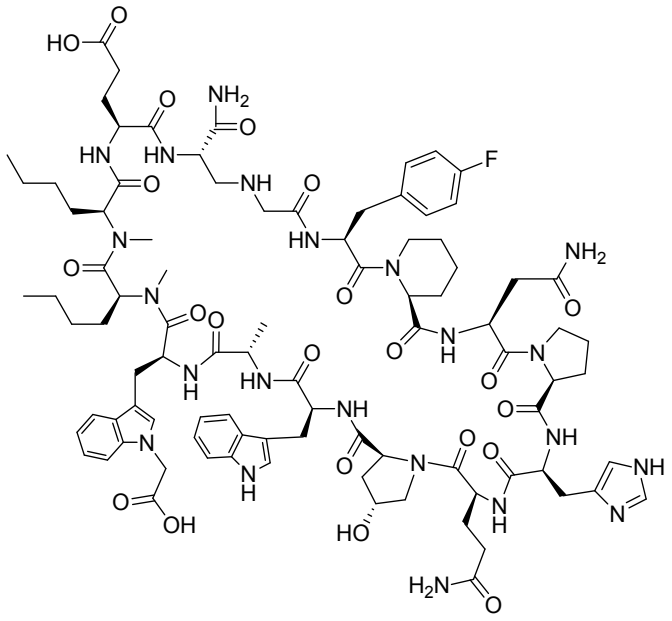


Ejemplo 9058

El material crudo se purificó mediante LC/MS

preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 30-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 4.2 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 947.6 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 9059

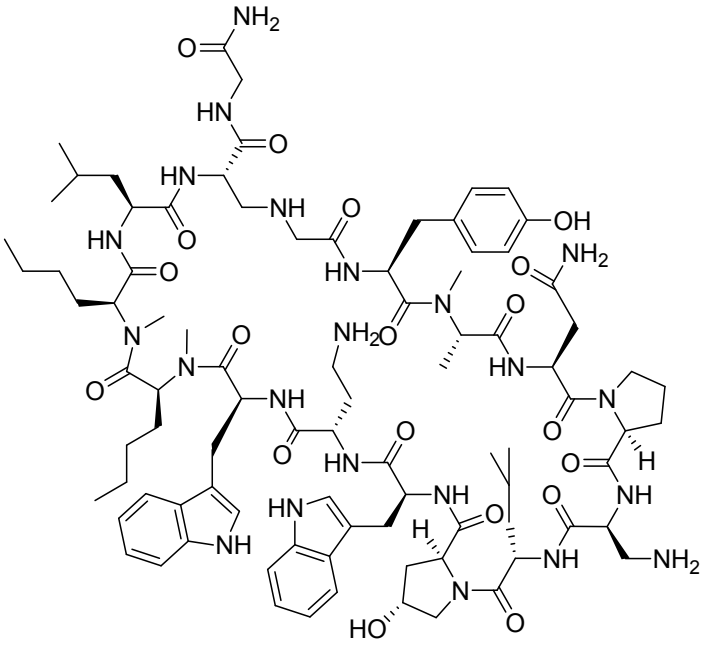


Ejemplo 9059

Fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 30-100% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; gradiente: 10-50% de B durante 20 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de

3.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 98%. ESI-MS(+) *m/z* 947.2 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10029



Ejemplo 10029

El material crudo del Ejemplo 10029 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

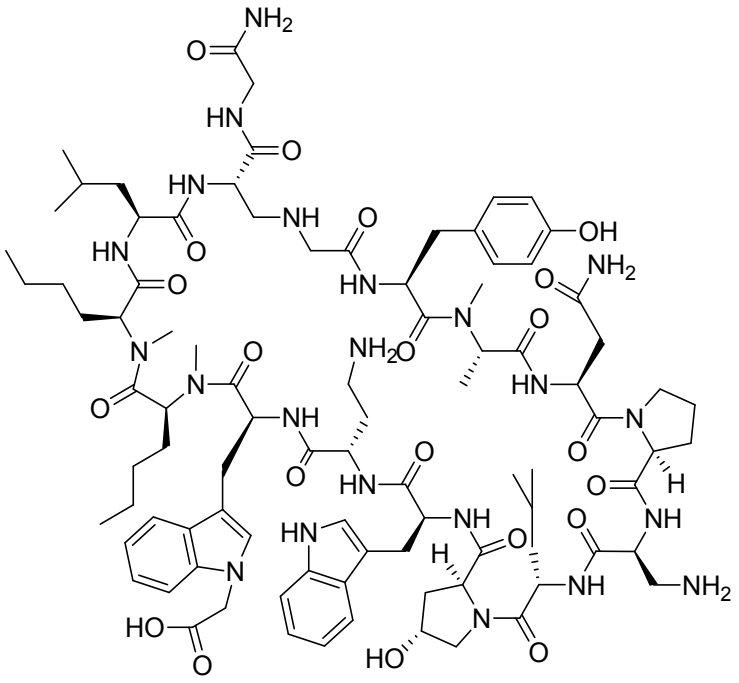
Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.24 min;

ESI-MS(+) *m/z* 907.2 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.67 min; ESI-MS(+) *m/z* 906.9 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: Calculado: 906.5014 (M+2H); Encontrado: 906.4994 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10030



Ejemplo 10030

El material crudo del Ejemplo 10030 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se

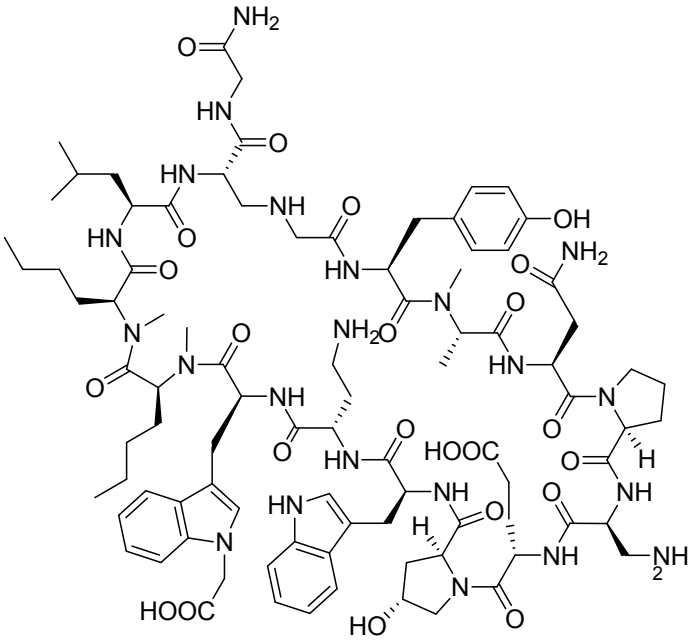
combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.65 min; ESI-MS(+) *m/z* 935.75 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.70 min; ESI-MS(+) *m/z* 935.80 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: Calculado: 935.5041 (M+2H); Encontrado: 935.5024 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10031



Ejemplo 10031

El material crudo del Ejemplo 10031 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de

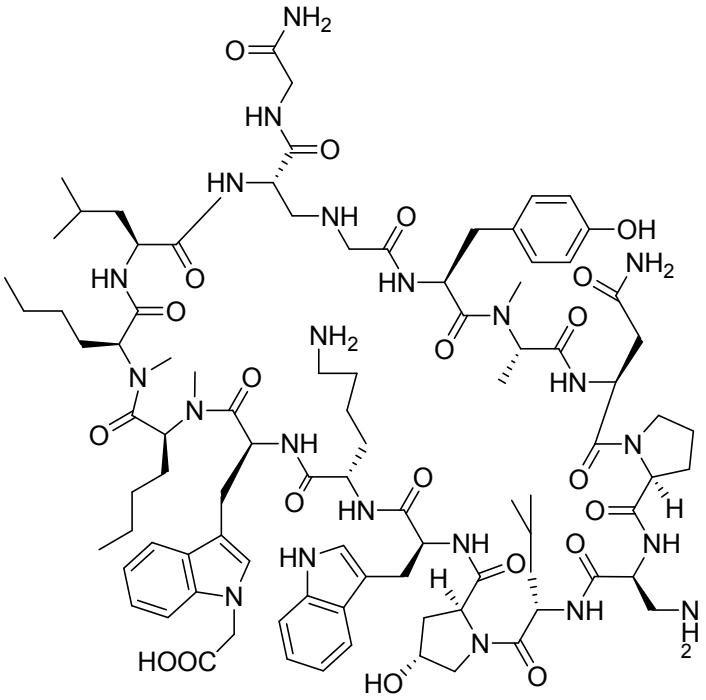
acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.14 min; ESI-MS(+) *m/z* 944.20 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.59 min; ESI-MS(+) *m/z* 94350 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: Calculado: 943.4834 (M+2H); Encontrado: 943.4808 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10032



Ejemplo 10032

El material crudo del Ejemplo 10032 se

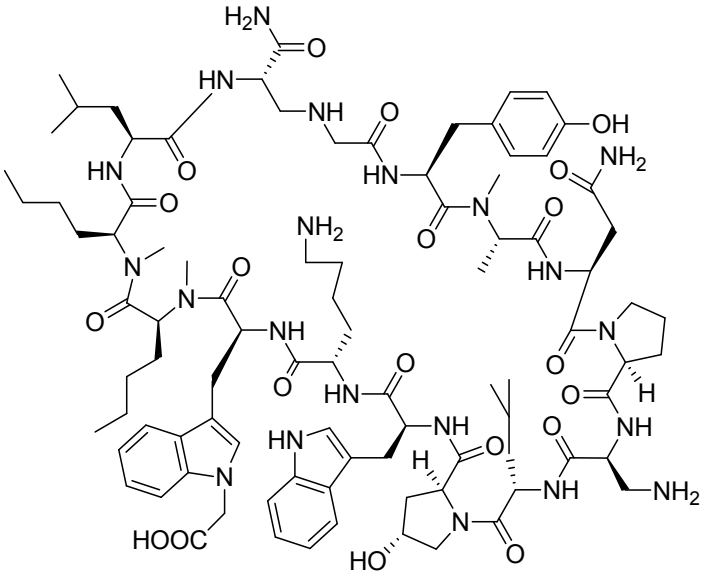
purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 3.9 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.15 min; ESI-MS(+) *m/z* 950.2 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.47 min; ESI-MS(+) *m/z* 950.3 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: Calculado: 949.5198 (M+2H); Encontrado: 949.5158 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10033



Ejemplo 10033

El material crudo del Ejemplo 10033 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 1.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

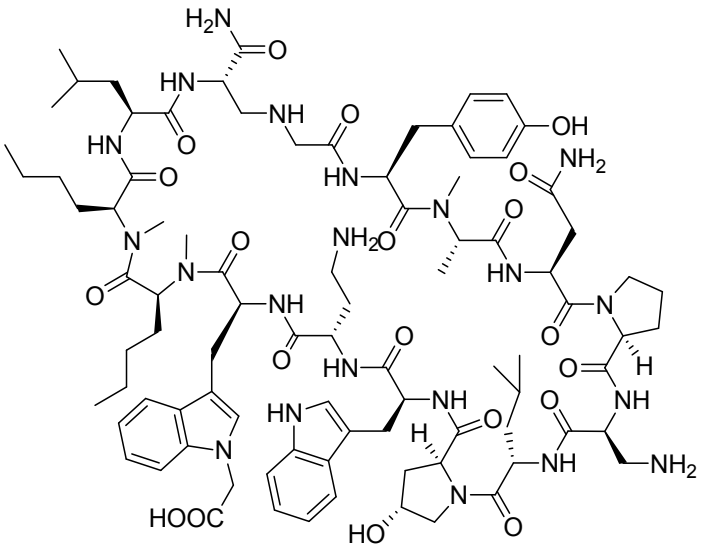
Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.17 min; ESI-MS(+) *m/z* 921.2 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.48

min; ESI-MS(+) *m/z* 920.9 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: Calculado: 921.0091 (M+2H); Encontrado: 921.0053 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10034



Ejemplo 10034

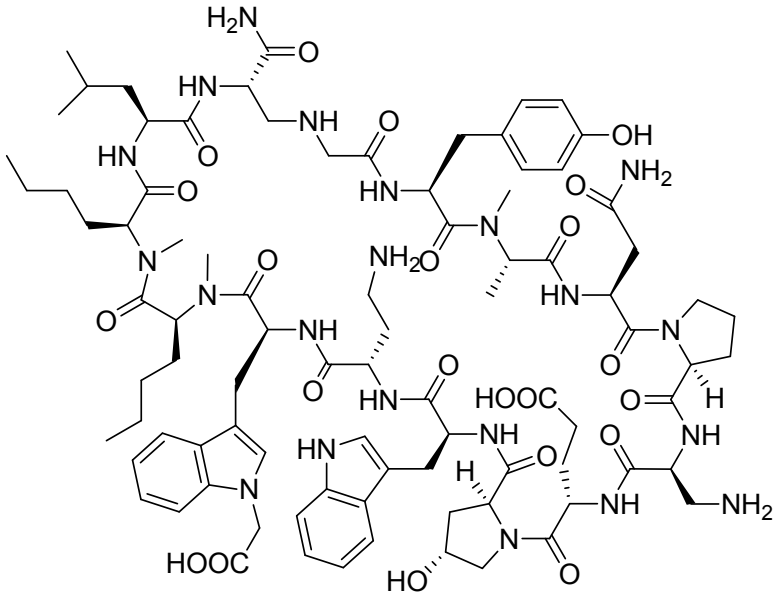
El material crudo del Ejemplo 10034 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.17 min;

ESI-MS(+) *m/z* 906.9 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.56 min; ESI-MS(+) *m/z* 907.1 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10035



Ejemplo 10035

El material crudo del Ejemplo 10035 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 0.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

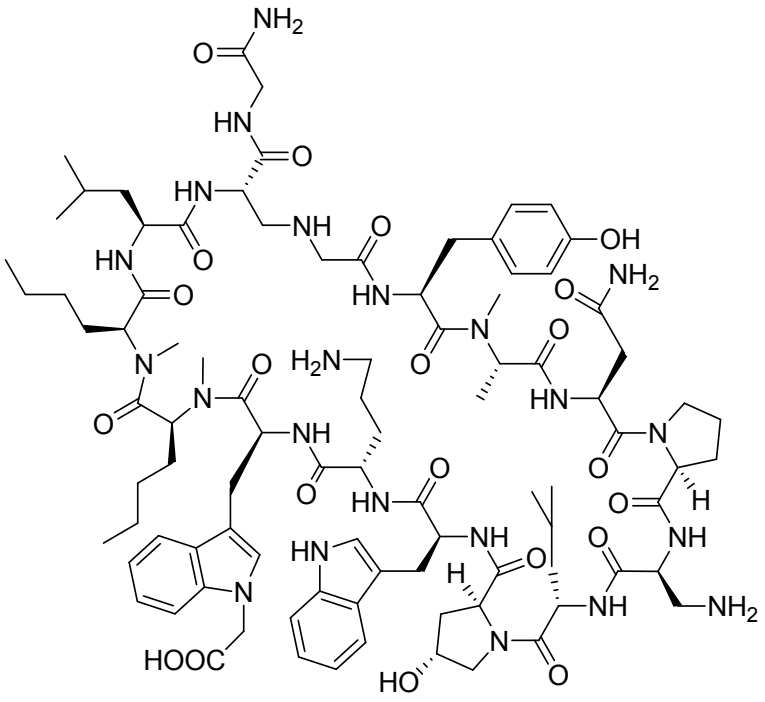
Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.15 min;

ESI-MS(+) *m/z* 915.0 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.48 min; ESI-MS(+) *m/z* 915.2 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z* : 914.9724 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10036



Ejemplo 10036

El material crudo del Ejemplo 10036 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El

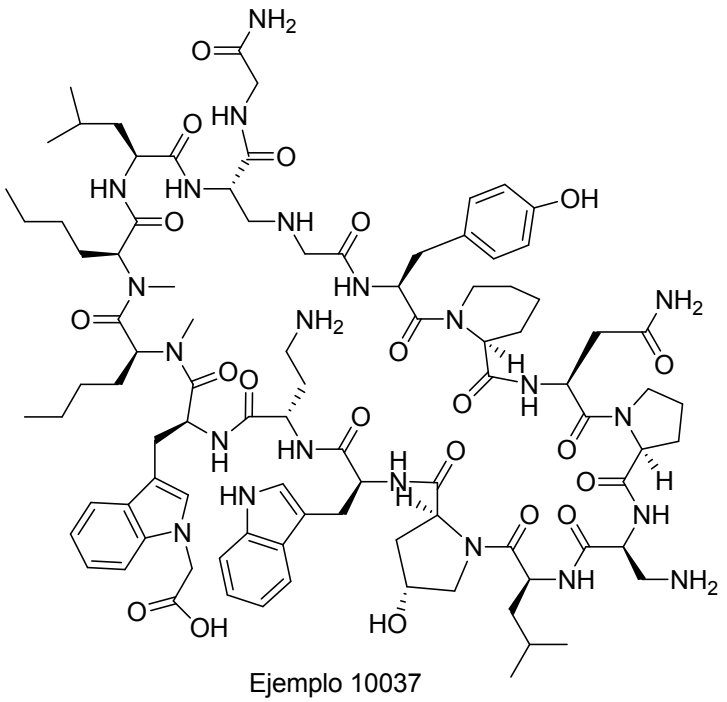
rendimiento del producto fue de 3.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.16 min; ESI-MS(+) *m/z* 943.0 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.51 min; ESI-MS(+) *m/z* 942.6 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 942.5112 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10037



Ejemplo 10037

El material crudo del Ejemplo 10037 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B;

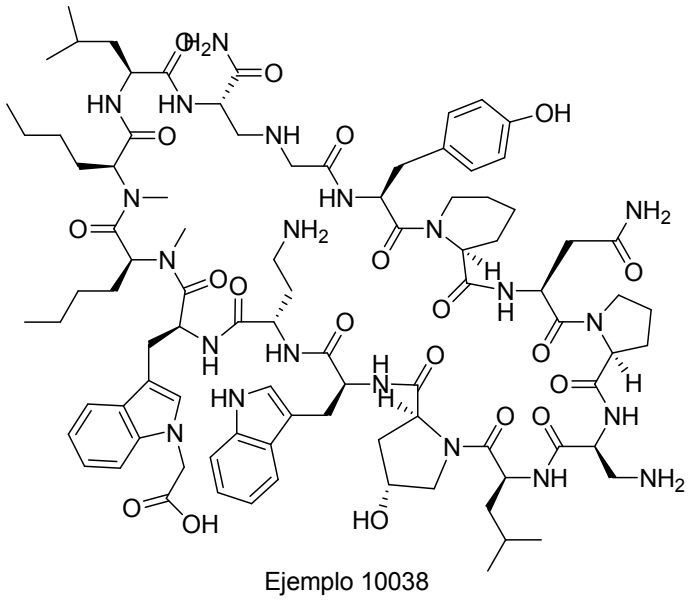
flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 20.8 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.17 min; ESI-MS(+) *m/z* 949.1 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.57 min; ESI-MS(+) *m/z* 949.1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 948.5098 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10038



Ejemplo 10038

El material crudo del Ejemplo 10038 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a

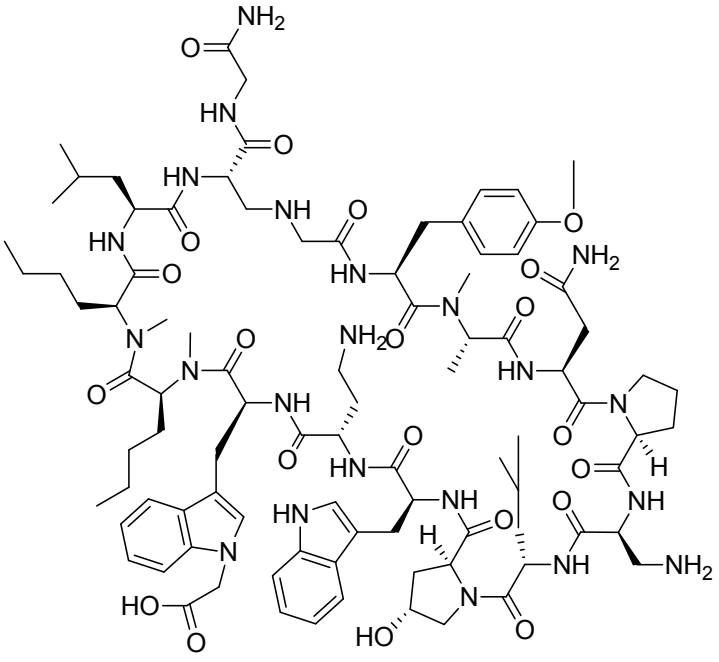
100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.20 min; ESI-MS(+) *m/z* 920.1 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.60 min; ESI-MS(+) *m/z* 921.0 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 919.9986 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10039



Ejemplo 10039

El material crudo del Ejemplo 10039 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de

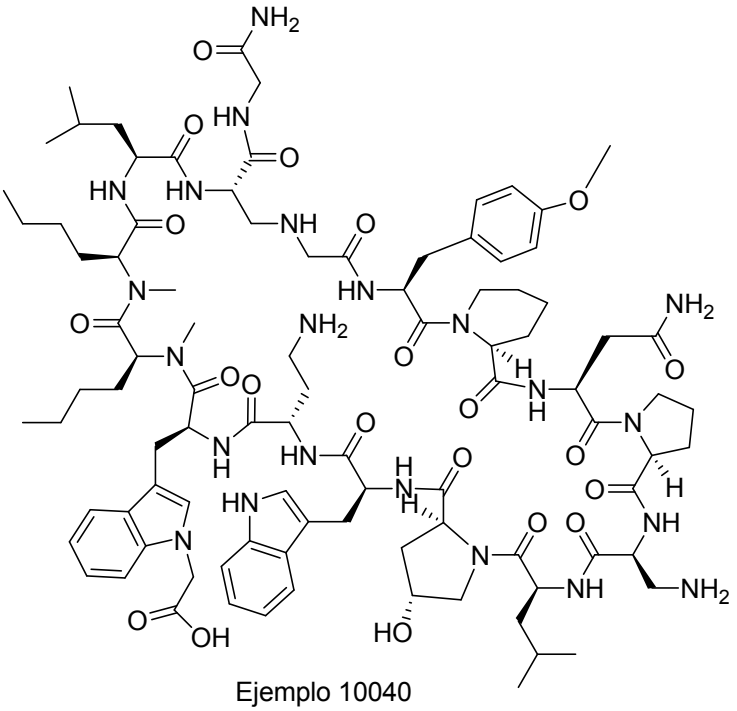
amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.4 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.24 min; ESI-MS(+) *m/z* 943.1 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.73 min; ESI-MS(+) *m/z* 943.1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 942.5096 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10040



