COMPUESTOS DERIVADOS DE 1-TETRAHIDROPIRANILCARBONIL-2,3-DIHIDRO-1H-INDOL PARA TRATAR EL CANCER

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de 2,3-dihidro-1H-indol que inhiben la conversión de triptófano a cinurenina, algunos de los cuales se ha confirmado que se unen a indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y métodos para usar estos compuestos para tratar trastornos fisiológicos, más particularmente para el tratamiento de cáncer tal como melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer tiroideo, glioma, linfoma no Hodgkin, y linfoma de Hodgkin.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El triptófano es un aminoácido esencial requerido para la biosíntesis de proteína, crecimiento celular, la generación de metabolitos neuroactivos tales como serotonina (5-hidroxitriptamina), melatonina, y la co-enzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). El triptófano es

catabolizado por indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), una enzima heme-dependiente que cataliza la primera etapa limitante de la velocidad en el catabolismo del triptófano a N-formil-cinurerina, la cual es entonces desformilada para generar cinurerina. Durante la infección, la expresión de IDO1 es inducida por el interferón gamma para agotar localmente el triptófano, el cual inhibe el crecimiento de patógenos intracelulares dependientes del triptófano, tales como *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii,* y virus. Adicionalmente, la IDO1 juega un papel en la prevención del daño oxidativo en células, neuropatologías severas, regulación del sistema inmune, y cáncer. Aunque la actividad de IDO1 es un componente crítico de la respuesta inmune a patógenos, la actividad prolongada resulta en el agotamiento del triptófano extracelular con la producción concomitante de cinurenina, ambos de los cuales son inmunosupresores. La expresión de IDO1 en cáncer es bien documentada y ocurre a través de tanto la activación intrínseca de la expresión del gen IDO1 y/o como a través de la activación de los ejes IFN-γ a IDO1, un resultado de la activación de células inmunes. Adicionalmente, las células inmunes innatas tales como células dendríticas, monocitos y macrófagos, los cuales son reclutados a sitios de inflamación y el microambiente del tumor, son inmunosupresores cuando expresan IDO1. En conjunto, el agotamiento dependiente de IDO1 de triptófano y

producción de cinurerina han sido ligados a la supresión de la activación de células T y proliferación y función de las células NK. Además, el agotamiento de triptófano y producción de cinurerina son críticos para la formación de células T reguladoras (Treg) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), las cuales funcionan para desalentar la activación de células inmunes. Estos mecanismos inmunosupresores dependientes de IDO1 son componentes que permiten a los tumores evitar el sistema inmune.

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

Existe una necesidad de nuevos tratamientos de cáncer. En particular, existe una necesidad de nuevos tratamientos de cáncer para melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer

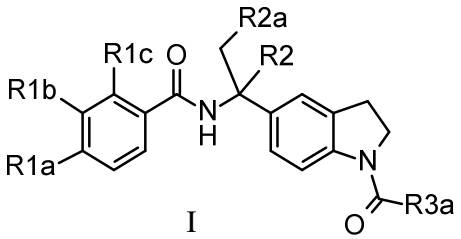
tiroideo, glioma, linfoma no Hodgkin, y linfoma de Hodgkin. Permanece una necesidad para proporcionar inhibidores alternativos de la producción de cinurerina en el tratamiento de cáncer. Preferiblemente, tales compuestos tienen propiedades que permiten la dosificación óptima requerida para la inhibición máxima del crecimiento de células tumorales mientras tiene tolerabilidad aceptable para el paciente. Preferiblemente, tales compuestos podrían también ser oralmente biodisponibles. Preferiblemente, tales compuestos podrían también tener la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y de este modo tener exposición del cerebro. Preferiblemente, tales compuestos podrían también tener la capacidad para potencialmente superar la resistencia a inhibidores de cinurerina existentes, teniendo un mecanismo de acción alterno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos de 2,3-dihidro-1H-indol que son inhibidores de la producción de cinurenina. La persona experta apreciará que los inhibidores de la producción de cinurenina pueden tener utilidad clínica como un agente único o en combinación con otros agentes anti-cancerígenos para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres y en particular melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer

colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer tiroideo, glioma, linfoma no Hodgkin, y linfoma de Hodgkin.

La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:



I

en donde:

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

R1b es hidrógeno, fluoro, o cloro;

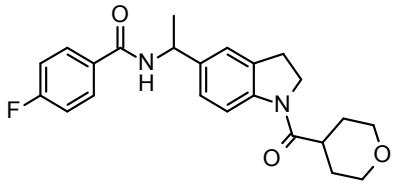
R1c es hidrógeno, hidroxi, fluoro, benciloxi, o hidroxietilamino;

R2 es hidrógeno o metilo;

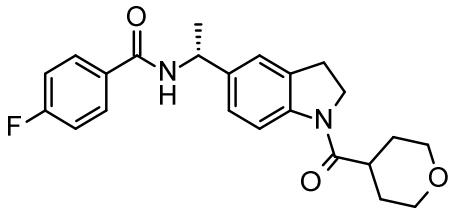
R2a es hidrógeno o metilo; y

R3a es tetrahidropiranilo.

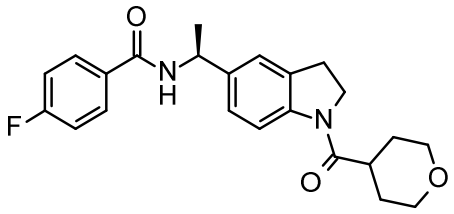
La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:

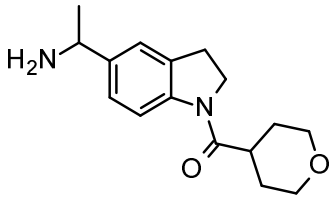


La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:



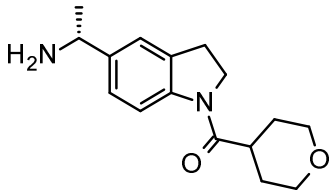
La presente invención también proporciona un compuesto el cual es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida en una forma cristalina. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida cristalina caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos X (radiación de Cu, λ-1.54060 Å) que comprende al menos un pico a 17.38° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste de 12.51°, 15.65°, 16.37°, 17.56°, 21.48° y 25.23° (2θ± 0.2°).

La presente invención también proporciona un intermediario o sal del mismo de la fórmula:



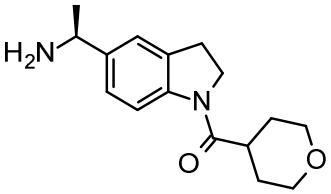
útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona un intermediario o sal del mismo de la fórmula:



útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

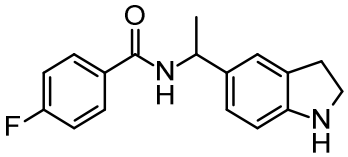
La presente invención también proporciona un intermediario o sal del mismo de la fórmula:



útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

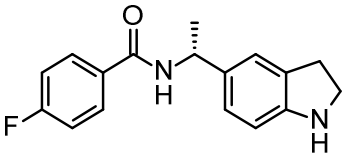
La presente invención también proporciona un

intermediario de la fórmula:



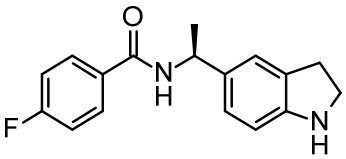
útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona un intermediario de la fórmula:



útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona un intermediario de la fórmula:



útil en el método para elaborar ciertos compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención con un excipiente, portador, o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-

dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida.

La presente invención proporciona un método para tratar un paciente con un cáncer seleccionado a partir del grupo que consiste de melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer tiroideo, glioma, linfoma no Hodgkin, y linfoma de Hodgkin, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. Preferiblemente el cáncer es melanoma. Preferiblemente el cáncer es cáncer colorrectal. Preferiblemente el cáncer es carcinoma de células renales. Preferiblemente el cáncer es cáncer de mama. Preferiblemente el cáncer es cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferiblemente el cáncer es cáncer de ovario. Preferiblemente el cáncer es glioma. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida.

Esta invención también proporciona un compuesto de la presente invención para uso en terapia. Adicionalmente, esta invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de un cáncer

seleccionado a partir del grupo que consiste de melanoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma peritoneal primario, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer tiroideo, glioma, linfoma no Hodgkin, y linfoma de Hodgkin. Preferiblemente el cáncer es melanoma. Preferiblemente el cáncer es cáncer colorrectal. Preferiblemente el cáncer es carcinoma de células renales, Preferiblemente el cáncer es cáncer de mama. Preferiblemente el cáncer es cáncer de pulmón, in particular cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferiblemente el cáncer es cáncer de ovario. Preferiblemente el cáncer es glioma. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida.

Esta invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de la presente invención y LY3300054 para uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento de un cáncer seleccionado a partir del grupo que consiste de cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de colon. Preferiblemente el cáncer es cáncer de pulmón de

células no pequeñas. Preferiblemente el cáncer es cáncer de colon. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida y el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferiblemente el compuesto es 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida y el cáncer es cáncer de colon.

Los siguientes párrafos describen las clases preferidas de Formula I:

a) R1a es hidrógeno, metilo, ciano, fluoro, o cloro;

b) R1b es hidrógeno, fluoro, o cloro;

c) R1c es hidrógeno o hidroxi;

d) R2 es hidrógeno o metilo;

e) R2a es hidrógeno o metilo;

f) R3a es tetrahidropiranilo; y

g) R1a es fluoro, R1b es hidrógeno, R1c es hidrógeno, R2 es hidrógeno, R2a es hidrógeno, y R3 es tetrahidropiranilo.

Ciertos de los compuestos de la presente invención son cristalinos. Es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades

relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como morfología y hábito del cristal. Donde los efectos de orientación preferida están presentes, las intensidades pico son alteradas, pero las posiciones pico características del polimorfo están sin cambio. Véase, *por ejemplo,* The U. S. Pharmacopeia 38 – National Formulary 35 Chapter <941> Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Además, es también bien conocido en la técnica de cristalografía que para cualquier forma de cristal dada, las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad en la cual una muestra es analizada, desplazamiento de muestra, o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de posición pico de ± 0.2 en 2θ tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma de cristal dada puede hacerse con base en cualquier combinación única de picos de distinción (en unidades de °2θ), típicamente los picos más prominentes. El cristal forma patrones de difracción, recolectados a temperatura ambiental y humedad relativa, son ajustados con base en picos del estándar NIST 675 a 8.85 y 26.77 grados 2-

theta.

Como se usa en la presente, “trata”, “tratar” o “tratamiento”, se refiere a restringir, reducir, detener o invertir el progreso o severidad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en la presente, el término “paciente” se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero, en particular un humano, el cual es afligido con una enfermedad, trastorno, o condición particular.

Uno de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que compuestos y ciertos intermediarios de la invención pueden existir en formas tautoméricas. Cuando se proporciona alguna referencia en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se entiende abarcar ambas formas tautoméricas y todas las mezclas de los mismos.

Algunos intermediarios o compuestos de la presente invención descritos en la presente pueden tener uno o más centros estereogénicos o quirales. Todos los estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales, así como también mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de todos estos compuestos o intermediarios mencionados anteriormente de la presente invención están contemplados incluyendo racematos. Se prefiere que los compuestos o intermediarios de la presente invención descritos en la presente, contengan al

menos un centro quiral que existe como enantiómeros o diastereómeros únicos. El enantiómero o diastereómero único puede ser preparado comenzando con reactivos quirales o por técnicas sintéticas estereoespecíficas o estereoselectivas (como se ilustra en las preparaciones y ejemplos). Alternativamente, los enantiómeros o diastereómeros únicos pueden ser aislados a partir de mezclas por cromatográficas quirales estándares (como se ilustra en las preparaciones y ejemplos) o técnicas de cristalización. El experto en la técnica apreciará que en algunas circunstancias, el orden de elución de enantiómeros o diastereómeros puede ser diferente debido a columnas cromatográficas y fases móviles diferentes.

La designación de “Isómero 1” en un nombre de compuesto representa que el intermediario o compuesto correspondiente la presente invención es el primero de dos enantiómeros de elución cuando una mezcla de un par de enantiómero se separa por cromatografía quiral. La designación de “Isómero 2” en un nombre de compuesto representa que el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es el segundo de dos enantiómeros de elución cuando la mezcla de un par de enantiómeros se separa por cromatografía quiral.

La designación de “Isómero A” en un nombre de compuesto representa que el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es un isómero único

de una síntesis quiral de configuración absoluta desconocida.

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

En algunas modalidades de LY3300054, la LY3300054 se une a PD-L1 humano, y comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la secuencia de aminoácido de la LCVR es la SEQ ID

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

Como se usa en la presente, el término “región variable de cadena ligera” o “LCVR” significa una porción de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácido de CDRs y FRs.

Como se usa en la presente, el término “región variable de cadena pesada” “HCVR” significa una porción de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácido de CDRs y FRs.

Como se usa en la presente, los términos “región determinante de complementariedad” y “CDR”, significan los sitios de combinación encontrados dentro de la región variable de polipéptidos de LC y HC de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Estas regiones particulares han sido descritas por otros que incluyen Kabat,

et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); MacCallum, et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); y North, et al., J. Mol. Biol., 406, 228-256 (2011), donde las definiciones incluyen traslapantes o subseries de residuos de aminoácido cuando se comparan entre sí.

Las CDRs son interdispersadas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón ("FR"). Cada LCVR y HCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas desde el término amino al término-carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las tres CDRs de la cadena ligera son referidas como "LCDR1, LCDR2, y LCDR3" y las tres CDRs de la cadena pesada son referidas como "HCDR1, HCDR2, y HCDR3". Las CDRs contienen la mayoría de los residuos los cuales forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y posicionamiento de residuos de aminoácido de CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de conformidad con convenciones conocidas (por ejemplo, Kabat (1991), Chothia (1987), y/o North (2011)). En diferentes modalidades de la invención, los FRs de la LY3300054 pueden ser idénticos a secuencias de línea germinal humana, o pueden ser naturalmente o artificialmente

modificados.

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

Como se usa en la presente, el término “se une” significa la afinidad del anticuerpo para PD-L1 humano está propuesto por significar, a menos que se indique de otro modo, una K_D de menos de aproximadamente $1x10^{-6}$ M, preferiblemente, menos de aproximadamente $1x10^{-9}$ M como se determina por métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen el uso de un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) a 37 °C esencialmente como se describe en la presente.

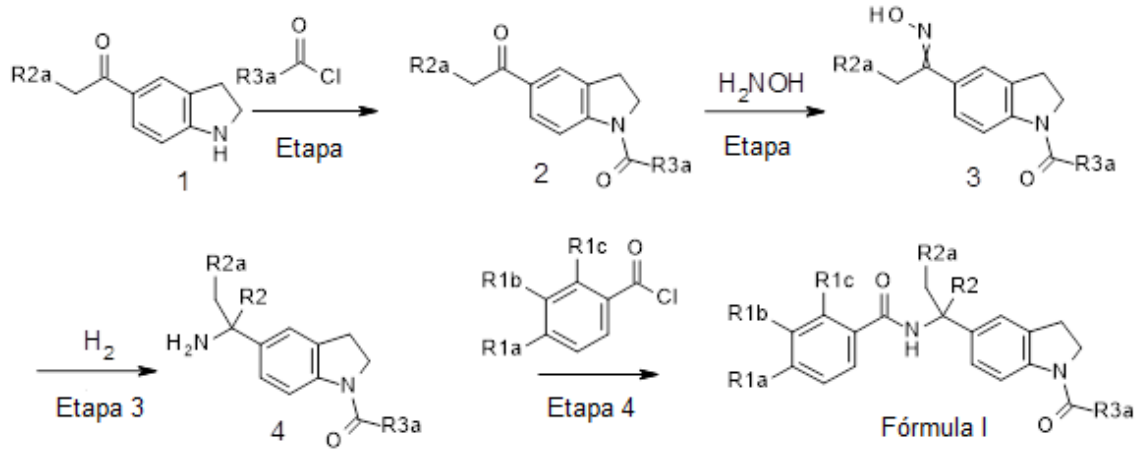
Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados indicados: “ACN” se refiere a acetonitrilo; “APCI” se refiere a ionización química a presión atmosférica; “BTI” se refiere a [bis(trifluoroacetoxi)yodo]benzeno; “CDI” se refiere a carbonildiimidazol; “DCM” se refiere a diclorometano; “DMSO” se refiere a dimetil sulfóxido; “DMF” se refiere a N,N-dimetilformamida; “DPBS” se refiere a salina amortiguada de fosfato de Dulbecco; “ES” se refiere a ionización por electro-rocío; “EtOAc” se refiere a acetato de etilo; “EtOH” se refiere a etanol; “FBS” se refiere a suero bovino fetal;

“HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alto desempeño; “iPrOH” se refiere a isopropanol; “LC/MS-MS” se refiere a espectrometría de masas en serie por cromatografía líquida; “L-cinurerina-d4” se refiere a ácido (2S)-2-amino-4-(2-amino-3,4,5,6-tetradeuterio-fenil)-4-oxo-butanoico; “MES” se refiere a ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico; “MS” se refiere a espectroscopia de masas; “MeOH” se refiere a metanol; “PBS” se refiere a salina amortiguada de fosfato; “TFA” se refiere a ácido trifluoroacético; “TEA” se refiere a trietilamina; “THF” se refiere a tetrahidrofurano; “SFC” se refiere a cromatografía de fluido supercrítico; y “UVW” se refiere a longitud de onda ultra-violeta.

Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados de conformidad con los siguientes esquemas de reacción, preparaciones y ejemplos por métodos bien conocidos y apreciados en el arte. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estas preparaciones y ejemplos son bien conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de solventes y co-reactivos están dentro de la habilidad de la técnica. Del mismo modo, se apreciará por aquellos expertos en la técnica, que los intermediarios sintéticos pueden ser aislados y/o purificados por varias técnicas bien conocidas como sean necesarias o deseadas, y que frecuentemente, será posible usar varios intermediarios directamente en etapas sintéticas subsecuentes con poca o

ninguna purificación. Además, el experto en la técnica apreciará que, en algunas circunstancias, el orden en el cual las porciones se introducen no es crítico. El orden particular de etapas requeridas para producir los compuestos de la presente invención es dependiente del compuesto particular siendo sintetizado, el compuesto de partida, y la confiabilidad relativa de las porciones sustituidas, como es bien apreciado por el químico experto. Todos los sustituyentes, a menos que se indique de otro modo, son como se definen previamente, y todos los reactivos son bien conocidos y apreciados en la técnica.

Los compuestos de la presente invención pueden ser sintetizados como se ilustra en los siguientes esquemas de reacción, donde R1a, R1b, R1c, R2, R2a y R3a son como se definen previamente.

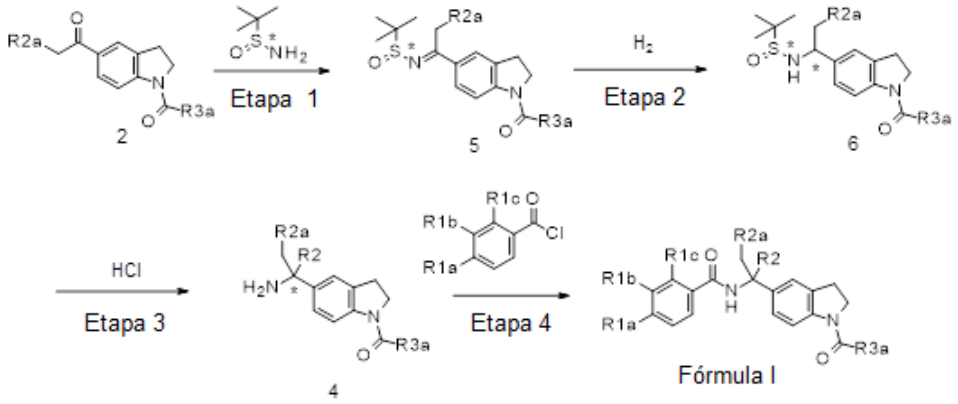


Esquema de reacción 1: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema de reacción 1 ilustra la síntesis general de compuestos de Fórmula I, R2 es H. En la Etapa 1,

un 2,3-dihidro-1H-indol (Compuesto 1) se hace reaccionar con un ácido carboxílico activado apropiado tal como un cloruro de ácido en la presencia de una base adecuada tal como TEA y en un solvente adecuado tal como DCM o dicloroetano (DCE) a una temperatura apropiada tal como 0 °C a reflujo. Un experto en la técnica apreciará que existen muchos ácidos carboxílicos activados y muchos métodos para activar ácidos carboxílicos *in situ* para realizar la reacción de la Etapa 1. La cetona resultante (Compuesto 2) de la Etapa 1 es entonces tratada con hidroxilamina en un solvente prótico polar tal como EtOH a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a reflujo para dar la oxima como una mezcla de isómeros E y Z (Compuesto 3). La Etapa 3 muestra la reducción de la oxima (Compuesto 3) a la amina (Compuesto 4). El experto en la técnica apreciará que existen muchos métodos disponibles para afectar esta transformación. Por ejemplo, la oxima (Compuesto 3) es puesta en contacto con un catalizador apropiado tal como níquel RANEY® en un solvente apropiado tal como MeOH o EtOH en un reactor apropiado tal como un sacudidor PARR®. La mezcla es entonces sometida a presión de hidrógeno tal como 100-500 kPa a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a 50 °C por un tiempo apropiado tal como una hasta 24 horas. El Esquema de reacción 1, Etapa 4 representa el acoplamiento amida de la amina (Compuesto 4) con un ácido carboxílico activado apropiado tal como un

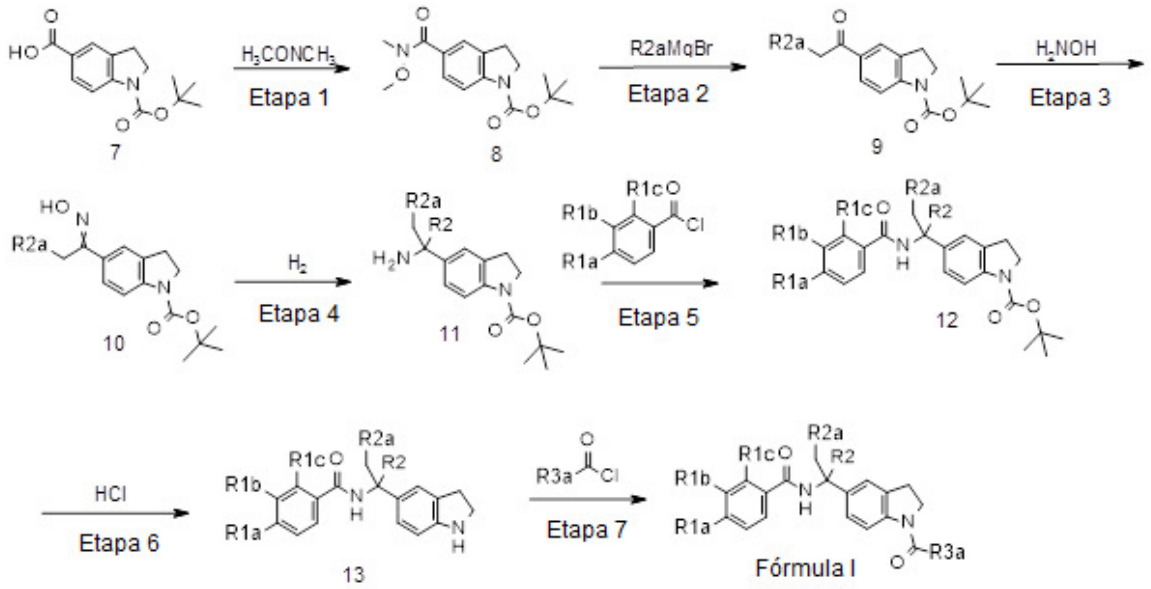
cloruro de ácido en la presencia de una base adecuada tal como TEA y en un solvente adecuado tal como DCM o DCE a una temperatura apropiada tal como 0 °C a reflujo para dar un compuesto de Fórmula I. Un experto en la técnica apreciará que existen muchos ácidos carboxílicos activados y muchos métodos para activar ácidos carboxílicos *in situ* para realizar la reacción de la Etapa 4. La persona experta además apreciará que, el Esquema de reacción 1, Etapa 3 y Etapa 4 resultan en productos con centros quirales. Los enantiómeros individuales pueden ser separados o resueltos por uno de habilidad ordinaria en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la presente invención por métodos tales como como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel and S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).



Esquema de reacción 2: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema de reacción 2 ilustra una síntesis general alterna de compuestos de Fórmula I, R2 es H. En la Etapa 1, la cetona (Compuesto 2) se hace reaccionar con una sulfinamida quiral apropiada en la presencia de un ácido Lewis apropiado tal como etóxido de titanio (IV) en un solvente apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a reflujo por un tiempo apropiado tal como una hasta 24 horas para dar una etilidensulfinamida quiral (Compuesto 5). Un experto en la técnica apreciará que los reactivos están disponibles para generar ya sea el enantiómero de la sulfinamida (Compuesto 5). La reducción quiral se representa en la Etapa 2 para generar una etilsulfinamida (Compuesto 6) a partir de una etilidinsulfinamida (Compuesto 5) y se usan asteriscos para indicar los centros quirales para claridad. Por ejemplo, un catalizador apropiado es pre-formado mezclando un reactivo de rutenio apropiado tal como dímero de dicloro(p-cimeno)rutenio(II) con un aminoetanol apropiado tal como 2-amino-2-metil-1-propanol en un solvente apropiado tal como iPrOH en la presencia de un depurador de agua tal como tamices moleculares 4Å a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a reflujo por un tiempo apropiado tal como cinco minutos hasta aproximadamente una hora. La reacción catalizadora realizada es enfriada a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente hasta 50 °C y tratada

con una etilidenesulfinamida (Compuesto 5) y una base apropiada tal como terc-butóxido de potasio. La reacción se mantiene a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a 50 °C por un tiempo apropiado tal como una hasta 24 horas. El experto en la técnica apreciará que existen muchos métodos estequiométricos y catalíticos que afectarán la misma transformación y que estos métodos pueden resultar en enriquecimiento diastereomérico dependiendo de la naturaleza de los sustratos y los reactivos usados, hasta y que incluyen, la generación de un diastereómero único. La hidrólisis de ácido de una etilsulfinamida (Compuesto 6) puede ser afectada por tratamiento con un ácido apropiado tal como ácido clorhídrico (HCl) en un solvente apropiado tal como dioxano, iPrOH, EtOAc o MeOH a una temperatura apropiada tal como 0 °C a temperatura ambiente por un tiempo apropiado tal como una a ocho horas para dar una amina (Compuesto 4). El experto en la técnica apreciará que muchos métodos para aislamiento se conocen y estos pueden resultar en aislamiento de ya sea la sal o base libre de la amina (Compuesto 4). La Etapa 4 representa el acoplamiento amida de una amina (Compuesto 4) con un ácido carboxílico activado apropiado análogo al Esquema de reacción 1, Etapa 4 anterior para dar un compuesto de Fórmula I.

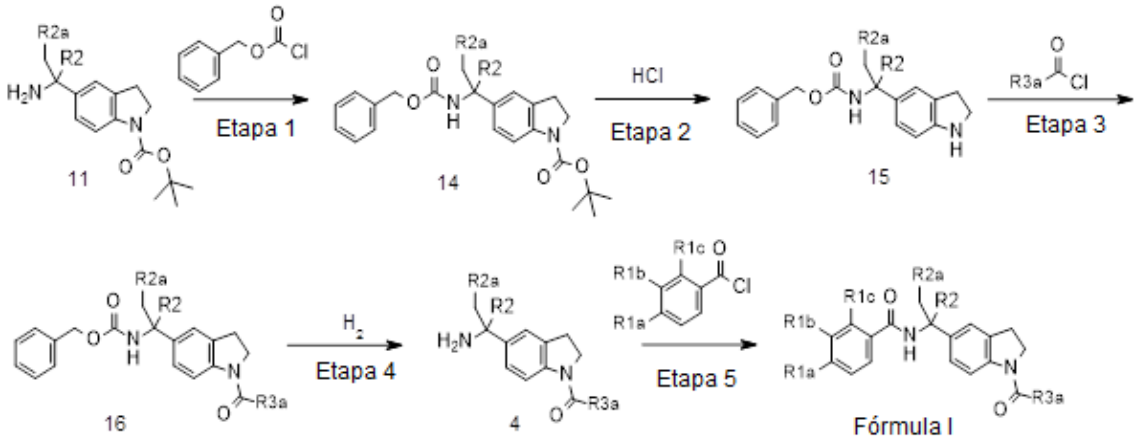


Esquema de reacción 3: Síntesis de compuestos de Fórmula I

El Esquema de reacción 3 representa una síntesis general alterna de un compuesto de Fórmula I, R2 es H. La Etapa 1 representa un acoplamiento amida de un ácido carboxílico (Compuesto 7) con clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina para dar una amida Weinreb (Compuesto 8). El experto en la técnica apreciará que existen muchos métodos para afectar esta transformación. Por ejemplo, un ácido carboxílico (Compuesto 7) puede ser tratado con un reactivo de acoplamiento apropiado tal como hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido (HATU) en la presencia de una base apropiada tal como N,N-diisopropiletilamina en un solvente apropiado tal como DMF por un tiempo apropiado tal como cinco a diez minutos. La mezcla es entonces tratada con clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina y la mezcla se agitó a una

temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a 100 °C por un tiempo apropiado tal como tres a 18 horas. La amida Weinreb resultante (Compuesto 8) es entonces tratada con un reactivo Grignard, alquil litio o alquil zinc apropiado, en la Etapa 2, para dar una cetona (Compuesto 9). El experto en la técnica apreciará que existe un gran número de métodos disponibles para afectar esta transformación. Por ejemplo, la amida Weinreb (Compuesto 8) en un solvente apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como 0 °C a −78 °C se trata con un reactivo de metal álcali apropiado tal como bromuro de etilmagnesio. La reacción se continúa después de la adición por un tiempo apropiado tal como una a 18 horas para dar a cetona (Compuesto 9). Las Etapas 3, 4 y 5 del Esquema de reacción 3 son presentadas por claridad. Los métodos son análogos a aquellos presentados en el Esquema de reacción 1, Etapas 2, 3 y 4 respectivamente. Uno de habilidad en la técnica apreciará que el compuesto 11 contiene un centro quiral y que la purificación quiral puede ser realizada en el compuesto 11 o la mezcla racémica puede ser llevada adelante y la separación puede ser realizada después de cualquiera de las etapas subsecuentes. La Etapa 6 representa la desprotección del grupo protector terc-butoxicarbonilo de un carbamato (Compuesto 12) para dar una amina (Compuesto 13). Un experto en la técnica apreciará que esta transformación puede ser conducida bajo condiciones

ácidos, de base o térmicas. Por ejemplo, un carbamato (Compuesto 12) es puesto en contacto con un ácido apropiado tal como HCl en un solvente apropiado tal como dioxano o DCM o una mezcla del mismo a una temperatura apropiada tal como 0 °C a reflujo por un tiempo apropiado tal como una a 18 horas para dar una amina (Compuesto 13). El experto en la técnica apreciará que existen métodos para aislar una amina como una sal o base libre. La Etapa 7 representa el acoplamiento amida de una amina (Compuesto 13) y un ácido carboxílico activado para dar un compuesto de Fórmula I. Las condiciones son análogas a aquellas presentadas en el Esquema de reacción 1, Etapa 1.

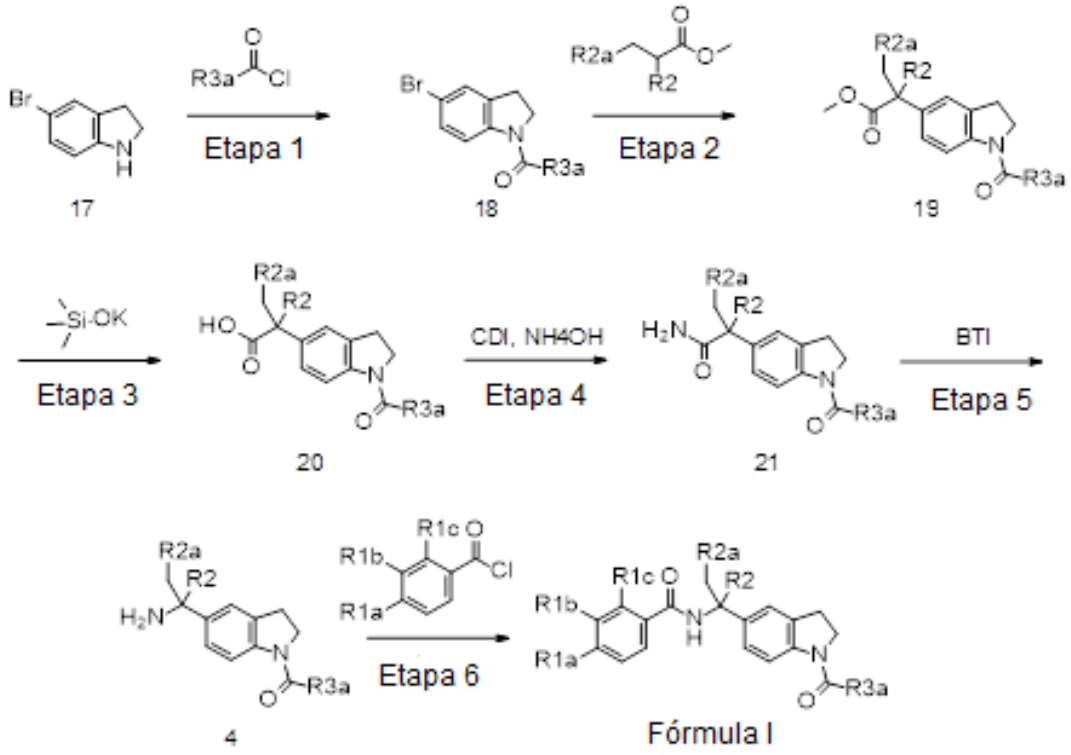


Esquema de reacción 4: Síntesis de compuestos de Fórmula I

Esquema de reacción 4 representa una síntesis general alterna de un compuesto de Fórmula I. La Etapa 1 representa la protección de una amina (Compuesto 11) con grupo protector de carbamato de bencilo para dar un carbamato (Compuesto 14). Un experto en la técnica apreciará que

existen muchos grupos protectores de amina disponibles que podrían ser grupos protectores ortogonales al grupo terc-butoxicarbonilo en el compuesto 14. En un procedimiento ejemplar, una amina (Compuesto 11) en un solvente apropiado tal como DCM y en la presencia de una base adecuada tal como N,N-diisopropiletilamina es puesta en contacto con benciloxicloroformiato a una temperatura apropiada tal como 0 °C a temperatura ambiente por un tiempo apropiado tal como una a 18 horas. El grupo protector terc-butoxicarbonilo del Compuesto 14 es selectivamente desprotegido para dar una amina (Compuesto 15) utilizando métodos análogos a aquellos descritos por el Esquema de reacción 3, Etapa 6. La amina resultante (Compuesto 15) es entonces sometida a una reacción de acoplamiento amida con un ácido carboxílico activado por métodos análogos a aquellos en el Esquema de reacción 1, Etapa 1 para dar una amida (Compuesto 16). La Etapa 4 representa la desprotección del grupo protector de carbamato de benciloxi del compuesto 16 para dar una amina (Compuesto 4). Un experto en la técnica apreciará que una variedad de métodos están disponibles para afectar esta transformación. Por ejemplo, el compuesto 16 es sometido a hidrogenación catalítica con un catalizador apropiado tal como hidróxido de paladio en un solvente apropiado tal como EtOH bajo una presión de hidrógeno apropiada tal como 100 a 500 kPa por un tiempo apropiado tal como una a ocho horas para dar la amina

(Compuesto 4). Finalmente, la conversión de amina (Compuesto 4) a un compuesto de Fórmula I es como se describe en el Esquema de reacción 1, Etapa 4.



Esquema de reacción 5: Síntesis de compuestos de Fórmula I

Esquema de reacción 5 representa una síntesis general alterna de un compuesto de Fórmula I. La Etapa 1 representa el acoplamiento amida de una amina (Compuesto 17) y un ácido carboxílico activado para dar una amida (Compuesto 18). Las condiciones son análogas a aquellas presentadas en el Esquema de reacción 1, Etapa 1. La Etapa 2 representa la formación del alfa ariléster (Compuesto 19) a través del acoplamiento cruzado catalítico de un bromuro (Compuesto 18) con un enolato de éster. La persona experta apreciará el

amplio intervalo de condiciones que pueden afectar esta transformación. Por ejemplo, una solución de una dialquil amina apropiada tal como diciclohexilamina en un solvente apropiado tal como tolueno, se trata con una base de litio apropiada tal como como n-butil litio a una temperatura apropiada tal como 0 °C a -78 °C por un tiempo apropiado tal como 10 minutos a una hora. Esta solución se trata con una solución de un éster apropiado tal como 2-metilpropanoato de metilo en un solvente apropiado tal como tolueno y la mezcla resultante se agitó por un tiempo apropiado tal como 10 minutos hasta una hora a una temperatura apropiada tal como 0 °C a -40 °C. La mezcla resultante es entonces tratada con un catalizador de paladio apropiado tal como di-μ-bromobis(tri-t-butilfosfina)dipaladio(I) y la mezcla se agitó a una temperatura apropiada tal como 0 °C a temperatura ambiente por un tiempo apropiado tal como una a 18 horas para dar un alfa ariléster (Compuesto 19). Un éster (Compuesto 19) puede ser hidrolizado a un ácido (Compuesto 20) por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un éster (Compuesto 19) es puesto en contacto con una base adecuada tal como timetilsilanoato de potasio en un solvente apropiado tal como THF a una temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a reflujo por un tiempo apropiado tal como uno a siete días. La Etapa 4 representa el acoplamiento amida de un ácido carboxílico (Compuesto 20) con amoníaco para dar una

carboxamida (Compuesto 21). La persona experta apreciará que muchos métodos disponibles para activar un ácido carboxílico así como también introducir fuentes de amoníaco. Por ejemplo, un ácido carboxílico (Compuesto 20) es puesto en contacto con 1,1'-carbonildiimidazol en un solvente apropiado tal como DCM o DMF o una mezcla del mismo a una temperatura apropiada tal como 0 °C a reflujo por un tiempo apropiado tal como 30 minutos a ocho horas. El hidróxido de amonio se agrega a la mezcla y la reacción se continúa por un tiempo adicional tal como una a 18 horas. La Etapa 21 representa el reacomodo Hoffman de una carboxamida (Compuesto 21) a una amina (Compuesto 4). La persona experta apreciará la amplia variedad de reactivos y condiciones que afectan esta transformación. Por ejemplo, una solución de una carboxamida (Compuesto 21) en un solvente apropiado tal como una mezcla de ACN y agua, se trata con [bis(trifluoroacetoxi)yodo]benceno a temperatura apropiada tal como temperatura ambiente a reflujo por un tiempo apropiado tal como una a 18 horas. Finalmente, la conversión de la amina (Compuesto 4) a un compuesto de Fórmula I se describe en el Esquema de reacción 1, Etapa 4.

Preparación 1

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

Se agregó TEA (51.9 mL, 372.2 mmol) y cloruro de tetrahidropiran-4-carbonilo (22.1 g, 148.9 mmol) a una mezcla de 1-indolin-5-iletanona (20.0 g, 124.1 mmol) en DCM (496 mL). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por dos horas. Se diluyó la mezcla de reacción con DCM (500 mL) y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se aisló la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa dos veces con DCM (500 mL). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con cloruro de sodio acuoso saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y lo filtrado se concentró para dar el compuesto del título cuantitativamente como un sólido amarillo ligero. ES/MS (m/z): 274.0 (M+H).

Procedimiento de aislamiento alternativo:

Se trató el producto con heptano y se concentró. Se repitió el tratamiento y la concentración una segunda vez. Se trató con heptano y se enfrió a 0-5°C. Se recolectó el producto por filtración y se enjuagó con heptano y se secó para dar el compuesto del título.

Preparación 2

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

Se agregó hidroxilamina (50 % de masa en agua, 22.8 mL, 372 mmol) a una mezcla de 1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etanona (Preparación 1)

(33.9 g, 124.0 mmol) en EtOH (1240 mL). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por tres días. Se concentró la mezcla de reacción para dar el compuesto del título como una mezcla de isómeros E/Z cuantitativamente. ES/MS (m/z): 289.0 (M+H).

Preparación 3

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

Se agregó níquel RANEY® (suspensión en EtOH, 60 g) a una botella agitadora de 2250 mL PARR® y se purgó con nitrógeno. Se agregó amoníaco 2M en MeOH (700 mL) y después una solución de [5-(N-hidroxietanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona (Preparación 2) (35.8 g, 124.0 mmol) en amoníaco 2M en MeOH (700 mL). Se enfrió la mezcla potencialmente exotérmica a temperatura ambiente si es necesario, se selló, se purgó con nitrógeno y después hidrógeno. Se agitó bajo hidrógeno 4.22 kgf/cm^2 (60 psi, o 414 kPa) por cuatro horas a temperatura ambiente. Se filtraron los sólidos y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 7-26% (amoníaco 7M en MeOH) en EtOAc para dar el compuesto del título (26.5 g, 78%) como un sólido blancuzco. ES/MS (m/z): 275.0 (M+H).

Preparación 4A y B

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

Se purificó [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona racémico (Preparación 3) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución (Isómero 1). ES/MS (m/z): 275.0 (M+H). Condiciones de purificación: columna CHIRALPAK® AD-H, 50 x 150 cm; Fase móvil: 40% EtOH (que contiene 0.5% N,N-dimetiletilamina) en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 300 g/minuto; UVW: 260 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 1.35 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% EtOH (que contiene 0.5% N,N-dimetiletilamina) en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 260 nm) o por HPLC analítico quiral (97.4% ee, R_t: 6.48 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100% EtOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm).

La purificación anterior también proporciona el segundo enantiómero de elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 275.1 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (97.2% ee, R_t: 1.85

minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% EtOH (que contiene 0.5% N,N-dimetiletilamina) en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 260 nm) o por HPLC analítico quiral (97.6% ee, R_t: 5.31 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100% EtOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm).

Preparación 5

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

Se agregó etóxido de titanio(IV) (5.0 g, 21.9 mmol) a una mezcla de 1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etanona (Preparación 1) (3.0 g, 11.0 mmol) y (R)-2-metilpropan-2-sulfinamida (1.6 g, 13.2 mmol) en THF (43.9 mL). Se sometió a reflujo la mezcla resultante por 24 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla con EtOAc (100 mL) y cloruro de sodio acuoso saturado (40 mL) y se agitó vigorosamente por 15 minutos. Se aisló la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa dos veces con EtOAc (100 mL). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con cloruro de sodio acuoso saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en

columna de gel de sílice con 10-100% ACN en DCM para dar el compuesto del título (3.7 g, 87%) como un sólido amarillo ligero. ES/MS (m/z): 377.0 (M+H).

Procedimiento de aislamiento alternativo:

En lugar de enfriar la reacción a temperatura ambiente, se enfrió la mezcla de reacción a 10 °C y después se filtró. Se enjuagó lo sólido con tolueno y se secó para dar el compuesto del título.

Preparación 6

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

Se calentó una mezcla del dímero dicloro(p-cimen)rutenio(II) (0.021 g, 0.033 mmol), 2-amino-2-metil-1-propanol (0.006 g, 0.066 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.5 g) en iPrOH (2 mL) para someter a reflujo y después se enfrió a 50 °C. Se agregó una solución de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etiliden}propan-2-sulfinamida (Preparación 5) (0.5 g, 1.33 mmol) en iPrOH (8.8 mL) y una solución de terc-butóxido de potasio (0.019 g, 0.17 mmol) en iPrOH (1.6 mL). Se calentó la mezcla resultante a 55 °C por dos horas. Después se calentó una mezcla adicional de dímero dicloro(p-cimen)rutenio(II) (0.021 g, 0.033 mmol), 2-amino-2-metil-1-propanol (0.06 g

0.66 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.5 g) en iPrOH (2 mL) a reflujo, se enfrió a 50 °C y se agregó a la mezcla de reacción anterior. Se agregó una solución de terc-butóxido de potasio (0.019 g, 0.17 mmol) en iPrOH (1.6 mL) a la mezcla de reacción anterior. Se calentó la mezcla a 55 °C por 20 minutos. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se diluyó la reacción con DCM (20 mL) y se filtró a través de una almohadilla de tierra diatomácea. Se lavó la almohadilla con 5% MeOH en DCM y lo filtrado se concentró para dar el compuesto del título cuantitativamente. ES/MS (m/z): 379.0 (M+H).

Procedimiento de aislamiento alternativo:

En lugar de enfriar la reacción a temperatura ambiente, se enfrió la mezcla de reacción a 28-32 °C y después se filtró a través de tierra diatomácea. Se enjuagó lo sólido de filtración con diclorometano y se concentró para dar el compuesto del título.

Preparación 7A y 7B

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

Se agregó ácido clorhídrico (4 M en 1,4-dioxano, 1.66 mL, 6.64 mmol) a una mezcla de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-

il]etil}propan-2-sulfinamida, Isómero A (Preparación 6) (503 mg, 1.33 mmol) en MeOH (6.6 mL). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por una hora. Se concentró y se purificó el residuo por cromatografía de fase inversa (Columna de Fase Inversa C18 de Alto Desempeño Redisep Rf Gold, 0-100% ACN en 10 mM bicarbonato de amonio acuoso). Se concentró para dar el compuesto del título (265 mg, 73%). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico por HPLC analítico quiral (98.8% ee, R_t: 6.40 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100% EtOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm). Se confirmó para la preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275.0 (M+H).

<u>Síntesis de clorhidrato de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1</u>

Se agregó ácido clorhídrico (5.5 M en iPrOH, 400 mL, 2.20 mol) a una suspensión a 5 °C de (R)-2-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}propan-2-sulfinamida, Isómero A (162.3 g, 364 mmol) en EtOAc (1.2 L) por goteo con agitación mecánica en la parte superior. Se removió el baño enfriante después de la adición de 100 mL de la adición del ácido. Se continuó la adición y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por tres horas. Se enfrió a 3 °C y se filtró. Se enjuagó la torta

filtrada con 1-1.5 L de EtOAc, hasta que los lavados son claros. Se secaron los sólidos recolectados en un horno a vacío en la casa a 60 °C para dar el compuesto del título como un sólido blancuzco (96.4 g, 82.5%). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico por HPLC analítico quiral (98% ee, R_t: 6.45 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 mm x 150 mm; Fase móvil: 100% EtOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm). Se confirmó para la preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275.0 (M+H). Se confirmó para la preparación 4A, Isómero 1. ES/MS (m/z): 275.1 (M+H).

Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente de manera análoga a la Preparación 1.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
8	[5-Bromo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona	ES/MS (m/z, $^{79}Br/^{81}Br$): 310.0/312.0 (M+H)
9	{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}carbamato de bencilo, Isómero A	ES/MS (m/z): 423.2 (M+H)

<u>Preparación 10Síntesis de 5-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo</u>

Se trató una solución a 100 °C de 1-indolin-5-iletanona (1.00 g, 6.02 mmol) en tolueno (12 mL) con una

solución de dicarbonato de di-terc-butilo (1.97 g, 9.03 mmol) en tolueno (12 mL) por goteo sobre 20 minutos. Se continuó calentando la mezcla por 30 minutos. Se concentró la mezcla de reacción. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 15-35% (1:1 EtOAc:DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (1.52 g, 97%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 262.0 (M+H).

Preparación 11

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

Se trató una solución de ácido 1-(terc-butoxicarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico (14.0 g, 53.2 mmol) en DMF (200 mL) y N,N-diisopropiletilamina (28.0 mL, 161 mmol) con hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-oxid (23.3 g, 61.1 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por cinco minutos. Se agregó clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (7.26 g, 74.4 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante la noche a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se aisló la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa dos veces con EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas dos veces con agua, se agregó cloruro de sodio acuoso saturado para ayudar a la

separación de fase. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 10-32% acetona en hexanos para dar el compuesto del título como un aceite espeso, incoloro, claro en rendimiento cuantitativo. ES/MS (m/z): 307.0 (M+H).

Preparación 12

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

Se enfrió una solución de 5-[metoxi(metil)carbamoil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo (Preparación 11) (14.3 g, 46.7 mmol) en THF (311 mL, anhidro) a 0 °C. Se agregó bromuro de etilmagnesio (3M en dietiléter, 39.0 mL, 117 mmol) por goteo sobre 25 minutos. Después de la agitación a 0 °C por 1.5 horas, cautelosamente se apagó la mezcla de reacción con solución de cloruro de amonio acuoso saturando. Se extrajo tres veces con EtOAc. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 15-30% (1:1 EtOAc:DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (11.7 g, 91%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 276.0 (M+1).

Se prepararon los siguientes compuestos

esencialmente de manera análoga a la Preparación 2, excepto la Preparación 14, en la cual el calentamiento a 70 °C incrementó la velocidad de reacción.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
13	5-(N-hidroxietanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo	ES/MS (m/z): 277.0 (M+H)
14	5-(N-hidroxipropanimidoil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo	ES/MS (m/z): 291.0 (M+H)

Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente de manera análoga a la Preparación 3.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
15	5-[1-aminoetil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo Racémico	ES/MS (m/z): 246.0 $(M-NH2)^+$
16	5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo Racémico	ES/MS (m/z): 260.1 $(M-NH2)^+$

Preparación 17A y B

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

Se purificó 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato terc-butilo racémico (Preparación 16) por cromatografía quiral para proporcionar el primer enantiómero

de elución (Isómero 1). MS (m/z): 260.0 $(M-NH2)^+$. Condiciones de purificación: columna CHIRALPAK® AD, 8 x 33.5 cm; Fase móvil: 100% MeOH (que contiene 0.2% N,N-dimetiletilamina); Velocidad de flujo: 400 mL/minuto; UVW: 240 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por HPLC analítico quiral (>99% ee, R_t: 9.2 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 100% MeOH (que contiene 0.2% N,N-dimetiletilamina); Velocidad de flujo: 0.6 mL/minuto; UVW: 280 nm).

La purificación anterior también proporciona el segundo enantiómero de elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 260.0 $(M-NH2)^+$. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por HPLC analítico quiral (99% ee, R_t: 14.7 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 100% MeOH (que contiene 0.2% N,N-dimetiletilamina); Velocidad de flujo: 0.6 mL/minuto; UVW: 280 nm).