Ejemplo 10040

El material crudo del Ejemplo 10040 se

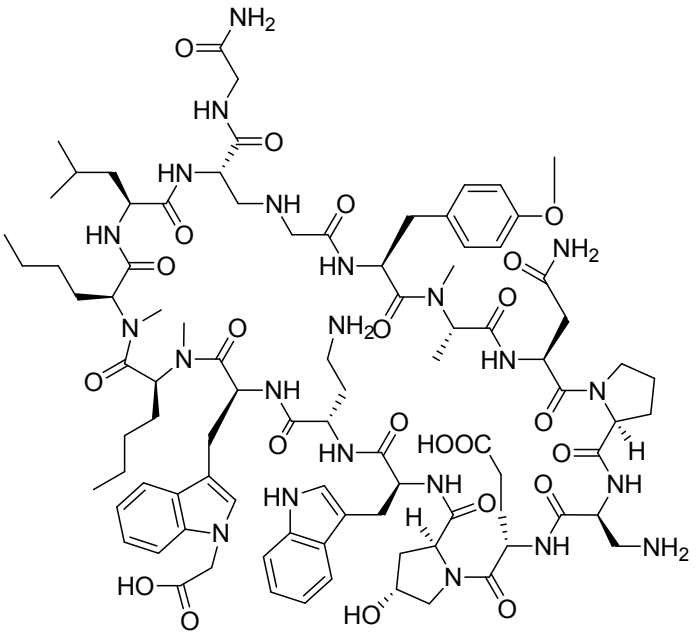
purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 8.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 100%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.28 min; ESI-MS(+) *m/z* 956.1 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.80 min; ESI-MS(+) *m/z* 956.1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 955.5169 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10041



Ejemplo 10041

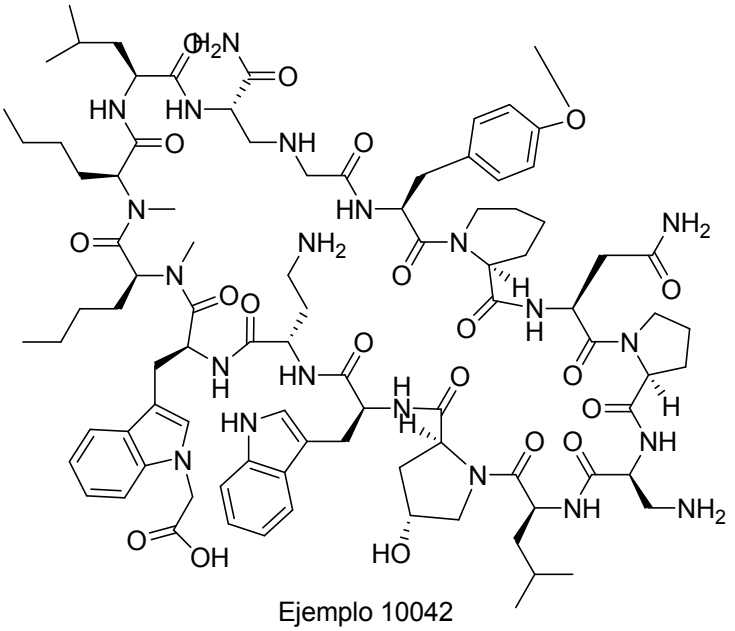
El material crudo del Ejemplo 10041 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 2.6 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 97%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.23 min; ESI-MS(+) *m/z* 950.4 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.64 min; ESI-MS(+) *m/z* 950.4 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 950.4883 (M+2H).

Preparación del Ejemplo 10042



Ejemplo 10042

El material crudo del Ejemplo 10042 se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 20-60% de B durante 15 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 14.5 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

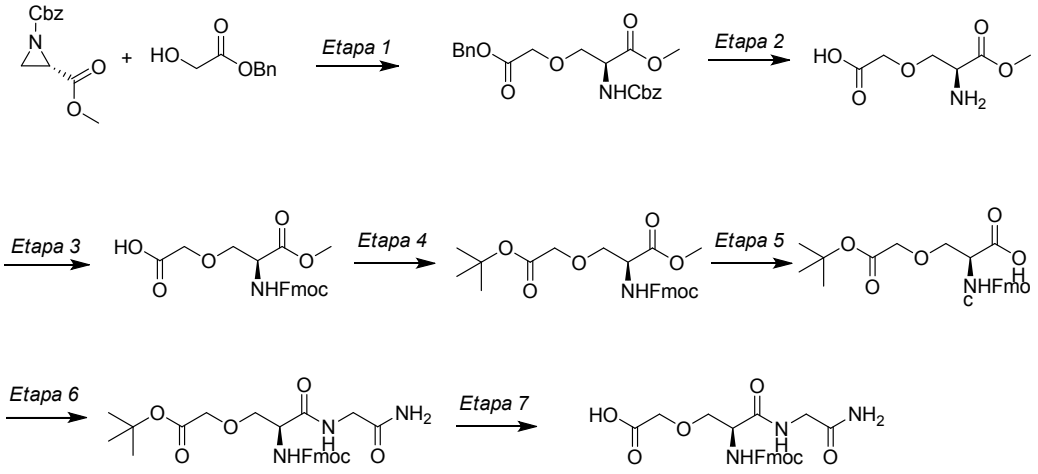
Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.47 min; ESI-MS(+) *m/z* 926.9 (M+2H).

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 1.83 min; ESI-MS(+) *m/z* 926.2 (M+2H).

ESI-HRMS(+) *m/z*: 927.0048 (M+2H).

Preparación de ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-((2-amino-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)acético

Esquema de reacción:



Etapa 1:

Se disolvieron 2-metil aziridin-1,2-dicarboxilato de (S)-1-bencilo (5.105 g, 21.70 mmol) y 2-hidroxiacetato de bencilo (6.16 mL, 43.4 mmol) en DCM (43.4 mL), se enfriaron a 0°C, y luego se agregó BF3.OEt2 (0.275 mL, 2.170 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. TLC mostró que el material de inicio de aziridina se había consumido. La reacción se agitó durante 14 h más. La solución saturada de bicarbonato de

sodio se agregó a la reacción, y la mezcla bifásica se agitó vigorosamente durante 20 min. La reacción se diluyó con DCM y se separó de la fase acuosa. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando 10-40% de EtOAc/hexanos. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío para obtener O-(2-(benciloxi)-2-oxoetil)-N-((benciloxi)carbonil)-L-serinato de metilo, 3.0 (34%). ESI-MS(+) *m/z* 402.1 (M+1). RMN-^{1}H (400MHz, CLOROFORMO-d) d 7.43 - 7.30 (m, 10H), 5.95 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.50 (dt, *J*=8.4. 3.1 Hz, 1H), 4.12 (d, *J*=2.8 Hz, 2H), 4.10 - 4.04 (m, 1H), 3.81 (dd, *J*=9.4. 3.1 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H).

Etapa 2:

Se disolvió 3-(2-(benciloxi)-2-oxoetoxi)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoato de (S)-metilo (3 g, 7.47 mmol) en MeOH (37.4 mL) y se colocó en una atmósfera de N_2. Se agregó Pd-C (0.398 g, 0.374 mmol) a la solución con agitación vigorosa. La reacción se colocó en una atmósfera de H_2 y se agitó durante 16 h. La reacción se filtró a través de celite y se concentró al vacío para obtener ácido (S)-2-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropoxi)acético, 1.32 g, (100%), que se usó en la etapa 3 sin purificación adicional. ESI-MS(+) *m/z* 178.1 (M+1).

Etapa 3:

Se disolvió ácido (S)-2-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropoxi)acético (1.323 g, 7.47 mmol) en THF (29.9 mL), y luego se agregó agua (29.9 mL). Luego se agregó bicarbonato de sodio (1.255 g, 14.94 mmol) y (2,5-dioxopirrolidin-1-il)carbonato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2.52 g, 7.47 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La mayor parte de THF se retiró al vacío, y luego se agregó Et_2O. La capa orgánica se descartó, y la capa acuosa se volvió a lavar con Et_2O. La fase acuosa se recolectó, se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metoxi-3-oxopropoxi)acético, 2.76 g (93%), que no se volvió a purificar. ESI-MS(+) *m/z* 400.1 (M+1).

Etapa 4:

A una solución de ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metoxi-3-oxopropoxi)acético (3.78 g, 9.46 mmol) en acetato de etilo (40.6 mL) y hexanos (15.05 mL), se agregó por goteo 2,2,2-tricloroacetimidato de terc-butilo (1.692 mL, 9.46 mmol). Luego de 15 min, se agregó $BF_3 \cdot OEt_2$ (0.060 mL, 0.473 mmol), y la reacción se agitó durante 1 h. Se agregó 2,2,2-tricloroacetimidato de terc-butilo adicional (1.692 mL, 9.46 mmol) y luego, $BF_3 \cdot OEt_2$ (0.060 mL, 0.473 mmol), y se agitó durante 1 h. El proceso

se repitió una vez más, se agregó 2,2,2-tricloroacetimidato de terc-butilo (1.692 mL, 9.46 mmol) y luego, $BF_3 \cdot OEt_2$ (0.060 mL, 0.473 mmol), y se agitó durante 1 h. Se agregó bicarbonato saturado a la reacción y se agitó durante 15 min. La fase orgánica se recolectó, se lavó con salmuera, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener el producto crudo que se volvió a purificar mediante cromatografía flash, usando 20-30% de EtOAc/hexanos como eluyente. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío para obtener N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-O-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-L-serinato de metilo, 3.9 g, (90%). ESI-MS(+) *m/z* 478.1 (M+Na).

Etapa 5:

Se disolvió 2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi)propanoato de (S)-metilo (3.9 g, 8.56 mmol) en DCE (42.8 mL), y luego se agregó trimetilestannanol (3.10 g, 17.12 mmol). La reacción se agitó a 80°C durante 5 h. El solvente se retiró al vacío, y el residuo se volvió a disolver en EtOAc y se lavó con HCl 1 N, 3x, luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener el producto deseado. La RMN mostró restos de estaño. El material se volvió a disolver en EtOAc y se lavó con $KHSO_4$ 0.1 M, 3x, y luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó

en sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-O-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-L-serina, 3.36 g (89%). ESI-MS(+) *m/z* 464.0 (M+Na). RMN-^{1}H (400MHz, CLOROFORMO-d) d 7.78 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.66 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.45 - 7.38 (m, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 2H), 6.44 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 4.55 - 4.33 (m, 3H), 4.26 (t, *J*=7.3 Hz, 1H), 4.12 - 4.01 (m, 3H), 3.82 (dd, *J*=9.7. 4.4 Hz, 1H), 1.52 (s, 9H).

Etapa 6:

Se suspendieron ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(terc-butoxi)-6-oxohexanoico (850 mg, 1.934 mmol), 2-aminoacetamida, HCl (278 mg, 2.51 mmol) en DCM (9670 µl), luego se agregó base de Hunig (1013 µl, 5.80 mmol) y luego, HATU (809 mg, 2.127 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM y se lavó con HCI 1 N, luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando 20-60% de acetona/DCM. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío para obtener el producto deseado, 789 mg (82%). ESI-MS(+) *m/z* 498.1 (M+H).

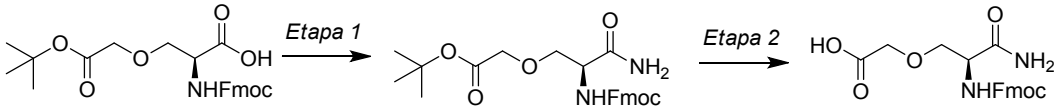
Etapa 7:

Se disolvió 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-((2-amino-2-oxoetil)amino)-3-

oxopropoxi)acetato de (S)-terc-butilo (1.25 g, 2.51 mmol) en HCl (4 N en dioxano) (15 mL, 60.0 mmol). La reacción se agitó durante 4 h. El solvente se retiró al vacío para obtener ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-((2-amino-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)acético, 1.11 g (100%). ESI-MS(+) *m/z* 442.0 (M+H).

Preparación de ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético

Esquema de reacción:



Etapa 1:

Se suspendieron ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi)propanoico (1.875 g, 4.25 mmol) (síntesis descrita en otra parte) y cloruro de amonio (0.568 g, 10.62 mmol) en DMF (21.24 mL), luego se agregó base de Hunig (2.225 mL, 12.74 mmol) y luego, HATU (1.776 g, 4.67 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM y se lavó con HCI 1 N, luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando 20-40% de acetona/DCM. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío

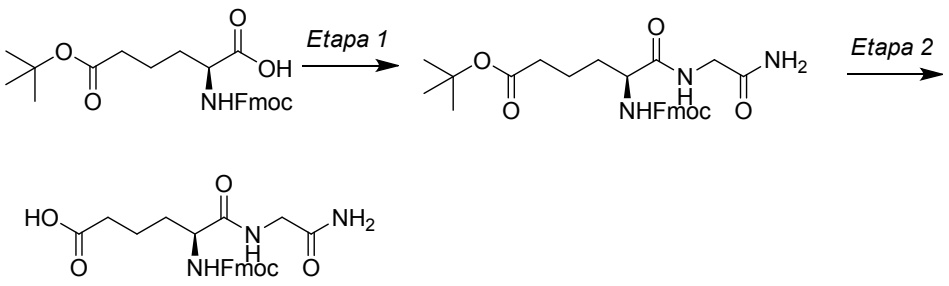
para obtener (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acetato de terc-butilo, 1.43 g (76%). ESI-MS(+) *m/z* 441.0 (M+1). RMN-^{1}H (400MHz, CLOROFORMO-d) d 7.78 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.65 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.46 - 7.38 (m, 2H), 7.36 - 7.30 (m, 2H), 6.99 (d, *J*=17.3 Hz, 1H), 6.44 (br. s., 1H), 5.46 (br. s., 1H), 4.43 (d, *J*=6.3 Hz, 2H), 4.31 (br. s., 1H), 4.27 - 4.21 (m, 1H), 4.16 - 3.95 (m, 3H), 3.73 - 3.64 (m, 1H), 1.51 (s, 9H).

Etapa 2:

Se disolvió 2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acetato de (S)-terc-butilo (1.432 g, 3.25 mmol) en HCl (4 N en dioxano) (15 mL, 60.0 mmol). La reacción se agitó durante 4 h. El solvente se retiró al vacío para obtener ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético, 1.25 g (100. ESI-MS(+) *m/z* 385.0 (M+1).

Preparación de ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico

Esquema de reacción:



Etapa 1:

Se suspendieron ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(terc-butoxi)-6-oxohexanoico (850 mg, 1.934 mmol), 2-aminoacetamida, HCl (278 mg, 2.51 mmol) en DCM (9670 µl), luego se agregó base de Hunig (1013 µl, 5.80 mmol) y luego, HATU (809 mg, 2.127 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM y se lavó con HCI 1 N, luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando 20-60% de acetona/DCM. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío para obtener (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoato de terc-butilo, 789 mg (82%). ESI-MS(+) *m/z* 496.1 (M+1). RMN-^{1}H (400MHz, CLOROFORMO-d) d 7.78 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 2H), 7.35 - 7.30 (m, 2H), 6.78 (br. s., 1H), 6.42 (br. s., 1H), 5.71 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 5.45 (br. s., 1H), 4.44 (d, *J*=6.8 Hz, 2H), 4.25 - 4.19 (m, 1H), 4.10 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 3.97 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 2.36 - 2.24 (m, 2H), 1.90 (br. s., 1H), 1.76 - 1.55 (m, 3H), 1.46 (s, 9H)

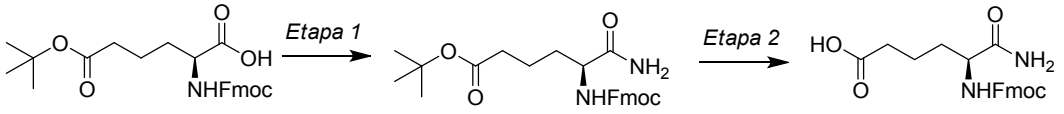
Etapa 2:

Se disolvió 5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-

oxohexanoato de (S)-terc-butilo (0.789 g, 1.593 mmol) en HCl (4 N en dioxano) (15 mL, 60.0 mmol). La reacción se agitó durante 6 h. El solvente se retiró al vacío para obtener ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico, 700mg (100%). ESI-MS(+) *m/z* 440.0 (M+1).

Preparación de ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico

Esquema de reacción:



Etapa 1:

Se suspendieron ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(terc-butoxi)-6-oxohexanoico (2.5 g, 5.69 mmol) y cloruro de amonio (0.761 g, 14.22 mmol) en DMF (28.4 mL), se agregó base de Hunig (2.98 mL, 17.06 mmol) y luego, HATU (2.379 g, 6.26 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La reacción se diluyó con Et_2O y se lavó con HCl 1 N, luego con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando 0-20% de acetona/DCM. Las fracciones de producto se recolectaron, y el solvente se retiró al vacío para obtener (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoato de terc-butilo, 1.89 g (76%). ESI-MS(+) *m/z*

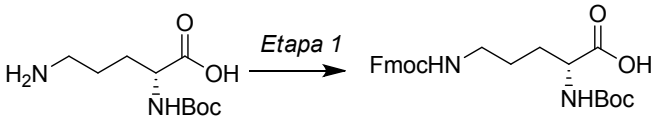
439.0 (M+1).

Etapa 2:

Se disolvió 5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoato de (S)-terc-butilo (1.89 g, 4.31 mmol) en HCl (4 N en dioxano) (15 mL, 60.0 mmol). La reacción se agitó durante 4 h. El solvente se retiró al vacío para obtener ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico, 1.65 g, (100. ESI-MS(+) *m/z* 385.0 (M+1). RMN-^{1}H (400MHz, METANOL-d4) d 7.80 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.71 - 7.65 (m, 2H), 7.43 - 7.36 (m, 2H), 7.35 - 7.29 (m, 2H), 4.47 - 4.35 (m, 2H), 4.26 - 4.21 (m, 1H), 4.09 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 2.32 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 1.88 - 1.57 (m, 4H).

Preparación de ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico

Esquema de reacción:

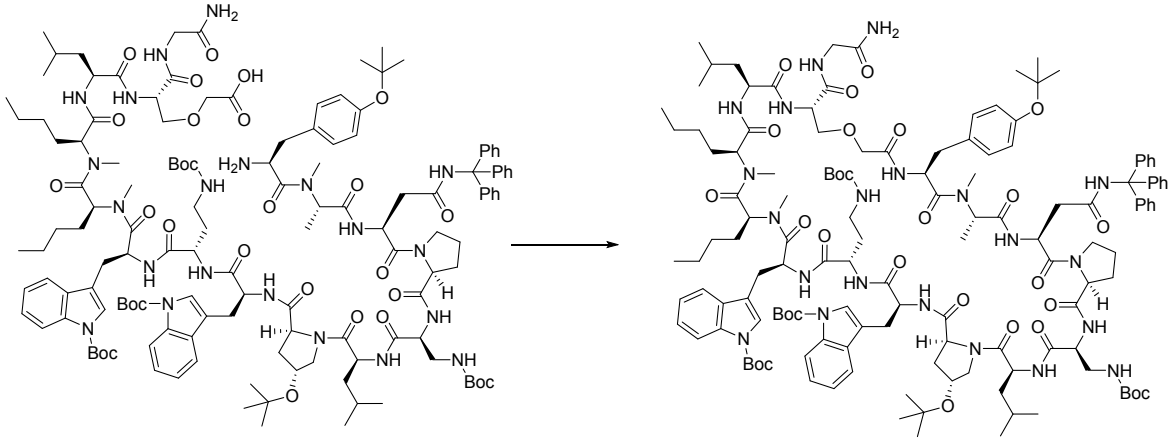


Etapa 1:

Se disolvió ácido (R)-5-amino-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico (4.77 g, 20.54 mmol) en THF (82 mL), y luego se agregó agua (82 mL). Luego se agregó bicarbonato de sodio (3.45 g, 41.1 mmol) y (2,5-dioxopirrolidin-1-il)carbonato de (9H-fluoren-9-il)metilo (6.93 g, 20.54 mmol). La reacción se agitó durante 2 h. La mayor parte de THF se retiró al vacío, y luego se agregó Et_2O. La capa orgánica se descartó, y la capa acuosa se volvió a lavar con Et_2O. La fase acuosa se recolectó, se acidificó con HCl 1

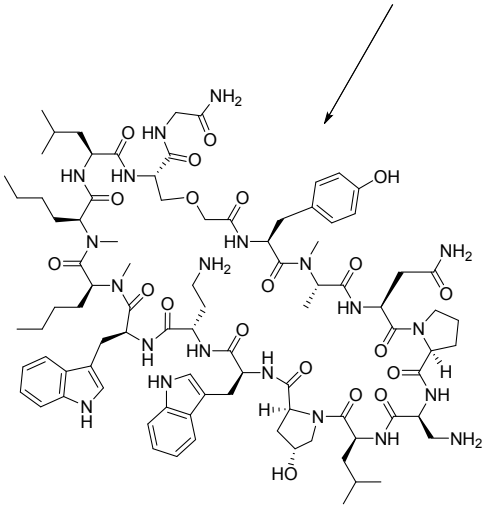
N y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se recolectó, se secó en sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico, 8.76 g (94%). ESI-MS(+) *m/z* 454.9 (M+1).

Preparación del Ejemplo 10504



Intermediario 10504A

Intermediario 10504B



Ejemplo 10504

Preparación del Intermediario 10504A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A". Se

usó ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-((2-amino-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)acético en el "procedimiento de carga de resina". Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente

durante 15 minutos, luego se filtró. El filtrado se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10501A.

Preparación del Intermediario 10504B:

A un vial de 40 mL cargado con la totalidad del Intermediario 10504A antes preparado, se agregó DCM (20 mL), luego HATU (38 mg, 0.10 mmol) y luego DIPEA (0.114 mL, 0.650 mmol). La solución se agitó durante 2 h. La solución se secó al vacío para obtener el Intermediario 10504B.