Preparación 18

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

Se trató una solución de 5-[1-aminoetil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo racémico (Preparación 15) (3.00 g, 11.4 mmol) en DCM (57 mL) con N,N-diisopropiletilamina (4.0 mL, 57.2 mmol). Se agregó cloruro de 4-fluorobenzoil (1.52 mL, 12.6 mmol) y se agitó durante la

noche. Se apagó la mezcla de reacción con agua y se agregó solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se separaron las capas y se extrajeron dos veces con DCM. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 50-75% (10% acetona en DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (4.29 g, 98%) como un sólido amarillo pálido. ES/MS (m/z): 407.0 $(M+Na)^+$, 383.0 $(M-H)^-$.

Se preparó el siguiente compuesto esencialmente de manera análoga a la Preparación 18.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
19	5-{1-[(4-fluorobenzoil)amino]propil}-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato terc-butilo Racémico	ES/MS (m/z): 421.0 $(M+Na)^+$, 397.2 $(M-H)^-$

Preparación 20

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

Se trató una solución de 5-[1-aminopropil]-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo, Isómero 2 (Preparación 17B) (3.25 g, 11.8 mmol) en DCM (47.0 mL) a temperatura ambiente con N,N-diisopropiletilamina (4.53 mL, 25.9 mmol). Se agregó cloroformiato de bencilo (2.12 mL, 14.1 mmol) y se agitó durante la noche. Se trató la mezcla de

reacción con N,N-diisopropiletilamina adicional (2.06 mL, 11.8 mmol) y cloroformiato de bencilo (0.707 mL, 4.70 mmol). Se agitó por 30 minutos. Se apagó la mezcla de reacción con agua y se agregó solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa dos veces con DCM. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con a gradiente de 5-35% acetona en hexanos para dar el compuesto del título (4.47 g, 93%) como una espuma blanca. ES/MS (m/z): 433.2 $(M+Na)^+$, 409.0 $(M-H)^-$.

Preparación 21

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

Se agregó ácido clorhídrico 4M en 1,4-dioxano (27.9 mL, 112 mmol) a una mezcla de 5-{1-[(4-fluorobenzoil)amino]etil}-2,3-dihidro-1H-indol-1-carboxilato de terc-butilo racémico (Preparación 18) (4.29 g, 11.2 mmol) en DCM (112 mL). Se calentó la mezcla resultante a 40 °C por seis horas. Se neutralizó con solución de NaOH acuosa 2N. Se agregó 4:1 $CHCl_3$:IPA para disolver sólidos gomosos y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en

columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 30-60% (25% acetona en DCM) en hexanos para dar el compuesto del título (2.48 g, 78%) como una espuma ligeramente blancuzca. ES/MS (m/z): 285.0 (M+H).

Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente de manera análoga a la Preparación 21.

Prep No.	Nombre Químico	Datos físicos
22	N-[1-(2,3-Dihidro-1H-indol-5-il)propil]-4-fluorobenzamida racémica	ES/MS (m/z): 299.0 (M+H)
23	[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)propil]carbamato de bencilo, Isómero A	ES/MS (m/z): 311.2 (M+H)

Preparación 24A y B

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

Se purificó N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida racémica (Preparación 21) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución (Isómero 1). ES/MS (m/z): 285.0 (M+H). Condiciones de purificación: columna CHIRALPAK® AS-H, 5 x 15 cm; Fase móvil: 15% iPrOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 300 g/minuto; UVW: 250 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por SFC analítico quiral (>99%

ee, R_t: 1.47 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 25% iPrOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 300 nm).

La purificación anterior también proporciona el segundo enantiómero de elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 285.0 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (98.5% ee, R_t: 2.08 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 25% iPrOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW 300 nm).

Preparación 25

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

Se agregó una solución de {1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}carbamato de bencilo, Isómero A (Preparación 9) (2.12 g, 5.02 mmol) en EtOH (35 mL) a una suspensión purgada con nitrógeno de 20% hidróxido de paladio en carbono (2.12 g) en EtOH (35 mL) en una botella agitadora PARR®. Se selló, se purgó con nitrógeno y después hidrógeno. Se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a 414 kPa (60 psi) por 3.6 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción a través de tierra diatomácea y lo filtrado se concentró para dar el compuesto del título (1.36 g, 94%) como un sólido

grisáceo-blanco. ES/MS (m/z): 289.2 (M+H), 272.0 $(M-NH2)^+$.

Preparación 26

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

Se agregó n-butillitio (3.6 mL, 8.9 mmol, 2.2 M en hexanos) a una solución agitada a 0 °C de diciclohexilamina (1.9 mL, 9.6 mmol) en tolueno (25 mL) bajo nitrógeno y se agitó por 20 minutos. Se agregó una solución de isobutirato de metilo (0.83 g, 8.2 mmol) en tolueno (5 mL) por goteo a la mezcla previamente separada y se agitó por 30 minutos a 0 °C. Se agregó [5-bromo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona (Preparación 8) (2.3 g, 7.4 mmol) y se desgasificó la mezcla resultante con nitrógeno. Se agregó di-μ-bromobis(tri-t-butilfosfina)dipaladio(I) (50 mg, 0.06 mmol) y la mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de dos horas, se agregó una segunda porción de di-μ-bromobis(tri-t-butilfosfina)dipaladio(I) (50 mg, 0.06 mmol) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Se diluyó con EtOAc y solución de HCl acuosa 1N y se agitó por 10 minutos. Se filtró y se enjuagaron los sólidos con EtOAc. Se separaron las capas filtradas y se lavó la capa orgánica con solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio

anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 20-60% EtOAc en hexanos para dar el compuesto del título (2.3 g, 94% de rendimiento, 89% de pureza) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 332.2 (M+H).

Preparación 27

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

Se disolvió 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanoato de metilo (Preparación 26) (2.2 g, 6.6 mmol) en THF (66 mL) y se agregó trimetilsilanolato de potasio (1.1 g, 8.6 mmol). Se agitó a temperatura ambiente por cuatro días. Se filtraron los sólidos y se lavaron con THF. Se disolvieron los sólidos en agua y se acidificaron con solución de HCl acuosa 5N. Se enfrió en un refrigerador por 30 minutos. Se filtró para recolectar el compuesto del título (1.20 g, 57%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 318.0 (M+H).

Preparación 28

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

Se agregó 1,1'-carbonildiimidazol (126 mg, 0.763 mmol) a una solución agitada de ácido 2-metil-2-[1-

(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanóico (Preparación 27) (202 mg, 0.636 mmol) en DCM (6.4 mL) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno por 45 minutos. Se agregó hidróxido de amonio (1 mL, 9.55 mmol, 25% p/v en agua) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno por 90 minutos. Se agregó DMF (3 mL) para ayudar a la solubilidad y se continuó la agitación a temperatura ambiente por dos horas. Se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 0-10% EtOH en DCM para obtener el compuesto del título (180 mg, 89%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 317.0 (M+H).

Preparación 29

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

Se agregó [bis(trifluoroacetoxi)yodo]benceno (115 mg, 0.26 mmol) a una mezcla agitada de 2-metil-2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propanamida (Preparación 28) (81 mg, 0.26 mmol) en ACN (0.25 mL) y agua (0.25 mL) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Se concentró para obtener el compuesto del título (140 mg, 94%, 50% material puro) como un sólido rosa ligero. ES/MS (m/z): 289.2 (M+H), 272.0 $(M-NH2)^{+}$.

Preparación 30

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

Se calentó una mezcla de metil-2-amino-4-fluorobenzoato (2.81 g, 15.9 mmol) y 2-yodoetanol (0.879 mL, 11.2 mmol) a 90 °C por seis horas después se enfrió a temperatura ambiente. Se disolvió la mezcla limpia en EtOAc, se lavó tres veces con solución de NaOH acuosa 1N, seguido por salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró para obtener 2.94 g de aceite marrón ligero. Se agregó 2-yodoetanol (1.26 mL, 15.9 mmol) y se calentó la mezcla a 100 °C durante la noche. Se agregó 2-yodoetanol adicional (0.314 mL, 3.99 mmol) y se continuó calentando a 100 °C por dos horas. Se enfrió a temperatura ambiente. Se disolvió la mezcla limpia en EtOAc, se lavó tres veces con solución de NaOH acuosa 1N, seguido por salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró para obtener 2.50 g de sólidos marrón. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con 20-40% EtOAc en hexanos para dar el compuesto del título (1.12 g, 33%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 214.0 (M+H).

Preparación 31

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

Se agregó hidróxido de sodio (0.49 mL, 2.4 mmol, 5M en agua) a una solución agitada de 4-fluoro-2-[(2-hidroxietil)amino]benzoato de metilo (Preparación 30) (104 mg, 0.488 mmol) en 1,4-dioxano (2.4 mL). Se agitó tapado a temperatura ambiente por 30 minutos, después se calentó a 70 °C por dos horas. Se concentró y se acidificó a aproximadamente pH 1-2 con HCl acuoso 1N, se extrajo dos veces con DCM. Se secó la capa orgánica combinada sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró para obtener el compuesto del título (89 mg, 92%) como sólidos tostados. ES/MS (m/z): 200.0 (M+H).

Preparación de Referencia 1

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

Se agitó una mezcla de 5-(aminometil)indolin-1-carboxilato de terc-butilo (4.1 g, 17 mmol) y 2,4-difluoro-1-isocianatobenceno (3 mL, 24 mmol) en DCM (100 mL) por una hora. Se apagó la reacción con MeOH y agua, y se concentró. Se disolvió el residuo en DCM (30 mL) y se agregó TFA (15 mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente por dos horas. Se concentró y se agregó bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se extrajo la mezcla con MeOH/DCM (1/5, v/v). Se secó la capa

orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y lo filtrado se concentró. Se recristalizó de EtOH para dar dos cultivos. Se combinaron los cultivos para dar el compuesto del título (3.5 g, 68%). ES/MS (m/z): 304.0 (M+H).

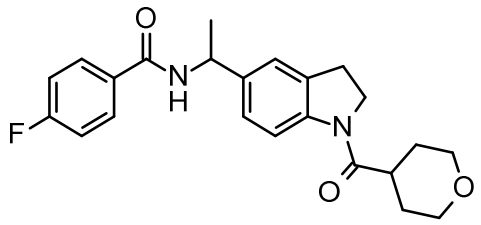
Preparación de Referencia 2

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

Se desgasificó (N_2) una solución de 1-(2,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidro-1H-indol-5-ilmetil)urea (Preparación de Referencia 1) (70 mg, 0.23 mmol), ácido 3,4,5-tribromobenzoico (170 mg, 0.24 mmol) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (134 mg, 0.35 mmol) en DMF (2 mL). Se agregó TEA (0.08 mL, 0.6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por una hora. Directamente se purificó la mezcla de reacción por purificación de fase inversa (Columna: Columna Redisep Rf Gold de Fase Inversa C18 de Alto Desempeño; eluyente: A: bicarbonato de amonio 10 mM en agua con 5% MeOH (pH 10), B: ACN; gradiente: 40% B por 5 minutos después 40-95% B sobre 15 minutos; flujo 60 mL/minuto, UVW 219/254 nM) se aisló el producto por liofilización para dar el compuesto del título (149 mg, 54%). ES/MS (m/z, $^{79}Br/^{81}Br$): 644.0/646.0 (M+H).

Ejemplo 1

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

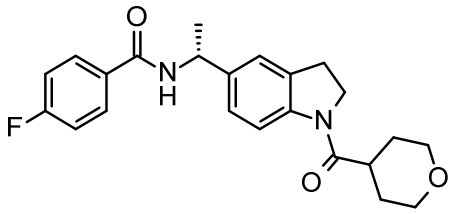


Se combinó [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona racémico (Preparación 3) (420 mg, 1.53 mmol) y ácido 4-fluorobenzoico (257 mg. 1.84 mmol) en DCM (15 mL). A la solución agitada se agregó N,N-diisopropiletilamina (534 µL, 3.06 mmol) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-oxid (890 mg, 2.30 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente por 16 horas. Se evaporó el solvente y se purificó por cromatografía de fase inversa (Columna de Fase Inversa C18 de Alto Desempeño Redisep Rf Gold, 25-100% ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM) para dar el compuesto del título (372 mg, 61%). ES/MS (m/z): 397.2 (M+H). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 8.73 (d, J=8 Hz, 1H), 7.98 (d, J=8 Hz, 1H), 7.93-7.89 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (d, J=8 Hz, 1H), 5.07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4.14 (t, J=8 Hz, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.09 (t, J=8 Hz, 2H), 2.80 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.41 (d, J=7 Hz, 3H).

Ejemplo 1A

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

Método Sintético 1:



Se purificó 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica (Ejemplo 1) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución como el compuesto del título. ES/MS (m/z): 397.0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 1.72 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 8.73 (d, J=8 Hz, 1H), 7.98 (d, J=8 Hz, 1H), 7.93-7.89 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (d, J=8 Hz, 1H), 5.07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4.14 (t, J=8 Hz, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.09 (t, J=8 Hz, 2H), 2.80 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.41 (d, J=7 Hz, 3H).

Método Sintético 2:

Se agregó TEA (9.8 mL, 70.3 mmol) y después cloruro de 4-fluorobenzoilo (5.85 g, 36.9 mmol) a una solución de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1 (Preparación 4A) (9.65 g, 35.2 mmol) en DCM (176 mL) a 0 °C. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (300 mL), se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice y se lavó con EtOAc. Lo filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con un gradiente de 25-30% ACN en DCM para dar el compuesto del título (9.4 g, 67.1%) como un sólido blancuzco. MS (m/z): 397.2 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 1.74 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 8.73 (d, J=8 Hz, 1H), 7.98 (d, J=8 Hz, 1H), 7.93-7.89 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (d, J=8 Hz, 1H), 5.07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4.14 (t, J=8 Hz, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.09 (t, J=8 Hz, 2H), 2.80 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.41 (d, J=7 Hz, 3H).

Método Sintético 3:

Se agregó TEA (65 mL, 468 mmol) a una mezcla de clorhidrato de [5-(1-aminoetil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-

il](tetrahidro-2H-piran-4-il)metanona, Isómero 1 (Preparación 7B) (70 g, 225 mmol) en DCM (700 mL) a 0-5 °C. Se agregó cloruro de 4-fluorobenzoilo (37.85 g, 239 mmol) por goteo. Se calentó la mezcla a temperatura ambiente y se agitó por dos horas. Se agregó agua por goteo a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de 30 °C y se agitó la mezcla a 20-30 °C por una hora. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con 18% H_2SO_4 acuoso. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con 7% $NaHCO_3$ acuoso. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con agua. Se separaron las capas y después se hizo pasar la solución orgánica a través de un filtro de carbono. Se trató la solución con SI-Tiol (7 g) y se calentó la mezcla a 40 °C. Se agitó la mezcla resultante por 12 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se filtró la mezcla a través de tierra diatomácea. Se concentró la capa orgánica a 200 mL (~3 vols). Se agregó acetona (140 mL, 2 vols) y se concentró la mezcla resultante a 200 mL (~3 vols). Se trató con acetona adicional (280 mL, 4 vols) y agua (280 mL, 4 vols). Se calentó a 65 °C por dos horas hasta que la reacción es una solución clara. Se enfrió lentamente a 30 °C sobre tres horas. Se agitó a 30 °C por una hora. Se agregó agua (140 mL, 2 vols) por goteo y se continuó la agitación a 30 °C por una hora. Se enfrió lentamente a 3-8 °C sobre aproximadamente dos horas. Se agitó a esta temperatura por seis horas. Se filtraron y se enjuagaron los sólidos con agua

(140 mL, 2 vols). Se secaron los sólidos a 55 °C por cuatro a seis horas. Se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco (55 g, 61.6%).

Procedimiento de Recolección de Difracción en Polvo de rayos X por el Ejemplo 1A

Los patrones XRD de sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractrómetro en polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKa ((λ = 1.54060 Å) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra se barrió entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0.0087° in 2θ y una velocidad de barrido de 0.5 segundos/etapa, y con 0.6 mm divergencia, 5.28mm anti-dispersión fijado, y 9.5 mm ranuras de detección. El polvo seco se envasó en receptáculo para muestra de cuarzo y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjeto de vidrio. Se recolectaron los patrones de difracción en forma de cristal a temperatura ambiente y humedad relativa.

Procedimiento de Recolección de Difracción en Polvo de Rayos X para 1A del método 3

Una muestra preparada del ejemplo 1A (método sintético 3) es caracterizada por un patrón XRD usando radiación CuKa por tener picos de difracción (valores 2 theta) como se describe en la tabla 1 a continuación. Específicamente el patrón contiene un pico a 17.38° en combinación con uno o más de los

picos seleccionados del grupo que consiste de 12.51°, 15.65°, 16.37°, 17.56°, 21.48° y 25.23° con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados (2θ±0.2°).

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

Pico	**Ángulo** (2-Theta °)	**Intensidad (%)**
1	9.99	13
2	12.51	73
3	15.65	90
4	16.37	57
5	17.38	100
6	17.56	62
7	18.79	25
8	19.81	38
9	21.48	56
10	23.38	43
11	24.41	21
12	24.70	17
13	25.23	64
14	25.46	28
15	27.69	15

Determinación de la Configuración Absoluta para el Ejemplo 1A

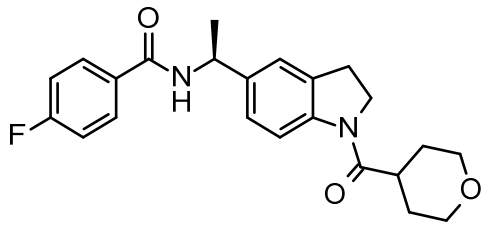
Se preparó un cristal único de 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida suspendiendo 10 mg de 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida en 1:1 EtOH/heptano (1.75 mL) y se sometió a suspensión en un agitador orbital por tres días. Se usó un

espécimen similar a cuchilla sin color de 4-fluoro-N-{(1R)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, dimensiones aproximadas 0.020 mm x 0.080 mm x 0.300 mm, para el análisis cristalográfico de rayos X. Se midieron los datos de intensidad de rayos X usando una fuente de radiación Iμ CuKa (λ = 1.54178 Å) y un difractrómetro goniómetro de 3 círculos con base a Bruker D8 Venture equipado con detector de área Photon 100 SL. Se recolectaron un total de 8840 armazones. Se integraron los armazones con en paquete de software SAINT Bruker usando un algoritmo de armazón estrecho. La integración de los datos usando una célula de unidad monoclínica proporcionando un total de 7242 reflexiones a un máximo de ángulo Θ de 6828° (resolución 0.83 Å), del cual 3059 son independientes (redundancia promedio 2.367, completado = 95.9%, Rint = 5.83%, Rsig = 6.58%) y 2893 (94.57%) es mayor que $2\sigma(F^2)$. Las constantes de célula finales de a = 5.5831(13) Å, b = 5.1082(9) Å, c = 35.013(6) Å, β = 90.578(17) °, volumen = 998.5(3) $Å^3$, se basan en el refinamiento de los centroides XYZ de las reflexiones 6280 por arriba de 20 σ(I) con 10.09° < 2θ < 136.8°. Se corrigieron los datos para efectos de absorción usando el método multi-barrido (SADABS). La proporción de mínimo a máximo de la trasmisión aparente es 0.784. Los coeficientes de transmisión mínimos a máximo calculados (con base al tamaño de cristal) son 0.8020 y

0.9850. Se resolvió la estructura y se refino usando el Paquete de Software Bruker SHELXTL, usando el grupo de espacio P 2_1, con Z = 2 para la unidad de fórmula, $C_{23}H_{25}FN_2O_3$. El refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa anisotrópico final en F2 con 264 variables convergen a R1 = 9.17%, para los datos observados y wR2 = 23.48% para todos los datos. La bondad del ajuste es 1.141. El pico más grande en la síntesis de densidad de electrón de diferencia final es 0.506e-/$Å^3$ y el agujero más grande es -0.358e-/Å3 con una desviación RMS de 0.088e-/$Å^3$. En las bases del modelo final, la densidad calculada es 1.319 g/cm^3 y F(000), 420 e-. El parámetro de estructura absoluta refina a 0.12(16), verifica la estereoquímica del centro quiral. La estructura absoluta es determinada por ser la R-configuración en el estereocentro.

Ejemplo 1B

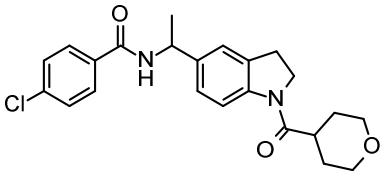
4-Fluoro-N-{(1S)-1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero 2



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

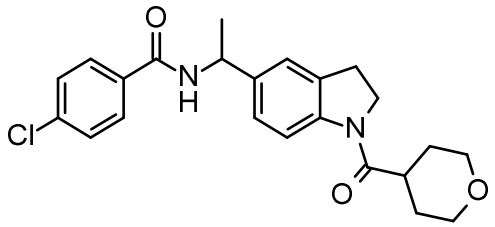
racémica (Ejemplo 1) por cromatografía quiral para proporcionar el segundo enantiómero de elución como el compuesto del título. ES/MS (m/z): 397.0 (M+H). Condiciones de purificación: Columna: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (98.3% ee, R_t: 2.37 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 8.73 (d, J=8 Hz, 1H), 7.98 (d, J=8 Hz, 1H), 7.93-7.89 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (d, J=8 Hz, 1H), 5.07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4.14 (t, J=8 Hz, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.09 (t, J=8 Hz, 2H), 2.80 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.41 (d, J=7 Hz, 3H).

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

Ej No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
2	4-cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 413.0 (M+H)

Ejemplo 2A y 2B

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

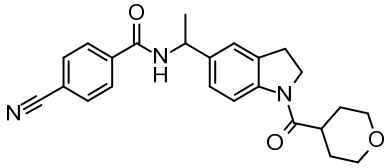
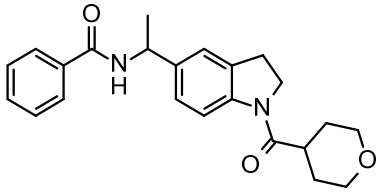
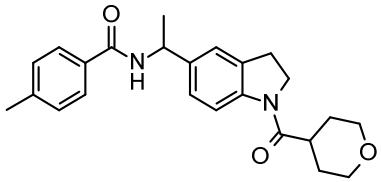
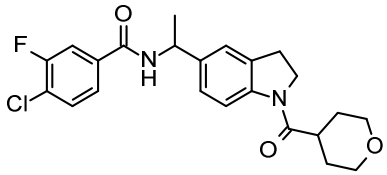


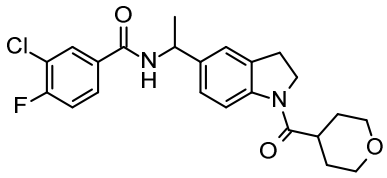
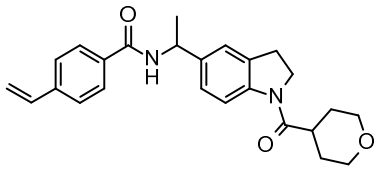
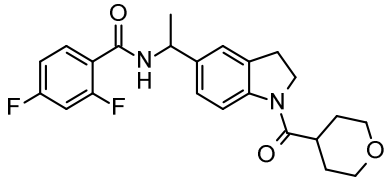
Se purificó 4-cloro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica (Ejemplo 2) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución (Isómero 1). ES/MS (m/z): 413.0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40% iPrOH en CO_2; Velocidad de flujo: 70 g/minuto; UVW: 260 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t=1.97 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% iPrOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

La purificación anterior también proporciona el segundo enantiómero de elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 413.0 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 3.04 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil:

40% iPrOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

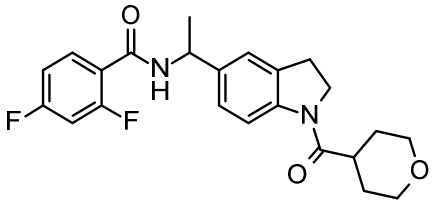
Se prepararon los Ejemplos 3 hasta el Ejemplo 9 esencialmente análogo al Ejemplo 1, usando el material de partida de la Preparación 3.

Ej No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
3	4-ciano-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 404.4 (M+H)
4	N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 379.4 (M+H)
5	4-metil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 393.4 (M+H)
6	4-cloro-3-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 431.4 (M+H)

7	3-cloro-4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 431.4 (M+H)
8	4-ethenil-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 405.4 (M+H)
9	2,4-difluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida racémica		ES/MS (m/z): 415.0 (M+H)

Ejemplo 9A y B

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

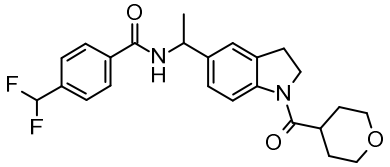


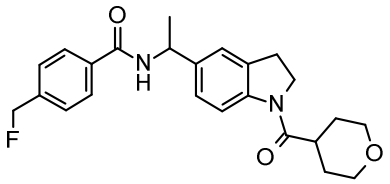
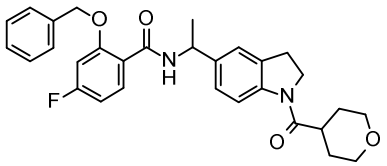
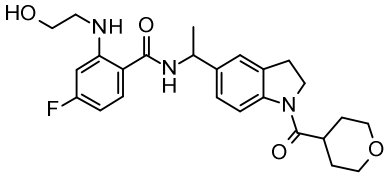
Se purificó 2,4-difluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida

racémico (Ejemplo 9) por SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución (Isómero 1). ES/MS (m/z): 415.0 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 70 g/minuto; UVW: 225 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por analítico quiral (98.6% ee, R_t: 1.72 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

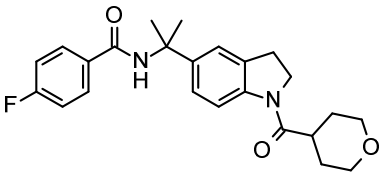
La purificación anterior también proporciona la segunda elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 415.2 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (98.5% ee, R_t: 2.60 minutos; Columna: CHIRALPAK® AD-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 40% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

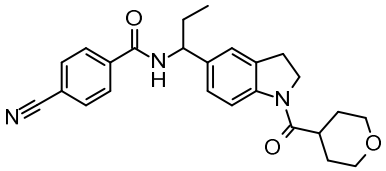
Se prepararon los Ejemplos 10 hasta el Ejemplo 13 esencialmente análogo al Ejemplo 1, usando el material de partida de la Preparación 7.

Ej No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
10	4-(Difluorometil)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 429.0 (M+H)

11	4-(Fluorometil)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 411.2 (M+H)
12	2-(Benciloxi)-4-(fluoro)-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 503.2 (M+H)
13	4-Fluoro-2-[(2-hidroxietil)amino]-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 456.2 (M+H)

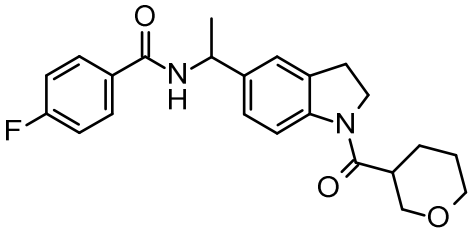
Se prepararon los Ejemplos 14 y 15 esencialmente análogos al Ejemplo 1A, Método Sintético 2.

Ej No.	Nombre Químico	Estructura	Datos físicos
14	4-Fluoro-N-{2-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propan-2-		ES/MS (m/z): 411.2 (M+H)

	il}benzamida		
15	4-Ciano-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}benzamida, Isómero A		ES/MS (m/z): 418.2 (M+H)

Ejemplo 16

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

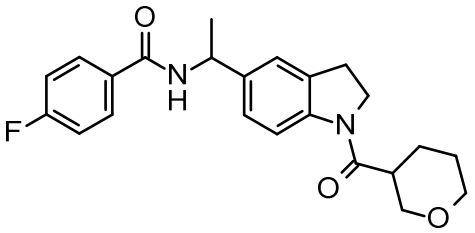


Se trató una mezcla de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)etil]-4-fluorobenzamida, Isómero 1 (Preparación 24A) (150 mg, 0.528 mmol), ácido tetrahidropiran-3-carboxílico racémico (100 mg. 0.739 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0.277 mL, 1.58 mmol) en DCM (5.28 mL) con hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-oxid (304 mg, 0.791 mmol). Se agitó a temperatura ambiente por 45 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con DCM. Se agregó agua y solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa dos veces con DCM. Se hizo pasar la capa orgánica

combinada a través de una frita hidrofóbica (cartucho separador de fase ISOLUTE®) y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 20-55% acetona en hexanos para dar el compuesto del título (184 mg, 88%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 397.2 (M+H).

Ejemplo 16A y B

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



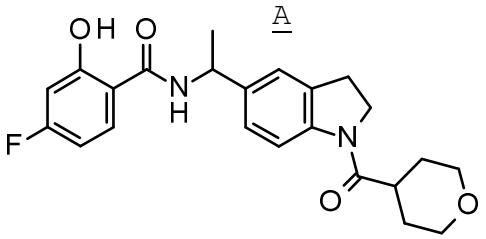
Se purificó 4-fluoro-N-[1-{1-[tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbonil]-2,3-dihidro-1H-indol-5-il}etil]benzamida diastereomérico (Ejemplo 16) por cromatografía quiral para proporcionar la primera elución de diastereómero (Isómero 1). MS (m/z): 397.2 (M+H). Condiciones de purificación: CHIRALCEL® OJ-H, 30 x 250 mm; Fase móvil: 100% MeOH; Velocidad de flujo: 30 mL/minuto; UVW: 225 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por HPLC analítico quiral (>99% de, R_t: 3.42 minutos; Columna:

CHIRALCEL® OJ-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 100% MeOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm).

La purificación anterior también proporciona la segunda elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 397.2 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por HPLC analítico quiral (97.8% de, R_t: 4.66 minutos; Columna CHIRALCEL® OJ-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 100% MeOH (que contiene 0.2% isopropilamina); Velocidad de flujo: 1 mL/minuto; UVW: 225 nm).

Ejemplo 17

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

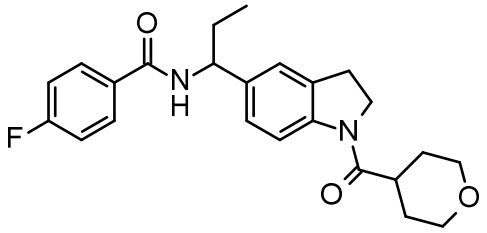


Se agregó 10% Pd/C (10 mg) a una solución lavada a chorro de nitrógeno de 2-(benciloxi)-4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]etil}benzamida, Isómero A (Ejemplo 12) (96.0 mg, 0.19 mmol) en etanol (2 mL) y se hidrogenó con 1 atm (101 kPa) de hidrógeno a temperatura ambiente por una hora. Se filtró sobre tierra diatomácea y lo filtrado se concentró para

obtener el compuesto deseado (66 mg, 84%) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 413.0 (M+H).

Ejemplo 18

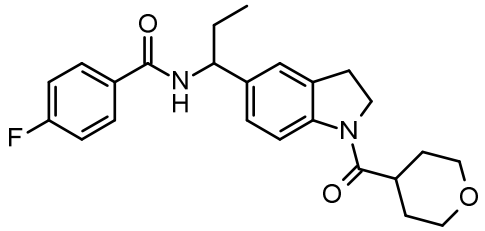
4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}benzamida Racémico



Se trató una mezcla de N-[1-(2,3-dihidro-1H-indol-5-il)propil]-4-fluorobenzamida racémico (Preparación 22) (200 mg, 0.650 mmol) en DCM (6.5 mL) con N,N-diisopropiletilamina (0.228 mL, 1.30 mmol). Se agregó cloruro de tetrahidropiran-4-carbonilo (110 mg, 0.715 mmol) y se agitó por 30 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con DCM. Se agregó agua y solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa dos veces con DCM. Se hizo pasar la capa orgánica combinada a través de una frita hidrofóbica (cartucho separador de fase ISOLUTE®) y lo filtrado se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con a gradiente de 20-60% acetona en hexanos para dar el compuesto del título como una espuma de color durazno ligera (244 mg, 91%). ES/MS (m/z): 411.2 (M+H).

Ejemplo 18A y B

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



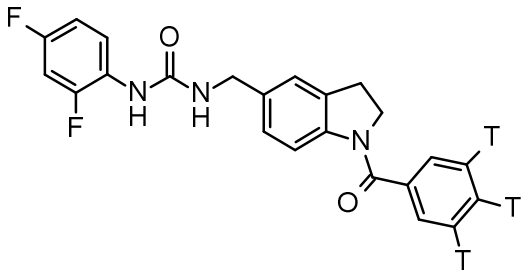
Se purificó 4-fluoro-N-{1-[1-(tetrahidro-2H-piran-4-ilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]propil}benzamida racémico (Ejemplo 18) por cromatografía SFC quiral para proporcionar el primer enantiómero de elución (Isómero 1). ES/MS (m/z): 411.2 (M+H). Condiciones de purificación: columna CHIRALPAK® AS-H, 21 x 150 mm; Fase móvil: 25% MeOH en CO_2; Temperatura de columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 80 g/minuto; UVW: 260 nm. Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 1 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 0.92 minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 25% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

La purificación anterior también proporciona el segundo enantiómero de elución (Isómero 2). ES/MS (m/z): 411.2 (M+H). Se confirmó el enriquecimiento enantiomérico del isómero 2 por SFC analítico quiral (>99% ee, R_t: 1.53

minutos; Columna: CHIRALPAK® AS-H, 4.6 x 150 mm; Fase móvil: 25% MeOH en CO_2; Velocidad de flujo: 5 mL/minuto; UVW: 225 nm).