Preparación del Ejemplo 10504:

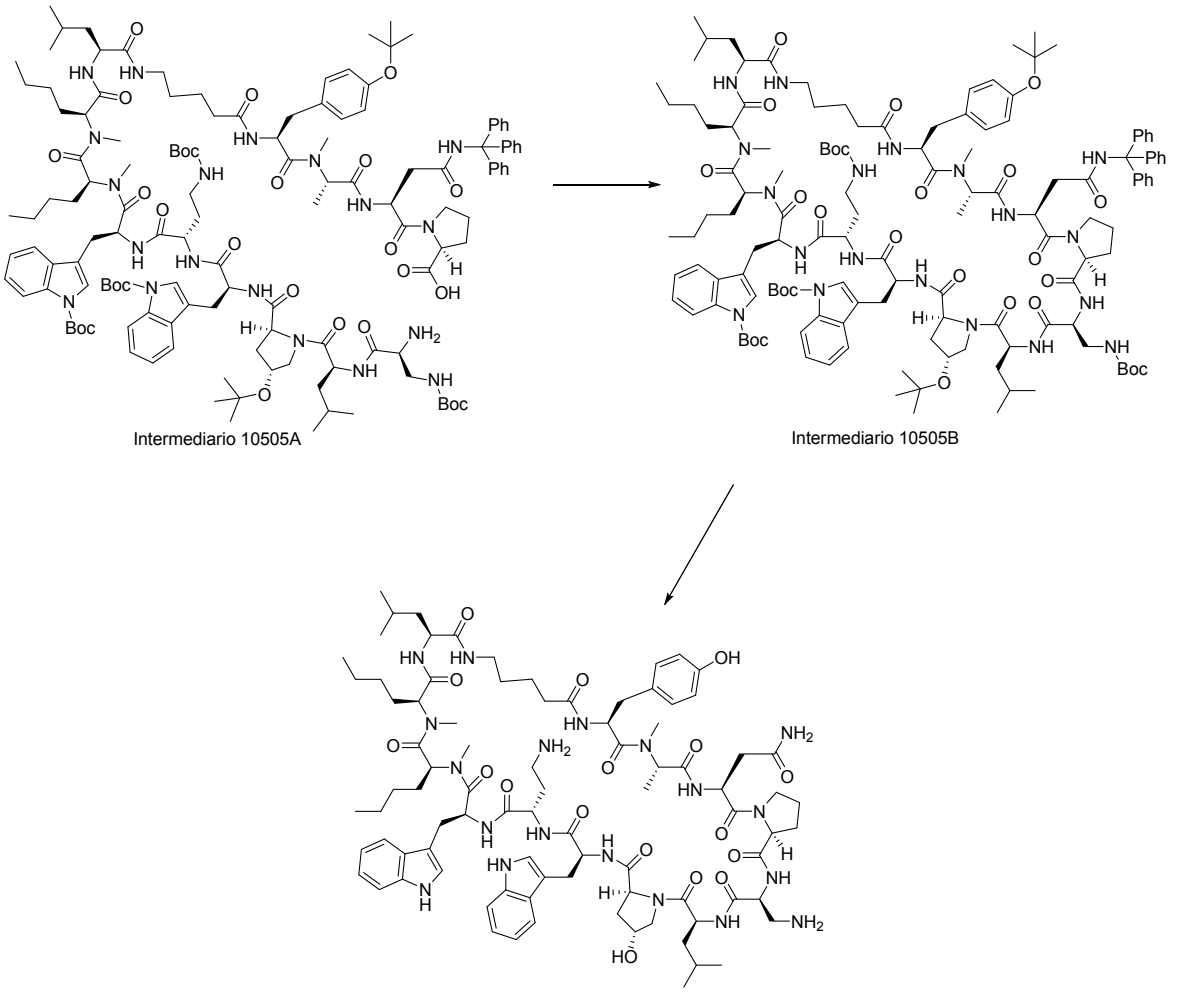
Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 5 dram cargado con la totalidad del Intermediario 10504A antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 20 minutos en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de cetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase

móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 0-40% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.3 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 93%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.58 min; ESI-MS(+) *m/z* 936.1 (M+2H)

Condición de análisis B: Tiempo de retención = 2.70 min; ESI-MS(+) *m/z* 935.9 (M+2H)

Preparación del Ejemplo 10505



Ejemplo 10505

Preparación del Intermediario 10505A:

Se siguió la "secuencia de síntesis general A" con la excepción de que la etapa de carga no fue necesaria debido a que se usó una resina Fmoc-L-Pro-2-clorotritilo precargada. Se usó ácido 5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)pentanoico en la 4.a etapa de formación del enlace de amida. Al recipiente de reacción que contenía la resina de la secuencia automatizada, se agregó

piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL). La mezcla se agitó periódicamente durante 4 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DCM (2.0 mL) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de que la solución drenara a través de la frita. La resina luego se transfirió inmediatamente usando DCM (8 mL) a un vial de 15 mL. A la solución se agregó hexafluoroisopropanol (2 mL). La resina inmediatamente se tornó de color rojo oscuro; la solución permaneció incolora. La mezcla se agitó en forma manual brevemente, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego se filtró. El filtrado se transfirió a un vial de 15 mL y se concentró en un flujo de N_2 para obtener un residuo sólido, el Intermediario 10501A.

Preparación del Intermediario 10505B:

A un vial de 40 mL cargado con la totalidad del Intermediario 10504A antes preparado, se agregó DCM (20 mL), luego HATU (76 mg, 0.20 mmol) y luego DIPEA (0.052 mL, 0.30 mmol). La solución se agitó durante 2 h. La solución se secó al vacío para obtener el Intermediario 10504B.

Preparación del Ejemplo 10505:

Se preparó una "solución de desprotección" combinando, en un vial de vidrio de 40 mL, ácido trifluoroacético (23.75 mL), 1,4-ditio-DL-treitol (625 mg), triisopropilsilano (0.625 mL). A un vial de 18.48 ml (5 dram) cargado con la totalidad del Intermediario 10504A antes preparado, se agregó la "solución de desprotección" (2.0 mL). La solución se mezcló durante 20 minutos en un agitador a 500 rpm, luego se vertió en un tubo de ensayo de 25 mL cargado con Et_2O (15 mL). Una pequeña cantidad de sólido blanco se precipitó. La mezcla se centrifugó; el líquido se decantó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (15 mL). La mezcla se centrifugó, el líquido se decantó. El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de cetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 10-50% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a

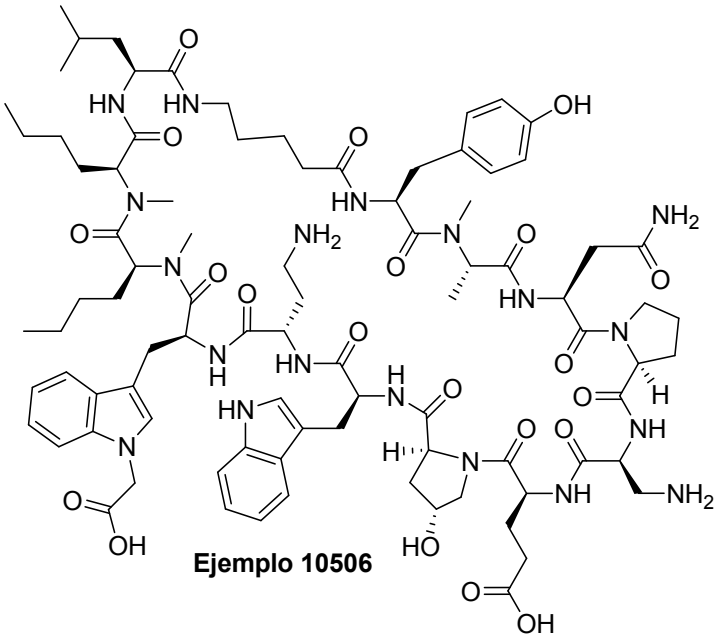
100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El material se volvió a purificar mediante LC/MS preparativa en las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; gradiente: 0-40% de B durante 30 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. El rendimiento del producto fue de 7.0 mg, y la pureza calculada mediante el análisis de LCMS fue de 95%.

Condición de análisis A: Tiempo de retención = 1.56 min; ESI-MS(+) *m/z* 927.0 (M+2H) Condición de análisis C: Tiempo de retención = 1.49 min; ESI-MS(+) *m/z* 927.1 (M+2H) 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético;

temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.52 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 922.9 *m/z*. 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.52 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 922.9 *m/z*. 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1%

de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.52 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 922.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10506

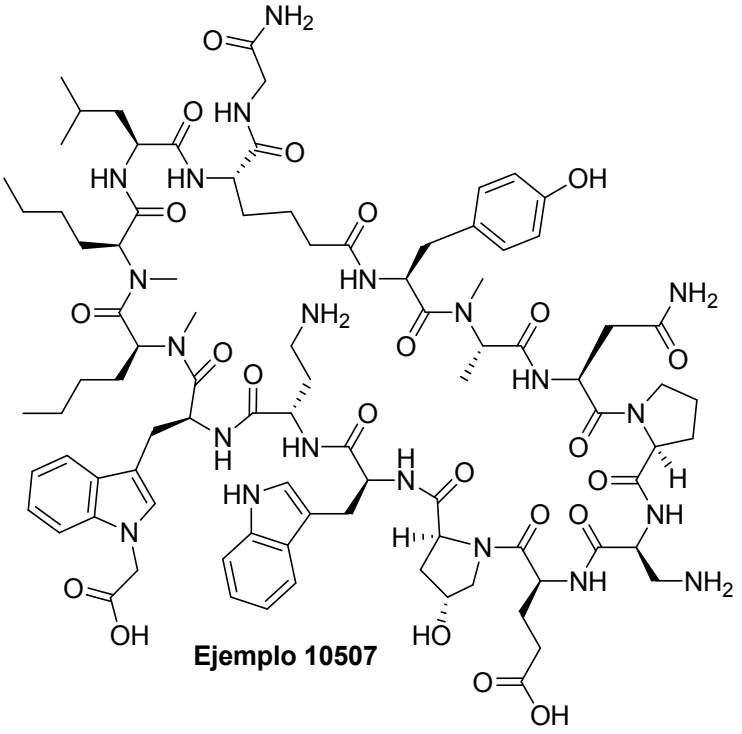


Ejemplo 10506

Se preparó el Ejemplo 10506 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 9.3 mg del producto con una pureza de 98.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio;

fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.43 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1785.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10507

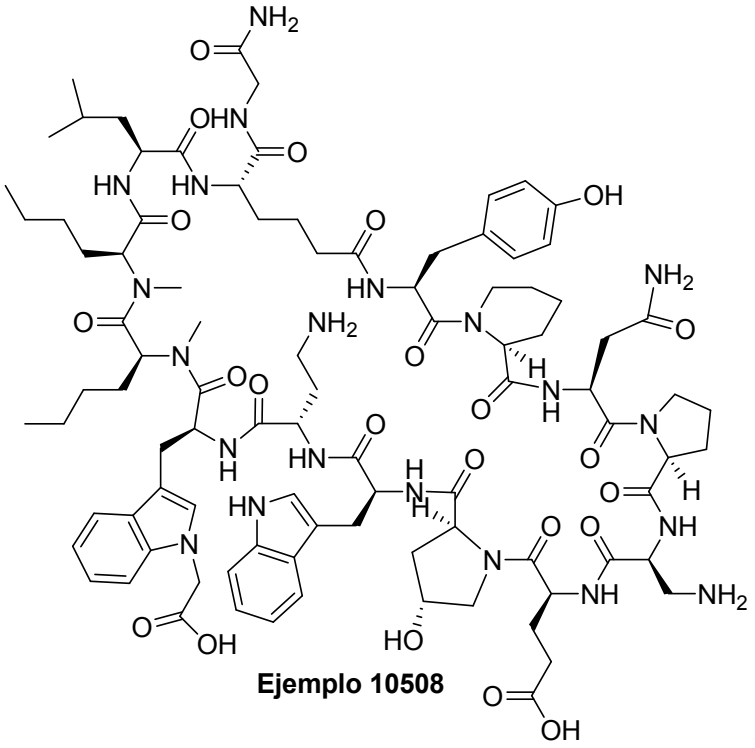


Ejemplo 10507

Se preparó el Ejemplo 10507 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.3 mg del producto con una pureza de 95.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.36 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1885.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10508

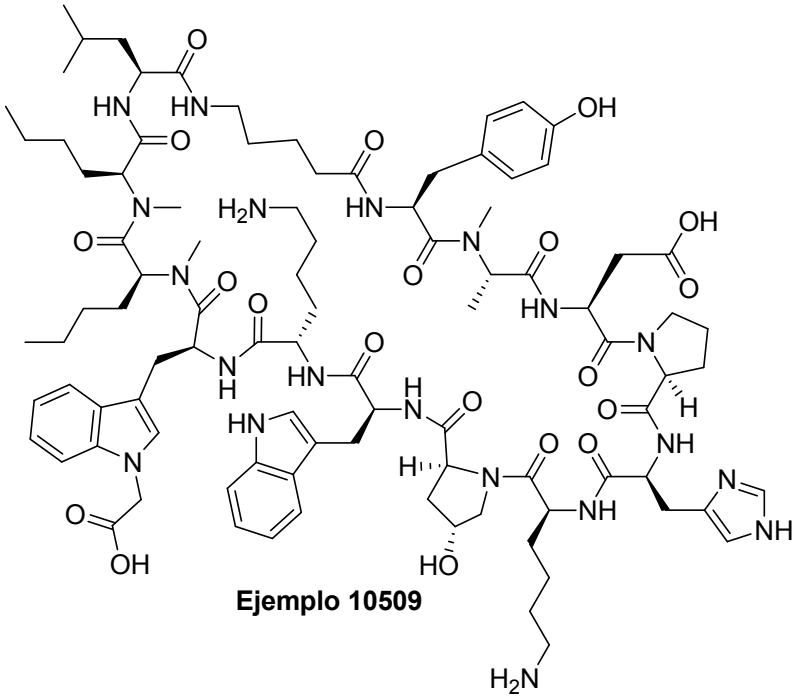


Ejemplo 10508

Se preparó el Ejemplo 10508 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.2 mg del producto con una pureza de 97.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos,

luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.38 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 956.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10509

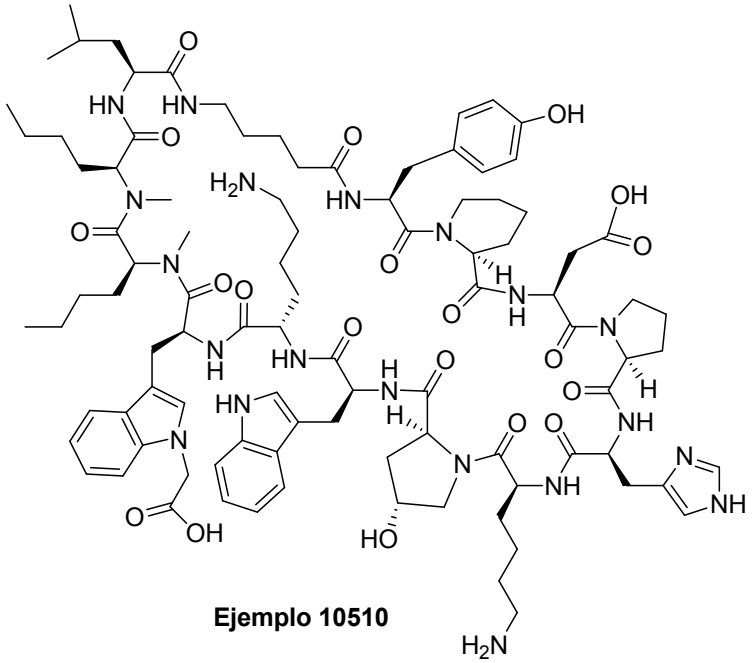


Ejemplo 10509

Se preparó el Ejemplo 10509 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505

para obtener 5.3 mg del producto con una pureza de 98.2%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.31 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 622 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10510

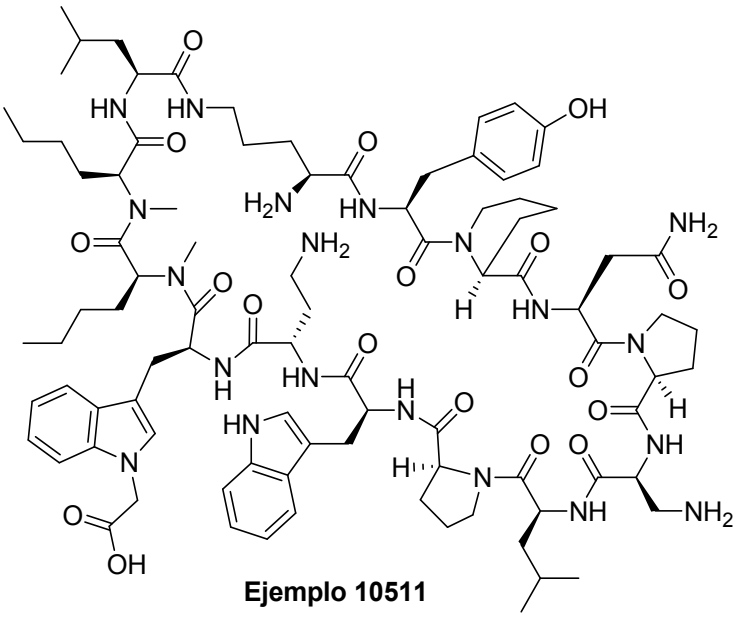


Ejemplo 10510

Se preparó el Ejemplo 10510 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 7 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección

2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.65 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 946 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10511

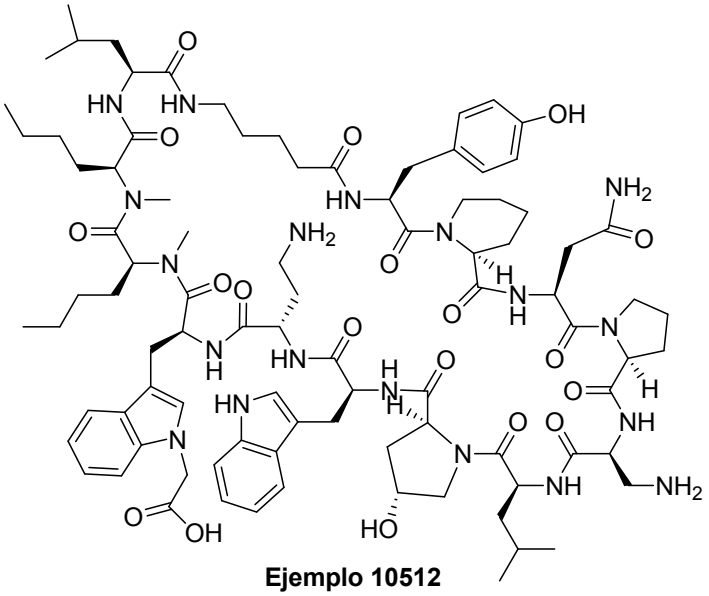


Ejemplo 10511

Se preparó el Ejemplo 10511 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.9 mg del producto con una pureza de 95.1%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza

final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.73 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1795 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10512

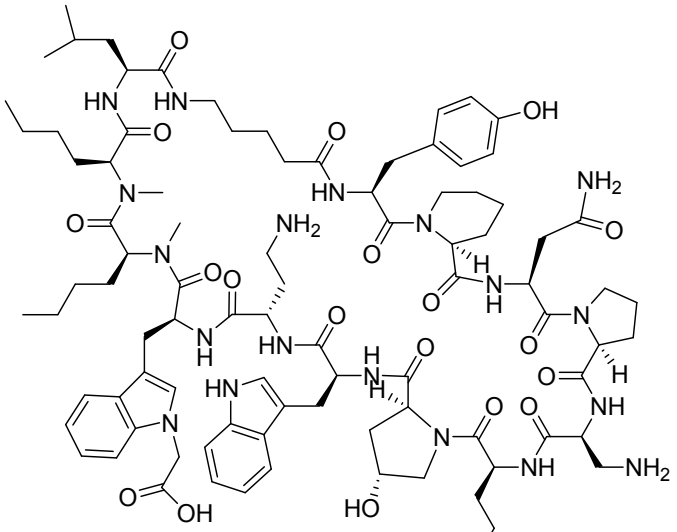


Ejemplo 10512

Se preparó el Ejemplo 10512 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 8.6 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.68 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 898.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10513

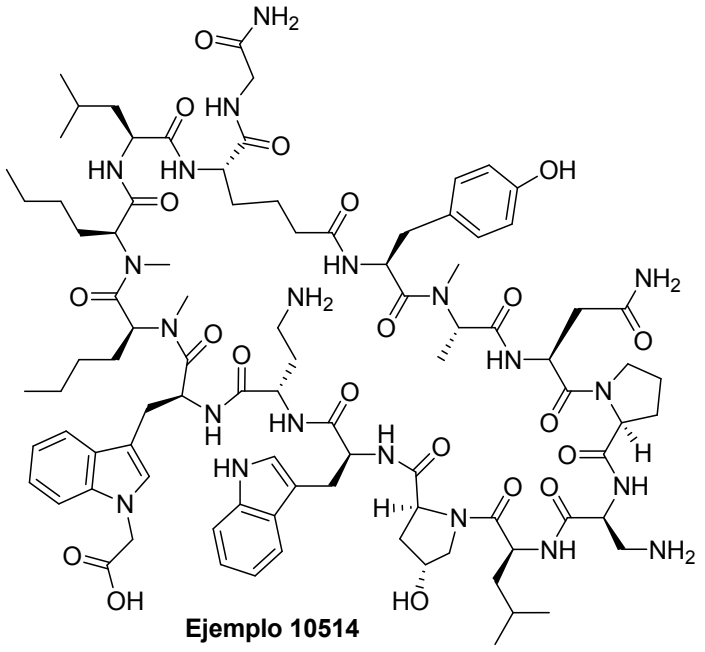


Ejemplo 10513

Se preparó el Ejemplo 10513 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 7.4 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase

móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.6 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 906.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10514

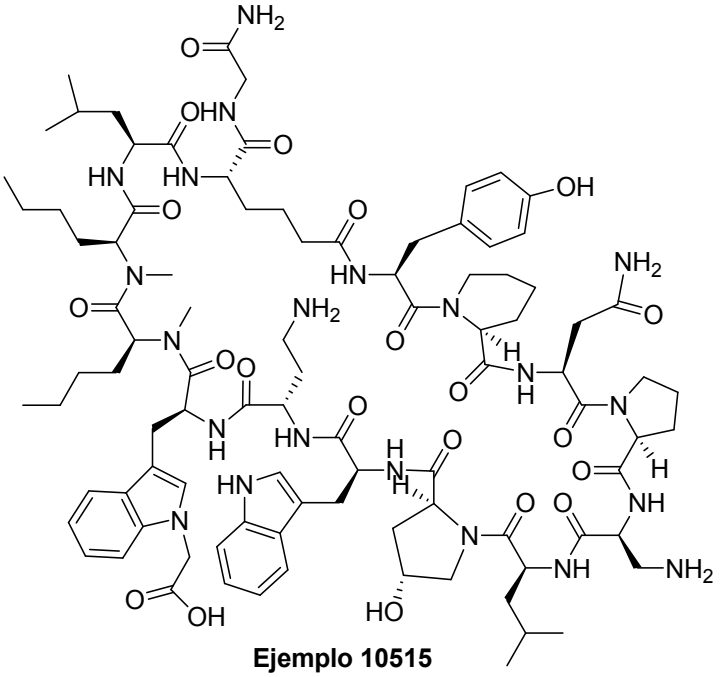


Ejemplo 10514

Se preparó el Ejemplo 10514 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.8 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH

C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.61 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 935.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10515

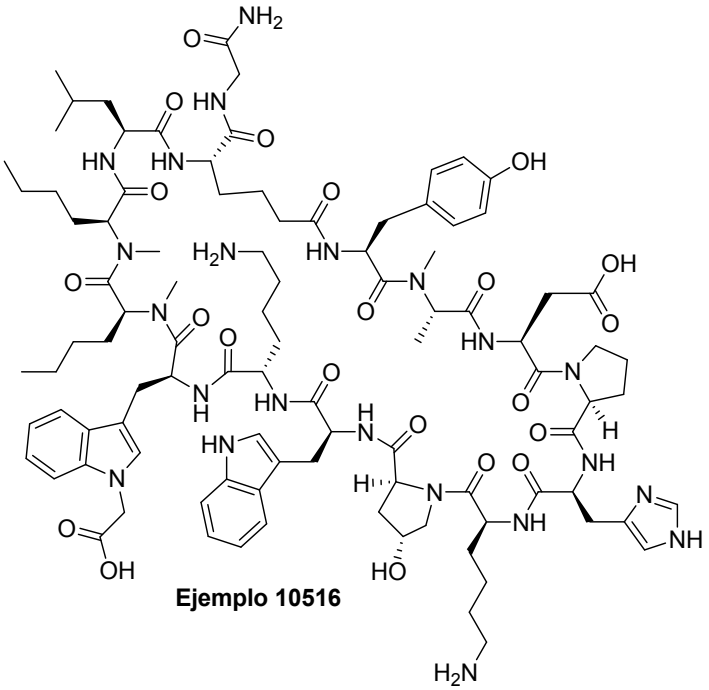


Ejemplo 10515

Se preparó el Ejemplo 10515 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 0.3 mg del producto con una pureza de 96.7%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.65 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 948.3 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10516

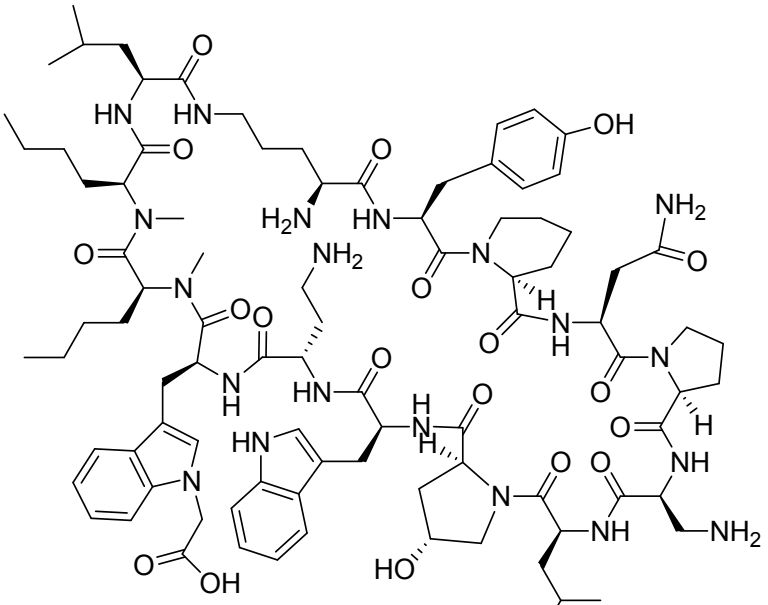


Ejemplo 10516

Se preparó el Ejemplo 10516 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((2-amino-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.5 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo:

0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.05% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.27 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 983 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10517

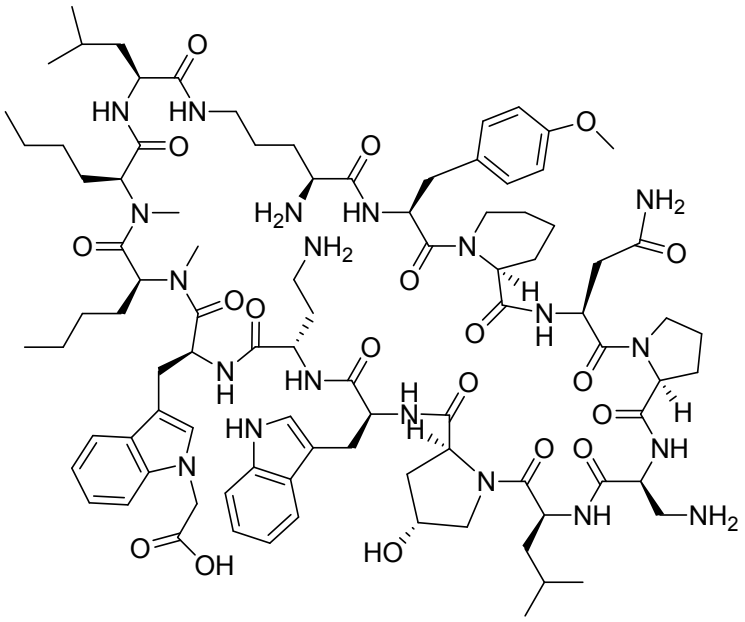


Ejemplo 10517

Se preparó el Ejemplo 10517 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-

butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 15.3 mg del producto con una pureza de 97%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.39 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1809.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10518

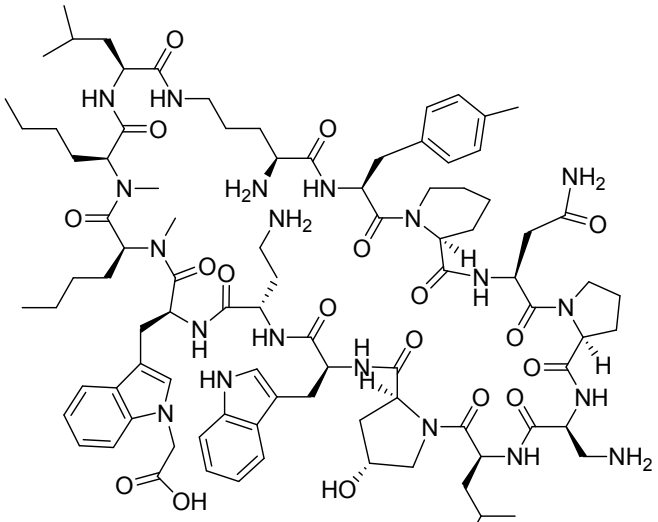


Ejemplo 10518

Se preparó el Ejemplo 10518 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 10.9 mg del producto con una pureza de 97.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1

x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.79 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1822.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10519

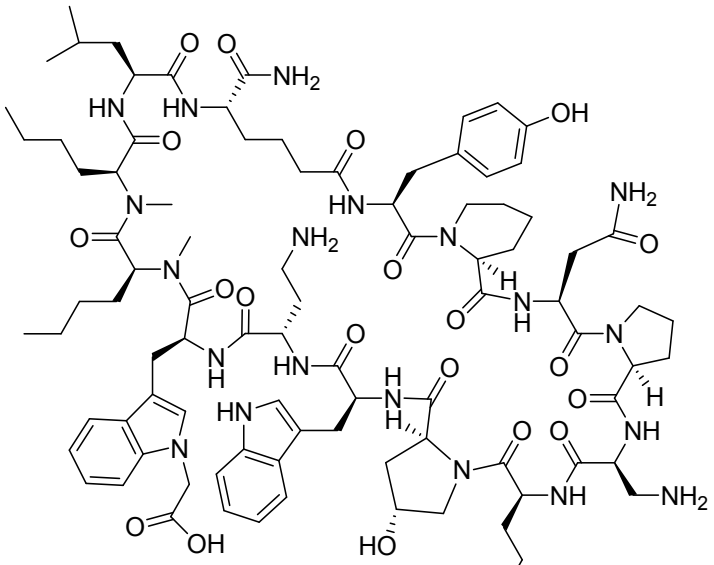


Ejemplo 10519

Se preparó el Ejemplo 10519 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 8.5 mg del producto con una pureza de 94.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna:

Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.89 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1807.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10520

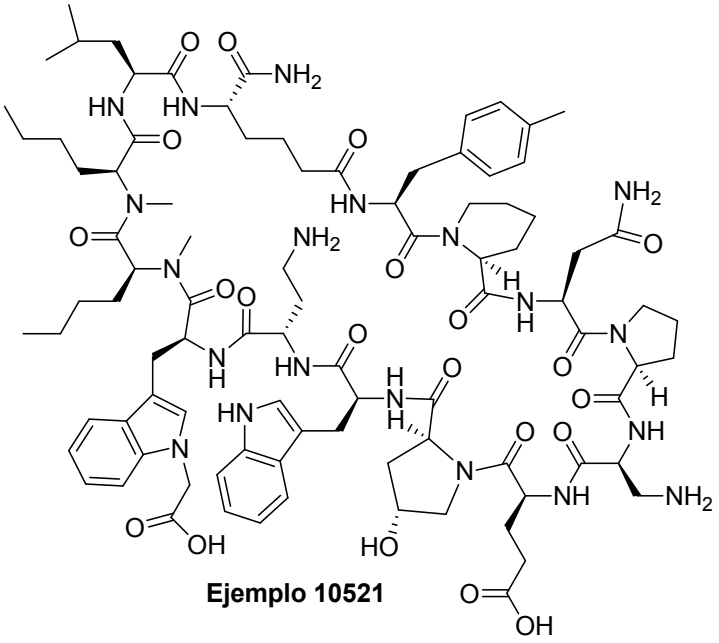


Ejemplo 10520

Se preparó el Ejemplo 10520 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 7 mg del producto con una pureza de 95.4%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.55 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1853.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10521

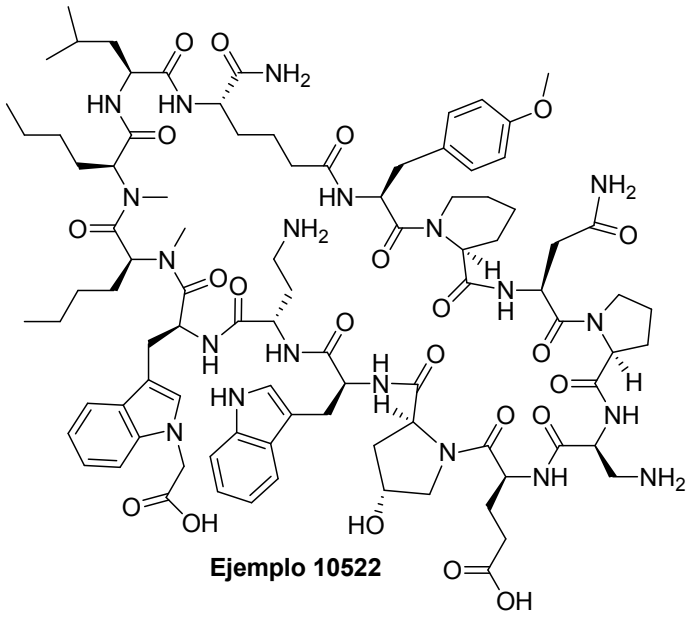


Ejemplo 10521

Se preparó el Ejemplo 10521 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.6 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.85 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1853.3 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10522

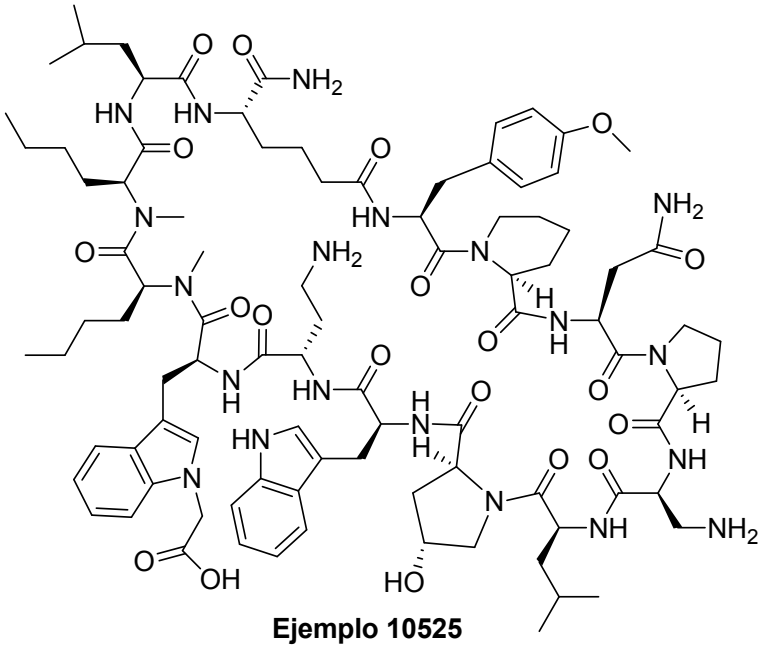


Ejemplo 10522

Se preparó el Ejemplo 10522 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.9 mg del producto con una pureza de 94.1%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna:

Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.74 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1867.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10525

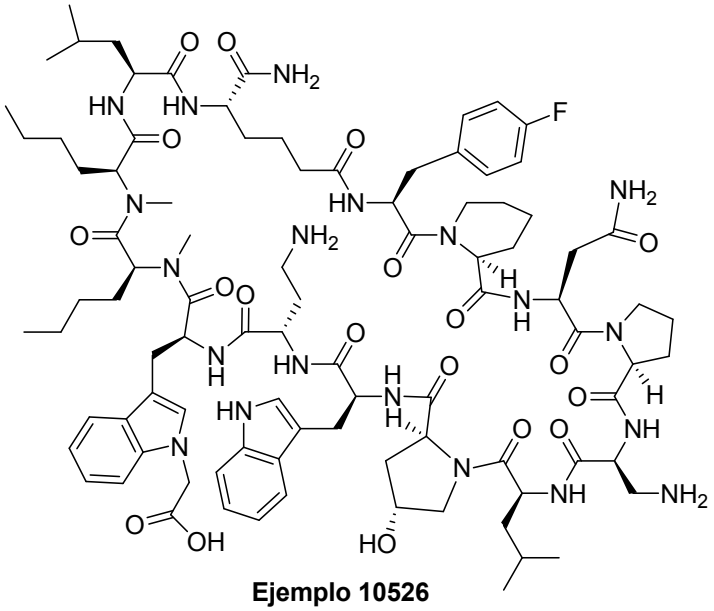


Ejemplo 10525

Se preparó el Ejemplo 10525 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.8 mg del producto con una pureza de 99.1%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.72 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 926.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10526

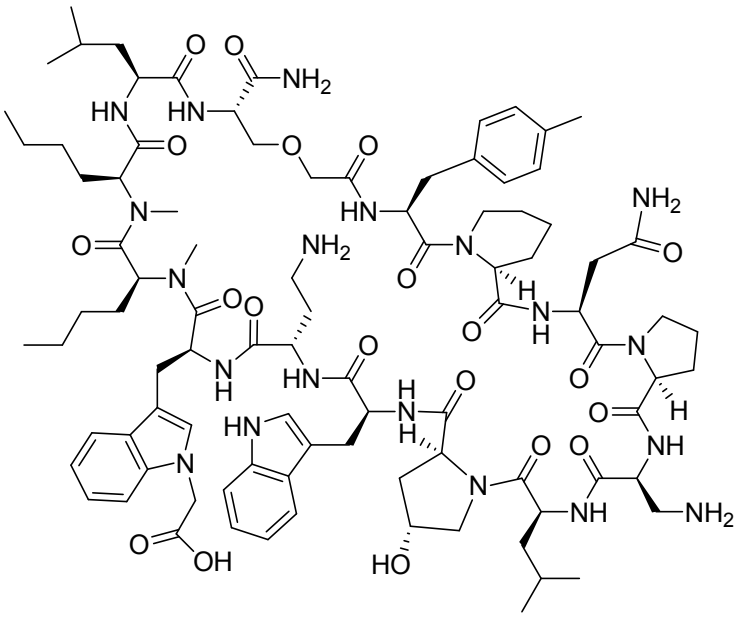


Ejemplo 10526

Se preparó el Ejemplo 10526 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.5 mg del producto con una pureza de 99.2%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.72 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 920.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10527

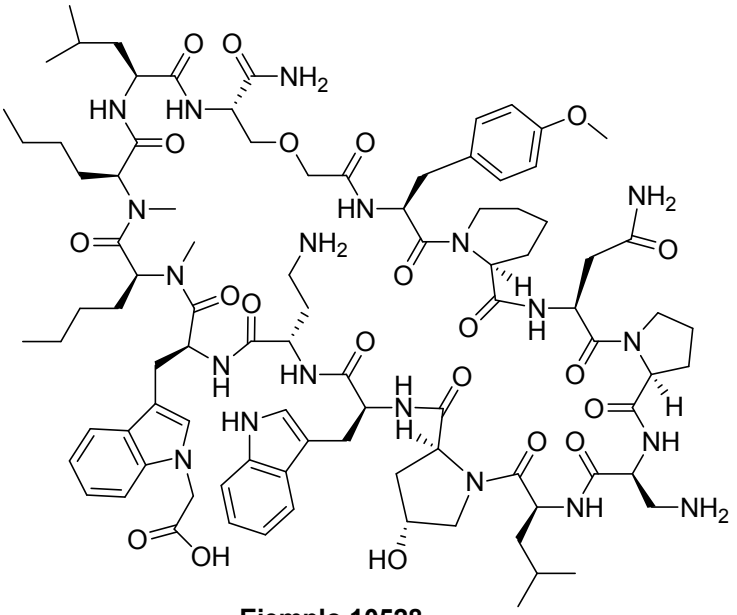


Ejemplo 10527

Se preparó el Ejemplo 10527 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.8 mg del producto con una pureza de 97.4%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil

A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.97 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1835.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10528

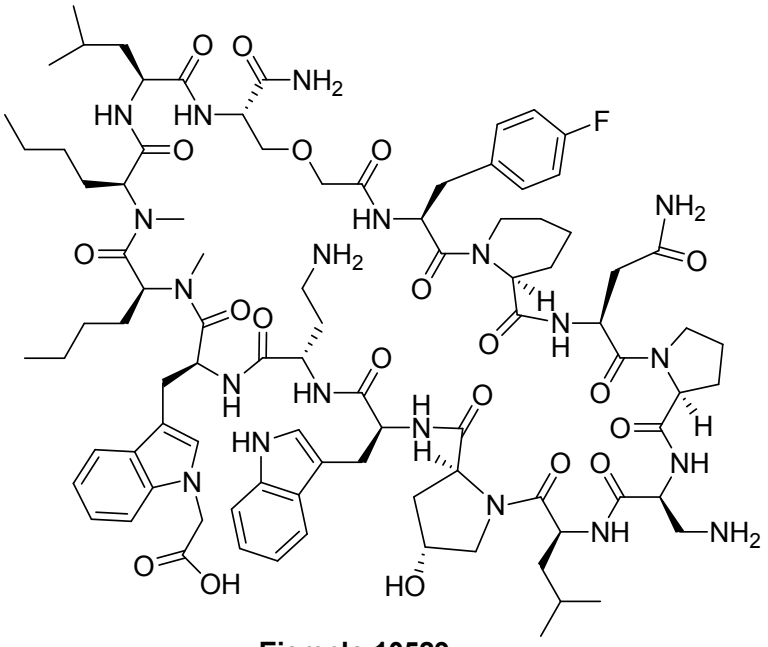


Ejemplo 10528

Se preparó el Ejemplo 10528 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.4 mg del producto con una pureza de 99%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.74 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 927.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10529

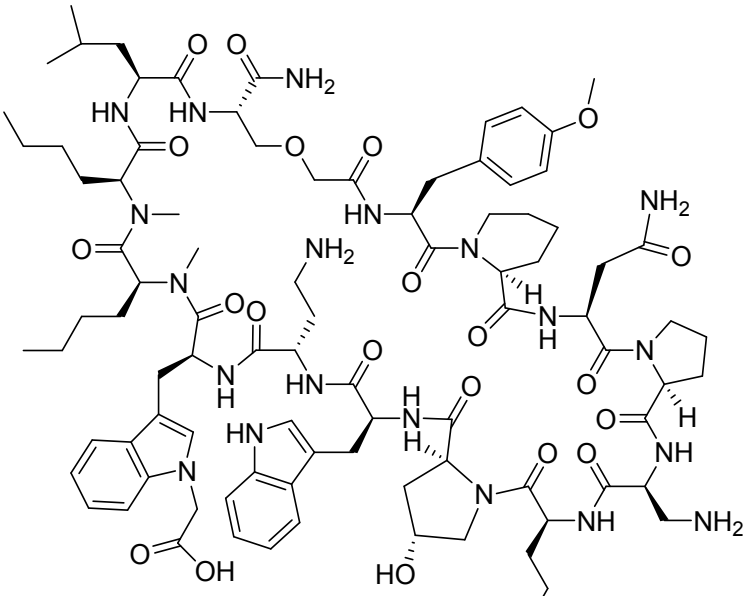


Ejemplo 10529

Se preparó el Ejemplo 10529 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.8 mg del producto con una pureza de 98.9%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220

nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.89 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1841.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10530

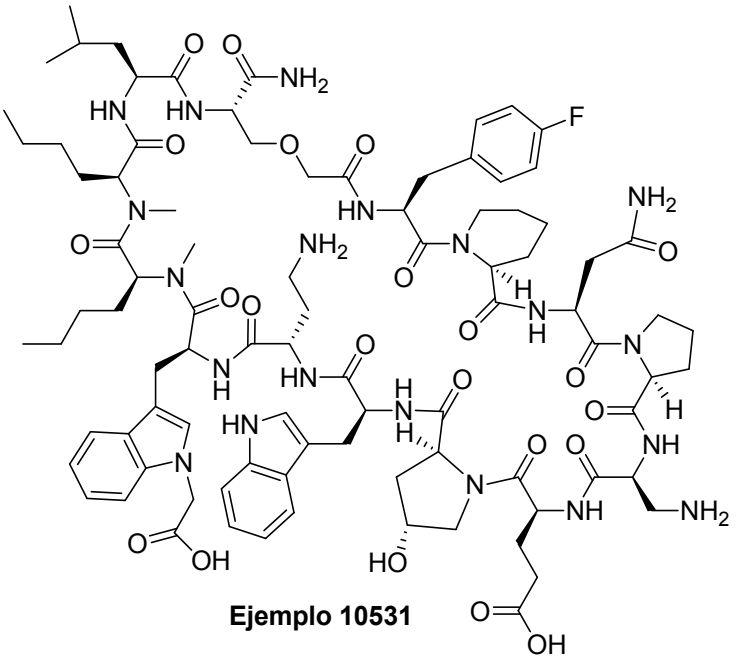


Ejemplo 10530

Se preparó el Ejemplo 10530 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de

acoplamiento de amida) para obtener 4.5 mg del producto con una pureza de 97.3%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.77 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 935.4 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10531