Ejemplo de Referencia 1

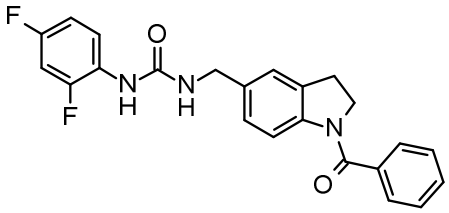
1-(2,4-Difluorofenil)-3-{[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil}urea



En un matraz de titulación, se agitó 1-(2,4-difluorofenil)-3-{[1-(3,4,5-tribromobenzoil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil}urea (3 mg, 0.005 mmol), paladio (10% en carbono, 3 mg) y N,N-diisopropiletilamina (10 µL, 0.06 mmol) en DMF (1 mL) bajo 3Ci de tritio por tres horas. Se filtró la reacción y se co-evaporó lo filtrado con EtOH para remover el tritio lábil. Se disolvió el residuo en EtOH y se purificó por cromatografía de fase inversa (Columna: GEMINI® C18 250 x 10 mm; Fase móvil: A: agua/TFA (1000:1), B: ACN/TFA (1000:1); gradiente: 20-70% B sobre 60 minutos; velocidad de flujo 3 mL/minuto) para dar el compuesto del título el cual se disolvió en EtOH. MS: 414.19 (M+H) y 74 Ci/mmol.

Ejemplo de Referencia 2

1-(2,4-Difluorofenil)-3-{[1-(fenilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil}urea



Se disolvió 1-(2,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidro-1H-indol-5-ilmetil)urea (300 mg, 0.99 mmol) en DCM (20 mL) y se agregó cloruro de benzoilo (0.13 mL, 1.1 mmol) y TEA (0.27 mL, 1.9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente por dos horas. Se concentró y se purificó el residuo por purificación de fase inversa (Columna: Columna de Fase Inversa C18 de Alto Desempeño Redisep Rf Gold; Fase móvil: A: 0.1% ácido fórmico en agua, B: ACN; gradiente: 0-80% B sobre 30 minutos; velocidad de flujo: 60 mL/minuto, UVW: 219/254 nm) se aisló el producto por liofilización para dar el compuesto del título (403 mg, 79%). ES/MS (m/z): 408.2 (M+H).

El sistema inmune es un punto de verificación crítico que contiene el desarrollo de tumor. Como tal, los cánceres han envuelto muchos mecanismos para evadir, suprimir o de otra forma subvertir el sistema inmune. Mientras el triptófano es absolutamente esencial para el crecimiento de células de cáncer, su degradación se selecciona en un arreglo amplio de cánceres a través de la expresión de indoleamina

2,3 desoxigenasa (IDO1) ya sea por la misma célula de cáncer (intrínseca), o por las células en el microambiente o nudos linfáticos que drenan el tumor (TDLNs) (extrínseca). La activación selectiva de IDO1 en el microambiente del tumor mientras se cuantifica para crecimiento celular rápido proporciona el tumor con una estrategia efectiva para evitar la inmunosupervivencia, un punto de verificación crítico en desarrollo y resistencia de cáncer por terapia. La actividad inmunosupresiva de IDO1 es un resultado directo de la reducción local de triptófano y la producción concomitante de cinurenina, ambos son inmunosupresivos.

El papel inmunosupresivo de la actividad IDO1 impacta múltiples tipos de células que incluye supresión de célula [células T (Frumento, et al., (2002) J Exp Med 196(4): 459-468; Terness, et al. (2002) J Exp Med 196(4): 447-457) y células NK (Della Chiesa, et al. (2006) Blood 108(13): 4118-4125)], desarrollo de la célula [células T reguladoras (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117(9): 2570-2582; Chen, et al. (2008) J Immunol 181(8): 5396-5404; Baban, et al. (2009) J Immunol 183(4): 2475-2483)] y células que presenten antígeno supresivo [células dendríticas supresivas y macrófagos (Munn, et al. (2004) J Clin Invest 114(2): 280-290; Munn, et al. (2005) Immunity 22(5): 633-642; Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117(9): 2570-2582)], y reclutamiento y expansión [células supresivas derivadas de mieloide (Yu, et

al. (2014) J Immunol 193(5): 2574-2586; Holmgaard, et al. (2015) Cell Rep 13(2): 412-424)]. La actividad IDO1 exhibe estos efectos a través de la reducción de triptófano y el incremento concomitante en cinurenina en el tumor, el microambiente del tumor y TDLNs.

Tanto el agotamiento local de triptófano como la producción de cinourenina por expresión IDO1 en el microambiente de tumor o en soporte TDLNs el desarrollo y activación de Tregs (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117(9): 2570-2582), MDSCs (Holmgaard, et al. (2015) Cell Rep 13(2): 412-424), y células dendríticas reguladoras (Sharma, et al. (2007) J Clin Invest 117(9): 2570-2582) todas las cuales juegan papeles inmunosupresivos que soportan el crecimiento del tumor. El agotamiento de soportes Treg de triptófano desarrollados a través de la activación de la cinasa GCN2 por respuesta al estrés, la cual es estimulada en respuesta a la acumulación de tARN sin cambio. Las células T que carecen de GCN2 no son susceptibles a inhibición medida por IDO1 de la proliferación o la inducción de un fenotipo anérgico (Munn, et al. (2005) Immunity 22(5): 633-642). Además al agotamiento de triptófano, la actividad IDO1 conduce a altas concentraciones de la cinurenina de metabolito corriente abajo, una molécula inmunosupresiva importante. Similar al agotamiento de triptófano, la activación del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) por

cinurenina es esencial para la generación de células T reguladoras (Mezrich, et al. (2010) J Immunol 185(6): 3190-3198), y producción elevada de cinurenina y expresión de AHR se correlaciona con el pobre pronóstico en cáncer de cerebro humano (Opitz, et al. (2011) Nature 478(7368): 197-203). Las células T bloquean la cinurenina y la proliferación de célula NK (Boiland, et al. (1956) Biochem J 64(3): 578-582) y es un agonista del receptor AHR (Mezrich, et al. (2010) J Immunol 185(6): 3190-3198; Opitz, et al. (2011) Nature 478(7368): 197-203), un factor de transcripción que regula la producción mediada inmune innata de citocinas tal como IL-1β, IL-6 y IL-21, y es sobreexpresada en varios cánceres donde se piensa que facilita el progreso de tumor y resistencia a la terapia (Julliard, et al. (2014) Front Immunol 5: 458). De hecho, la expresión intrínseca de IDO1 en cáncer es regulada, en parte, por activación medida por cinurenina de un bucle de señalización AHR-IL-6-STAT3 que enfoca la expresión de IDO1 e inhibe la proliferación de célula T. La expresión de este eje de señalización IDO1 es asociado con una reducción en sobrevivencia libre de recaída en pacientes con cáncer de pulmón (Litzenburger, et al. (2014) Oncotarget 5(4): 1038-1051). La expresión de IL-6 mediada con IDO1 también juega un importante papel en el soporte del desarrollo de MDSCs pro-tumorigénico y ruptura de IDO1 reduce la producción de IL-6, la actividad supresiva de MDSC atenuada, retrasa el

crecimiento del tumor e incrementa la sobrevivencia en un modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS (Smith, et al. (2012) Cancer Discov 2(8): 722-735). La conexión entre agotamiento dependiente de IDO1 de la activación dependiente de triptófano y cinurenina de AHR proporciona un eje explicando por qué el catabolismo de triptófano está íntimamente asociado con el escape inmune, un punto de verificación crítico que contiene el progreso del cáncer.

La regulación de la expresión de IDO1 en el microambiente del tumor es completa. La IDO1 fue el primer gen regulado por IFN-γ descubierto Yoshida, et al. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78(1): 129-132). En efecto, existe una fuerte correlación entre IFN-γ y la expresión de IDO1 a través de todas las histologías de cáncer (http://cancergenome.nih.gov/). Adicionalmente, la expresión de IDO1 es regulada ascendentemente por las interferonas tipo 1, ligandos TLR, TNF, IL-1, CTLA-4, CD200, GITR, CD40 y TGF-β, todos los cuales juegan papeles importantes en el sistema inmune, y desarrollo del cáncer, progreso y respuesta a la terapia. La actividad de IDO1 alta como se mide por la expresión de IDO1, agotamiento de triptófano y/o incremento en cinurerina, ha sido implicada en la prognosis pobre, velocidades de supervivencias reducidas y potencial metastásico incrementado de una amplia variedad de tipos de tumores. Como tal, incrementos en los niveles de suero de

cinurerina con una reducción concomitante en triptófano, son evidenciados en mama, cáncer colorrectal, cánceres de cabeza y cuello, pulmón y próstata (Liu, et al. (2010) Blood 115(17): 3520-3530). En adición, a IDO1 es crónicamente activada en pacientes con cáncer (Schrocksnadel, et al. (2006) Clin Chim Acta 364(1-2): 82-90), asociado con la enfermedad extensiva (Huang, et al. (2002) Br J Cancer 86(11): 1691-1696), resultado pobre y/o resistencia a quimioterapia estándar en varios cánceres que incluyen melanoma (Weinlich, et al. (2007) Dermatology 214(1): 8-14), leucemia mieloide aguda (Chamuleau, et al. (2008) Haematologica 93(12): 1894-1898; Corm, et al. (2009) Leuk Res 33(3): 490-494), cáncer de mama y cervical (Inaba, et al. (2010) Gynecol Oncol 117(3): 423-428; Yu, et al. (2011) Clin Dev Immunol 2011: 469135; Yu, et al. (2013) J Immunol 190(7): 3783-3797; Chen, et al. (2014) Cáncer de mama Res 16(4): 410): Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):6993-7002; Trott, et al. (2016). Oncotarget, 7(41), 66540-66557, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, melanoma cutáneo, linfoma de células B grandes difusas, cáncer endometrial, cáncer gástrico, glioma, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, carcinoma de células escamosas laríngeas, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, carcinoma de células escamosas orales y esofageales, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma ductal del páncreas, leucemia de células

T y carcinoma tiroideo. El IFN-γ es una citocina efectora crítica secretada a partir de células NK y T activadas. Los circuitos reguladores negativos que son acoplados para restringir la actividad de células T ya sea sistémicamente (CTLA-4) o localmente (PD-L1/L2) son actualmente aprobados para uso como agentes anti-cancerígenos donde mejoran la inhibición del crecimiento tumoral mediado por las células T. Los agénicos genéticos de puntos de comprobación tal como CTLA-4, PD-1 o PD-L1, resultan en el mejoramiento marcado de producción de IFN-γ (Latchman, et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101(29): 10691-10696; Pandiyan, et al. (2007) J Immunol 178(4): 2132-2140), los cuales pueden acoplar el eje IFN-γ-a-IDO1 inmunosupresor. La inhibición de la expresión de IDO1 intrínseca con 1-Metil Triptófano en un modelo de melanoma de ratón, mejora significantemente la eficacia de Ipilimumab, un anticuerpo que bloquea a CTLA-4 (Holmgaard, et al. (2013) J Exp Med 210(7): 1389-1402). Esta eficacia mejorada de Ipilimumab se asoció con un incremento en células efectoras CD8 y una disminución en Tregs. Estas observaciones se extendieron a otros anticuerpos de objetivo a PD1, PD-L1 y GITR donde la inhibición de IDO1 mejora su actividad anti-cancerígena. De manera mecánica la IDO1 se mostró por impedir la eficacia de estos inhibidores de punto de comprobación a través de la inducción de Tregs con el reclutamiento subsecuente de MDSCs creando un ambiente inmunosupresor en el

tumor (Holmgaard, et al. (2015) Cell Rep 13(2): 412-424). Los procedimientos terapéuticos para tratar cáncer tal como el IFN-γ mismo, activadores inmunes innatos tales como CpG-ODNs, anti-4-1BB (CD137), anti-OX40, anti-PD-1/PD-L1/PD-L2, anti-CTLA 4, todos tienen el potencial para activar la expresión de IDO1 restringiendo su eficacia a largo plazo en la clínica. Por lo tanto, puede ser un potencial terapéutico significante en la combinación de inhibidores de IDO1 con estos agentes. De manera específica, la combinación de inhibidores de IDO1 con anticuerpo anti-PD1 (pidilizumab, nivolumab, pembrolizumab), anticuerpos anti-PD-L1 (durvalumab, atezolizumab, avelumab), anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab), anticuerpos anti-OX40 (MEDI6469, KHK4083) y anticuerpos anti-4-1BB (CD137) (PF-05082566) tienen significante potencial terapéutico en un amplio intervalo de tipos de tumor.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que los inhibidores del agotamiento de triptófano y la producción concomitante de cinurerina tal como inhibidores de IDO1, puede ser útil como un agente único o en combinación en una variedad de tipos de cáncer en tanto tratamiento naïve como también en pacientes con cáncer resistente al tratamiento. Esta utilidad ha sido demostrada por inhibidores de IDO1 conocidos tales como epacadostat (INCB024360) y NLG919. El Epacadostat se conoce por unirse a IDO1 y bloquear el

catabolismo del triptófano y la subsecuente producción de cinurerina tanto *in vitro* como *in vivo*. Adicionalmente, el epacadostat ha demostrado una eficacia de agente único en modelos de ratón preclínicos, CT26 y PAN02, un efecto que es dependiente de la presencia de células T. (Yue, et al. (2009) J Med Chem 52(23): 7364-7367; Koblish, et al. (2010) Mol Cancer Ther 9(2): 489-498; Liu, et al. (2010) Blood 115(17): 3520-3530; Jochems, et al. (2016) Oncotarget, Advance Publications). La eficacia pre-clínica de epacadostat se ha traducido en resultados de ensayos clínicos humanos (NCT01195311).

Los resultados de los siguientes ensayos demuestran evidencia de que los compuestos ejemplificados en la presente son útiles como inhibidores de protección de cinurerina tales como inhibidores de IDO1 y pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer. Además, los resultados de los siguientes ensayos demuestran que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1 y que todos los compuestos ejemplificados inhiben la conversión de triptófano a cinurerina en células de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ensayo de Unión para IDO1

El propósito de este ensayo es demostrar que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1 *in vitro*. Específicamente, este ensayo evalúa la capacidad de los

compuestos de prueba para competir con una molécula espía trititada de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea y permite el cálculo de la afinidad de unión, IC_{50}.

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

Se cargó 300 nM His_6-IDO1 (Proteros, SwissProtID P14902, Cat# PR-0278, lote 19/59, 98 mg/mL en 25 mM de MES pH 6.5, 150 mM de KCl, pureza >95%) diluida en DPBS a cada cavidad de placa recubierta con níquel (Sigma, Cat# S5563) y se incubó durante la noche a 4 °C. Las proteínas no unidas se removieron lavando la placa con 300 µL de DPBS cuatro veces en Lavador de Microplaca BIOTEK®. Se agregó 100 µL de amortiguador de bloqueo (0.05% de TWEEN® 20/DPBS) por cavidad e incubó por una hora a temperatura ambiente para reducir la unión no específica. Mientras se bloquea la placa, se prepararon 50 nM de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea (Biocair, Cat# TRQ41455) por dilución en DPBS, y se diluyó serialmente la solución base no etiquetada 2.5 veces en DMSO para generar una curva de dilución de siete puntos. Se agregó 5 µL de compuestos no etiquetados diluidos en serie a 95 µL de 50 nM de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea, se agregó la mezcla

a las cavidades en la placa, y se incubó a temperatura ambiente por cuatro horas con agitación suave. Para determinar el desplazamiento máximo de la molécula espía tritiada (1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea), se agregó una cantidad en exceso de 1-(2,4-difluorofenil)-3-{[1-(fenilcarbonil)-2,3-dihidro-1H-indol-5-il]metil}urea no etiquetada (ChemDiv, Cat# G714-0242))100 µM a 50 nM de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea y se agregó a cavidades de control de unión no específica en la placa. Después de cuatro horas de incubación, las cavidades se aspiraron usando una MultiMek96 y la placa se lavó rápidamente una vez con 300 µL de DPBS enfriado en hielo usando un lavador de Microplaca BIOTEK®. Se agregó 100 µL de 100 mM de imidazol en PBS pH 7.5 a cada cavidad e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para desplazar el complejo de IDO1-ligando a partir de la placa recubierta con níquel. El complejo de IDO1-ligando se desplazó por transferencia en una placa de fondo claro blanca de 96 cavidades (Costar, Cat# 3632) que contiene 200 µL de Microscint-20 (Perkin Elmer, Cat# 6013621), por cavidad usando un MultiMek96. Se cuantificó la unión total y la unión no específica (NSB) del ligando de 1-(2,4-difluorofenil)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoil)indolin-5-il]metil]urea usando un Contador Trilux Microbet. Los valores NSB y de unión total se

usaron para calcular la IC_{50} para el compuesto no etiquetado usando análisis de regresión no lineal en GraphPad Prism. Los resultados de este ensayo demuestran que ciertos compuestos ejemplificados se unen a IDO1. Por ejemplo, los Ejemplos 1A y 1B demuestran valores IC_{50} de menos de 1.5 μM. Específicamente, le IC_{50} por ejemplo 1A es 0.033 μM ± 0.0028 (n=2).

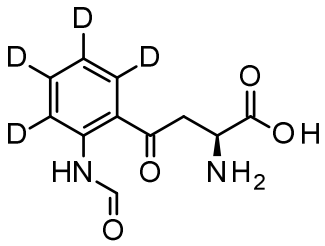
Ensayo de Producción de Cinurenina (SKOV3)

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

Síntesis de Estándares Internos

Síntesis de N-Formil L-Cinurerina-d4

Ácido (2S)-2-amino-4-oxo-4-(2,3,4,5-tetradeuterio-6-formamido-fenil)butanoico



Se agregó una mezcla preformada de anhídrido acético (0.026 mL, 0.264 mmol) en ácido fórmico (0.052 mL, 1.32 mmol) a una mezcla de L-cinurerina-d4 (56 mg, 0.264 mmol) en ácido fórmico (0.132 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno por dos horas. La mezcla de reacción se diluyó con ACN y se concentró bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Columna: PHENOMENEX® LUNA® 5 μm C18 (2) 100Å AXIA, 30 x 75 mm; eluyente: A: 0.1% de ácido fórmico/agua, B: 0.1% de ácido fórmico/ACN; gradiente: 0% B por 2 minutes después gradiente a 22% B durante 5 minutos; flujo: 85 mL/minutos a UVW 231/214 nm) para dar el compuesto del título 29 mg como un sólido blanco esponjoso después de la liofilización. ES/MS (m/z): 241.0 (M+H).

Tratamiento Celular y Viabilidad Celular

Se plaquearon células SKOV3, una línea de células

de cáncer de ovario que expresan IDO1, a 20,000 células por cavidad en 100 µL de medio McCoys 5A (Gibco, Cat# 16600-082) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat# 11140-050), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco, Cat#11360-070), y 10% de suero bovino fetal, medio completo, en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (BD Biosciences). Después, las células se incubaron por 16 horas en una incubadora 37 °C con 5% de CO_2. Se prepararon diluciones seriales del compuesto a partir de compuestos de prueba de solución base 10 mM en DMSO. Se diluyó serialmente la solución base 3 veces en DMSO, y se transfirieron 5 µL de los compuestos a una placa de dosificación intermediaria que contiene 95 µL de medio completo para generar una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto final que varían desde ya sea 1 µM hasta 0.5 pM o 10 µM hasta 0.5 nM. Se decantó el medio a partir de la placa que contiene células y se manchó sobre toallas de papel. La placa se lavó dos veces con 90 µL de medio completo por cavidad y se reemplazó el lavado final con 90 µL de medio completo. Después del lavado, se agregó 10 µL de compuestos diluidos en serie a partir de la placa de dosificación del intermediario a cada pocillo de la(s) placa(s) y se incubó por 18 horas en una incubadora a 37°C con 5% de CO_2. La concentración de DMSO final en el ensayo es 0.5%. Al final de las 18 horas de incubación, se transfirieron 50 µL de medio de cada cavidad en una placa de

fondo en v de 96 cavidades (Thermo Scientific), la placa se selló, y almacenó a -80 °C para medición subsecuente a base de espectrometría de masas de cinurerina, N-formil-cinurerina y triptófano. Opcionalmente, la(s) placa(s) originales se regresaron a la incubadora por unas 24 horas adicionales y se midió la viabilidad de las células agregando un volumen igual de CELLTITER-GLO® (Promega) y se midió la luminiscencia en un lector de placa PERKIN ELMER® EnVision.

Medición Espectrométrica de Masas (MS) de Triptófano, N-Formil-cinurerina, y Cinurerina

Se recolectaron muestras descongeladas de ensayos a base de células SKOV3 en hielo y se separaron algunos desechos celulares centrifugando la placa a 3220xg por un minuto a 4 °C. Se agregó 12.5 µL de estándares internos que consisten de 2.5 µg/mL de L-triptófano-2',4',5',6',7'-d5 (CDN Isotopes, Cat# D-1522), sulfato de L-cinurerina-anillo-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat# DLM-7842-0.01) y se preparó internamente N-formil L-cinurerina-d4. Se sellaron con calor todas las placas con sellos Easy Peel (ThermoScientific) y se mezclaron por vórtices por 1-2 minutos y después se centrifugó por un minuto a 3220xg a 4 °C. Se generaron soluciones de calibración estándares para cuantificación de cinurerina y N-formilcinurerina disolviendo cada una en agua para dar una concentración final de 1 mg/mL.

Se sometieron a alícuotas 20.8 µL de cinurerina y 23.6 µL de N-formilcinurerina a partir de 1 mg/mL de solución base respectiva y se diluyó a 1 mL usando medio McCoys 5A para dar una concentración final de cada estándar de 100 µM. Se diluyeron en serie soluciones de calibración 2 veces en medio completo para obtener una curva estándar de 5 puntos con concentraciones finales de 5 µM a 0.313 µM (cinurerina) y 2 µM a 0.125 µM (N-formilcinurerina). Se inyectó 1 µL de la muestra de medio (desconocido) o solución de calibración estándar sobre un sistema de LC/MS-MS que consiste de un Sistema de HPLC SHIMADZU® Prominence 30A y un espectrómetro de masas cuadrupolo triple AB SCIEX® 5500. Se separaron los analitos en una columna XBridge™ C18, 2.1 x 50 mm, 3.5 µm (Waters, Cat#186003021) mantenida a 35 °C, con velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/minuto. La fase móvil A es 0.1% de ácido fórmico en agua, y la fase móvil B es MeOH. El perfil de gradiente es: 0 minutos, 0.5% B; 0.8 minutos, 98% B; 1.10 minutos, 98% B; 1.11 minutos, 0.5% B; 1.7 minutos, y después se detuvo. Se operó el espectrómetro de masas en modo de monitoreo de reacción múltiple positivo APCI. Los datos se usaron a partir de las muestras de curva estándar y generaron una curva de calibración de ajuste lineal para cada analito usando el software MultiQuan™. Se usó la curva estándar generada para calcular las concentraciones de analito para las desconocidas.

Se calcularon los valores de IC_{50} del compuesto usando la medición espectrométrica de masas de cinurerina a partir del medio que contiene 500 µM de tratamiento estándar de referencia como un cien porciento de inhibición, y sin compuesto, pero con tratamiento de DMSO como cero porcentaje de inhibición. Se usaron mediciones de N-formil-cinurerina y triptófano para evaluar la validez de los datos generados mostrando la relación directa entre la producción de cinurerina y N-formil-cinurerina con la reducción concomitante en los niveles de triptófano. Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la producción de cinurerina y N-formil-cinurerina en células de cáncer que expresan IDO1 a valore IC_{50} para inhibir tanto cinurerina como N-formil-cinurerina de menos de 0.9 µM y de aquellas probadas (Ejemplos 1-9) en la viabilidad celular, todos los compuestos no se desea que sean abiertamente tóxicos a las células hasta al menos 1 µM. Por ejemplo, la IC_{50} para el Ejemplo 1A para inhibir la cinurerina y N-formil-cinurerina es 0.007 µM ± 0.002 (n=6) y 0.007 µM ± 0.002 (n=6) respectivamente. Además, el Ejemplo 1A no inhibe la proliferación celular hasta 10 µM.

Ensayo de Inhibición de Objetivo *in vivo*

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la producción de cinurerina y agotamiento de

triptófano en células de cáncer *in vivo*. SKOV3X (Indiana University Research y Technology Center), una línea de células de cáncer de ovario, expresa intrínsecamente IDO1 y fácilmente forma tumores en la cavidad peritoneal de ratones Atímicos Sin Pelo-Foxn1^{nu} (Harlan). Como una consecuencia de la expresión de IDO1, los tumores SKOV3X localmente agotan el triptófano con la producción concomitante de altos niveles de cinurerina en el microambiente del tumor. El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la IDO1 evidenciada por la reducción clara en los niveles de cinurenina en el tumor.

Fase Viva

Se cultivó SKOV3X en medio McCoys 5A (Gibco, Cat# 16600-082) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat# 11140-050), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco, Cat#11360-070) y 10% de FBS e incubó a 37° C en 5% de CO_2. Las células se tripsinizaron y aislaron del cultivo y se resuspendieron en células en solución de sal balanceada de Hank (HBSS). Se implantaron células SKOV3X $2x10^6$ en la cavidad intraperitoneal de cada ratón Atímico Desnudo-Foxn1^{nu} (Harlan). Aproximadamente tres semanas post-implante, los animales se palparon para asegurar la formación del tumor y los ratones que portan el tumor se aleatorizaron en los grupos de tratamiento del compuesto y control de vehículo. Se

administró el compuesto formulado en el vehículo que contiene 1% dehidroxietilcelulosa (HEC) y 0.025% de TWEEN® 80 y 0.05% de Antiespuma o vehículo solo por alimentación forzada oral. Se generó el perfil de inhibición de curso de tiempo dosificando animales que portan el tumor con una dosis única y se recolectó el plasma, hígado, y muestras de tumor a 2, 4, 8, 12, y 24 horas post dosis. Se recolectó la sangre en tubos de recolección de sangre que contienen EDTA (Greiner bio-one, Cat# 450474) y se centrifugó a 2365xg, el plasma se aisló, y se congeló a -80 °C. Se aisló el hígado y los fragmentos del tumor, se registraron los pesos y se congeló instantáneamente y se almacenó a -80 °C.

Generación de Curva Estándar, Procesamiento de Tejido e Inhibición Objetivo

Se prepararon estándares de calibración para L-cinurerina y L-triptófano generando primero matrices retiradas, las cuales son homogenados de tejido y plasma agotados de L-cinurerina y L-triptófano por diálisis. Después, las matrices retiradas se fortificaron con cantidades conocidas de L-cinurerina y L-triptófano. Se generó plasma de ratón retirado agregando 10 mL de plasma de ratón tratado con EDTA (BioreclamationIVT, Cat# MSEPLEDTA3) a un SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 (Spectrum Labs, Cat# G235063) y se colocó este dispositivo de diálisis en 1000 mL

de salina amortiguada con fosfato y se dializó durante la noche. Posteriormente, se transfirió este dispositivo a 1000 mL fresco de salina amortiguada de fosfato y se repitió la diálisis. Se transfirió el plasma de ratón retirado a un contenedor limpio y se almacenó a -20 °C para uso futuro. Se preparó el homogenado de hígado de control agregando 3 mL de MeOH/agua (1:1, v/v) a cada gramo de hígado de ratón de control y se homogeneizó con una sonda ultrasónica. Se prepararon homogenados de tumor de control en la misma forma excepto que se usó un triturador de tejido para homogeneizar el tejido del tumor. Se agregó 10 mL de los homogenados de tejido de control, hígado y tumor, a dispositivos separados SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 y se dializó cada uno durante la noche en 1000 mL de MeOH/agua (1:1, v/v), después se transfirió cada uno a 1000 mL de MeOH/agua fresco (1:1, v/v) y se repitió la diálisis. Se transfirieron los homogenados de tenido retirado a contenedores separados y se almacenó a -20 °C para uso futuro.

Se prepararon soluciones base estándares de sulfato de L-cinurerina (Sigma Aldrich, Cat# K3750), se disolvió en ACN/agua (1:1, v/v) y L-triptófano (Sigma Aldrich), se disolvió en N-metil-2-pirrolidona/agua (4:1, v/v), para dar concentraciones de base libre final de 1 mg/mL. Se sometieron a alícuotas 50 µL de las soluciones base respectivas y se diluyeron con MeOH/agua (1:1, v/v) para proporcionar una

solución de trabajo combinada de 50 µg/mL. Se prepararon seis soluciones de trabajo de calibración adicional en MeOH/agua (1:1, v/v) por dilución serial de 50,000 ng/mL de solución para obtener una curva de calibración de 7 puntos con concentraciones finales de 25 ng/mL a 50 µg/mL.

Se mezclaron muestras de hígado adquiridas de sujetos de prueba con MeOH/agua (1:1, v/v) en una proporción de 1 gramo de tejido a 3 mL de solvente y se homogeneizó en una sonda ultrasónica. Las muestras de tumor se homogeneizaron con la misma proporción de MeOH/agua (1:1, v/v) usando un triturador de tejido. Las muestras de plasma se descongelaron de los sujetos de prueba y se mezclaron por homogeneidad.

Se realizó extracción de las soluciones de trabajo de calibración, las series de dilución de 7 puntos de L-cinurerina y L-triptófano, transfiriendo 25 µL de cada muestra para separar las cavidades de una placa de 96 cavidades y se agregó 25 µL de la matriz de control retirada apropiada (plasma, homogenado de hígado o tumor) a estas cavidades dependiendo del tejido de origen de las muestras de prueba. Se agregó 25 µL de MeOH/agua (1:1, v/v) para separar las cavidades, seguido por 25 µL de las muestras de prueba respectivas. Después, se agregó 180 µL de ACN/MeOH (1:1, v/v) que contiene 250 ng/mL de L-triptófano-2’,4’,5’,6’,7’-d5 (Sigma Aldrich, Cat# 615862) y sulfato de L-cinurerina-

anillo-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat# DLM-7842-0.005) a todas las cavidades y se mezcló para precipitar proteínas en las muestras. Ce centrifugó la placa de 96 cavidades para peletizar el material de proteína precipitado, después se diluyó una porción de cada sobrenadante a menos de 10 veces con agua/TFA (100:2, v/v). Se inyectaron 10 µL de cada muestra extraída y el estándar de calibración en un sistema de LC/MS-MS que consiste de un controlador SHIMADZU® con bombas de HPLC SHIMADZU® LC-10AD*vp*, un automuestreador CTC-PAL y un espectrómetro de masas cuadrupolo triple AB SCIEX® 4000. Se separaron los analitos en una columna Advantage™ Echelon™ C18, 2.1 x 20 mm, 4 µm (Analytical Sales and Service, Cat# Sprite AE1822) mantenida a condiciones ambientales con una velocidad de flujo de fase móvil de 1.5 mL/minuto. La Fase Móvil A es agua/TFA/1 M de bicarbonato de amonio, (1000:4:1, v/v/v) y la fase móvil B es ACN/TFA/1 M de bicarbonato de amonio 1000:4:1, v/v/v). El perfil del gradiente es: 0 minutos, 0.3% B; 0.03 a 0.2 minutos, 7% B; 0.3 a 0.4 minutos, 36% B; 0.41 minutos, 98% B, después se detuvo a 0.7 minutos para regresar a las condiciones originales. Se operó el espectrómetro de masas en modo de monitoreo de reacción múltiple positiva TURBOIONSPRAY®. Se usaron datos de muestras de curva de estándares de calibración y se generó una curva de calibración de ajuste cuadrático para cada analito usando el software Analyst™. Se

usó la curva estándar generada para calcular las concentraciones de analito para las muestras de estudio.

Se usó la concentración en hígado de cinurerina a partir de animales que no portan tumor tratados con vehículo como inhibición máxima o nivel más bajo de cinurerina. Se usó la concentración del tumor SKOV3X de cinurerina a partir de ratones que portan tumor tratados con vehículo como inhibición mínima o nivel más alto de cinurerina. Se calculó el porcentaje de inhibición para los grupos tratados con compuesto con relación a la inhibición de IDO1 mínima en el tumor tratado con vehículo. Los resultados de este ensayo demuestran que el Ejemplo 1A inhibe la producción de cinurerina y N-formil-cinurerina en células de cáncer que expresan IDO1 *in vivo*. Específicamente, el Ejemplo 1A se dosificó a 75 mg/kg, 25 mg/kg y 5 mg/kg resultando en 79%, 59% y 37% de inhibición respectivamente, 12 horas después de la dosificación.

Efecto Anti-tumoral del Ejemplo 1A en el Modelo de Colon26 de Ratón Singeneico para Cáncer de Colon y en Combinación con LY3300054 en el Modelo de Ratón Humanizado L55 Establecido

Modelo de Colon26 de Ratón Singeneico:

Se hizo crecer la línea de células de cáncer de colon Colon26 derivada de ratones BALB/c en medio RPMI 1640 suplementada con 10 mM de HEPES, 1 nM de piruvato de sodio, y

10% de suero bovino fetal. Se recolectaron las células sub-confluentes con tripsina y se enjuagaron dos veces con suero que carece de medio de crecimiento completo. Se iniciaron los tumores subcutáneos inyectando 1 x 10^6 células resuspendidas en HBSS en el flanco trasero de ratones BALB/c inmuno-competentes (Envigo, Indianápolis, IN). Seis días después del implante del tumor, los animales se aleatorizaron con base en el peso corporal y se colocaron en sus grupos de tratamiento respectivos usando el número de animales por grupo como se indica.

Modelo de Tumor Humanizado L55, Estimulación de hPBMC, y Tratamiento:

Se hizo crecer la línea de células NSCLC humana, L55, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. Las células sub-confluentes se recolectaron con tripsina y se enjuagaron dos veces con medio de crecimiento que carece de suero. Se inició el crecimiento de tumores subcutáneos inyectando 5 x 10^6 en una mezcla 1:1 de HBSS y MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en el flanco trasero de ratones NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ más comúnmente conocido como ratones agénicos de cadena gama scid NOD (NSG) (The Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine), los cuales carecen de células T, células B, y células NK, y son deficientes en la señalización de citocina. Cuando el volumen

del tumor medio alcanzó aproximadamente 200-300 mm^3, los animales se aleatorizaron por tamaño del tumor y peso corporal y se colocaron en sus respectivos grupos de tratamiento como se indica. Después de la aleatorización, los tumores que portan ratón se estimularon con PBS solo (sin PBMCs) o con PBS que contiene 1 x 10^7 PBMCs humanas en la vena de la cola de recipientes.