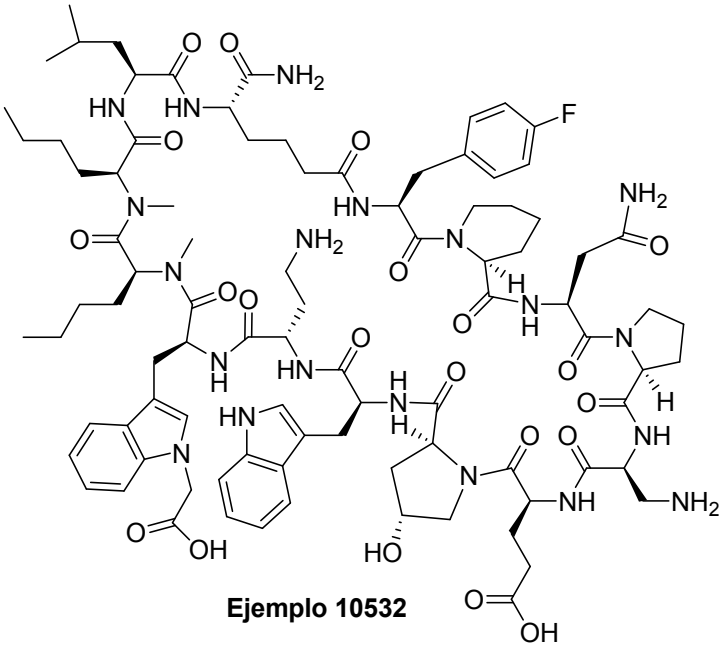


Ejemplo 10531

Se preparó el Ejemplo 10531 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.8 mg del producto con una pureza de 97.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1

x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.81 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1859 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10532

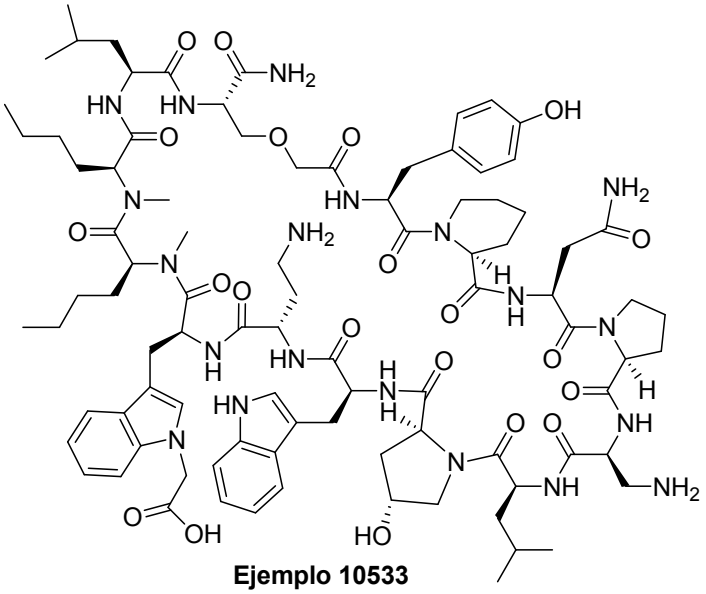


Ejemplo 10532

Se preparó el Ejemplo 10532 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.7 mg del producto con una pureza de 95.4%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para

determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.67 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1854 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10533

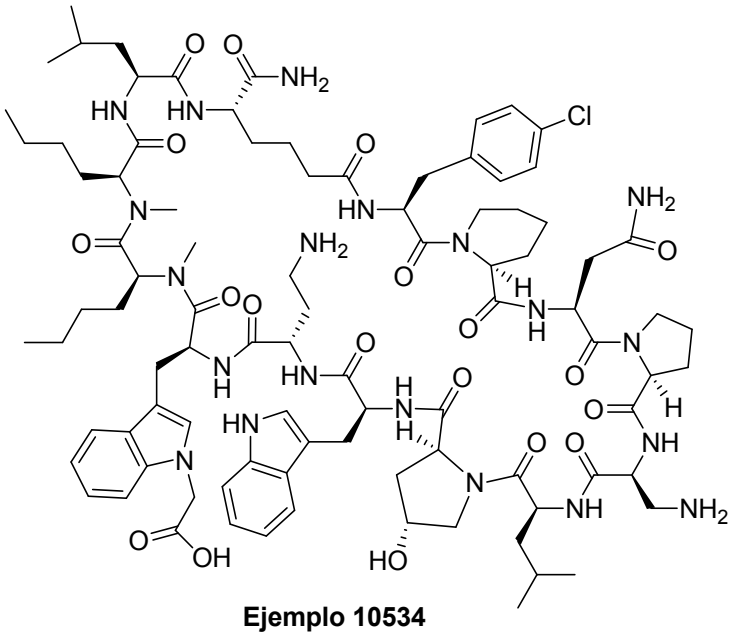


Ejemplo 10533

Se preparó el Ejemplo 10533 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.5 mg del producto con una pureza de 92.7%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.62 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1839.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10534

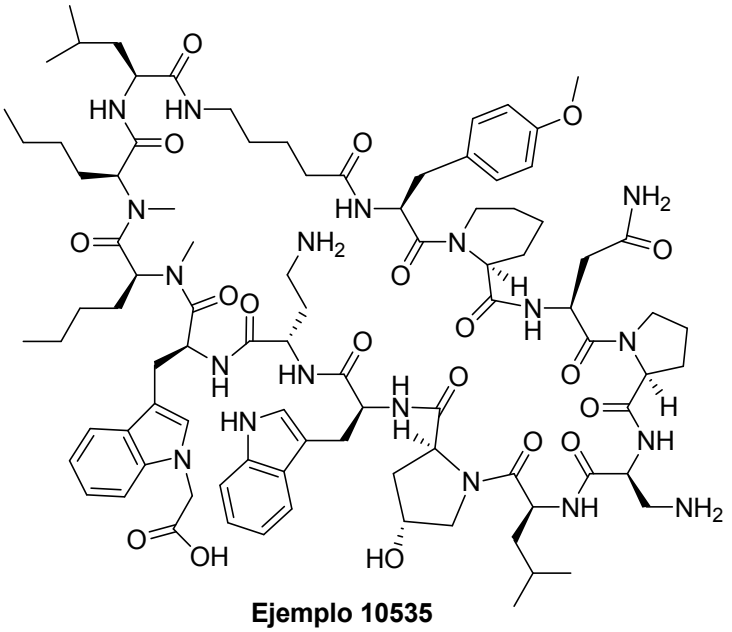


Ejemplo 10534

Se preparó el Ejemplo 10534 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.8 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC

BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 2 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 929.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10535

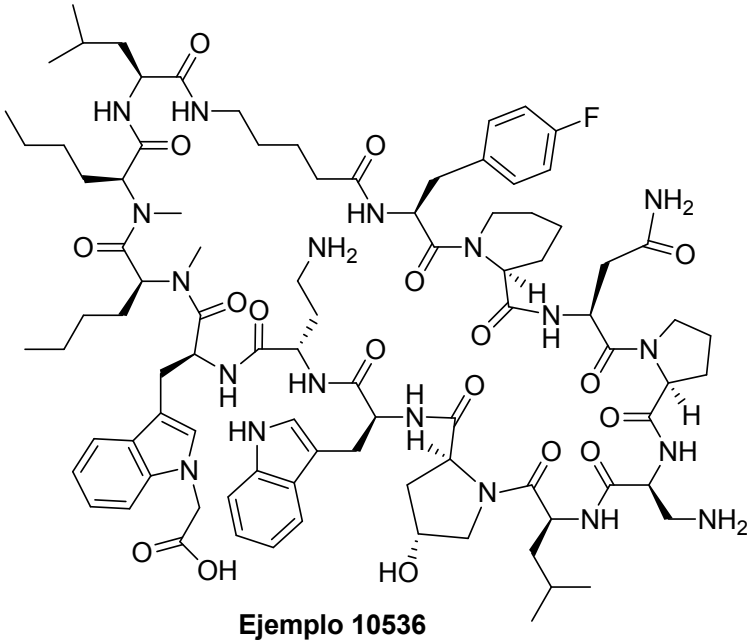


Ejemplo 10535

Se preparó el Ejemplo 10535 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 9.3 mg del producto con una pureza de 95.8%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A:

5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.78 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 904.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10536

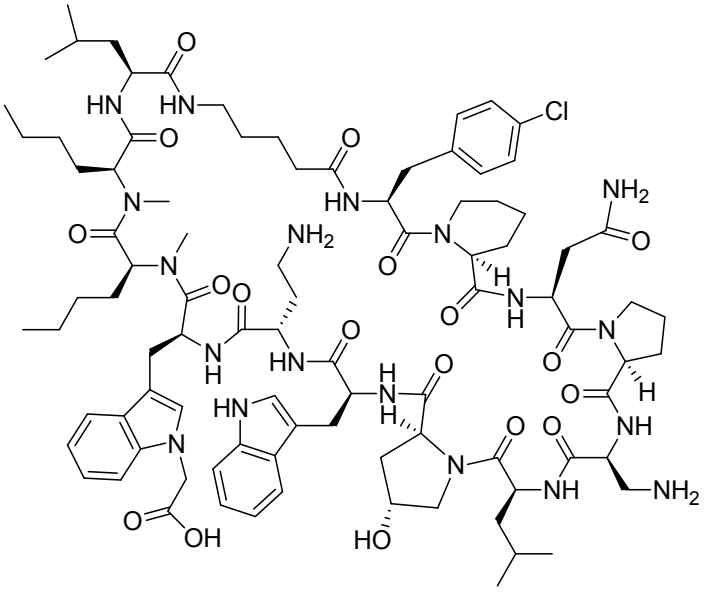


Ejemplo 10536

Se preparó el Ejemplo 10536 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 11.6 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.9 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 899.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10537

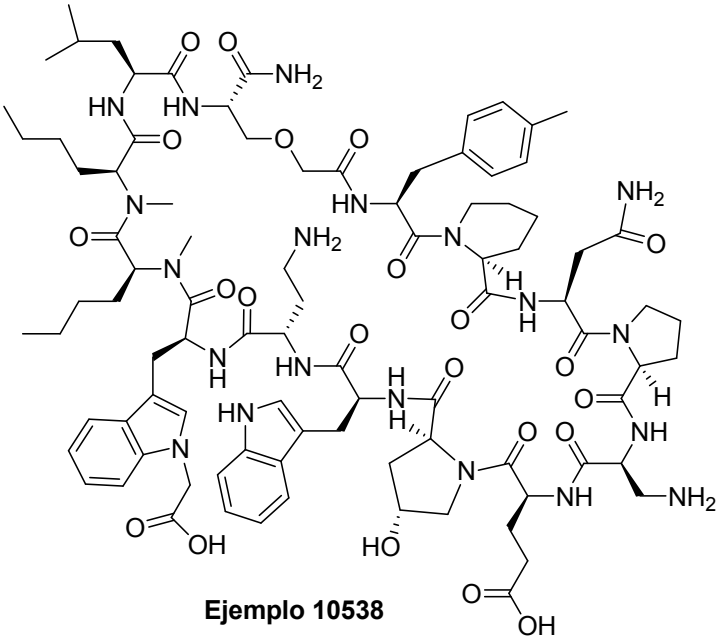


Ejemplo 10537

Se preparó el Ejemplo 10537 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 5.9 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase

móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 50°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 0.75 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.94 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 605.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10538

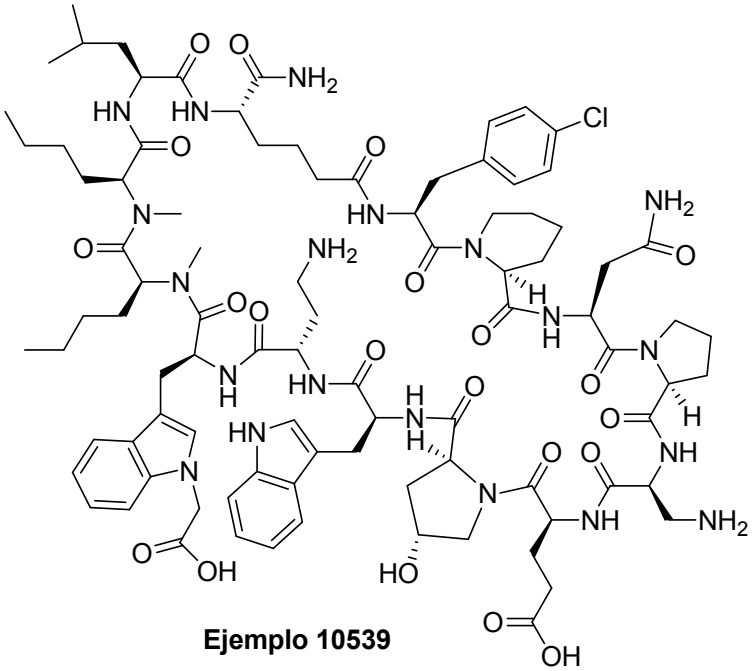


Ejemplo 10538

Se preparó el Ejemplo 10538 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-amino-3-oxopropoxi)acético usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.1 mg del producto con una pureza de 99%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas

de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.78 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1852.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10539

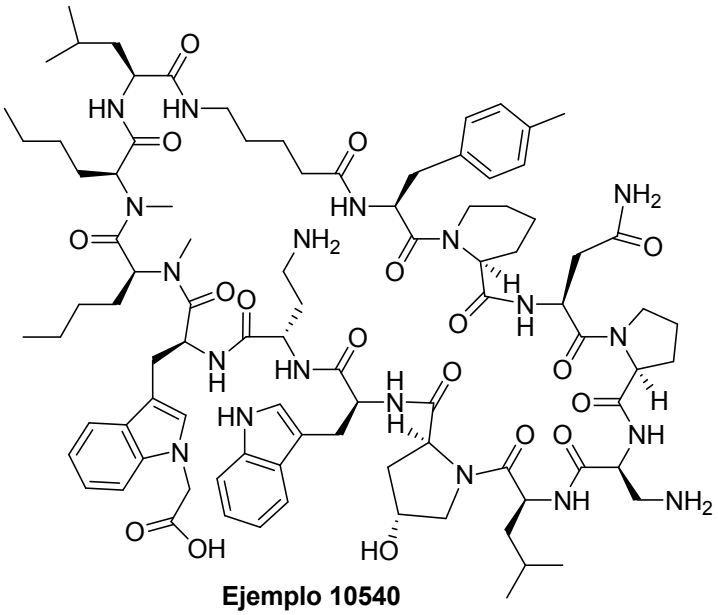


Ejemplo 10539

Se preparó el Ejemplo 10539 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4ª etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.8 mg del producto con una pureza de 97.8%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.64 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 923.0 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10540

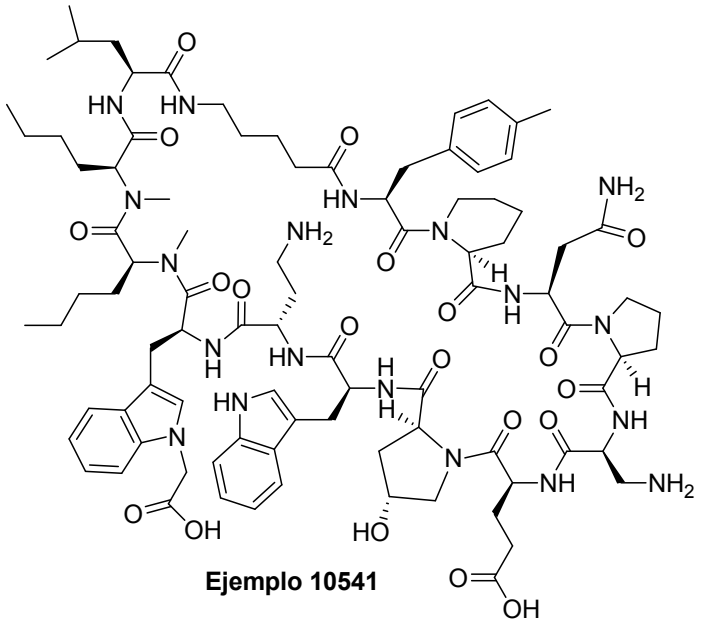


Ejemplo 10540

Se preparó el Ejemplo 10540 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 5.5 mg del producto con una pureza de 95.7%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.96 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1793.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10541

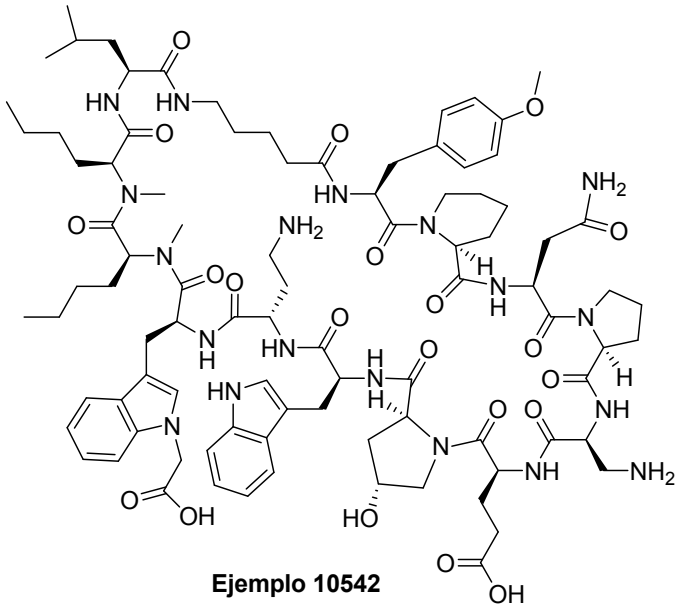


Ejemplo 10541

Se preparó el Ejemplo 10541 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 9.2 mg del producto con una pureza de 96.7%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato

de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.86 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1810 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10542

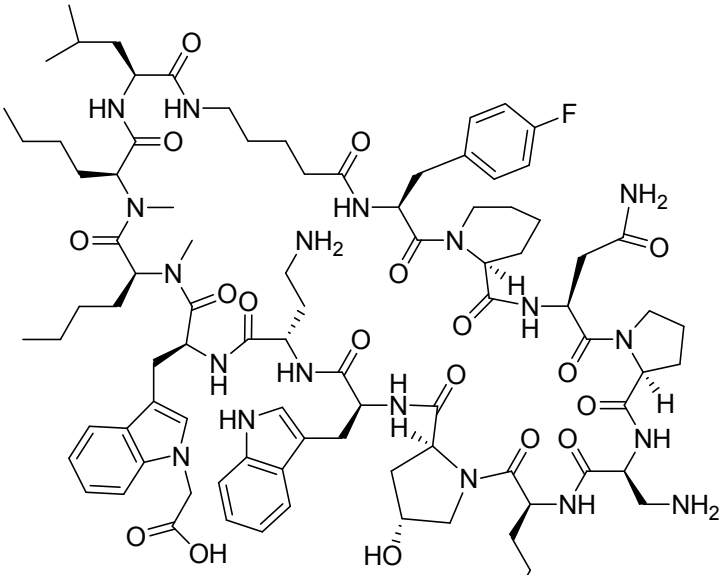


Ejemplo 10542

Se preparó el Ejemplo 10542 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505

para obtener 10.6 mg del producto con una pureza de 94.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.76 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1824.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10543

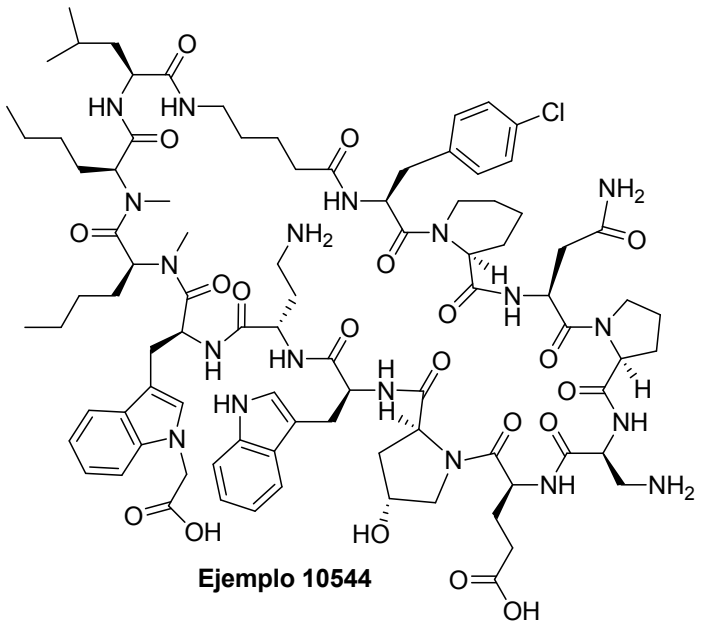


Ejemplo 10543

Se preparó el Ejemplo 10543 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 6.4 mg del producto con una pureza de 95.4%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de

acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.79 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1811.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10544

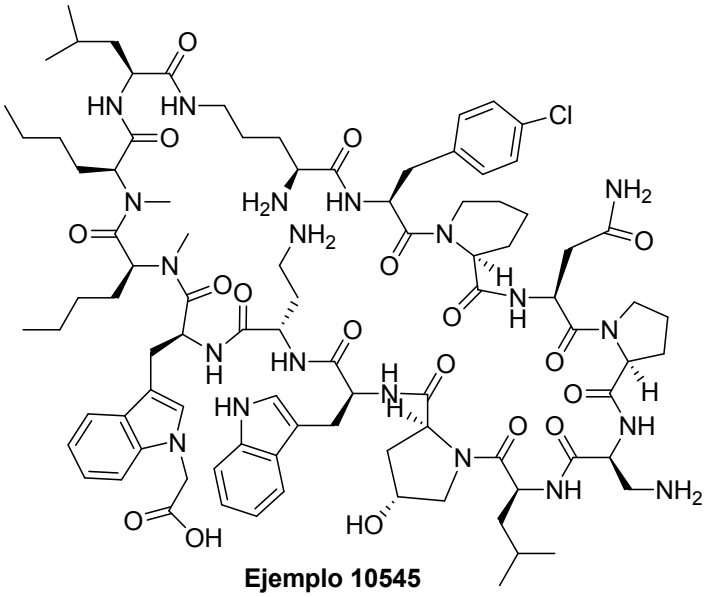


Ejemplo 10544

Se preparó el Ejemplo 10544 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 6.6 mg del producto con una pureza de 98.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato

de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.86 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1829.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10545

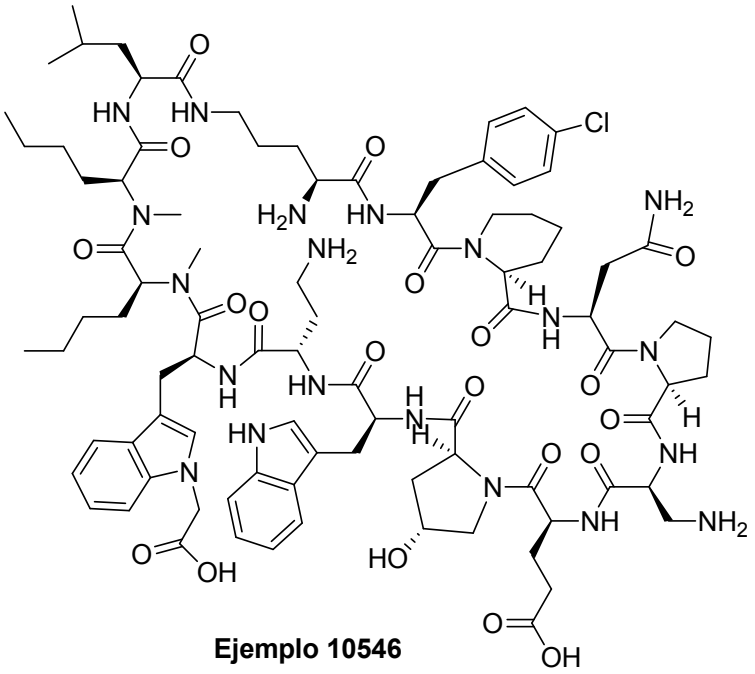


Ejemplo 10545

Se preparó el Ejemplo 10545 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-

((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3 mg del producto con una pureza de 94.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.91 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1826.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10546

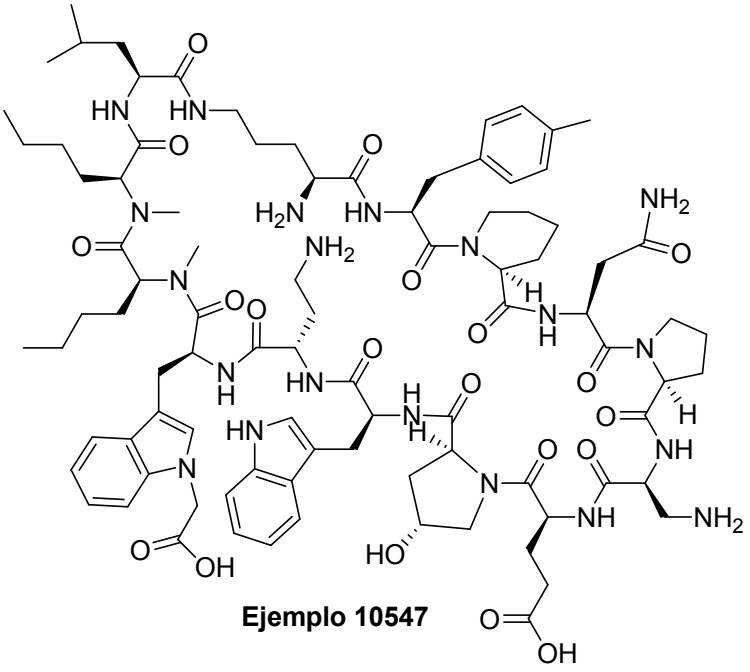


Ejemplo 10546

Se preparó el Ejemplo 10546 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 6.4 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético;

fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.64 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de [ERROR] *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10547

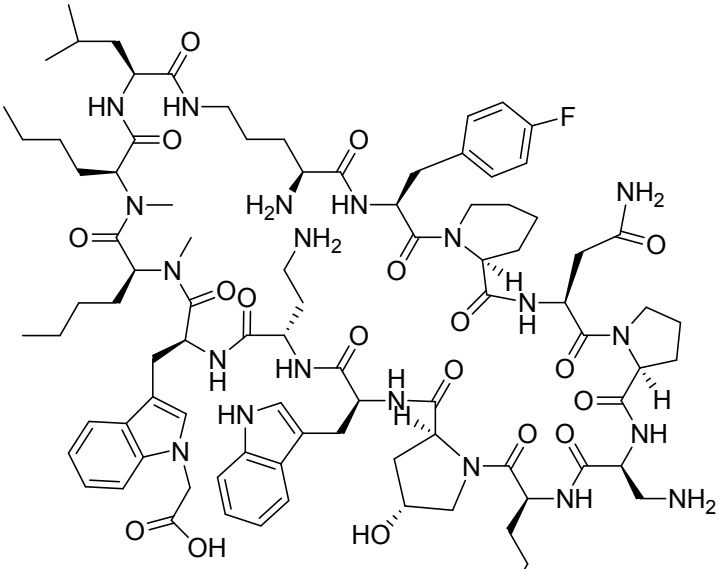


Ejemplo 10547

Se preparó el Ejemplo 10547 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.5 mg del producto con una pureza de 97.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna:

Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.89 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1822.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10548

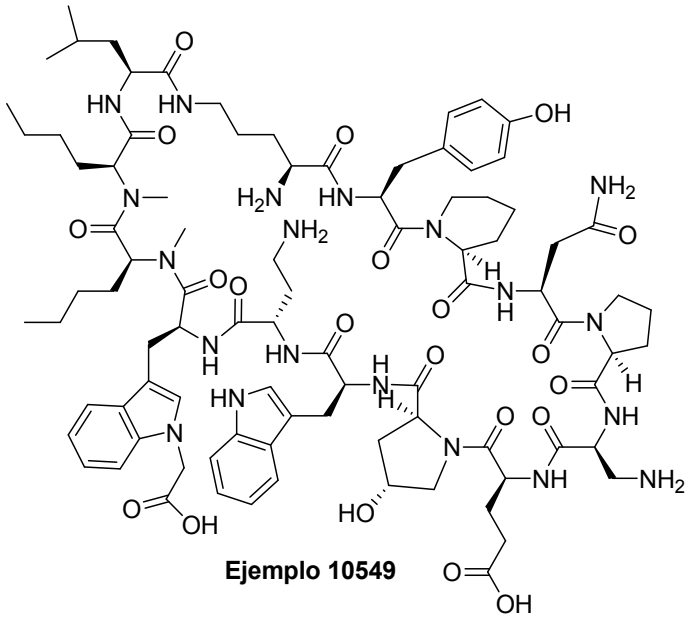


Ejemplo 10548

Se preparó el Ejemplo 10548 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.2 mg del producto con una pureza de 97.7%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.8 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1828.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10549

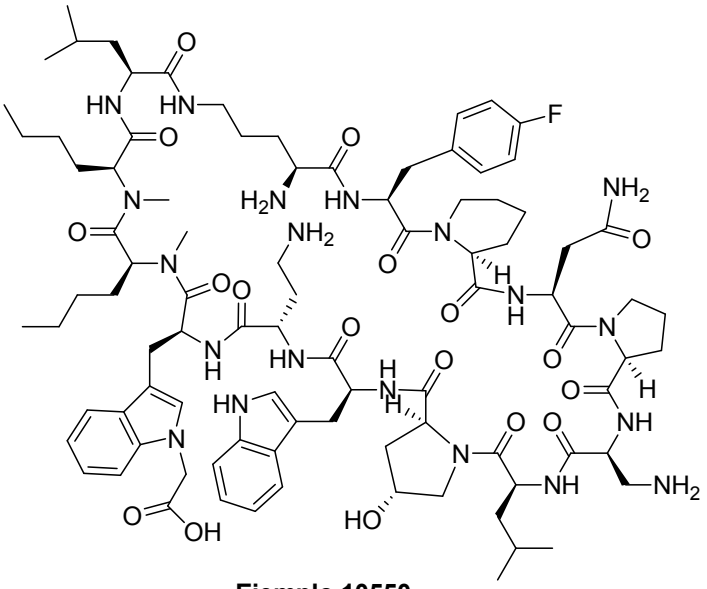


Ejemplo 10549

Se preparó el Ejemplo 10549 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.9 mg del producto con una pureza de 98%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1

x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.39 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1824.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10550

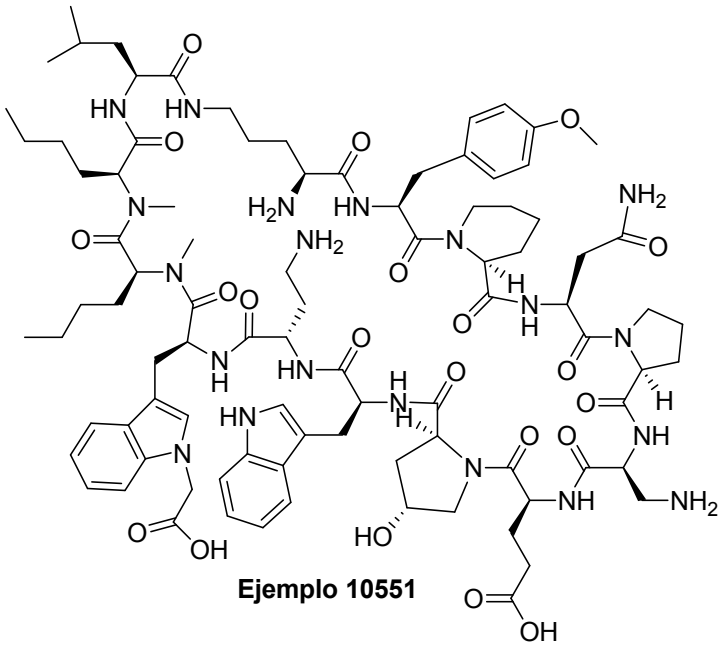


Ejemplo 10550

Se preparó el Ejemplo 10550 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.8 mg del producto con una pureza de 98.3%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.83 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1810.6 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10551

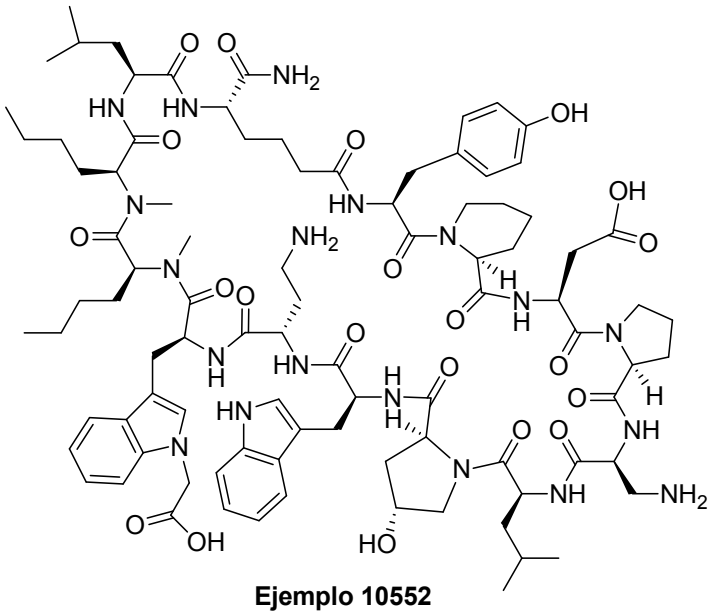


Ejemplo 10551

Se preparó el Ejemplo 10551 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.8 mg del producto con una pureza de 95.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.79 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1840.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10552

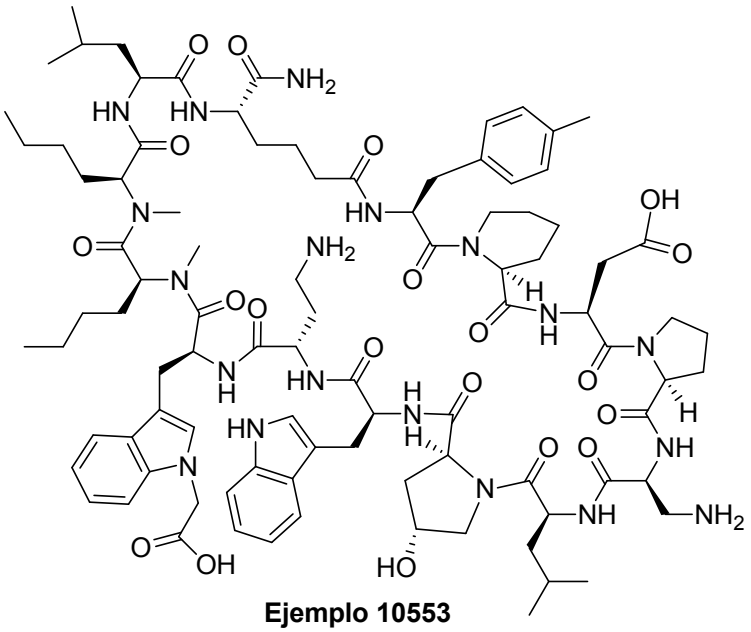


Ejemplo 10552

Se preparó el Ejemplo 10552 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.9 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.5 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1837 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10553

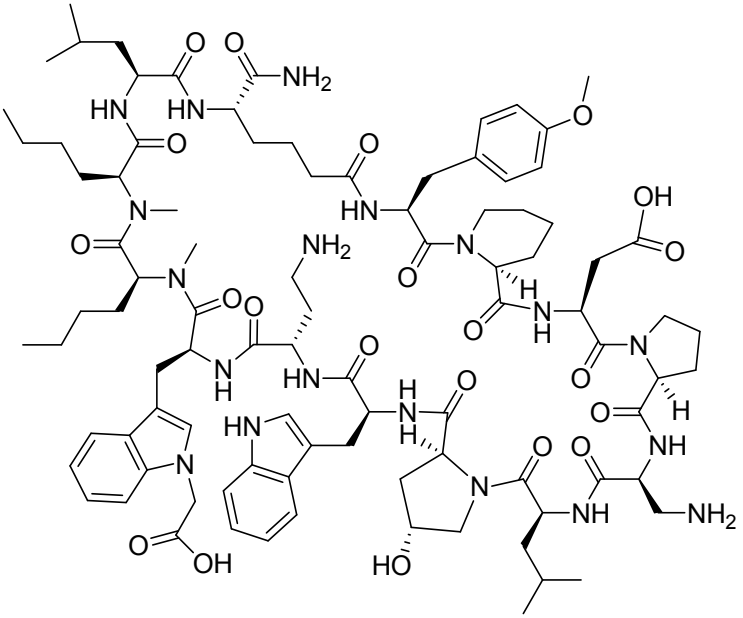


Ejemplo 10553

Se preparó el Ejemplo 10553 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.2 mg del producto con una pureza de 94.3%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna:

Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.74 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1834.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10554

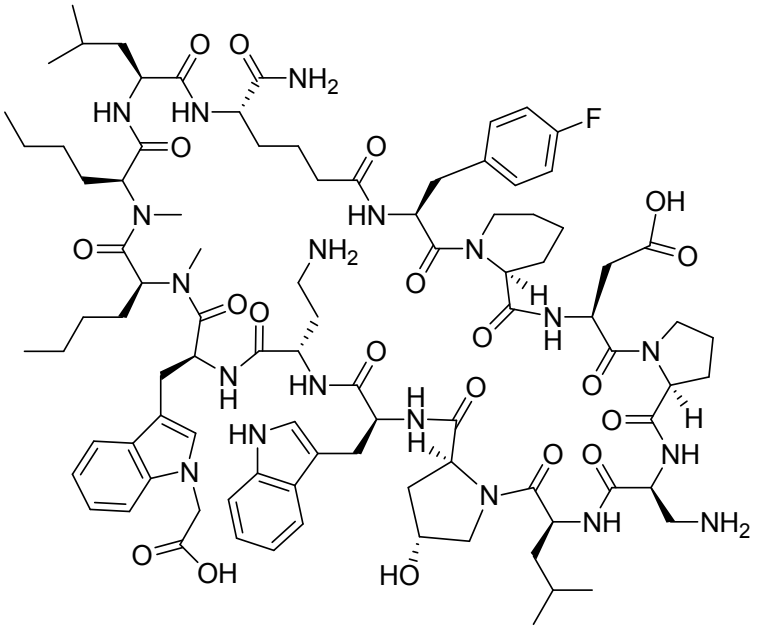


Ejemplo 10554

Se preparó el Ejemplo 10554 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.1 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.79 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1851.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10555

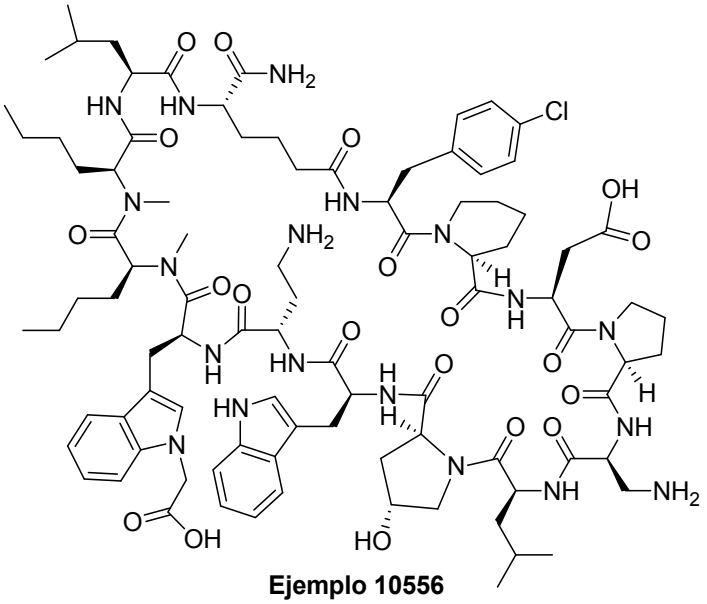


Ejemplo 10555

Se preparó el Ejemplo 10555 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 8.6 mg del producto con una pureza de 98.8%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm.

Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.82 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1841 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10556

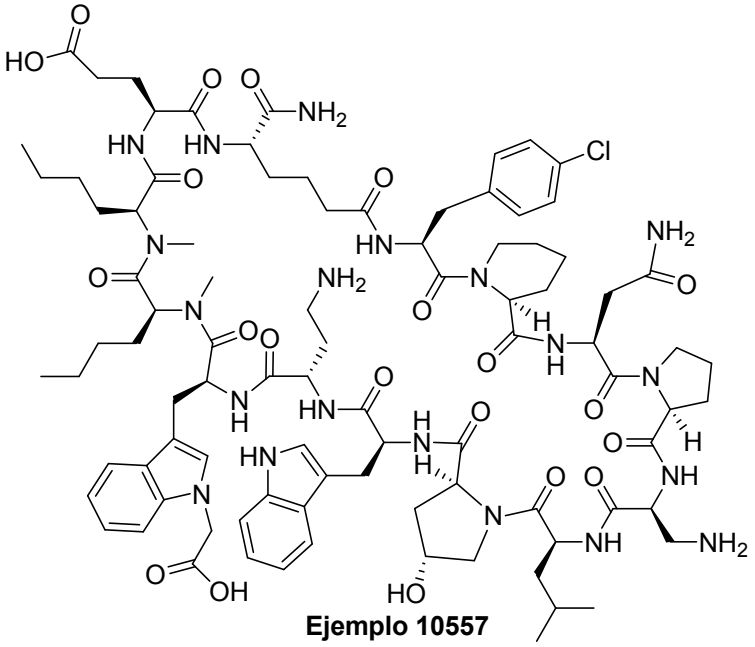


Ejemplo 10556

Se preparó el Ejemplo 10556 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-

il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.3 mg del producto con una pureza de 98.5%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.9 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1855.6 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10557

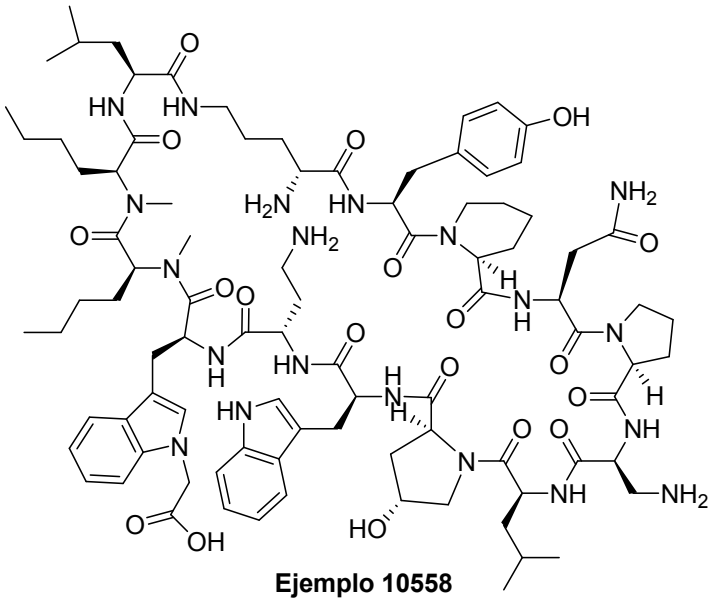


Ejemplo 10557

Se preparó el Ejemplo 10557 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 2.2 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.69 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1870.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10558

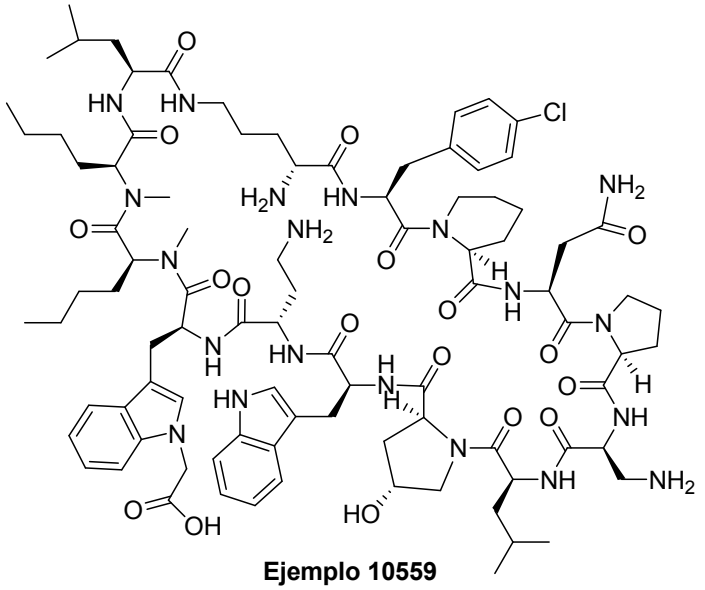


Ejemplo 10558

Se preparó el Ejemplo 10558 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.4 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza

final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.37 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 905.7 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10559

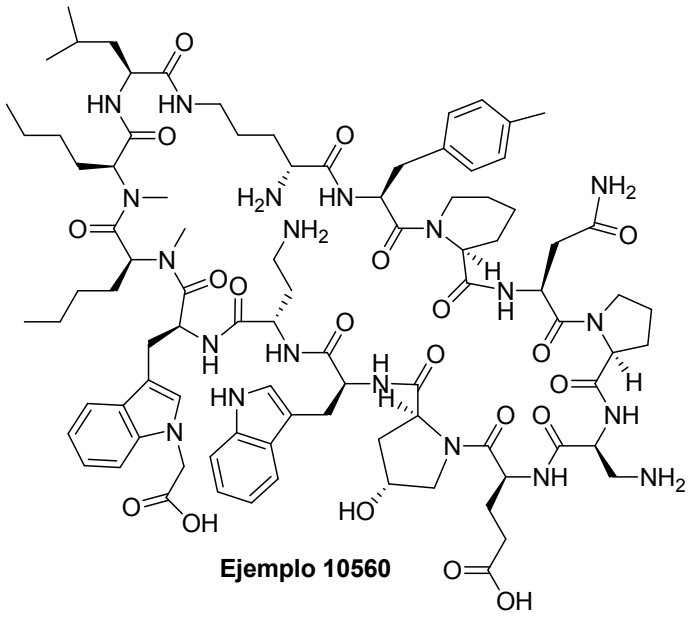


Ejemplo 10559

Se preparó el Ejemplo 10559 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.9 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.91 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1826.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10560

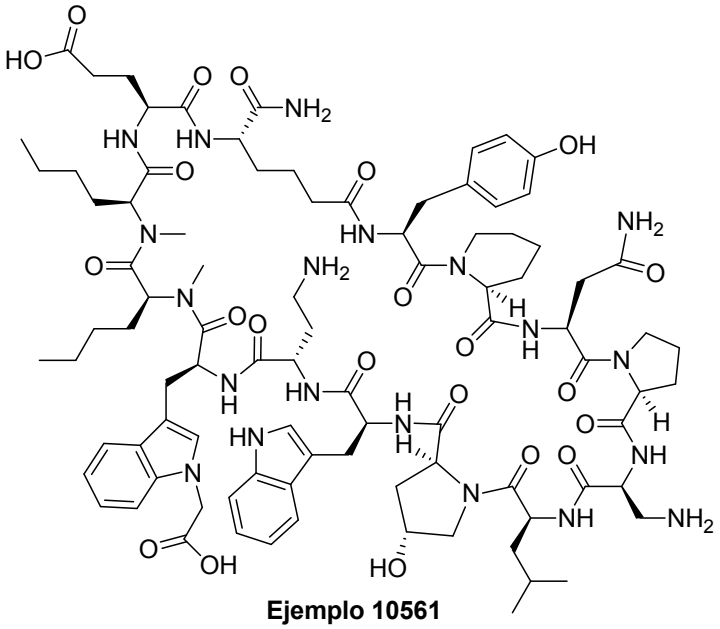


Ejemplo 10560

Se preparó el Ejemplo 10560 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.4 mg del producto con una pureza de 95.9%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1

x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.47 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1823.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10561

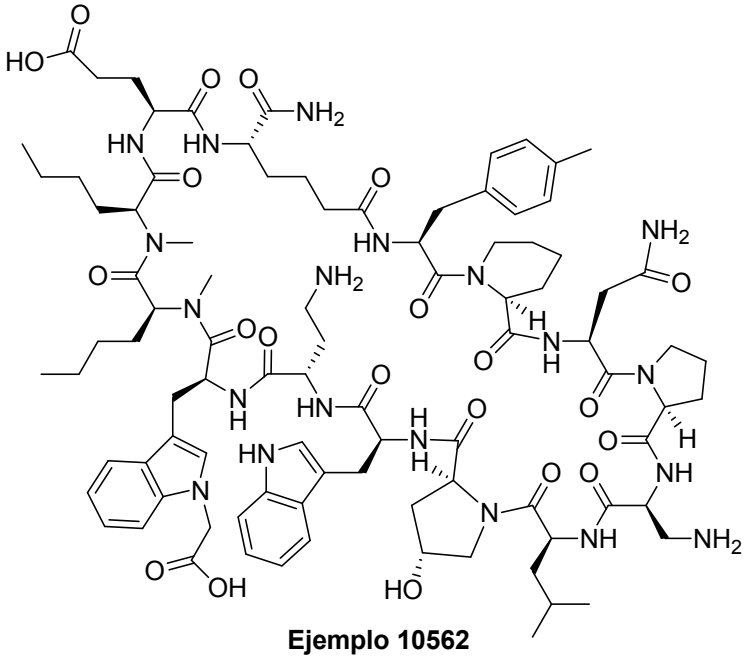


Ejemplo 10561

Se preparó el Ejemplo 10561 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.1 mg del producto con una pureza de 96.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna:

Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.37 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1852.8 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10562

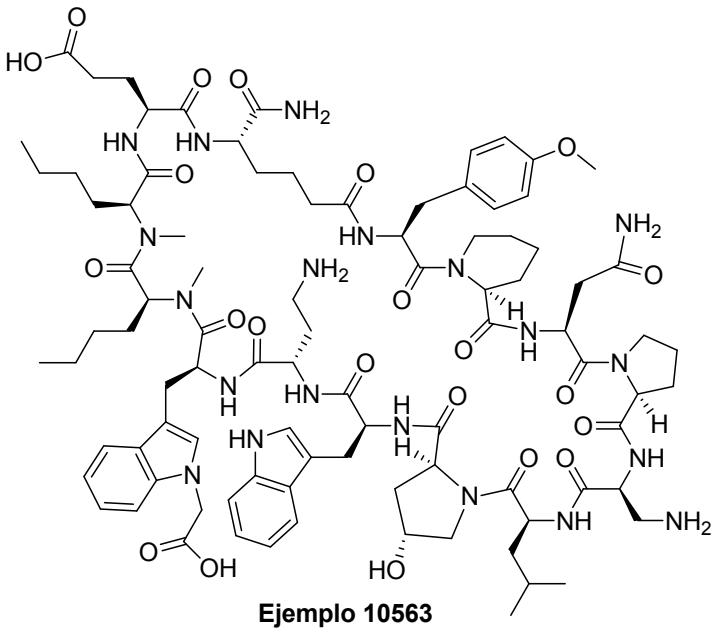


Ejemplo 10562

Se preparó el Ejemplo 10562 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.6 mg del producto con una pureza de 96.9%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.69 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1851.3 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10563

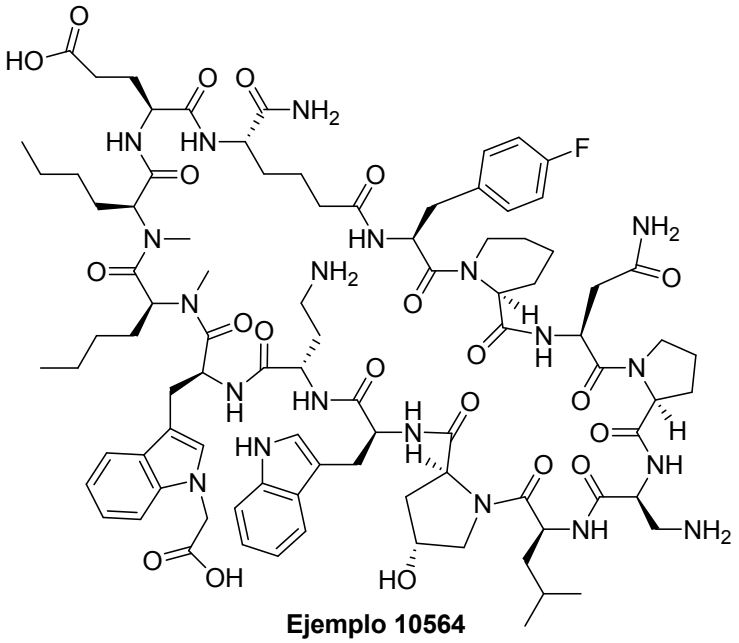


Ejemplo 10563

Se preparó el Ejemplo 10563 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.6 mg del producto con una pureza de 97%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.6 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1867.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10564

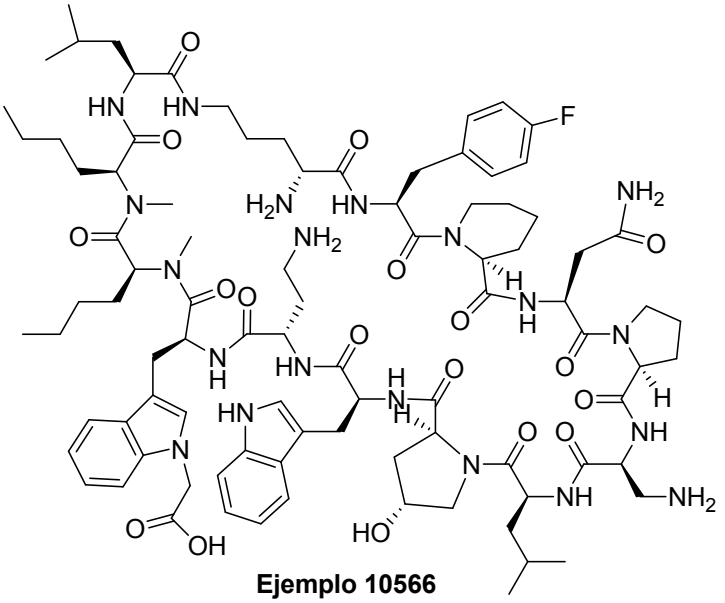


Ejemplo 10564

Se preparó el Ejemplo 10564 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (S)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-amino-6-oxohexanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 3.2 mg del producto con una pureza de 97.1%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para

determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.62 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1854 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10566

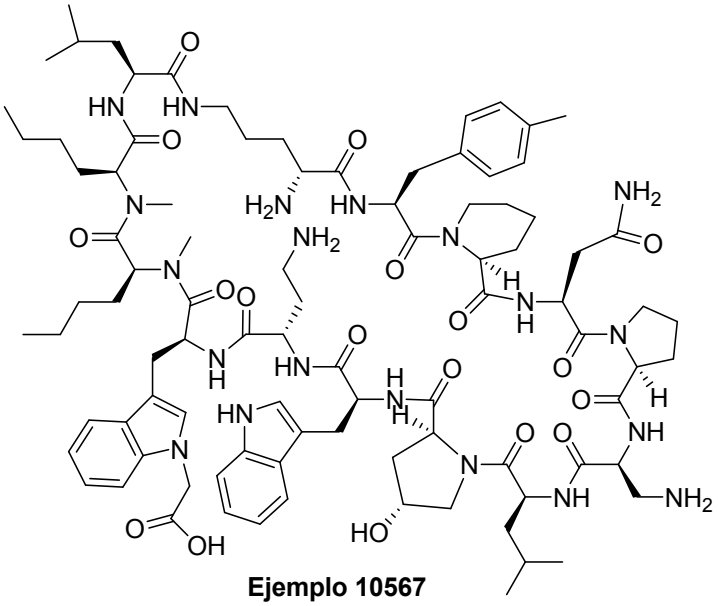


Ejemplo 10566

Se preparó el Ejemplo 10566 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 5.9 mg del producto con una pureza de 96.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.47 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1811.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10567

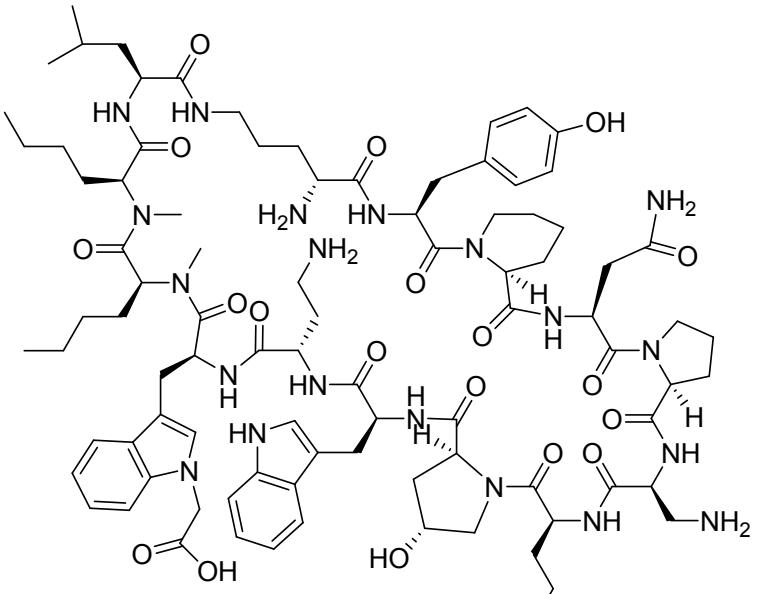


Ejemplo 10567

Se preparó el Ejemplo 10567 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.3 mg del producto con una pureza de 93.9%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm,

partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.52 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1807.4 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10568

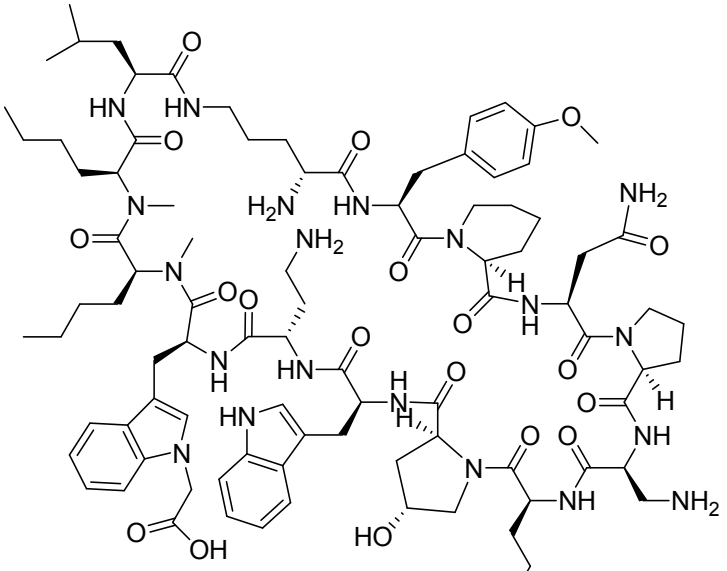


Ejemplo 10568

Se preparó el Ejemplo 10568 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 4.5 mg del producto con una pureza de 97.6%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.6 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1826.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10569

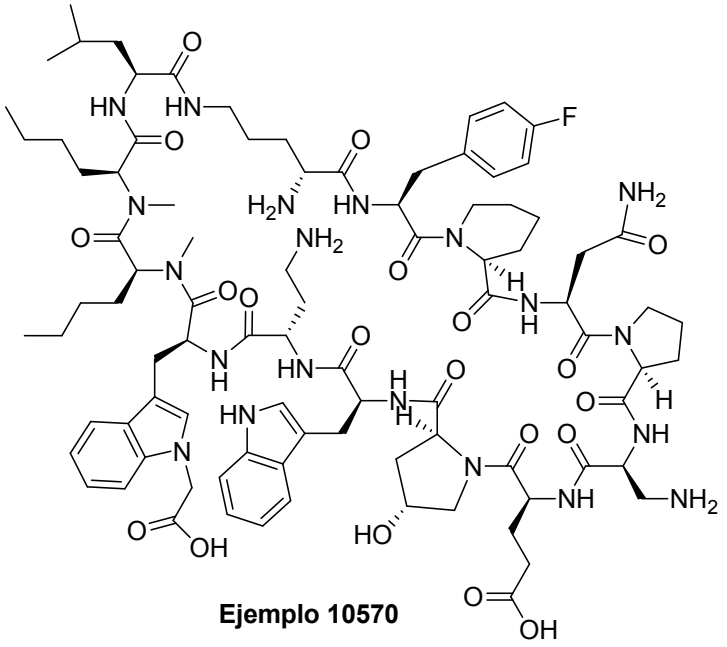


Ejemplo 10569

Se preparó el Ejemplo 10569 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 6.1 mg del producto con una pureza de 100%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.78 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1838.1 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10570

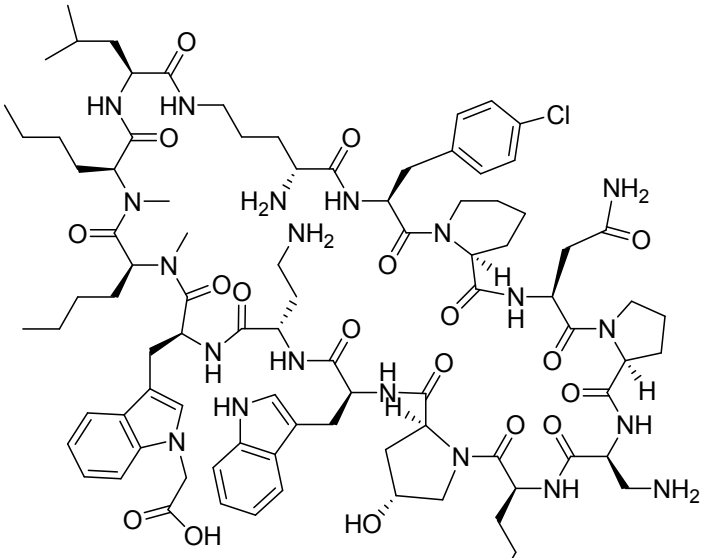


Ejemplo 10570

Se preparó el Ejemplo 10570 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 1.8 mg del producto con una pureza de 97%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1

x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.47 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1827.2 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10571

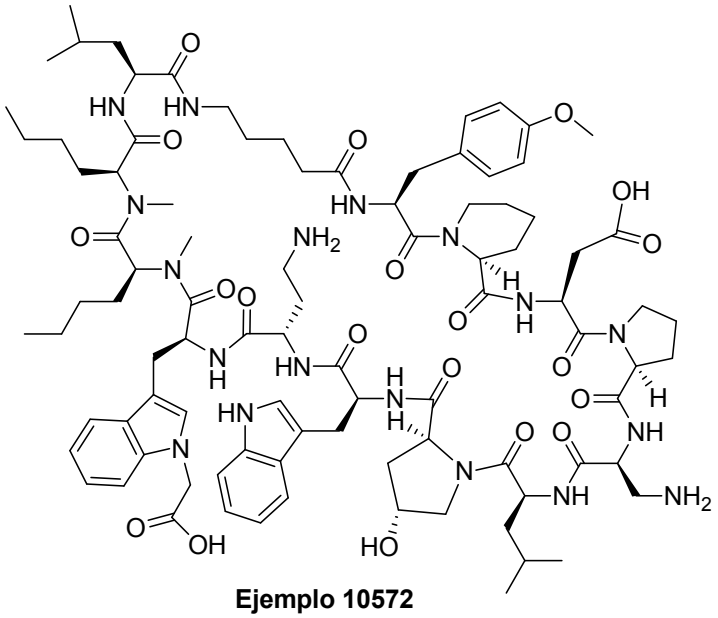


Ejemplo 10571

Se preparó el Ejemplo 10571 siguiendo el procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 (ácido (R)-5-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanoico usado en la 4.a etapa de acoplamiento de amida) para obtener 0.7 mg del producto con una pureza de 91.3%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50

mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.52 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 922.9 *m/z*.

Preparación del Ejemplo 10572



Ejemplo 10572

Se preparó el Ejemplo 10572 siguiendo el

procedimiento usado para la preparación del Ejemplo 10505 para obtener 21.7 mg del producto con una pureza de 94.8%. Se usaron dos inyecciones de LC/MS analítica para determinar la pureza final. Condiciones de inyección 1: Columna: Waters BEH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Condiciones de inyección 2: Columna: Waters CSH C18, 2.1 x 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético; temperatura: 70°C; gradiente: 0-100% de B durante 3 minutos, luego un mantenimiento de 2.0 minutos a 100% de B; flujo: 0.75 mL/min; detección: UV a 220 nm. Resultados del análisis: Tiempo de retención = 1.59 minutos con la correspondiente detección mediante ESI de 1810.8 *m/z*.

MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE PÉPTIDOS MACROCÍCLICOS PARA COMPETIR POR LA FIJACIÓN DE PD-1 A PD-L1 MEDIANTE ENSAYOS DE FIJACIÓN DE FLUORESCENCIA HOMOGÉNEA DE RESOLUCIÓN TEMPORAL (HTRF)

La capacidad de los péptidos macrocíclicos de la presente descripción para fijarse a PD-L1 se investigó

mediante un ensayo de fijación de fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF) PD-1/PD-L1.

Métodos

Ensayos de fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF) de fijación de PD-1 soluble a PD-L1 soluble. PD-1 soluble y PD-L1 soluble se refieren a proteínas con truncamientos de extremo de carboxilo que eliminan las regiones que abarcan transmembrana y se fusionan con secuencias heterólogas, específicamente la porción Fc de la secuencia de inmunoglobulina humana G (Ig) o la etiqueta del epítopo de hexahistidina (His). Todos los estudios de fijación se realizaron en un amortiguador de ensayo HTRF que consistía en dPBS enriquecido con 0.1% (p/v) de albúmina de suero bovino y 0.05% (v/v) de Tween-20. Para el ensayo de fijación de PD-1-Ig/PD-L1-His, los inhibidores se incubaron previamente con PD-L1-His (10 nM final) durante 15 m en 4 µl de amortiguador de ensayo, y luego se agregó PD-1-Ig (20 nM final) en 1 µl de amortiguador de ensayo, y se continuó la incubación durante 15 m. Se usaron proteínas de fusión PD-L1 de ser humano, macaco, ratón u otras especies. La detección mediante HTRF se logró usando anticuerpo monoclonal anti-Ig etiquetado con criptato de europio (1 nM final) y anticuerpo monoclonal anti-His etiquetado con aloficocianina (APC) (20 nM final). Los anticuerpos se diluyeron en amortiguador de detección de HTRF, y se colocaron 5 µl encima de la reacción

de fijación. La reacción se equilibró durante 30 minutos, y se obtuvo la señal (relación 665nm/620nm) usando un fluorómetro EnVision. Se establecieron ensayos de fijación adicionales entre PD-1-Ig/PD-L2-His (20 y 5 nM, respectivamente), CD80-His/PD-L1-Ig (100 y 10 nM, respectivamente) y CD80-His/CTLA4-Ig (10 y 5 nM, respectivamente). Se realizaron estudios de competición entre el Compuesto biotinilado No. 71 y PD-L1-His humana de la siguiente manera. Se incubaron previamente inhibidores del péptido macrocíclico con PD-L1-His (10 nM final) durante 60 minutos en 4 µl de amortiguador de ensayo, y luego se agregó Compuesto biotinilado No. 71 (0.5 nM final) en 1 µl de amortiguador de ensayo. Se dejó que la fijación se equilibrara durante 30 minutos, y luego se agregó estreptadivina etiquetada con criptato de europio (2.5 pM final) y anti-His etiquetado con APC (20 nM final) en 5 µl de amortiguador de HTRF. Se dejó que la reacción se equilibrara durante 30 m, y se obtuvo la señal (relación 665 nm/620 nm) usando un fluorómetro EnVision.

Proteínas recombinantes. PD-1 humano truncado con carboxilo (aminoácidos 25-167) con una etiqueta del epítopo de Ig humana del C-terminal [hPD-1 (25-167)-3S-IG] y PD-L1 humana (aminoácidos 18-239) con una etiqueta del epítopo His del C-terminal [hPD-L1(19-239)-sitio de escisión del Virus del moteado de las nerviaciones del tabaco (TVMV)-His] se

expresaron en células HEK293T y se purificaron secuencialmente mediante cromatografía de afinidad de proteína A recombinante y cromatografía por exclusión de tamaño. Se obtuvieron PD-L2-His (Sino Biologicals), CD80-His (Sino Biologicals), CTLA4-Ig (RnD Systems) de ser humano a través de fuentes comerciales.

Secuencia de PD-1-Ig humana recombinante

hPD1(25-167)-3S-IG

```
  1       LDSPDRPWNP PTFSPALLVV TEGDNATFTC SFSNTSESFV LNWYRMSPSN
 51       QTDKLAAFPE DRSQPGQDCR FRVTQLPNGR DFHMSVVRAR RNDSGTYLCG
101       AISLAPKAQI KESLRAELRV TERRAEVPTA HPSPSPRPAG QFQGSPGGGG
151       GREPKSSDKT HTSPPSPAPE LLGGSSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
201       VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
251       LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
301       SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
351       KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
```

(SEQ ID NO:1)

Secuencia de PD-L1-TVMV-His humana recombinante (PD-L1-His)

hPDL1(19-239)-TVMV-His

```
  1 FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
 51 HGEEDLKVQH SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101 GGADYKRITV KVNAPYNKIN QRILVVDPVT SEHELTCQAE GYPKAEVIWT
151 SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTTNEIFY CTFRRLDPEE
201 NHTAELVIPE LPLAHPPNER TGSSETVRFQ GHHHHHH
```

(SEQ ID NO:2)

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Como puede apreciarse, los péptidos macrocíclicos de la presente descripción demostraron una inhibición potente de la actividad de fijación de PD-1-Ig a PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His). Los intervalos son los siguientes: A = 0.10-10 µM; B = 0.01-0.099 µM; C = 0.001 - 0.0099 µM

Tabla 1

Número de ejemplo	*IC50 de HTRF (μM)*
Ejemplo 5001	C
Ejemplo 5002	C
Ejemplo 5003	A
Ejemplo 5004	A
Ejemplo 5005	A
Ejemplo 5006	B
Ejemplo 5007	C
Ejemplo 5008	C
Ejemplo 5009	C
Ejemplo 10001	C
Ejemplo 10002	B
Ejemplo 10003	C
Ejemplo 10004	C
Ejemplo 10005	10.00
Ejemplo 10006	B
Ejemplo 10007	C
Ejemplo 10008	C
Ejemplo 10009	A
Ejemplo 10010	A
Ejemplo 10011	C
Ejemplo 10012	B

Ejemplo 10013	0.07
Ejemplo 10014	C
Ejemplo 10015	C
Ejemplo 10016	C
Ejemplo 10017	C
Ejemplo 10018	B
Ejemplo 10019	A
Ejemplo 10020	B
Ejemplo 10021	B
Ejemplo 10022	B
Ejemplo 10023	A
Ejemplo 10024	B
Ejemplo 10025	A
Ejemplo 10026	B
Ejemplo 10027	6.95E-03
Ejemplo 10028	A
Ejemplo 10500	A
Ejemplo 10501	C
Ejemplo 10502	C
Ejemplo 10503	B
Ejemplo 9005	C
Ejemplo 9006	C
Ejemplo 9007	0.005
Ejemplo 9008	C

Ejemplo 9009	C
Ejemplo 9010	B
Ejemplo 9011	B
Ejemplo 9012	B
Ejemplo 9013	B
Ejemplo 9014	C
Ejemplo 9015	0.015
Ejemplo 9016	C
Ejemplo 9017	B
Ejemplo 9018	C
Ejemplo 9019	C
Ejemplo 9020	B
Ejemplo 9021	B
Ejemplo 9022	B
Ejemplo 9023	B
Ejemplo 9024	B
Ejemplo 9025	0.016
Ejemplo 9026	C
Ejemplo 9027	C
Ejemplo 9028	C
Ejemplo 9029	C
Ejemplo 9030	B
Ejemplo 9031	C
Ejemplo 9032	C

Ejemplo 9033	C
Ejemplo 9034	C
Ejemplo 9035	C
Ejemplo 9036	C
Ejemplo 9037	C
Ejemplo 9038	C
Ejemplo 9039	C
Ejemplo 9040	C
Ejemplo 9041	0.005
Ejemplo 9042	C
Ejemplo 9043	C
Ejemplo 9044	C
Ejemplo 9045	C
Ejemplo 9046	C
Ejemplo 9047	C
Ejemplo 9048	C
Ejemplo 9049	C
Ejemplo 9050	C
Ejemplo 9051	C
Ejemplo 9052	0.010
Ejemplo 9053	C
Ejemplo 9054	C
Ejemplo 9055	C
Ejemplo 9056	C

Ejemplo 9057	C
Ejemplo 9058	C
Ejemplo 9059	C
Ejemplo 1029	B
Ejemplo 1030	C
Ejemplo 1031	C
Ejemplo 1032	C
Ejemplo 1033	B
Ejemplo 1034	C
Ejemplo 1035	C
Ejemplo 1036	C
Ejemplo 1037	C
Ejemplo 1038	C
Ejemplo 1039	C
Ejemplo 1040	C
Ejemplo 1041	C
Ejemplo 1042	B
Ejemplo 10504	B
Ejemplo 10505	C
Ejemplo 10506	C
Ejemplo 10507	C
Ejemplo 10508	B
Ejemplo 10509	0.765
Ejemplo 10510	A

Ejemplo 10511	A
Ejemplo 10512	A
Ejemplo 10513	0.354
Ejemplo 10514	B
Ejemplo 10515	B
Ejemplo 10516	B
Ejemplo 10517	B
Ejemplo 10518	B
Ejemplo 10519	B
Ejemplo 10520	B
Ejemplo 10521	B
Ejemplo 10522	B
Ejemplo 10525	B
Ejemplo 10526	B
Ejemplo 10527	B
Ejemplo 10528	B
Ejemplo 10529	B
Ejemplo 10530	C
Ejemplo 10531	C
Ejemplo 10532	C
Ejemplo 10533	C
Ejemplo 10534	C
Ejemplo 10535	C
Ejemplo 10536	C

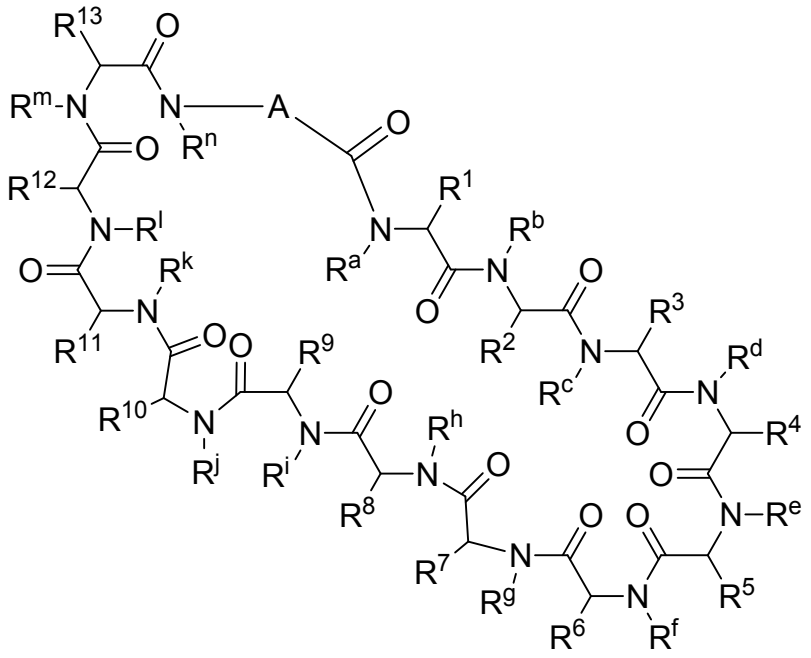
Ejemplo 10537	B
Ejemplo 10538	C
Ejemplo 10539	C
Ejemplo 10540	C
Ejemplo 10541	C
Ejemplo 10542	C
Ejemplo 10543	C
Ejemplo 10544	C
Ejemplo 10545	0.008
Ejemplo 10546	B
Ejemplo 10547	B
Ejemplo 10548	B
Ejemplo 10549	B
Ejemplo 10550	B
Ejemplo 10551	C
Ejemplo 10552	C
Ejemplo 10553	B
Ejemplo 10554	C
Ejemplo 10555	B
Ejemplo 10556	C
Ejemplo 10557	C
Ejemplo 10558	B
Ejemplo 10559	B
Ejemplo 10560	B

Ejemplo 10561	C
Ejemplo 10562	B
Ejemplo 10563	C
Ejemplo 10564	B
Ejemplo 10566	C
Ejemplo 10567	B
Ejemplo 10568	C
Ejemplo 10569	C
Ejemplo 10570	0.012
Ejemplo 10571	C
Ejemplo 10572	C

Una persona del oficio de nivel medio comprenderá que la presente descripción no se limita a los ejemplos ilustrativos anteriores, y que se puede realizar en otras formas específicas sin apartarse de los atributos esenciales de esta. Por lo tanto, se pretende que los ejemplos se consideren, en todo sentido, ilustrativos y no restrictivos, y que se haga referencia a las reivindicaciones adjuntas, en lugar de a los ejemplos anteriores; por ello, se pretende que todos los cambios que se encuentren dentro del significado y intervalo de equivalencia de las reivindicaciones estén incluidos en ellas.

REIVINDICACIONES

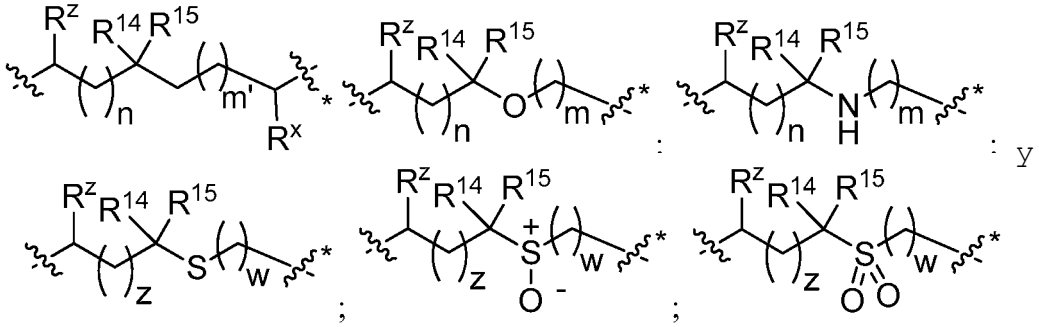
1. Un compuesto caracterizado porque tiene la Fórmula (I)



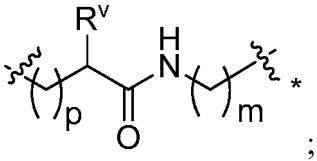
(I),

o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde:

A se selecciona de $-CH_2CH_2-$;



y



;

en donde:

~~* indica el punto de unión al grupo carbonilo y ~~ indica el punto de unión al átomo de nitrógeno;

n es 0, 1 ó 2;

m es 1 ó 2;

m' es 0 ó 1;

z es 1 ó 2;

cuando z es 1, w es 2;

cuando z es 2, w es 1 ó 2;

p es 0, 1 ó 2;

R^{14} y R^{15} se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^{x} se selecciona de hidrógeno, amino, hidroxi y metilo; y

R^{z} se selecciona de hidrógeno y $-C(O)NHR^{16}$; en donde R^{16} se selecciona de hidrógeno, $-CHR^{17}C(O)NH_2$, $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ y $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$; en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y $-CH_2OH$, y en donde R^{18} se selecciona de hidrógeno y metilo;

R^{v} es hidrógeno, metilo o una cadena lateral de aminoácido natural;

R^c, R^f, R^h, R^i y R^m son hidrógeno;

R^n es hidrógeno o metilo, o R^v y R^n forman un anillo de pirrolidina;

R^a, R^e, R^j y R^k se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural o forman un anillo con el grupo R próximo correspondiente, como se describe más adelante;

R^e y R^k pueden formar, cada uno, un anillo con el grupo R próximo correspondiente y los átomos a los que están unidos, seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^b es metilo, o R^b y R^2 junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi;

R^d es hidrógeno o metilo, o R^d y R^4, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo

seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo, hidroxi y fenilo;

R^g es hidrógeno o metilo, o R^g y R^7, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado de azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, bencilo opcionalmente sustituido con un grupo halo, benciloxi, ciano, ciclohexilo, metilo, halo, hidroxi, isoquinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo metoxi, quinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo halo, y tetrazolilo; y en donde los anillos de pirrolidina y piperidina están opcionalmente fusionados con un grupo ciclohexilo, fenilo o indol; y

R^L es metilo, o R^L y R^{12}, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado de azetidina y pirolidina, en donde cada anillo se sustituye opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de amino, ciano, metilo, halo e hidroxi.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, caracterizado porque

R^d y R^4 junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina;

R^g y R^7 junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de pirolidina, en donde el anillo se sustituye opcionalmente con un grupo hidroxi; y

R^k es metilo.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, o una sal de este terapéuticamente aceptable, caracterizado porque:

R^a, R^e y R^j, hidrógeno;

R^b y R^2 son, cada uno, metilo, o R^b y $R^{2\cdot}$ junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo de piperidina;

R^L es metilo;

R^n es hidrógeno, metilo, o R^n y R^v forman un anillo de pirrolidina;

R^1 es fenilmetilo, en donde fenilo se sustituye con un grupo seleccionado de halo, hidroxi, metoxi o metilo;

R^3 se selecciona de $-CH_2C(O)NH_2$ y $-CH_2CO_2H$;

R^5 se selecciona de hidrógeno, $-CH_2NH_2$, $-CH_2$(imidazolilo) y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^6 se selecciona de $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_2CO_2H$ y $(CH_2)_2C(O)NH_2$;

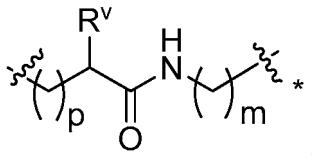
R^8 y R^{10} son $-CH_2$(indolilo), en donde indolilo se sustituye opcionalmente con $-CH_2CO_2H$;

R^9 se selecciona de hidrógeno, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2C(O)NH_2$;

R^{11} y R^{12} son $-(CH_2)_3CH_3$; y

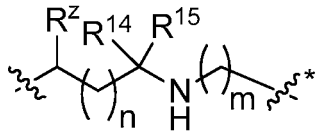
R^{13} se selecciona de metilo, $-CH_2OH$, $-CH_2CH(CH_3)_2$ y $-(CH_2)_2CO_2H$.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, o una sal de este terapéuticamente aceptable, caracterizado porque A es



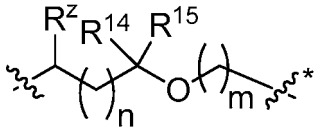
.

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, o una sal de este aceptable desde el punto de vista terapéutico, caracterizado porque A es



.

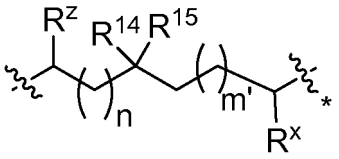
6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, o una sal de este aceptable desde el punto de vista terapéutico, caracterizado porque A es



.

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, o una sal de este aceptable desde el punto

de vista terapéutico, caracterizado porque A es



8. Un compuesto caracterizado porque se selecciona de:

Ejemplo 5001, Ejemplo 5002, Ejemplo 5003, Ejemplo 5004, Ejemplo 5005, Ejemplo 5006, Ejemplo 5007, Ejemplo 5008, Ejemplo 5009, Ejemplo 10001, Ejemplo 10002, Ejemplo 10003, Ejemplo 10004, Ejemplo 10005, Ejemplo 10006, Ejemplo 10007, Ejemplo 10008, Ejemplo 10009, Ejemplo 10010, Ejemplo 10011, Ejemplo 10012, Ejemplo 10013, Ejemplo 10014, Ejemplo 10015, Ejemplo 10016, Ejemplo 10017, Ejemplo 10018, Ejemplo 10019, Ejemplo 10020, Ejemplo 10021, Ejemplo 10022, Ejemplo 10023, Ejemplo 10024, Ejemplo 10025, Ejemplo 10026, Ejemplo 10027, Ejemplo 10028, Ejemplo 10500, Ejemplo 10501, Ejemplo 10502, Ejemplo 10503, Ejemplo 9005, Ejemplo 9006, Ejemplo 9007, Ejemplo 9008, Ejemplo 9009, Ejemplo 9010, Ejemplo 9011, Ejemplo 9012, Ejemplo 9013, Ejemplo 9014, Ejemplo 9015, Ejemplo 9016, Ejemplo 9017, Ejemplo 9018, Ejemplo 9019, Ejemplo 9020, Ejemplo 9021, Ejemplo 9022, Ejemplo 9023, Ejemplo 9024, Ejemplo 9025, Ejemplo 9026, Ejemplo 9027, Ejemplo 9028, Ejemplo 9029, Ejemplo 9030, Ejemplo 9031, Ejemplo 9032, Ejemplo 9033, Ejemplo 9034, Ejemplo 9035, Ejemplo 9036, Ejemplo 9037, Ejemplo 9038, Ejemplo 9039,

Ejemplo 9040, Eample 9041, Ejemplo 9042, Ejemplo 9043, Ejemplo 9044, Ejemplo 9045, Ejemplo 9046, Ejemplo 9047, Ejemplo 9048, Ejemplo 9049, Ejemplo 9050, Ejemplo 9051, Ejemplo 9052, Ejemplo 9053, Ejemplo 9054, Ejemplo 9055, Ejemplo 9056, Ejemplo 9057, Ejemplo 9058, Ejemplo 9059, Ejemplo 10029, Ejemplo 10030, Ejemplo 10031, Ejemplo 10032, Ejemplo 10033, Ejemplo 10034, Ejemplo 10035, Ejemplo 10036, Ejemplo 10037, Ejemplo 10038, Ejemplo 10039, Ejemplo 10040, Ejemplo 10041, Ejemplo 10042, Ejemplo 10504, Ejemplo 10505, Ejemplo 10506, Ejemplo 10507, Ejemplo 10508, Ejemplo 10509, Ejemplo 10510, Ejemplo 10511, Ejemplo 10512, Ejemplo 10513, Ejemplo 10514, Ejemplo 10515, Ejemplo 10516, Ejemplo 10517, Ejemplo 10518, Ejemplo 10519, Ejemplo 10520, Ejemplo 10521, Ejemplo 10522, Ejemplo 10525, Ejemplo 10526, Ejemplo 10527, Ejemplo 10528, Ejemplo 10529, 10530, Ejemplo 10531, Ejemplo 10532, Ejemplo 10533, Ejemplo 10534, Ejemplo 10535, Ejemplo 10536, Ejemplo 10537, Ejemplo 10538, Ejemplo 10539, Ejemplo 10540, Ejemplo 10541, Ejemplo 10542, Ejemplo 10543, Ejemplo 10544, Ejemplo 10545, Ejemplo 10546, Ejemplo 10547, Ejemplo 10548, Ejemplo 10549, Ejemplo 10550, Ejemplo 10551, Ejemplo 10552, Ejemplo 10553, Ejemplo 10554, Ejemplo 10555, Ejemplo 10556, Ejemplo 10557, Ejemplo 10558, Ejemplo 10559, Ejemplo 10560, Ejemplo 10561, Ejemplo 10562, Ejemplo 10563, Ejemplo 10564, Ejemplo 10566, Ejemplo 10567, Ejemplo 10568, Ejemplo 10569, Ejemplo 10570, Ejemplo 10571 y Ejemplo 10572, o una

sal de aquel aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

9. Un método para mejorar, estimular y/o aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita, caracterizado porque comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque también comprende administrar un agente adicional antes, durante o después de la administración del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el agente adicional es un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un agente citotóxico y/o un modificador de la respuesta inmunitaria.

12. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el agente adicional es un inhibidor de HDAC.

13. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el agente adicional es un agonista de TLR^7 y/o TLR^8.

14. Un método para inhibir el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células cancerígenas en un

sujeto que lo necesita, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el cáncer se selecciona de melanoma, carcinoma de células renales, cáncer pulmonar de células no pequeñas escamosas (NSCLC), NSCLC de células no escamosas, cáncer colorrectal, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer de ovario, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma pancreático, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas de esófago, tubo gastrointestinal y mama, y tipos de cáncer hematológico.

16. Un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesita, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la enfermedad infecciosa es causada por un virus.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el virus se selecciona de VIH, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, virus del herpes e influenza.

19. Un método para tratar el choque séptico en un sujeto que lo necesita, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

20. Un método para bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1 y/o CD80 en un sujeto; caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o una sal de este terapéuticamente aceptable.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona péptidos macrocíclicos novedosos que inhiben las interacciones proteína/proteína PD-1/PD-L1 y PD-L1/CD80, y por ende, son útiles para la mejora de varias enfermedades, que incluyen el cáncer y las enfermedades infecciosas.