Captura de Datos, formulación de compuesto y controles de vehículo (Ambos Modelos)

Se capturó el tamaño del tumor y peso corporal usando Director de Estudio. Se estimó el volumen del tumor (V) usando la fórmula: $V=.536 \times L \times W^2$ donde L = diámetro más grande medido y W = más pequeño del diámetro perpendicular. Se transformaron los datos de volumen del tumor a una escala log para ecualizar la varianza a través del tiempo y los grupos de tratamiento. Se analizaron los datos de volumen log con análisis de varianza de mediciones repetidas de dos vías por tiempo y tratamiento usando los procedimientos MEZCLADOS en el software SAS (Versión 9.2). El modelo de correlación para las medidas repetidas es la Potencia Espacial. Se compararon los grupos tratados al grupo de control en cada punto de tiempo. Se usó el procedimiento MEZCLADO también separadamente para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y errores estándares en cada punto de

tiempo. Ambos análisis representan la autocorrelación dentro de cada animal y para la pérdida de datos que ocurren cuando los animales con grandes cantidades son removidos del estudio de manera temprana. Se calcularon los cambios relativos en el volumen del tumor (%T/C) usando las mediciones de volumen del tumor tomadas más cercanas al último día de la dosificación con el Ejemplo 1A, usando la Fórmula $\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$, donde T = volumen de tumor medio del grupo tratado con el compuesto, ΔT = volumen medio del tumor del grupo tratado con el compuesto menos el volumen del tumor medio en el día del valor de referencia, C = volumen del tumor medio del grupo de control (vehículo), y ΔC = volumen del tumor medio del grupo de control menos el volumen del tumor medio en el día del valor de referencia. Si $\Delta T < 0$, entonces un valor de regresión del tumor se calcula en lugar de %T/C, de este modo el % de Regresión = $100 \times \Delta T/T_{inicial}$ de manera que $T_{inicial}$ = volumen del tumor medio en el día del valor de referencia.

Se evaluó la eficacia antitumoral del Ejemplo 1A y LY3300054 solo, o en combinación midiendo el volumen del tumor por mediciones de calibre de tres dimensiones dos veces por semana durante el curso del estudio. Se midió el peso corporal dos veces semanalmente durante el curso del estudio, como un indicador general de tolerabilidad.

Formulaciones para el Ejemplo 1A y LY3300054: el Ejemplo 1A se formuló en una base semanal en 1% de HEC/0.25%

de Tween 80/0.05% de Antiespuma y se almacenó a 4 °C. Se solubilizó LY3300054 en salina amortiguada de fosfato y se almacenó a 4 °C

Grupo(s) de control: Para estudios de eficacia de agente único, se administró el vehículo para el Ejemplo 1A solo. Para estudios de combinación, se administraron ambos vehículos usados para el Ejemplo 1A y LY3300054 de conformidad con el mismo esquema para cada compuesto, respectivamente. Para grupos de inmunoterapia en estudios de eficacia de combinación, los animales se trataron con el compuesto deseado y el vehículo para el compuesto no es dosificado después del esquema para el compuesto no dosificado.

Modelo Singeneico de Colon26, Tratamiento y Resultados:

Monoterapia del Ejemplo 1A

Se trataron ratones BALB/c hembra (n=10) que portan tumores de Colon26 con el Ejemplo 1A dos veces diariamente por 21 días por alimentación forzada a dosis de 10, 50, y 100 mg/kg. Se inició la administración del Ejemplo 1A seis días después de la implantación del tumor, y se monitoreó el crecimiento del tumor y peso corporal dos veces por semana por la duración del periodo de tratamiento.

Resultados: El tratamiento con 10, 50, y 100 mg/kg del Ejemplo 1A resultó en un efecto sensible a la dosis en el

crecimiento del tumor con solamente dosis de 50 y 100 mg/kg que muestran inhibición del crecimiento estadísticamente relevante ($p<.001$) al día 20. Los cambios en el volumen del tumor (%T/C) observados al día 20 fueron 17.5%, 31.2%, y 62.6% para las dosis de 10, 50, y 100 mg/kg, respectivamente. No hubo problemas de tolerabilidad significantes en algunas dosis probadas con el Ejemplo 1A con respecto a cambios en el peso corporal durante el curso del tratamiento comparado con ratones tratados con vehículo. La pérdida de peso corporal se midió como el cambio de porcentaje a partir de los pesos corporales medios registrados en los valores de referencia 6 días después del implante del tumor para cada grupo. Al día 20, los ratones tratados con vehículo promedio mostraron 5.5% de reducción en el peso corporal comparado con el valor de referencia con los grupos dosificados a 10, 50, y 100 mg/kg que muestran una reducción del 2.5%, 8%, y 2.5%, respectivamente. Mientras existe una tendencia de dependencia de dosis en la pérdida de peso corporal con respecto a la dosis, no fueron estadísticamente diferentes del ratón tratado con vehículo.

Modelo de Tumor Humanizado L55, Tratamiento y Resultados:

Efecto de hPBMC en el crecimiento de tumor L55

La línea de células de cáncer humano NCLC L55 es

intrínsecamente resistente a la alo-respuesta asociada con la inyección de hPBMCs. La meta de estos estudios es evaluar la capacidad de los compuestos para potenciar las respuestas alo permitiendo a las células T humanas dirigir y restringir el crecimiento de tumores L55 humanos en un ratón que carece de un sistema inmune adaptivo (ratones NSG). Para evaluar la contribución de hPBMCs en la inhibición del crecimiento del tumor de los tumores L55, se inyectaron falsos ratones NSG que portan tumores L55 establecidos (n=10) que han alcanzado aproximadamente 250 mm^3 con PBS que carece de hPBMCs, o PBS que contiene 1 x 10^7 hPBMCs. Se midió el volumen del tumor y peso corporal dos veces a la semana por la duración del periodo de tratamiento.

Resultados: No hubo inhibición estadísticamente significante de crecimiento del tumor L55 cuando se compara con animales que no reciben hPBMCs durante el curso del estudio. No se observaron problemas de tolerabilidad significantes con la inyección de PBMCs humanas durante el curso del estudio evidenciado por la carencia de pérdida de peso significante cuando se compara con el valor de referencia, el cual al día 41 fue 0.1% inferior que en el valor de referencia.

Monoterapia del Ejemplo 1A

Para evaluar la capacidad del Ejemplo 1A para

mejorar la inhibición del crecimiento del tumor L55 mediada por hPBMCs, se inyectaron falsos ratones NSG que portan tumores L55 establecidos (n=10) que han alcanzado aproximadamente 250 mm^3 con PBS que carecen de hPBMCs, y otro grupo (n=10) con PBS que contiene 1 x 10^7 hPBMCs. Se trataron ambos grupos con 75 mg/kg del Ejemplo 1A por alimentación oral forzada dos veces diariamente por 21 días. Se midió el volumen del tumor y el peso corporal dos veces a la semana por la duración del periodo de tratamiento.

Resultados: En la ausencia de hPBMCs, el tratamiento de tumores L55 con el Ejemplo 1A no resulta en significante inhibición del crecimiento del tumor durante el curso del tratamiento cuando se compara con el vehículo solo sin PBMCs. El tratamiento de animales que portan el tumor L55 con el Ejemplo 1A en la presencia de hPBMCs resultó en la inhibición del crecimiento del tumor cuando se compara con el grupo de control de vehículo que carece de hPBMCs. La supresión estadísticamente relevante del crecimiento del tumor fue muy aparente en puntos de tiempo posteriores con una %T/C de 47.6% al día 41 ($P<.001$). No fueron aparentes problemas de tolerabilidad significantes durante el curso del estudio con hPBMCs, Ejemplo 1A, o la combinación evidenciada por la carencia de reducciones estadísticamente significantes en la pérdida de peso corporal cuando se compara con las mediciones del valor de referencia.

Monoterapia de LY3300054

Para evaluar la capacidad de LY3300054 para mejorar la inhibición del crecimiento del tumor L55 mediada por hPBMCs, se inyectaron dos grupos de ratones NSG que portan tumores L55 establecidos (n=10/grupo) que han alcanzado aproximadamente 250 mm^3 con PBS que contiene hPBMCs. Se trató un grupo con 10 mg/kg de anticuerpo de control efector nulo IgG (IgG-EN) y el otro con 10 mg/kg de LY3300054 por inyección intraperitoneal una vez a la semana por 4 semanas. El volumen del tumor y peso corporal se midieron dos veces a la semana por la duración del periodo de tratamiento.

Resultados: El tratamiento de ratones que portan el tumor L55 que fueron inyectados con hPBMCs con 10 mg/kg de IgG-EN, no altera el crecimiento o progreso del tumor cuando se compara con el vehículo solo con o sin hPBMCs. El tratamiento de animales que portan el tumor L55 que han sido inyectados con hPBMCs con 10 mg/kg de LY3300064, resultó en la inhibición del crecimiento del tumor estadísticamente significante cuando se compara con los controles tratados con vehículo que contienen o carecen de hPBMCs. El cambio en el volumen del tumor (%T/C) observado al final del periodo de dosificación cuando se compara con el vehículo solo que carece de PBMCs (día 37) fue 75.7%. No fueron aparentes problemas de tolerabilidad significante durante el curso del estudio con LY3300054 con o sin hPBMCs evidenciado por la

carencia de reducciones estadísticamente significantes en la pérdida de peso corporal cuando se compara con las mediciones del valor de referencia.

Combinación del Ejemplo 1A y LY3300054

Se inyectaron ratones NSG (n=10) que portan tumores L55 que han alcanzado aproximadamente 250 mm^3 con hPBMCs y Se trataron con 75 mg/kg del Ejemplo 1A dos veces al día por alimentación forzada por 21 días y 10 mg/kg de LY3300054 por inyección intraperitoneal una vez por semana por 4 semanas. Se midió el volumen del tumor y peso corporal dos veces por semana por la duración del periodo de tratamiento.

Resultados: El tratamiento combinado de 75 mg/kg del Ejemplo 1A y 10 mg/kg de LY3300054 resultó en un mejoramiento en la eficacia anti-tumoral cuando se compara con ya sea el grupo de monoterapia sola. Los volúmenes del tumor fueron significantemente inferiores que los grupos de vehículo solo que ya sea carecen de PBMCs o fueron inyectados con hPBMCs (P<.001 en todas las mediciones). Los volúmenes del tumor en los días 30, 34, 37, y 41 fueron 9.6 %T/C, 19.8 %T/C, 13.3 %T/C, y 27.3% T/C, respectivamente. La diferencia en la eficacia anti-tumoral entre los grupos de monoterapia comparada con el grupo de combinación fue estadísticamente significante (p<.001). Para evaluar si o no la combinación fue aditiva o sinergística, los datos son analizados

esencialmente como sigue:

Análisis Estadístico (Ambos Modelos):

El análisis estadístico de los datos del volumen del tumor comienza con una transformación de datos a una escala log para ecualizar la varianza a través del tiempo y grupos de tratamiento. Los datos de volumen log son analizados con un análisis de varianza de mediciones repetidas de dos vías por el tiempo y tratamiento usando los procedimientos MEZCLADOS en software SAS (Versión 9.3). El modelo de correlación para las mediciones repetidas es Potencia Espacial. Los grupos tratados son comparados con el grupo de control en cada punto de tiempo. El procedimiento MEZCLADO es también usado separadamente para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y errores estándares en cada punto de tiempo. Ambos análisis representan la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que ocurre cuando los animales con tumores grandes son removidos del estudio de manera temprana. Las medias ajustadas y errores estándares (s.e.) son trazados para cada grupo de tratamiento contra el tiempo.

Método de Análisis de Combinación (Independencia Bliss para Estudios IVEF):

Con los resultados del análisis de mediciones

repetidas, las declaraciones de contraste son usadas para probar un efecto de interacción en cada punto de tiempo, comparando la media del vehículo y grupos de combinación con la media de los dos grupos de agentes únicos. Esto es equivalente al método de Independencia de Bliss para probar la avidez. La respuesta aditiva esperada (EAR) para la combinación se calcula en la escala del volumen del tumor como: volumen EAR = V1 * V2/V0, donde V0, V1, y V2 son los volúmenes de tumor medio estimados para el control de vehículo, tratamiento 1 solo, y tratamiento 2 solo, respectivamente. Si la prueba de interacción es significante, el efecto de combinación es declarado estadísticamente más que aditivo o menos que aditivo dependiendo del volumen medio de combinación observado siendo menos que o más que el volumen EAR, respectivamente. De otro modo, la conclusión estadística es aditiva.

Usando este método de análisis, la inhibición del crecimiento del tumor no fue mejor que la aditiva hasta los días 34 y 37 donde la inhibición del crecimiento del tumor fue sinergística con $P<0.008$ y $p<0.001$, respectivamente. No fueron aparentes problemas de tolerabilidad significantes durante el curso del estudio con la combinación del Ejemplo 1A y LY3300054 evidenciado por la carencia de reducciones estadísticamente significantes en la pérdida de peso corporal cuando se compara con las mediciones del valor de referencia.

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

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

Una cantidad efectiva puede ser fácilmente determinada por el especialista que atiende, como un experto en la técnica, por el uso de técnicas conocidas y observando resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad efectiva para un paciente, un número de factores son considerados por el especialista que atiende, que incluyen, pero no se limitan a: las especies de mamífero; su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de, o el involucramiento o la severidad de la enfermedad o trastorno;

la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos la presente invención son en general efectivos sobre un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo diario de aproximadamente 0.05-1000 mg. Preferiblemente tales dosis caen dentro del intervalo diario de 0.1-500 mg. Más preferiblemente tales dosis caen dentro del intervalo de dosificación de 1-200 mg. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos mencionados anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras en otros casos, todavía dosis más grandes pueden ser empleadas sin causar algunos efectos secundarios nocivos, y por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no están propuestos para limitar el alcance de la invención en cualquier forma. Se entenderá que la cantidad del compuesto actualmente administrado será determinada por un especialista, en vista de las circunstancias relevantes, que incluyen la condición que será tratada, la ruta elegida de administración, el compuesto o compuestos actuales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencias de Aminoácido y Nucleótido

SEQ ID NO: 1 (PD-L1 humano)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMED
KNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGAD
YKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTN
SKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVIL
GAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

SEQ ID NO: 2 (HCDR1 de LY3300054)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2 de LY3300054)

GIIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3 de LY3300054)

ARSPDYSPYYYYGMDV

SEQ ID NO: 5 (LCDR1 de LY3300054)

SGSSSNIGSNTVN

SEQ ID NO: 6 (LCDR2 de LY3300054)

YGNSNRPS

SEQ ID NO: 7 (LCDR3 de LY3300054)

QSYDSSLSGSV

SEQ ID NO: 8 (HCVR de LY3300054)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYA
QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPDYSPYYYYGMDVWGQGTTVTVS
S

SEQ ID NO: 9 (LCVR de LY3300054)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLG

SEQ ID NO: 10 (HC de LY3300054)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYA
QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPDYSPYYYYGMDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC de LY3300054)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLGQPKAAPSVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSILS
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

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

CAGGTCCAGCTGGTCCAGTCAGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGGTCATCTGTCAAAGTGT
CTTGTAAGGCATCCGGGGGCACATTTTCCAGCTACGCTATCTCCTGGGTGAGACAGGCACC
AGGGCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCGGAATCATTCCCATCTTCGGGACCGCCAACTACGCT
CAGAAGTTTCAGGGAAGGGTCACTATTACCGCCGACAAAAGCACATCTACTGCTTATATGG
AGCTGTCTAGTCTGAGGTCTGAAGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCCGGAGTCCCGACTA
TAGCCCTTACTATTACTATGGCATGGATGTCTGGGGCCAGGGAACCACAGTGACAGTCTCA
TCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC

GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAA
ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGT
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGCAAA

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

CAGTCCGTCCTGACACAGCCACCCTCAGCCTCTGGCACCCCTGGGCAGCGAGTGACAATCT
CTTGTTCTGGGAGTTCCTCAAATATTGGTAGTAACACCGTGAATTGGTACCAGCAGCTGCC
CGGCACAGCACCTAAGCTGCTGATCTATGGAAACTCAAATAGGCCATCCGGAGTCCCCGAC
CGGTTCTCTGGTAGTAAATCAGGCACTTCCGCCAGCCTGGCTATTAGCGGGCTGCAGTCTG
AGGACGAAGCCGATTACTATTGCCAGTCTTACGATTCCAGCCTGTCTGGAAGTGTGTTTGG
CGGAGGGATCAAGCTGACCGTCCTGGGCCAGCCTAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTC
CCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACT
TCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT
GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC

CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGA
GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTGCAGAATGCTCT.